

طراحی و بهینه سازی برون تنی پروتئین Loa22 در سرووارهای بیماریزای لپتوسپیرو جهت استفاده در واکسن نو ترکیب

مهدی قره خانی^۱، محمد فائزی قاسمی^۲ پژوهاک خاکی^{۳*}، مجید اسمعیلی زاده^۴، مجید تیبانیان^۵

۱- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

۳- دانشیار، بخش میکروبی شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات کشاورزی، آموزش و ترویج (AREEO)، کرج، ایران

۴- دانشیار، بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات کشاورزی، آموزش و ترویج (AREEO)، کرج، ایران

۵- دانشیار، بخش ایمونولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات کشاورزی، آموزش و ترویج (AREEO)، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۲۴

چکیده

لپتوسپیروز که توسط گونه های بیماریزای لپتوسپیرو ایجاد می شود، یک بیماری مشترک بین انسان و دام است که پیامدهای بهداشت عمومی قابل توجهی دارد. توسعه یک واکسن نو ترکیب موثر علیه لپتوسپیروز به دلیل ماهیت پیچیده پاتوژن و پروتئین های غشاء خارجی آن (OMPs) کماکان بصورت یک چالش باقی مانده است. پروتئین غشاء خارجی Loa22 به دلیل خواص ایمنی زایی آن به عنوان یک واکسن بالقوه مطرح شده است. هدف این مطالعه بررسی کاربرد بیوانفورماتیک و ایمونوآفورماتیک در مطالعه پروتئین Loa22، توضیح ویژگی های ساختاری و عملکردی آن، و ارزیابی پتانسیل آن به عنوان یک واکسن کاندید برای لپتوسپیروز است.

بر اساس یافته های این تحقیق، با همترازی چند توالی، پروتئین Loa22 در سویه های مختلف لپتوسپیروهای بیماریزا، بین ۹۸-۱۰۰ درصد همگرایی نشان داد. ارزیابی ویژگی های مختلف این پروتئین، آن را یک آنتی ژن ایمنی زا، غیر توکسیک و غیر حساسیت زا نشان داد که می تواند پاسخ ایمنی قابل توجهی را در برابر عفونت لپتوسپیروا القاء کند. همچنین بر اساس پیش بینی ها، نشان داده شد که پروتئین Loa22 ساختاری پایدار، محلول و دارای نواحی آنتی ژنی منطبق با اپی توپ های سلول T و B دارد که در تمام ایزوله ها حفاظت شده است و می تواند بعنوان واکسنی نو ترکیب و یا با استفاده از اپی توپ های ایمونوژن آن در ترکیب با اپی توپ های ایمونوژن سایر پروتئین های حفاظت شده غشاء خارجی لپتوسپیرو در طراحی واکسنی مولتی اپی توپ در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: لپتوسپیروز، لپتوسپیرو، پروتئین Loa22، بیوانفورماتیک، ایمونوآفورماتیک

*نویسنده مسئول: دکتر پژوهاک خاکی

آدرس: بخش میکروبی شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات کشاورزی، آموزش و ترویج (AREEO)، کرج، ایران.

پست الکترونیک: khakipejvak53@gmail.com

مقدمه

لپتوسپیروز یک بیماری مشترک بین انسان و دام با توزیع جهانی است که عامل آن اسپروکت‌هایی از جنس لپتوسپیرا می باشد. لپتوسپیروز عمدتاً در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری و نیز مناطق معتدل پر باران شیوع بیشتری دارد. منبع اصلی آن جوندگان و حیوانات وحشی می باشند که لپتوسپیراها را در ادرار خود دفع می کنند. این بیماری در انسان و در تمام پستانداران اهلی و وحشی بروز می کند (Adler, 2015). انسان بواسطه قرارگیری در معرض آب آلوده و یا حیواناتی که بطور مزمن آلوده می باشند، تبدیل به میزبان تصادفی می شود، بطوریکه در دنیا سالانه بیش از یک میلیون مورد ابتلا گزارش می شود (Fraser and Brown, 2017).

این بیماری در انسان، درجات مختلف از شدت شامل یک بیماری تب دار خود محدود شونده تا نارسایی کلیوی، کبدی و تظاهرات ریوی شدید را سبب می شود. عمده مشکل مرتبط با لپتوسپیروز، تشخیص صحیح و سریع بیماری است که بدلیل علایم متعددی است که غالباً با دیگر بیماری‌های تب دار و خونریزی دهنده اشتباه گرفته می شود (Hidalgo et al., 2020).

از اولین مطالعات درباره واکسن بر علیه لپتوسپیروز تاکنون، واکسن‌های تجاری عمدتاً از نوع واکسن‌های کشته، بطور گسترده در دامپزشکی استفاده می شوند که از محدودیت‌های زیادی از جمله عدم ایجاد ایمنی پایدار، عوارض جانبی متعدد ناشی از اجزای باقیمانده محیط و لیپولی ساکراید لپتوسپیرال و ایجاد سطح پایینی از ایمنی متقاطع رنج می برند (Adler, 2015).

