DOI: 10.48305/jims.v40.i662.0130

مجله دانشکده پزشکی اصفهان | سال چهلم/شماره‌ی ۶۶۲/هفته‌ی دوم اردیبهشت ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۲ | تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۷ | تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۲/۱۴

طراحی واکسن مولتی اپی‌توپی بر علیه تریکوموناس واژینالیس با استفاده از ایمونوانفورماتیک

بابک بیک زاده[۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: تریکوموناس واژینالیس، یکی از شایع‌ترین عفونت مقاربتی در جهان است. با توجه به اهمیت این عفونت در بهداشت عمومی، تلاش‌های گسترده‌ای برای ساخت واکسن صورت گرفته است. تحقیقات پیشین به واکسن کشته شده و یا استفاده از یک پروتئین چسبنده به عنوان کاندید واکسن محدود شده‌اند و هیچ واکسن مؤثری تاکنون برای این بیماری معرفی نشده است. هدف از این مطالعه، طراحی واکسن بر اساس اپی‌توپ‌های پروتئین‌های چسبنده انگل به عنوان یک پروتئین ایمنی‌زا با استفاده از ابزارهای ایمونوانفورماتیک بود.

روش‌ها: در ابتدا توالی پروتئین‌های AP33، AP51 و AP65 بازیابی شدند. سپس اپی‌توپ‌های لنفوسیت‌های B و T آن‌ها پیشگویی شد. خاصیت آنتی‌ژنی، عدم آلرژی‌زایی و عدم سم‌زایی اپی‌توپ‌ها بررسی و سازه‌ی واکسن طراحی گردید. سپس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و ساختاری واکسن مشخص شد و در نهایت توانایی اتصال واکسن با TLRs بررسی گردید.

یافته‌ها: در مجموع ۹ اپی‌توپ لنفوست B و T انتخاب گردید و بر اساس آن سازه‌ی واکسن طراحی شد. ارزیابی‌های ایمونوانفورماتیک نشان داد که واکسن طراحی شده بی‌خطر، هیدروفیل و پایدار در دماها و شرایط مختلف است و قابلیت اتصال TLRs و فعال‌سازی ایمنی ذاتی را دارد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به دست آمده، سازه‌ی پلی‌اپی‌توپی طراحی شده می‌تواند یک کاندید مناسب واکسن ضد بیماری تریکومونیازیس باشد.

واژگان کلیدی: تریکوموناس واژینالیس؛ واکسن؛ پروتئین چسبنده؛ اپی توپ

ارجاع: بیک زاده بابک. **طراحی واکسن مولتی اپی‌توپی بر علیه تریکوموناس واژینالیس با استفاده از ایمونوانفورماتیک.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۶۲): ۱۳۸-۱۳۰

مقدمه

تریکوموناس واژینالیس، تک یاخته‌ای تاژک‌دار است که به عنوان یک عامل عفونی مقاربتی شیوع جهانی دارد (۱). طبق برآورد سازمان جهانی بهداشت، سالیانه ۲۵۰ میلیون نفر در جهان به این تک یاخته آلوده می‌شوند (۲). شیوع جهانی تریکومونیازیس برای زنان، بسته به موقعیت فرهنگی و اجتماعی بین ۵ تا ۲۰ درصد و برای مردان، ۱ درصد برآورد شده است (۳). در ایران مطالعات مختلف این میزان را از کمتر از ۱ تا حداکثر ۴۲ درصد تخمین زده‌اند (۱، ۳). زنان مبتلا به تریکومونیازیس از منظر بالینی علائمی مانند سرویکس ملتهب، دفع ادرار با درد، تحریک‌پذیری ژنیتال، درد پس از مقاربت، ناباروری، زایمان زودرس، تولد نوزاد با وزن کم را نشان می‌دهند و در بیش از ۵۰ درصد موارد می‌توانند تا ماه‌ها به عنوان حاملین بدون علامت باشند. مردان نیز غالباً حاملین بودن علامت این تک یاخته هستند (۳-۶).

شروع عفونت با اتصال تروفوزوئیت‌های تریکوموناس واژینالیس به سلول‌های اپی‌تلیال میزبان توسط پروتئین‌های چسبنده‌ی AP65، AP51، AP33، AP23 و AP120 انجام می‌گیرد. در این میان AP33، AP51، AP65 پروتئین‌های غالب در اتصال تک یاخته محسوب می‌شوند (۷، ۸). مترونیدازول، انتخاب نخست برای درمان تریکومونیازیس است. با این حال افزایش مقاومت انگل به دارو باعث تبدیل این بیماری به یک مسأله‌ی بهداشت عمومی شده است (۹). واکسیناسیون، بهترین راه برای کنترل بیماری‌های عفونی است. با این وجود تا به امروز، هیچ واکسن تجاری علیه تریکومونیازیس ارائه نشده است (۸). از آن‌جایی که فرایند تولید واکسن با چالش‌های فراوانی از جمله زمان و منابع گسترده‌ی مالی رو به رو است و

۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: بابک بیک زاده: استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

Email: b.beikzadeh@bio.ui.ac.ir

همچنین اثربخشی واکسن‌های تولیدی با روش‌های رایج (واکسن‌های کشته و تخفیف حدت یافته) تا زمان آزمایش آن‌ها بر روی میزبان مشخص نمی‌شود، امروزه به منظور به حداکثر رساندن اثر واکسن‌ها و همچنین کاهش هزینه‌ها از تلفیق دانش پروتئوم و ایمونوانفورماتیک استفاده می‌گردد. بنابراین با توجه به اهمیت بیماری و چالش‌های ذکر شده، هدف از مطالعه‌ی حاضر، طراحی ایمونوانفورماتیک واکسن مولتی‌اپی‌توپی بر پایه‌ی پروتئین‌های چسبنده‌ی (AP33، AP51، AP65) تریکوموناس واژینالیس است.