مطالعات ژنومی که منجر به تعیین توالی کامل ژنوم گونه‌های مختلف لپتوسپیرا اعم از بیماریزا و محیطی شده، مبنایی برای درک بیماریزایی سرووارهای بیماریزای لپتوسپیرا فراهم کرده است. همچنین، مطالعه خصوصیات عملکردی غشاء خارجی و پروتئین‌های

سیتوپلاسمی، راه را برای جستجوی عوامل تشخیصی و کاندیداهای جدید احتمالی واکسن هموارتر کرده است (Cerqueira et al., 2011). از سوی دیگر، واکسینولوژی معکوس (RV) با رویکرد برون تنی (In-silico) با استفاده از این توالی‌های ژنومی، پیش‌بینی اولیه تقریباً دقیقی در مورد کاندیداهای واکسن ارائه می کند. با استفاده از این روش می توان تمام آنتی‌ژن‌های بالقوه کدگذاری شده توسط ژنوم را صرف نظر از فراوانی، مرحله بیان و ایمنی‌زایی آنها شناسایی کرد (Dellagostin et al., 2017).

در سال های اخیر، شناسایی پروتئین‌های ایمونوژنیک غشاء بیرونی لپتوسپیرا که در میان گونه‌های بیماریزا حفاظت شده‌اند به موضوعی مهم در تحقیقات لپتوسپیریایی در راستای توسعه واکسن‌های نو ترکیب با خاصیت حفاظت متقاطع تبدیل شده است (Grassmann et al., 2017).

غشاء بیرونی لپتوسپیرا با داشتن فسفولیپدها، LPS و سه نوع مختلف پروتئین‌های غشاء خارجی (OMPs) شناخته می شود (Haake and Matsunaga, 2010). لیوپروتئین‌ها، پروتئین‌های تراغشایی و پروتئین‌های سطح غشایی؛ سه گروه پروتئین‌های غشاء خارجی لپتوسپیراها هستند (Hsu and Yang, 2022). لذا با گسترش و پیشرفت علوم وابسته به بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک، واکسن‌هایی بر پایه پروتئین نو ترکیب ممکن است جایگزینی برای واکسن‌های کلاسیک جهت پیشگیری از لپتوسپیروز باشد.

چندین پروتئین غشاء خارجی لپتوسپیرا از جمله لیوپروتئین‌هایی مانند LipL21، LipL36، LipL41 و LigB به عنوان آنتی‌ژن‌های بالقوه واکسن، ارزیابی شده اند (Monaris et al., 2015). دو فاکتور مهم در ارزیابی این پروتئین‌ها بعنوان عوامل بیماریزایی در لپتوسپیراها؛ موقعیت سطحی این پروتئین‌ها و بیان آنها در طول



مطالعات فیلوژنتیکی

آنالیز توالی کامل پروتئین (Complete Coding Sequence) Loa22 از سرووارهای بومی و غیر بومی مورد مطالعه در این تحقیق، با استفاده از سرور آنالیز BlastP از ابزارهای پایگاه داده NCBI و نرم افزار 17 DNASTAR Lasergene انجام گردید و درصد شباهت و واگرایی توالی پروتئین Loa22 مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی ORF در توالی پروتئین Loa22

برای پیش بینی چارچوب باز خوانش (Open Reading Frames) در توالی پروتئین Loa22 از سرور ExpASy استفاده شد. این سرور چارچوب باز خوانشی که طول بلندتری دارد را بعنوان ORF اصلی و کد کننده پروتئین گزارش می کند.

بررسی حضور و جایگاه سیگنال پپتید

برای پیش بینی حضور و بررسی جایگاه توالی سیگنال پپتید از سرور SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) و ابزار SignalP استفاده شد. در انتهای سیگنال پپتید ناحیه برشی قرار دارد که در بعضی پروتئین‌ها در حین یا پس از جایگیری در محل هدف، برش می خورد. در باکتری های گرم منفی وجود سیگنال پپتید باعث قرار گیری پروتئین در غشاء داخلی یا منطقه پری پلاسمی می شود و یا ترشحی بودن پروتئین را مشخص می کند.

پیش بینی ساختار دوم پروتئین Loa22

برای پیش بینی ساختار دوم پروتئین هدف از سرور آنالیز GOR4 (https://npsa-gor4.ibcp.fr/NPSA/npsa_gor4.html) استفاده شد. این سرور، با انجام محاسبات، موقعیت و نحوه قرار گیری آمینواسیدهای در گیر در انواع مارپیچ‌ها، دورها، پل‌ها و در نهایت ساختار ثانویه پروتئین هدف را پیش‌بینی می کند.

عفونت پستانداران بوده است (Raja and Natarajaseenivasan, 2015). آنتی‌ژن‌های در معرض سطح، بدلیل موقعیت مکانی که دارند، احتمالاً در تعامل اصلی میزبان- پاتوژن، چسبندگی و/یا تهاجم دخیل هستند. این میانکنش‌ها با اتصال باکتری به بافت هدف، پاسخ‌های ایمنی و در نهایت ورود به بافت‌های میزبان دنبال می‌شوند (Haake and Zückert, 2015, Dhayabaran et al., 2020).