روش‌ها

بازیابی توالی آمینواسیدی پروتئین‌های چسبنده: در ابتدا توالی آمینو اسیدی پروتئین‌های چسبنده‌ی AP33 به شماره دسترسی (AAC48339)، AP51 به شماره دسترسی (AAB68609) و AP65 به شماره دسترسی (AAA87406) از پایگاه داده‌ی www.ncbi.nlm.nih.gov/protein بازیابی شد.

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی لنفوسیت‌های B: اپی‌توپ‌های لنفوسیت B برای تحریک سیستم ایمنی هومورال و تولید آنتی‌بادی ضروری هستند. بنابراین برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی پروتئین‌های چسبنده‌ی تریکوموناس از سرور ABCpred و الگوریتم شبکه‌ی عصبی با طول ۱۶ اسید آمینه و حد آستانه‌ی ۰/۵۱ (https://webs.iiitd.edu.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html) استفاده گردید (۱۰).

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های لنفوسیت‌های T: نقش لنفوسیت‌های T کشنده (CTL) مورد و لنفوسیت‌های T کمکی (TH) در ایمنی‌زایی واکسن‌های زیر واحد و همچنین مقابله با عفونت‌های تک یاخته‌ای بسیار مهم می‌باشد. بدین منظور برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های فعال کننده‌ی CTL و TH از سرور IEDB (http://tools.iedb.org/main/tcell) به ترتیب برای اتصال پپتیدهای متصل شونده به MHC-I و MHC-II استفاده شد. بر اساس روش پیشگویی SMM برای MHC-I به طور پیش‌فرض، آلل‌های پرتکرار در جمعیت انسانی که شامل ۵۲ آلل است انتخاب گردید. همچنین بر پایه‌ی روش پیش‌گویی (SMM-align) برای MHC-II به طور پیش‌فرض، آلل‌های پرتکرار در جمعیت انسانی که شامل ۲۷ آلل می‌باشد، انتخاب شد. طول اسید آمینه‌ها به ترتیب برای MHC-I و MHC-II، ۹ و ۱۵ اسید آمینه تعیین گردید و در نهایت اپی‌توپ‌هایی که افینیتی (IC۵۰) آن‌ها کمتر از ۵۰ و ۵۰۰ نانومولار بودند، برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند (۱۱).

پیش‌بینی خاصیت آنتی‌ژنی، عدم آلرژی‌زایی و سمی نبودن اپی‌توپ‌ها: یکی از ویژگی‌های مهم در تولید واکسن، خاصیت آنتی‌ژنی کاندیدهای واکسن است که به همراه عدم آلرژی‌زایی و سمی نبودن باید مورد بررسی قرار بگیرد. برای تعیین آنتی‌ژن بودن اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده از سرور VaxiJen v2 (http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html) و حد آستانه‌ی ۴≤ در نظر گرفته شد. الگوریتم VaxiJen مبتنی بر روش هم ترازی توالی است و خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین را تجزیه و تحلیل می‌کند تا آن‌ها را به عنوان آنتی‌ژن شناسایی کند. سرور AllerTOP v.2.0 (http://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/) خواص آلرژی‌زایی پروتئین‌ها را بر اساس شباهت با اپی‌توپ‌های شناخته شده بررسی می‌کند. و در نهایت با استفاده از سرور ToxinPred (https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/multi_submit.php) تمامی اپی‌توپ‌ها از نظر سمیت، بررسی گردید و اپی‌توپ‌های غیر سمی انتخاب شدند (۱۲).

پیش‌بینی ایمونوژنیسیته اپی‌توپ‌های CTL: به منظور بررسی ایمنی‌زایی اپی‌توپ‌های CTL از سرور IEDB (http://tools.iedb.org/immunogenicity/) استفاده گردید و اپی‌توپ‌هایی که امتیاز آن‌ها عددی مثبت بود، انتخاب شد (۱۳).

طراحی سازه‌ی واکسن پلی‌اپی‌توپی: جهت طراحی سازه‌ی واکسن، اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیک، ایمنی‌زا، غیر سمی و غیر آلرژی‌زا انتخاب شدند. اپی‌توپ‌های سلول B و HTL خطی با پیونددهنده‌ی GPGPG و اپی‌توپ‌های CTL توسط پیونددهنده‌ی AAY به یکدیگر متصل شدند. علاوه بر این، یک griselimycin به عنوان ادجوان برای افزایش ایمنی‌زایی واکسن انتخاب شد و از طریق پیونددهنده‌ی EAAAK پیوند داده شد. توالی griselimycin از پایگاه داده (http://aps.unmc.edu/AP/main.php) بازیابی گردید (۱۲).

بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سازه‌ی واکسن: برای پیش‌بینی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سازه‌ی واکسن مانند نقطه‌ی ایزوالکتریک تئوری (pI)، نیمه‌ی عمر، وزن مولکولی (MW)، پایداری، شاخص آلیفاتیک و مقدار GRAVY (Grand Average of Hydropathicity) از سرور https://web.expasy.org/protparam استفاده گردید (۱۴). همچنین برای تعیین حلالیت سازه‌ی واکسن از پایگاه داده‌ی Protein Sol (https://protein-sol.manchester.ac.uk) استفاده شد.

بررسی تغییرات پس از ترجمه: برای بررسی تغییرات پس از ترجمه‌ی سازه‌ی واکسن از سرور NetNGlyc1.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services) استفاده گردید. سرور NetNGlyc1.0 از الگوریتم شبکه‌ی عصبی توالی (Asn-Xaa-Ser/Thr) برای شناسایی مکان‌های N گلیکوزیلاسیون استفاده می‌کند (۱۵).