لیپوپروتئین Loa22 از خانواده پروتئین‌های ompA غشاء بیرونی لیتوسپیرا است که اولین بار توسط محققان ژاپنی با استفاده از روش فیوژن phoA و سپس با روش ایمونوبلاتینگ با استفاده از سرم موش‌های در حال بهبودی شناسایی و نشان داده شد که توالی آن بشدت حفاظت شده است (Koizumi and Watanabe, 2003, Ristow et al., 2007). در این مطالعه طی آنالیزهای برون‌تنی، پارامترهای فیزیکی و شیمیایی، ساختارها، موقعیت مکانی، مارپیچ‌های گذرنده، آنتی‌ژنیسته، توالی سیگنال و اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T در توالی پروتئین Loa22 در راستای امکان استفاده از آن در طراحی واکسنی نو ترکیب بر علیه لیتوسپیروز مورد پیش‌بینی و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بررسی توالی پروتئین Loa22

هجده توالی پروتئین Loa22 مربوط به سرووارهای بومی لیتوسپیرا، در کنار دیگر توالی‌های ثبت شده تا تاریخ ۱۳ سپتامبر ۲۰۲۱ در پایگاه اطلاعات ژنتیکی NCBI، جهت مطالعات بیوانفورماتیک استخراج شد. همچنین با استفاده از همترازی توالی سرووار بومی کانیکولا؛ با بیش از ۵۰ توالی کامل ژنومی (کروموزوم I) سرووارهای مختلف لیتوسپیراهای پاتوژن موجود در بانک ژنومی NCBI، هفده توالی جهت مطالعه جامع‌تر استخراج شد.



پیش بینی ساختار سه بعدی پروتئین Loa22

بررسی و شناسایی ساختار سه بعدی پروتئین ها یک منبع بسیار مهم از اطلاعات برای درک عملکرد و فعالیت پروتئین ها، میانکنش آنها با لیگاند، پروتئین، DNA و همچنین درک اثرات جهش ها می باشد. روش مدل سازی ساختار سه بعدی پروتئین بر اساس توالی آمینواسیدی راهکار در مواردی است که ساختار کریستالوگرافی شده ای در مورد پروتئین هدف وجود ندارد. به روزترین ابزار مدل سازی که توسط گوگل ارائه شده Alphafold (alphafold21_predict_colab.ipynb) نام دارد که از طریق یک نرم افزار رابط بنام ChimeraX نیز قابل دسترسی است (Jumper et al., 2021). این سرور همچنین از هوش مصنوعی آنلاین Dali server (<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali/>) برای پیش بینی ساختار پروتئین هدف بهره می گیرد. سرور Dali با استفاده از بهترین مدل (best model) پیش بینی شده، ساختارهای مشابه به پروتئین هدف را شناسایی و نتایج را بصورت تفاوت در آمینواسیدها (درصد Identity)، تفاوت در ساختار (عدد RMSD) و در نهایت برآیند تمام محاسبات (عدد Z) گزارش می کند.

تعیین محل قرارگیری پروتئین Loa22 در ساختار غشاء

برای پیش بینی محل و نحوه قرارگیری پروتئین Loa22 در ساختار غشاء باکتری؛ توالی آمینواسیدی این پروتئین با استفاده از سرور آنلاین DeepTMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?DeepTMHMM>) مورد بررسی قرار گرفت. این سرور در حال حاضر بهترین برنامه پیش بینی غشایی است که از یک مدل پنهان مارکوف (Hidden Markov Model) برای پیش بینی مارپیچ های گذرنده در توالی های پروتئینی استفاده می کند (Hallgren et al., 2022).

پیش بینی اپی توپ های سلول T

برای یافتن اپی توپ هایی در پروتئین هدف که توسط سلول T سیستم ایمنی (T Cell Epitopes) شناسایی می شوند، از دو سرور مختلف استفاده شد. سرور Net CTL 1.2 (<http://services.healthtech.dtu.dk>) با ۱۲ سوپرتایپ HLA (A1, A2, A3, A4, A26, B7, B8, B27, B39, B44, B58, B62 Immune) و سرور IEDB (Epitope Database Analysis Resource) با ۵۰ سوپرتایپ مختلف HLA (HLA-A, HLA-B, HLA-C و HLA-C) جهت پیش بینی اپی توپ های احتمالی (۹ مری) در ساختار پروتئین Loa22 مربوط به MHC-I بررسی شد. حد آستانه (Threshold) در سرور NetCTL بر اساس حساسیت و اختصاصیت مورد نیاز مطالعه، بین ۱/۲۵-۰/۵ متغیر است. هر چه آستانه بالاتری را انتخاب کنیم، نتایج کمتر اما موثرتر خواهد بود. با استفاده از سرور IEDB بر پایه روش SMM، اپی توپ هایی با IC50 کمتر از ۲۰۰ انتخاب شدند. هر چه عدد کوچکتري داشته باشیم تطابق اپی توپ با آلل انتخابی بیشتر می باشد.

جهت بررسی آلل های MHC-II، لوکوس HLA-DR بدلیل تنوع وسیع تر نسبت به سایر HLA ها انتخاب شد. از آنجا که تاکنون هیچ سروری آلل های MHC-II دامی را جهت پیشگویی اپی توپ های آنتی ژنیک سلول T ارائه نکرده است؛ آللهای MHC انسانی مشابه با آللهای دامی به عنوان آللهای معادل برای پیشگویی اپی توپ های مورد استفاده قرار گرفتند. به دلیل اینکه MHC-II شیار بازتری نسبت MHC-I دارد لذا برای پیش بینی افینیتی اتصال، طول اپی توپ ها بین ۱۲-۱۸ آمینواسید انتخاب شد. از آنجائیکه سرور IEDB بطور پیش فرض آمینواسیدهای اول، دوم و آخر هر اپی توپ را بعنوان متصل به MHC (Masked) در نظر می گیرد،



لذا هسته ۹-۱۲ مری از آمینواسیدها (Core Peptide) برای شناسایی شدن توسط TCR در دسترس هستند.

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول B

سلول‌های B سیستم ایمنی هم توانایی شناسایی اپی‌توپ‌های خطی و هم فضایی را دارد. برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی و آمینواسیدها در اپی‌توپ‌های ناپوسته سلول B در توالی پروتئین Loa22 از سرور آنلاین BepiPred-3.0 (DTU Health tech) با استفاده از الگوریتم LM و حد آستانه مفروض (۰/۵) استفاده شد (Clifford et al., 2022).

برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های فضایی از سرور IEDB Conformational B cell prediction Tool Ellipro Discotope - Prediction of epitopes from protein structure ابزار و حد آستانه پیش فرض ۷/۷- با اختصاصیت ۷۵٪ استفاده شد. برای شناسایی اپی‌توپ‌های فضایی نمی‌توان از توالی خطی پروتئین استفاده کرد. بنابراین ساختار کریستالوگرافی شده پروتئین‌ها از پایگاه داده پروتئین‌ها مانند پایگاه داده Uniprot (PDB) جهت پیش‌بینی مورد نیاز است. در صورتی که پروتئین هدف کریستالوگرافی نشده (مانند پروتئین مورد مطالعه در این تحقیق)، از ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده استفاده می‌شود.

پیش‌بینی آلرژنیستی، توکسیستی و آنتی‌ژنیستی
جهت پیش‌بینی آلرژنیستی، حلالیت و آنتی‌ژنیستی پروتئین Loa22 توالی آمینواسیدی این پروتئین قبل و بعد از بهینه‌سازی مورد ارزیابی قرار گرفت.

میزان آلرژن بودن پروتئین بر اساس الگوریتم‌های دو سرور AllerTop و AllergenFP مورد ارزیابی قرار گرفت. این دو سرور هم بر اساس متد مورد استفاده جهت پیشگویی و نیز درصد صحت عمل آنها متفاوت هستند. صحت پیش‌بینی سرور AllergenFP حدود ۸۷/۹٪ و سرور AllerTop حدود ۸۷/۷٪ است.

بررسی و پیش‌بینی نواحی توکسیک در پروتئین اصلی و توترکیب Loa22 با استفاده از سرور ToxinPred براساس روش SVM (Swiss-Prot) با حد آستانه صفر و E-value برابر با ۰/۱ انجام شد.

برای پیش‌بینی آنتی‌ژنیستی یا میزان تحریک سیستم ایمنی این پروتئین، از سرور Vaxijen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen>)

استفاده شد که پیش‌بینی خود را بر اساس خواص فیزیکوشیمیایی پلی‌پپتید انجام می‌دهد. صحت پیش‌بینی این سرور در حدود ۸۹-۷۰٪ عنوان شده است.

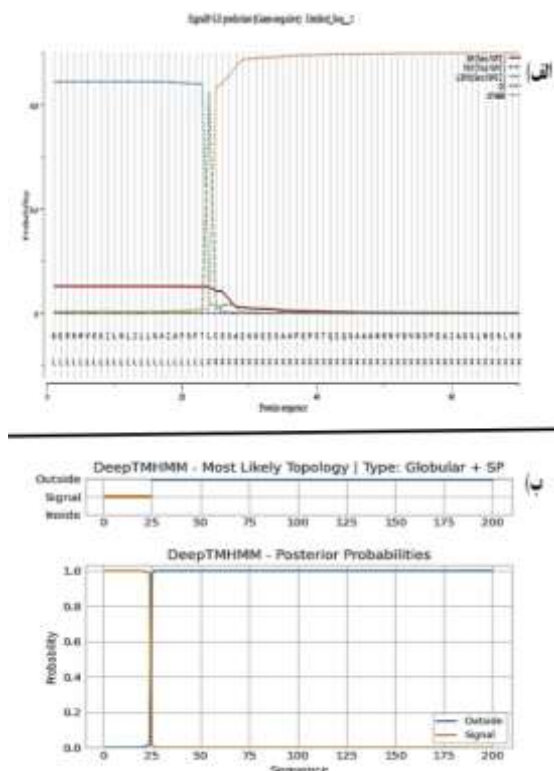
تجزیه و تحلیل پارامترهای فیزیکی و شیمیایی و پیش‌بینی حلالیت

با استفاده از سرور ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>)، خواص فیزیکی و شیمیایی از جمله pH ایزوالکتریک، وزن مولکولی، نیمه عمر آنتی‌ژن و همچنین حلالیت پروتئین اصلی و نوترکیب هر کدام بصورت جداگانه با استفاده از سرور SolPro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) مورد بررسی و پیش‌بینی قرار گرفت.