پیش‌گویی ساختمان دوم و سوم سازه‌ی واکسن: ساختارهای

ثانویه سازه‌های واکسن با استفاده از ابزار آنلاین PSIPRED و Property RaptorX تولید شدند. PRISPRED (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/)، یک ابزار تولید ساختار ثانویه‌ی آنلاین است که توپولوژی غشاء گذر، مارپیچ غشاء گذر، چین‌ها، دامنه و غیره را نیز به طور مؤثر پیش‌بینی می‌کند. سرور Property RaptorX (http://raptorx.uchicago.edu/StructurePropertyPred/predict/) یک ابزار آنلاین است که برای شناسایی ویژگی‌هایی از قبیل درصد آلفا هلیکس، بتا استرند و کویل استفاده می‌شود و می‌تواند میزان انعطاف‌پذیری سازه را نشان دهد (۱۲). همچنین مدل‌سازی ساختمان سوم با استفاده از سرور I-TASSER انجام گرفت (۱۶).

بهینه‌سازی و بررسی اعتبار ساختمان سوم سازه‌ی واکسن: بهینه‌سازی مدل واکسن با سرور Galaxy Refine (http://galaxy.seokolab.org) انجام شد. این سرور با بازسازی زنجیره‌های جانبی و دوباره بسته‌بندی آن‌ها از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای دستیابی به ساختار کلی با حداقل انرژی لازم برای نگهداری ساختار استفاده می‌کند (۱۷). برای اعتبارسنجی ساختار سوم سازه‌ی واکسن نیز از سرور PROCHECK (https://saves.mbi.ucla.edu/) و تهیه‌ی نقشه‌ی Ramachandran که نشان‌دهنده‌ی انرژی زاویه‌های مجاز و غیرمجاز ψ (psi) و φ (phi) یک اسید آمینه است، استفاده گردید. نتایج حاصل، شامل درصد اسید آمینه‌ها در مناطق مجاز و غیرمجاز است که کیفیت ساختار مدل سه بعدی را تعیین می‌کند (۱۸).

داکینگ سازه‌ی نهایی واکسن با گیرنده‌های شبه Toll (TLR): از آن‌جایی که ایمنی ذاتی و به ویژه گیرنده‌های TLR در شروع پاسخ‌های ایمنی، اهمیت ویژه‌ای دارند؛ امکان اتصال سازه‌ی واکسن و ترکیب شدن آن با TLR2، TLR4 و TLR5 به عنوان مهم‌ترین گیرنده‌های دخیل در شروع پاسخ التهابی بر علیه تریکوموناس، توسط روش داکینگ مولکولی و سرور ClusPro 2.0 (https://cluspro.bu.edu/login.php) بررسی گردید (۱۲).

کلونینگ: در نهایت، به منظور ساخت پلاسمید که دارای توالی چند اپی‌توپی باشد، از سرور جاوا کدون (JCat) استفاده شد. این سرور یک نسخه‌ی بهینه‌ای از توالی DNA مورد نظر را بر اساس ارگانیسم انتخابی ارائه می‌دهد. در این مطالعه *E.coli* K12 به عنوان ارگانیسم هدف انتخاب شد. همچنین دو پارامتر دیگر، شاخص سازگاری کدون Codon index و درصد محتوای GC برای توالی سازه‌ی واکسن توسط این سرور ارائه می‌شود. سپس توالی مولتی اپی‌توپی بهینه شده‌ی واکسن در وکتور بیانی pET28a(+) توسط نرم‌افزار SnapGene کلون گردید. برای اطمینان از ورود صحیح توالی به وکتور از جایگاه‌های محدود EcoRI و BamHI استفاده شد (۱۹).

یافته‌ها

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های لنفوسیت B و T: بر اساس نتایج به دست آمده از پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی لنفوسیت B برای پروتئین AP33، AP51 و AP65 به ترتیب ۲۰، ۲۱ و ۳۲ اپی توپ ۱۶ اسید آمینه‌ای پیش‌بینی شد. همچنین برای لنفوست‌های CTL به ترتیب ۱۸۰۶، ۲۳۶۴ و ۳۳۵۴ اپی‌توپ یافت شد و در خصوص لنفوسیت‌های TH، اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده به ترتیب ۴۴۲۶، ۵۸۲۰ و ۸۲۹۴ تعیین گردید. بر این اساس، تنها اپی‌توپ‌هایی انتخاب شدند که علاوه بر پایین‌ترین IC۵۰ برای لنفوسیت‌های T و بالاترین امتیاز برای لنفوسیت B (جدول ۱)، خاصیت آنتی‌ژنی و ایمنی‌زایی داشته و آلرژی‌زا و سمی نباشند (جدول ۲).

طراحی سازه‌ی واکسن و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی: اپی‌توپ‌های منتخب از مرحله‌ی قبل توسط پیونددهنده‌ی GPGPG برای لنفوسیت‌های B و TH و پیونددهنده‌ی AAY برای اپی‌توپ‌های CTL به همراه ادجوان به یکدیگر متصل شدند (شکل ۱).