ترجمه معکوس، تعیین جایگاه‌های برشی و بهینه‌سازی کدون

بر اساس مطالعات فیلوژنی پس از همترازی توالی‌های مورد مطالعه، توالی نهایی با حداکثر انطباق با سروواریهای بومی لپتوسپیرا و پس از حذف توالی سیگنال، بصورت توالی نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار EditSeq ترجمه معکوس شد. این توالی به لحاظ جایگاه‌های برشی آنزیم‌های اندونوکلاز در راستای انتخاب آنزیم‌های مناسب جهت وارد کردن قطعه نهایی در ناقل (Vector)، جهت جلوگیری از برش‌های ناخواسته بدلیل وجود سایت برشی مشابه، مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت برای بهینه‌سازی کدونهای ژنی





شکل ۱. پیش‌بینی موقعیت و نحوه قرارگیری پروتئین Loa22 و توالی سیگنال آن در ساختار غشاء

الف. پیش‌بینی توالی سیگنال توسط سرور SignalP-5.0

ب. پیش‌بینی موقعیت و نحوه قرارگیری پروتئین Loa22 و جایگاه سیگنال پپتید با استفاده از سرور DeepTMHMM

پیش‌بینی ساختار دو بعدی

بر اساس نتایج پیش‌بینی سرور GOR4 از توالی آمینواسیدی پروتئین Loa22؛ ۶۷ آمینواسید (۳۳/۵٪) در تشکیل مارپیچ آلفا، ۲۹ آمینو اسید (۱۴/۵٪) در ساختار رشته توسعه یافته (Extended Strand) و ۱۰۴ آمینواسید (۵۲٪) در پیچش‌های تصادفی (Random Coil) شرکت دارند (شکل ۲).

برای بیان در میزبان E.coli از ابزار آنالین GeneSmart™ (<https://www.genscript.com/gensmart-free-gene-codon-optimization.html>) استفاده شد.

نتایج

آنالیز توالی پروتئین Loa22

بر اساس نتایج همترازی توالی‌های آمینواسیدی سرووارهای بومی و غیربومی مورد مطالعه، تنها جایگزینی در ۵ آمینواسید در توالی‌های مختلف پروتئین Loa22 مشاهده شد. این تغییرات شامل؛ سه آمینواسید آلانین^{۳۷}، آلانین^{۸۷} و والین^{۱۸۵} در میان سرووارهای گریپوتیفوزا بود که بترتیب با آمینواسیدهای ترئونین^{۳۷}، پرولین^{۸۷} و آلانین^{۱۸۵} در دیگر سرووارها جایگزین شده بودند. از میان دو مورد دیگر یک مورد در سرووار کانیکولا مشاهده شد که آمینواسید هیستیدین در موقعیت ۵۸ با آمینواسید اسپارتیک اسید در سایر سرووارها متفاوت بود و مورد دیگر آمینواسید گلوتامین در موقعیت ۱۲۹ در سرووار آتومنالیس با گلوتامیک اسید در دیگر سرووارها متفاوت بود.

تعیین قالب صحیح خوانش پروتئین Loa22

برای بررسی چارچوب صحیح باز خوانش (ORF) از سرور Expasy استفاده شد. از میان انواع قالب ORF شناسایی شده، قالب ۱۹۵ آمینواسیدی (5'-3' Frame 1)، قالب کامل و در برگیرنده تمام طول پروتئین Loa22 بود.

بررسی سیگنال پپتید در ساختار پروتئین Loa22

با استفاده از سرور آنالین SMART و ابزار SignalP، حضور سیگنال پپتید در انتهای آمینی توالی مورد نظر نشان داده شد. جایگاه برشی توالی سیگنال بین آمینواسیدهای Cys²⁴ و Ser²⁵ پیش‌بینی شد (شکل الف).

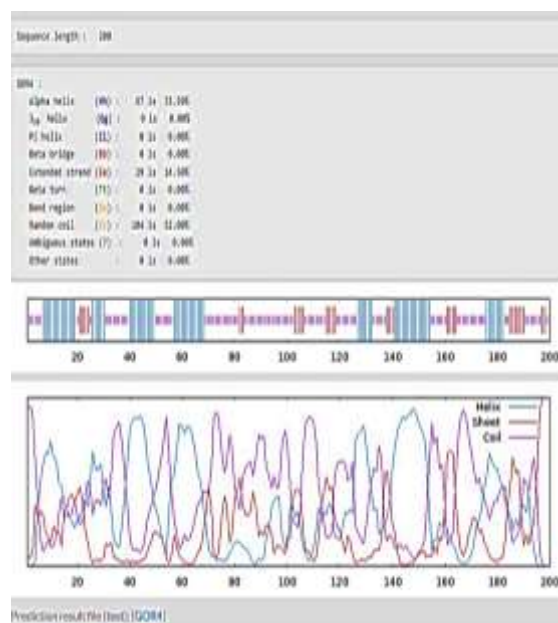


سرور IEDB با IC50 کمتر از ۲۰۰ شمار متعددی از اپی‌توپ‌های سلولهای T مربوط به MHC-I پیش‌بینی شد.

در میان سوپرتایپ‌های سرور NetCTL، سوپرتایپ‌های A1، B7 و B8 و سپس B62 و B58 بیشترین قابلیت انطباق با پپتیدهای پیش‌بینی شده در ساختار پروتئین Loa22 را داشتند. در این میان و بر اساس مقادیر امتیاز مجموع پپتیدهای پیش‌بینی شده، هجده پپتید با حد آستانه بیش از یک شناسایی شد که توالی پپتیدی DAKNRRVTF (آمینواسیدهای ۱۸۸-۱۸۰) با عدد ۱/۸۰ ایمونوژن‌ترین پپتید پیش‌بینی شده بود. همچنین توالی پپتیدی FRFATSAPQ با عدد ۱/۵۳ (آمینواسیدهای ۱۹۷-۱۸۹)، توالی FRYPDGLTR با عدد ۱/۴۲ (آمینواسیدهای ۷۹-۷۱)، توالی LTRPGFSY با عدد ۱/۴۰ (آمینواسیدهای ۸۵-۷۷) و توالی YSELRANAV با عدد ۱/۲ (آمینواسیدهای ۱۴۹-۱۴۱) محتمل‌ترین اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده بودند.

از سوی دیگر، نتایج سرور IEDB از اپی‌توپ‌های سلولهای T برای آلل‌های مربوط به MHC-I بر اساس فراوانی آلل‌های منطبق بر توالی پپتیدی پیش‌بینی شده؛ اپی‌توپ‌های FTLCSAEK با انطباق با ۸ سوپرتایپ و FATSAPQQL، FSFTLCSA و FRFATSAPQ هر کدام با ۷ سوپرتایپ و YSELRANAV و FRYPDGLTR نیز هر کدام با ۶ سوپرتایپ بیشترین تعداد انطباق را داشتند.

بررسی اپی‌توپ‌های سلولهای T برای لوکوس HLA-DRB متصل شونده به مولکول‌های MHC-II در ساختار پروتئین Loa22 ۳۰ پپتید با مقادیر IC50 کمتر از ۲۰۰ با استفاده از سرور IEDB شناسایی شد که در این میان هسته اپی‌توپیک VKKILNLIL در شش موقعیت متفاوت در بازه توالی پپتیدی ۱۵-۱ بیشتر احتمال اتصال به آلل‌های MHC-II (HLA-DRB1,4,5,8) را داشت. همچنین هسته YSELRANAV با شش موقعیت متفاوت در



شکل ۲. پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین Loa22 با استفاده از سرور GOR4

پیش‌بینی ساختار سه بعدی

بهترین مدل پیش‌بینی شده از ساختار سه بعدی پروتئین هدف با استفاده از سرور alphafold پس از محاسبات و آنالیز داده‌های سرور Dali، بیشترین تشابه را با ساختارهای کریستالوگرافی شده پروتئین‌های خانواده OMP نشان داد که پروتئین Loa22 نیز عضوی از این خانواده پروتئینی می‌باشد (شکل ۳).

تعیین محل و نحوه قرارگیری پروتئین Loa22 در ساختار غشاء

نتایج محاسبات سرور DeepTMHMM، از موقعیت و نحوه قرارگیری این پروتئین در غشاء لپتوسپیرا، پروتئین Loa22 بصورت کامل خارج غشایی و فاقد مارپیچ گذرنده از عرض غشاء پیش‌بینی شد. همچنین این سرور، یک سیگنال پپتید در انتهای آمینی (آمینواسیدهای ۱-۲۴) پیش‌بینی کرد (شکل ۱ب).

بررسی اپی‌توپ‌های سلولهای T در ساختار پروتئین Loa22

براساس نتایج سرور NetCTL با حد آستانه ۰/۵ و بر اساس امتیاز مجموع (Combination Score) و نتایج

بازه آمینواسیدهای ۱۵۰-۱۳۶، هسته LILGAI AF نیز در شش موقعیت مختلف در بازه پپتیدی ۲۱-۷ و هسته FRFATSAPQ در سه موقعیت مختلف در بازه آمینواسیدهای ۲۰۰-۱۸۴ با بیشترین احتمال امکان قرارگیری در شیار آلل‌های مختلف MHC-II را داشتند (جدول ۱).

در مجموع توالی‌های پپتیدی پیش‌بینی شده، ۱۷ توالی مشترک با امکان تطابق و قرارگیری در شیار HLA های هر دو کلاس MHC یافت شد که با یک بررسی سخت‌گیرانه‌تر، بر اساس امتیاز مجموع و فراوانی آلل‌های انطباق یافته، توالی‌های پپتیدی FRFATSAPQ، YSELRANAV، FRYPDGLTR و RRVTFRAFAT با بیشترین احتمال حضور داشتند. محتمل‌ترین سوپرتایپ برای هر یک از این پپتیدهای پیش‌بینی شده در جدول به همراه امتیازات مربوط به آن آورده شده است.