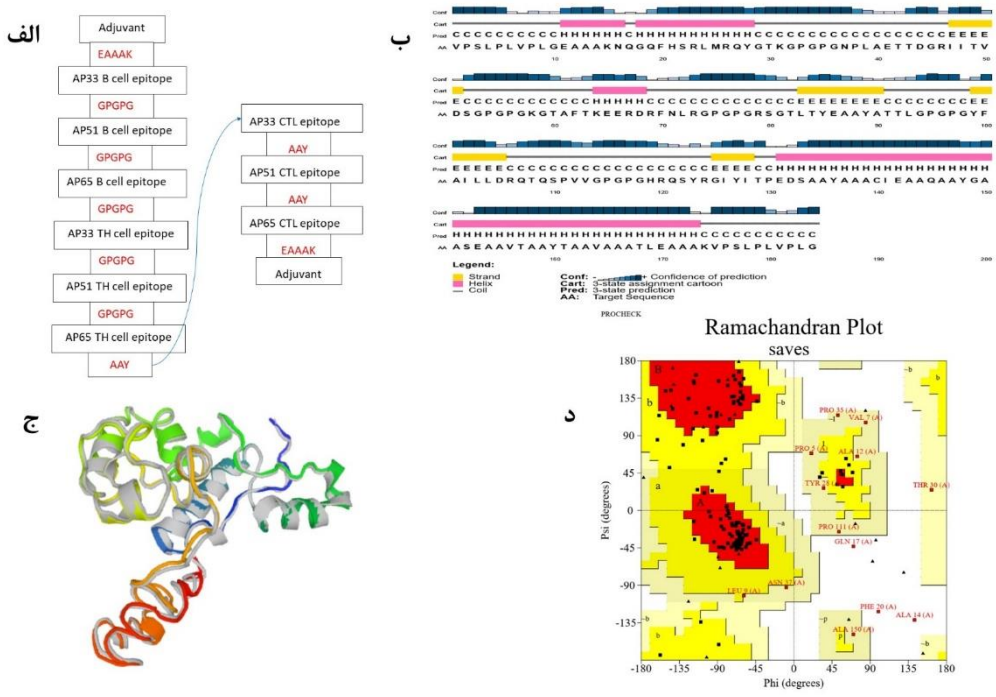
جدول ۱. اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شدهی پروتئین‌های چسبنده تریکوموناس واژینالیس به همراه امتیاز و آلل‌ها

پروتئین	اپی‌توپ خطی B cell/ امتیاز	اپی‌توپ CTL/ آلل/ امتیاز	اپی‌توپ TH/ آلل/ امتیاز
AP33	NQGQFHSRLMRQYGTK ۰/۸۱	AAACIEAAQ HLA-C*03:03 IC۵۰ = ۲/۸	RSGTLTYEAAYATTL HLA-DRB1*09:01 IC۵۰ = ۳۴
AP51	NPLAETTDGRIITVDS ۰/۸۱	GAASEAAVT HLA-C*03:03 IC۵۰ = ۵/۸	YFAILLDRQTQSPVV HLA-DRB1*03:01 IC۵۰ = ۴۴
AP65	KGTAFTKEERDRFNLR ۰/۸۷	TAAVAAATL HLA-C*03:03 IC۵۰ = ۱/۰۵	HRQSYRGIYITPEDS HLA-DRB1*04:05 IC۵۰ = ۲۶

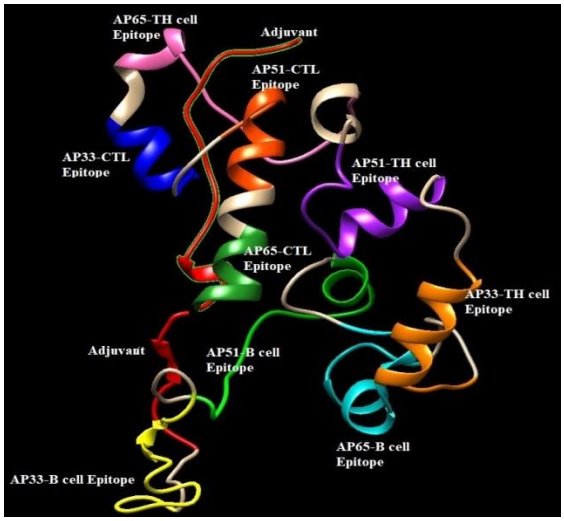
جدول ۲. خواص آنتی‌ژنی و ایمنی‌زایی اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده

پروتئین	اپی‌توپ خطی B cell	اپی‌توپ CTL	اپی‌توپ TH
AP33	NQGQFHSRLMRQYGTK	AAACIEAAQ	RSGTLTYEAAYATTL
آنتی ژنیسیته	۰/۸۱۶۴	۰/۴۱۰۸	۰/۷۴۳۱
ایمنی‌زایی	–	۰/۲۳۸۱۸	–
AP51	NPLAETTDGRIITVDS	GAASEAAVT	YFAILLDRQTQSPVV
آنتی ژنیسیته	۰/۸۷۳۴	۱/۰۰۹۶	۰/۷۶۶۴
ایمنی‌زایی	–	۰/۰۳۷۷	–
AP65	KGTAFTKEERDRFNLR	TAAVAAATL	HRQSYRGIYITPEDS
آنتی ژنیسیته	۰/۷۶۹۳	۰/۶۱۸۱	۰/۵۳۴۵
ایمنی‌زایی	–	۰/۱۸۴۸۷	–

همچنین جایگاه اپی‌توپ‌ها در ساختمان سه بعدی سازه‌ی واکسن مشخص گردید (شکل ۲). نتایج به دست آمده از سرور Protparam حاکی از وزن مولکولی ۱۸۷۰۸ دالتونی ساز واکسن دارد. نقطه‌ی ایزوالکتریک آن، ۸/۰۱ تعیین شد که با توجه به شاخص ناپایداری ۳۵/۵۷، یک سازه‌ی قلیایی و پایدار می‌باشد. همچنین شاخص آلیفاتیک، میزان GRAVY به ترتیب ۷۳/۹۳ و ۰/۱۸۰– بوده که بالا بودن شاخص آلیفاتیک نشان‌دهنده‌ی پایداری بیشتر سازه در دماهای مختلف و منفی بودن GRAVY، نشان‌دهنده‌ی آب‌دوست بودن آن است. نیمه‌ی عمر سازه در پستانداران، ۱۰۰ ساعت، در مخمر بیش از ۲۰ ساعت و در *E.coli* بیش از ۱۰ ساعت تخمین زده شد. با توجه به نتایج به دست آمده از پایگاه Protein-Sol حلالیت سازه‌ی واکسن طراحی شده، ۰/۵۰۵ تعیین شد. از آن‌جایی که حد آستانه برای حلالیت پروتئین بیان شده در *E.coli*، ۰/۴۵ تعیین گردیده است، سازه‌ی واکسن طراحی شده از حلالیت بالاتری برخوردار است.