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی سلولهای B در ساختار پروتئین Loa22 نتایج پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی سلولهای B در ساختار پروتئین Loa22 با استفاده از سرور BepiPred-3.0 در مجموع ۵ توالی پپتیدی (به استثناء اپی‌توپ پیش‌بینی شده در ناحیه سیگنال پپتید) را بعنوان توالی اپی‌توپیک نشان داد (جدول ۲).

همچنین بر اساس پیش‌بینی، آمینواسیدها با بیشترین احتمال درگیری در میانکنش اپی‌توپ‌های خطی با سلولهای B به رنگ زرد و در رده بعدی به رنگ نارنجی و به همین ترتیب آمینواسیدهای کمتر موثر با رنگ بنفش در شکل ۴ نمایش داده شده‌اند. در گراف بدست آمده از سرور DiscoTope - 3.0 بر اساس ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده با استفاده از سرور alphafold برای پروتئین Loa22 مناطق سبز رنگ اپی‌توپ‌های فضایی پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد. (شکل ۵ و جدول ۲).

تعیین آنتی‌ژن‌سیته، توکسیسیته و آلرژن بودن پروتئین

بر اساس پیش‌بینی سرور Vaxigen این پروتئین خاصیت تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی را داشته و آنتی‌ژن‌سیته این پروتئین را ۰/۸۰۲۶ پیش‌بینی کرد که به میزان دو برابر بیشتر از حد آستانه تعیین شده (۰/۴) برای مدل‌های باکتریایی بود.

از آنجائی که سازه ایمنی‌زا اگر آلرژیک باشد، ممکن است باعث ایجاد واکنش‌های ایمنی متقاطع خاص آلرژن مانند تحریک و التهابات پوستی و مخاطی در بدن میزبان شود. بنابراین پروتئین Loa22 قبل و بعد از بهینه‌سازی با استفاده از هر دو سرور AllerTOP و AllergenFP مورد بررسی و نتیجه هر دو ارزیابی، این پروتئین را فاقد ویژگی‌های آلرژیک پیش‌بینی کردند. همچنین بر اساس پیش‌بینی سرور Toxinpred به لحاظ سمیت و توکسیسیته، بی‌خطر گزارش شد (جدول ۳).

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی آنتی ژن و حالیت

خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین Loa22 در سرور ProtParam قبل و بعد از بهینه‌سازی بررسی شد. وزن مولکولی قطعه مورد نظر قبل از بهینه‌سازی حدود ۲۲ kDa، نقطه ایزوالکتریک حدود ۸/۹ و نیمه عمر تخمین زده شده در سیستم پروکاریوتی تنها حدود ۳ دقیقه بود که در دسته پروتئین‌های ناپایدار قرار می‌گیرد. اما پس از بهینه‌سازی و حذف توالی سیگنال وزن مولکولی به حدود ۱۹/۲ kDa (۱۷۳ آمینواسید) و نقطه ایزوالکتریک ۶ و نیمه عمر تخمین زده شده در سیستم پروکاریوتی به حدود ۱۰ ساعت تغییر کرد که در این حالت پروتئین پایدار بشمار می‌آید (جدول ۳). ترجمه معکوس، تعیین جایگاه‌های برشی و بهینه‌سازی کدون بر اساس مطالعات فیلوژنی پیشین و همترازی توالی‌های مورد مطالعه، توالی نهایی با حداکثر انطباق با سروواری بومی لپتوسپیرا و پس از حذف توالی



جدول ۱. بررسی و مقایسه پپتیدهای برتر MHC-I، پیش‌بینی شده با سرور IEDB و NetCTL و اشتراک با MHC-II

ردیف	پپتید	شروع	پایان	MHC-I IEDB	IC50	MHC-I NetCTL	امتیاز	MHC-II	IC50
1	FRFATSAPQ	189	197	HLA-C*03:03	9.4	HLA-B27	1.54	HLA-DRB5*01:01	18.00
2	ATSAPQQLL	192	200	HLA-C*03:03	5.6	HLA-A1	0.65	--	--
3	FATSAPQQL	191	199	HLA-C*12:03	1.3	HLA-B39	0.69	HLA-DRB1*07:01	18.00
4	FRYPDGLTR	71	79	HLA-C*03:03	10.2	HLA-B27	1.42	HLA-DRB5*01:01	27.00
5	LTRPGFSYK	77	85	HLA-A*30:01	4.8	HLA-A3	1.46	--	--
6	LILLGAIAF	12	20	HLA-C*03:03	30.7	HLA-B62	1.23	HLA-DRB1*01:01	9.00
7	GAIAFSFTL	16	24	HLA-C*03:03	4.7	HLA-A2	0.93	--	--
8	FSFTLCSSA	20	28	HLA-C*12:03	7.5	HLA-A2	0.54	HLA-DRB5*01:01	65.00
9	FTLCSSAEK	22	30	HLA-C*03:03	4.8	HLA-A3	1.21	HLA-DRB5*01:01	59.00
10	IADSLNEKL	60	68	HLA-C*12:03	7.1	HLA-A1	0.62	--	--
11	HTDAIGPEQ	122	130	HLA-C*12:03	7.8	HLA-A1	1.00	--	--
12	YSELRANAV	141	149	HLA-C*15:02	9.0	HLA-B8	1.20	HLA-DRB1*01:01	6.00
13	LGLPDSYAL	109	117	HLA-C*03:03	5.8	HLA-B39	0.59	--	--
14	DAKNRRVTF	181	189	HLA-C*12:03	5.6	HLA-B8	1.80	--	--
15	NRRVTFRFA	184	192	HLA-C*12:03	19.3	--	--	--	--
16	RRVTFRFAT	185	193	HLA-C*12:03	32.3	HLA-B27	1.46	HLA-DRB1*07:01	152.0
17	NRNVDVNSP	49	57	HLA-C*07:03	3.7	--	--	--	--
18	NVDVNSPEA	51	59	HLA-C*12:03	4.8	--	--	--	--
19	FSYKKADVT	82	90	HLA-C*03:03	6.4	--	--	--	--
20	SAEKKEESA	27	35	HLA-C*12:03	6.6	--	--	--	--