شکل ۱. الف: نمایی شماتیک از سازه‌ی نهایی واکسن پلی‌اپی‌توپی به طول ۱۸۴ اسید آمینه که ابتدا و انتهای آن به ادجوان متصل شده است. ب: ساختمان دوم سازه‌ی واکسن با ۵۳ درصد رندوم کویل، ۲۹ درصد آلفا هلیکس و ۱۶ درصد صفحات بتا. ج: مدل نهایی اصلاح شده از ساختمان سوم سازه‌ی واکسن. د: نقشه‌ی راماچاندران جایگاه مجاز و غیر مجاز اسید آمینه‌ها را نشان می‌دهد. ۷۹/۳ درصد از اسید آمینه‌ها در نواحی مطلوب و ۱۳/۶ درصد در مناطق مجاز فرعی، ۵ درصد در منطقه‌ی مجاز سخاوتمندانه و ۲/۱ درصد در مناطق غیر مجاز هستند.



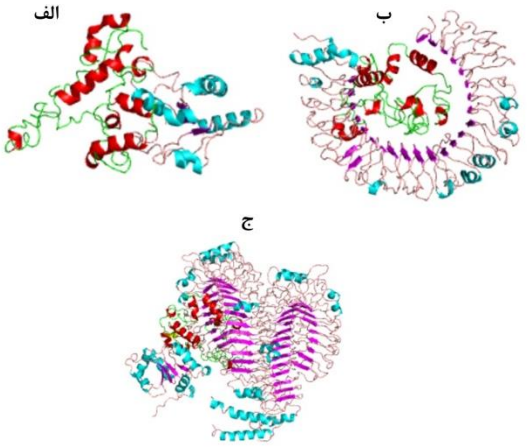
شکل ۲. جایگاه اپی‌توپ‌های لنفوسیت‌های B و T در ساختمان سه بعدی سازه‌ی واکسن

بررسی تغییرات پس از ترجمه: بر اساس نتایج سرور NetNGlyc1.0، هیچ جایگاه گلیکوزیلاسیونی در سازه‌ی واکسن یافت نشد که این نشان‌دهنده‌ی پایداری پروتئین واکسن بوده و در ایمنی‌زایی اهمیت بالایی دارد.

ساختمان دوم و سوم سازه‌ی واکسن: پیش‌بینی ساختمان دوم سازه‌ی واکسن نشان داد که ساختمان دوم از ۵۳ درصد رندوم کویل، ۲۹ درصد آلفا هلیکس و ۱۶ درصد صفحات بتا تشکیل شده است. درصد بالای رندوم کویل حاکی از انعطاف‌پذیری بیشتر سازه‌ی واکسن است (شکل ۱). بر اساس پیش‌بینی ساختمان سوم توسط سرور I-TASSER و امتیاز C که بین ۲ تا ۵- است، بهترین مدل که بالاترین امتیاز (۲/۶۹-) را دارد انتخاب و توسط Galaxy Refine بهینه و متعاقباً با سرور PROCHCK و تهیه‌ی نقشه‌ی Ramachandran، جایگاه مجاز و غیر مجاز اسید آمینه‌ها مشخص گردید (شکل ۱).

داکینگ مولکولی با گیرنده‌های شبه Toll: نتایج به دست آمده از داکینگ مولکولی سازه‌ی واکسن با TLR2، TLR4 و TLR5 در سرور Clus Pro 2.0 نشان‌دهنده‌ی ترکیب خوب مولتی اپی‌توپ‌های واکسن به ترتیب با گیرنده‌های مذکور بر اساس پایین‌ترین میزان انرژی ۹۵۰-، ۱۱۰۷- و ۱۳۴۹/۴- بود (شکل ۳).

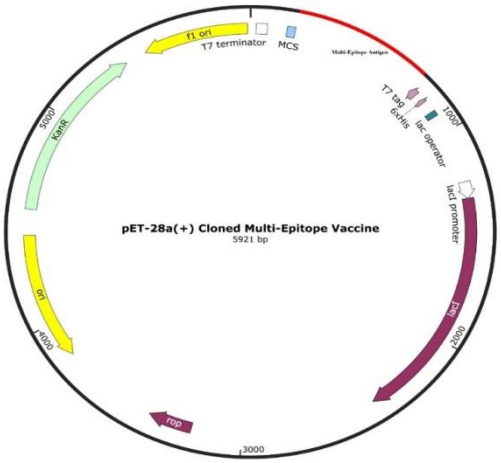
کلونینگ: نتایج بهینه‌سازی کدون‌های سازه‌ی واکسن با استفاده از سرور JCat نشان‌دهنده‌ی، ۵۹/۹ درصد GC (میزان استاندارد ۳۰ تا ۷۰ درصد) و ۰/۹۷ شاخص سازگاری کدون (مقدار استاندارد شاخص سازگاری ۱ است) بود که حاکی از بیان بالای آنتی ژن‌های واکسن در E.coli K12 است. در نهایت توالی بهینه‌سازی شده در وکتور بیانی pET28a(+) قرار گرفتند (شکل ۴).



شکل ۳. تصاویر داکینگ مولکولی سازه‌ی واکسن با TLRs. الف: سازه‌ی واکسن (قرمز و سبز) با TLR2 (آبی و بنفش)، ب: سازه‌ی واکسن (قرمز و سبز) با TLR4 (آبی و بنفش)، سازه‌ی واکسن (قرمز و سبز) با TLR5 (آبی و بنفش).

بحث

امروزه گسترش تریکومونیازیس، وجود ناقلین بدون علامت و بروز مقاومت دارویی، این بیماری عفونی مقاربتی را به یکی از معظلات بهداشت عمومی تبدیل کرده است (۲۰). اگرچه تلاش‌هایی برای تولید واکسن صورت گرفته مانند واکسن‌های حاوی تریکوموناس واژینالیس کشته شده با حرارت، اما تاکنون واکسنی که در دسترس عموم قرار بگیرد، ساخته نشده و تنها یک مورد در گاو برعلیه ترکوموناس فتوس واکسن تجاری عرضه شده است (۲۱). به همین دلیل اخیراً پژوهش‌های گسترده‌تری برای استفاده از تکنولوژی‌های طراحی و تولید واکسن برای این بیماری در جریان است.



شکل ۴. کلونینگ آنتی‌ژن‌ها واکسن مولتی اپی‌توپی در وکتور بیانی pET28a(+) باکتری *E.coli* K12. ناحیه‌ی قرمز رنگ نشان‌دهنده‌ی آنتی‌ژن‌های واکسن است.

Oliveros و همکاران از پروتئین نوترکیب Transient receptor potential برای ایمنی‌زایی موش‌ها بر علیه عفونت تجربی ترکومونیازیس استفاده کردند و موفق به تحریک پاسخ آنتی‌بادی و سایتوکاین‌های التهابی شدند (۲۲).

در مطالعه‌ای دیگر، Xie و همکاران از زیرواحد آلفا اکتین این انگل برای ایمنی‌زایی در موش استفاده کردند که باعث تحریک پاسخ‌های هومورال و سلولی شد (۲۳).

اما در جدیدترین مطالعه‌ی تیم تحقیقاتی Zhang و همکاران، پروتئین‌های چسبنده AP33 و AP65 را به عنوان کاندید واکسن معرفی و ایمنی‌زایی آن را بررسی کردند (۸، ۲۴). این پروتئین‌ها چون در سطح تروفوزوئیت‌های انگل وجود دارند، کاندید مناسبی برای القاء پاسخ آنتی‌بادی هستند (۲۴). با این حال به نظر نمی‌رسد استفاده از یک پروتئین به تنهایی به عنوان کاندید واکسن، ایمنی موثر و طولانی مدتی را القاء کند. از این رو خلاء مطالعات ایمونوانفورماتیک و طراحی واکسن پلی‌اپی‌توپی همچنان پا برجا است.

استفاده از پروتئین‌های چسبنده به دلیل این‌که در دسترس سیستم ایمنی می‌باشند و لازمه‌ی عفونت‌زایی هستند، حائز اهمیت است (۲۴). بنابراین پژوهش حاضر با انتخاب سه پروتئین چسبنده به جای یک نوع آن و بررسی اپی‌توپ‌های اختصاصی لنفوسیت‌های B و T و طراحی واکسن پلی‌اپی‌توپی صورت گرفت. شناسایی اپی‌توپ‌هایی که خاصیت آنتی‌ژنی دارند، یک گام اساسی در طراحی واکسن است، زیرا می‌تواند به طور بالقوه پاسخ‌های ایمنی را فعال کنند. بر این اساس پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول B یک ویژگی مهم برای فراهم کردن پاسخ هومورال به واسطه‌ی آنتی‌بادی است (۲۵). در مطالعه‌ی حاضر، اپی توپ‌های لنفوسیت B با طول ۱۶ اسید آمینه از طریق سرور ABCpred پیش‌بینی و آنتی‌ژنیسیته‌ی آن تأیید شد. مطالعات گذشته نشان داده است که اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده توسط این سرور، سطح بالایی از آنتی‌بادی و سایتوکاین را تولید می‌کنند (۱۲، ۲۶، ۲۷).

اپی‌توپ‌های سلول T برای تحریک ایمنی سلولی و همچنین تولید آنتی‌بادی ضروری هستند. بنابراین، انتخاب اپی‌توپ‌های سلول‌های T CD4+ و CD8+ هنگام توسعه‌ی واکسن‌های مبتنی بر چند اپی‌توپ بسیار مهم است. در مطالعات مشابه بر روی واکسن‌های پلی‌اپی‌توپی ثابت شده است که نبود خاصیت آلرژیک، منجر به افزایش ایمنی‌زایی این نوع از واکسن‌ها می‌شود (۱۲، ۲۸).

اپی‌توپ‌های سلول‌های T پس از تأیید خاصیت آنتی‌ژنی، به همراه اپی‌توپ‌های سلول B از نظر آلرژی‌زایی و سمیت مورد ارزیابی قرار گرفتند و ایمنی‌زایی اپی‌توپ‌های CTL نیز تأیید گردید. سپس با استفاده از پیوندهای AAY و GPGPG آن‌ها را به هم متصل کرده تا واکسن مبتنی بر چند اپی‌توپ ساخته شود. از آن‌جایی که این نوع از واکسن‌ها به تنهایی ممکن است ایمنی‌زایی قوی نداشته باشند (۲۸)، از پیونددهنده‌ی EAAAK و ادجوانت برای بهبود ایمنی‌زایی آن‌ها استفاده شد. تجزیه و تحلیل ساختار ثانویه‌ی واکسن نشان داد که این سازه از ۵۳ درصد رندوم کویل و ۲۹ درصد آلفا هلیکس تشکیل شده است. این نواحی به عنوان ساختارهای آنتی‌ژنی مشهور هستند؛ بنابراین هنگامی که واکسن‌های پلی پپتیدی مورد بررسی قرار می‌گیرند، این دو نوع ساختار می‌توانند در ساختار اصلی خود جمع شوند و توسط آنتی‌بادی‌هایی که به طور طبیعی در پاسخ به عفونت القا می‌شوند، شناسایی شوند (۲۹).

از آن‌جایی که سازه‌ی واکسن پایداری مناسبی در دما و میزبان‌های مختلف دارد و حلالیت پروتئین بیان شده در *E.coli* که یکی از مهم‌ترین شاخص‌های عملکردی پروتئین‌ها است، بر اساس نتیجه‌ی به دست آمده می‌توان ادعا کرد که واکسن طراحی شده، حلالیت قابل قبولی دارد. نتیجه‌ی نقشه‌ی راماچاندران نشان می‌دهد که ۷۹/۳ درصد از اسید آمینه‌ها در نواحی مطلوب و ۱۳/۶ درصد در مناطق مجاز فرعی، ۵ درصد در منطقه‌ی مجاز سخاوتمندانه و ۲/۱ درصد در مناطق غیر مجاز هستند. بر این اساس، کیفیت کل مدل قابل قبول است. علاوه بر این، برای بررسی قابلیت اتصال واکسن ساخته شده به TLR روی سلول‌های ایمنی، TLR2، TLR3 و TLR5 با سازه‌ی واکسن داکینگ شد. نتایج حاصل از سرور Cluspro نشان داد که سازه‌ی واکسن قابلیت اتصال به TLR2 و TLR4 و تحریک پاسخ‌های التهابی دارد و TLR5 که شناسایی‌کننده‌ی تاژک انگل است توسط این واکسن فعال می‌شود. TLRs به عنوان مولکول‌های شناساگر الگوهای پاتوژنی، مولکول‌هایی نظیر لیپوپلی‌ساکاریدها، فلاژل و اسیدنوکلوئیک پاتوژن‌ها را شناسایی می‌کنند و با القاء تولید سایتوکاین‌ها نه تنها در ایجاد پاسخ‌های التهابی نقش دارند بلکه در شکل‌گیری پاسخ ایمنی تطبیقی با فراخوانی لنفوسیت‌ها به محل عفونت، برداشت آنتی‌ژن‌ها، بلوغ سلول‌های دندریتیک و متعاقباً عرضه‌ی آنتی‌ژن و فعال شدن لنفوسیت‌های B و T و همچنین تولید آنتی‌بادی دخیل هستند (۳۰). از آن‌جایی که هدف از طراحی واکسن‌های مولتی اپی‌توپی، تولید آن‌ها در سطح صنعتی است، استفاده از پروکاریوت‌ها به ویژه *E.coli* به علت سهولت در کشت و تولید پروتئین در الویت می‌باشد. بر این اساس طراحی وکتور بیانی pET28a(+) و همچنین مشخص شدن عدم گلیکوزیلاسیون و تغییرات پس از ترجمه نشان‌دهنده‌ی این است که ساختار اپی‌توپ‌های سازه‌ی واکسن تغییر نخواهد کرد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه با بکارگیری ابزارهای گوناگون ایمونوانفورماتیک، سه

اپی‌توپ خطی لنفوسیت B، سه اپی‌تـوپ CTL و سـه اپی‌تـوپ TH پروتئین‌های چسبنده‌ی انگل تریکومونـاس واژینـالیس کـه دارای بـالاترین میل ترکیبی، آنتی‌ژنیسیته و بی‌خطری هستند برای طراحی سـازه‌ی واکسـن انتخاب شدند. بر اساس نتایج به دست آمده، واکسـن طراحـی شـده یـک آنتی‌ژن هیدروفیل و پایدار در شرایط متفاوت با نیمه عمری طـولانی اسـت و قابلیت تحریک TLRs که لازمه‌ی فعال شدن ایمنی ذاتـی و متعاقـب آن ایمنی تطبیقی اسـت را دارد. همچنـین ایمنـی‌زا بـودن اپی‌توپ‌هـای CTL تضمین‌کننده‌ی پاسخ ایـن سـلول‌ها اسـت. بنـابراین سـازه‌ی پلی‌اپی‌تـوپی حاضر می‌تواند کاندیدی جهت القاء ایمنی بر علیـه تریکومونیـازیس باشـد که نیازمند مطالعه‌ی بیشتر در مدل‌های آزمایشگاهی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با بودجه‌ی شخصی نگارش شده و هیچگونه حمایت مالی صورت نگرفته است.

References

1. Arbabi M, Delavari M, Fakhrieh-Kashan Z, Hooshyar H. Review of trichomonas vaginalis in Iran, based on epidemiological situation. J Reprod Infertil 2018; 19(2): 82-8.
2. Rowley J, vander Hoorn S, Korenromp E, Low N, Unemo M, Abu-Raddad LJ, et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. Bull World Health Organ 2019; 97(8): 548-62.
3. Matini M, Rezaie S, Mohebali M, Maghsood A, Rabiee S, Fallah M, et al. Prevalence of Trichomonas vaginalis Infection in Hamadan City, Western Iran. Iran J Parasitol 2012; 7(2): 67-72.
4. Singh BN, Lucas JJ, Fichorova RN. Trichomonas vaginalis: pathobiology and pathogenesis. In: Khan NA, editors. Emerging protozoan pathogens. London, UK: Taylor & Francis Group; 2007. p. 411-55.
5. Sallam TAK, Meghahed LA, Ibrahim SM, Morsy TA. An overview on trichomonas vaginalis with reference to Egypt. J Egypt Soc Parasitol 2021; 51(2): 267-80.
6. de Aquino MFK, Hinderfeld AS, Simoes-Barbosa A. Trichomonas vaginalis. Trends Parasitol 2020; 36(7): 646-7.
7. Lin WC, Chang WT, Chang TY, Shin JW. The pathogenesis of human cervical epithelium cells induced by interacting with Trichomonas vaginalis. PLoS One 2015; 10(4): e0124087.
8. Zhang Z, Li Y, Wang S, Hao L, Zhu Y, Li H, et al. The molecular characterization and immunity identification of trichomonas vaginalis adhesion protein 33 (AP33). Front Microbiol 2020; 11: 1433.
9. Lin HC, Chu LJ, Huang PJ, Cheng WH, Zheng YH, Huang CY, et al. Proteomic signatures of metronidazole-resistant Trichomonas vaginalis reveal novel proteins associated with drug resistance. Parasit Vectors 2020; 13(1): 1-14.
10. Liu T, Shi K, Li W. Deep learning methods improve linear B-cell epitope prediction. BioData Min 2020; 13: 1.
11. Fleri W, Paul S, Dhanda SK, Mahajan S, Xu X, Peters B, et al. The immune epitope database and analysis resource in epitope discovery and synthetic vaccine design. Front Immunol 2017; 8: 278.
12. Bibi S, Ullah I, Zhu B, Adnan M, Liaqat R, Kong WB, et al. In silico analysis of epitope-based vaccine candidate against tuberculosis using reverse vaccinology. Sci Rep 2021; 11(1): 1249.
13. Calis JJ, Maybeno M, Greenbaum JA, Weiskopf D, De Silva AD, Sette A, et al. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. PLoS Comput Biol 2013; 9(10): e1003266.
14. Walker JM. The proteomics protocols handbook. New York, NY: Springer. 2005; p. 571-608.
15. Pitti T, Chen CT, Lin HN, Choong WK, Hsu WL, Sung TY. N-GlyDE: a two-stage N-linked glycosylation site prediction incorporating gapped dipeptides and pattern-based encoding. Sci Rep 2019; 9(1): 15975.
16. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature 2021; 596(7873): 583-9.
17. Heo L, Park H, Seok C. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. Nucleic Acids Res 2013; 41(Web Server issue): W384-8.
18. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. J Appl Crystallogr 1993; 26(2): 283-91.
19. Sanches RC, Tiwari S, Ferreira LC, Oliveira FM, Lopes MD, Passos MJ, et al. Immunoinformatics design of multi-epitope peptide-based vaccine against Schistosoma mansoni using transmembrane proteins as a target. Front Immunol 2021; 12: 621706.
20. Kissinger P. Trichomonas vaginalis: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. BMC Infect Dis 2015; 15: 307.
21. Bouchemal K, Bories C, Loiseau PM. Strategies for prevention and treatment of Trichomonas vaginalis infections. Clin Microbiol Rev 2017; 30(3): 811-25.
22. Mendoza-Oliveros T, Arana-Argáez V, Alvaréz-Sánchez LC, Lara-Riegos J, Alvaréz-Sánchez ME, Torres-Romero JC. Immune response of BALB/c mice toward putative calcium transporter recombinant protein of Trichomonas vaginalis. Korean J Parasitol 2019; 57(1): 33-8.
23. Xie YT, Gao JM, Wu YP, Tang P, Hide G, Lai DH, et al. Recombinant α-actinin subunit antigens of Trichomonas vaginalis as potential vaccine candidates in protecting against trichomoniasis. Parasit Vectors 2017; 10(1): 83.
24. Zhang Z, Song X, Zhang Z, Li H, Duan Y, Zhang H, et al. The molecular characterization and immune protection of adhesion protein 65 (AP65) of

Trichomonas vaginalis. Microb Pathog 2021; 152: 104750.
25. Dubey KK, Luke GA, Knox C, Kumar P, Pletschke BI, Singh PK, et al. Vaccine and antibody production in plants: developments and computational tools. Brief Funct Genomics 2018; 17(5): 295-307.
26. García-Angulo VA, Kalita A, Kalita M, Lozano L, Torres AG. Comparative genomics and immunoinformatics approach for the identification of vaccine candidates for enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. Infect Immun 2014; 82(5): 2016-26.
27. Dong R, Chu Z, Yu F, Zha Y. Contriving multi-epitope subunit of vaccine for COVID-19: immunoinformatics approaches. Front Immunol 2020; 11: 1784.
28. Meza B, Ascencio F, Sierra-Beltrán AP, Torres J, Angulo C. A novel design of a multi-antigenic, multistage and multi-epitope vaccine against Helicobacter pylori: an in silico approach. Infect Genet Evol 2017; 49: 309-17.
29. Corradin G, Villard V, Kajava AV. Protein structure based strategies for antigen discovery and vaccine development against malaria and other pathogens. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2007; 7(4): 259-65.
30. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like receptors and the control of immunity. Cell 2020; 180(6): 1044-66.

DOI: *10.48305/jims.v40.i662.0130*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 40, No. 662, 2nd Week, May 2022**

Received: 23.11.2021 Accepted: 06.02.2022 Published: 04.05.2022

Designing of Multi-Epitope Vaccine against *Trichomonas vaginalis* Using Immuno-informatics

Babak Beikzadeh[1]

Original Article

Abstract

Background: *Trichomonas vaginalis* is one of the most common sexually transmitted infections around the world. Given the importance of this infection in public health, extensive efforts have been made to develop vaccines. Previous research has been limited to the inactivated vaccine or using an adhesion protein as a vaccine candidate, and no effective vaccine for the disease has been suggested until now. This study aimed to design a vaccine based on epitopes of parasite adhesion proteins to be used as an immunogenic protein using immune-informatics tools.

Methods: First, AP33, AP51 and AP65 protein sequences were retrieved. Epitopes of B and T lymphocytes were then predicted. Antigenicity, non-allergenicity and non-toxicity of epitopes were evaluated and vaccine structure was designed. Then the physical, chemical and structural properties of the vaccine were determined and finally, the ability of the vaccine to bind to TLRs was investigated.

Findings: A total of 9 lymphocytes B and T epitopes were selected and a vaccine construct was designed based on them. Immuno-informatics evaluations showed that the designed vaccine is safe, hydrophilic and stable at different temperatures and conditions, that can bind to TLRs and activate innate immunity.

Conclusion: Based on the results, the polypeptide construct can be a suitable candidate for Trichomoniasis vaccine.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*; Vaccine; Adhesion protein; Epitopes

Citation: Beikzadeh B. **Designing of Multi-Epitope Vaccine against *Trichomonas vaginalis* Using Immuno-informatics.** J Isfahan Med Sch 2022; 40(662): 130-8.

1- Assistant Professor, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, School of Biological Sciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Babak Beikzadeh, Assistant Professor, Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology, School of Biological Sciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran; Email: b.beikzadeh@bio.ui.ac.ir