جدول ۲. اپی‌توپ‌های خطی و فضایی پیش‌بینی شده در ساختار پروتئین Loa22 با استفاده از سرور BepiPred

نوع اپی‌توپ	شروع	پایان	پپتید	امتیاز	طول پپتید
خطی	۲۷	۶۱	SAEKKEESAAPEPSTQEQSAAANRNVDVNSPEAIA	۰٫۲۷۵	۳۵
	۶۸	۷۷	LKDFRYPDGL	۰٫۲۷۷	۱۰
	۱۲۶	۱۳۹	IGPEQAEGAKKGNI	۰٫۲۹۱	۱۴
	۱۷۴	۱۸۲	VSGLDKDA	۰٫۲۸۸	۹
	۱۹۴	۱۹۸	SAPQQ	۰٫۲۵۷	۴
فضایی	۲۵	۵۷	CSSAEKKEESAAPEPSTQEQSAAANRNVDVNSP	۰٫۸۷۵	۳۶
	۷۵	۸۷	DGLTRPGFSYKKA	۰٫۵۲۷	۱۳
	۱۰۹	۱۱۴	GKLPDS	۰٫۶۴۴	۶
	۱۲۵	۱۳۸	DAIGPEQAEGAKKG	۰٫۷۰۵	۱۴
	۱۷۷	۱۸۱	LDKAD	۰٫۵۳۸	۵
	۱۹۴	۲۰۰	SAPQQLE	۰٫۷۰۳	۷

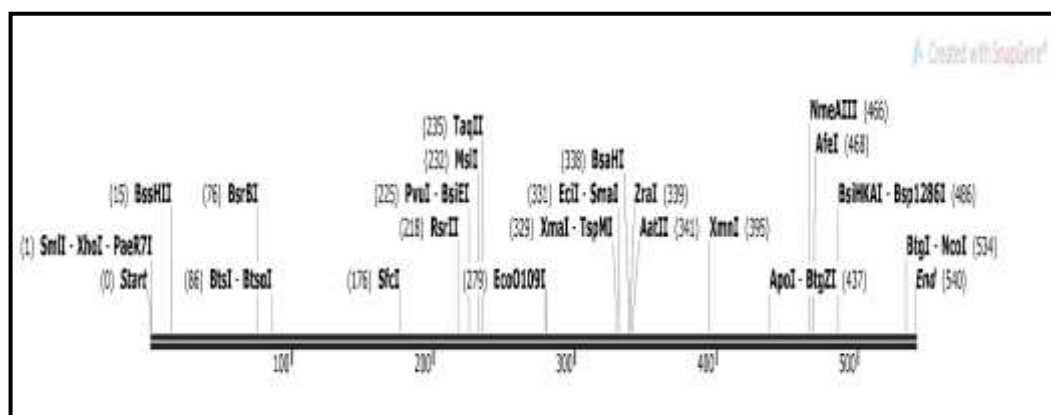


جدول ۳. بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، آنتی ژنیسیته، توکسیسیته و آلرژنیسیته پروتئین Loa22 قبل و بعد از بهینه سازی

ویژگی ها	پروتئین اصلی Loa22	پروتئین Loa22 بهینه شده
طول توالی آمینواسیدی	۲۰۰	۱۸۰
وزن مولکولی	~۲۱/۶	~۱۹/۲
نیمه عمر در باکتری E.coli	۳ دقیقه	حدود ۱۰ ساعت
نقطه ایزوالکتریک	۸/۸۸	~۶
آلرژنیسیته (سرور VaxiJen v.2.0)	۰/۷۴۵۶	۰/۸۰۲۶
آنتی ژنیسیته (سرور Aller TOP v.2.0)	Not Allergen	Not Allergen
توکسیسیته	منفی	منفی
حلالیت (سرور Scratch)	0.918793 (محلول)	0.926586 (محلول)



شکل ۵. گراف اپی توپ های فضایی پیش بینی شده با سرور IEDB



شکل ۶. بررسی توالی نهایی ژن loa22 از نظر جایگاه های برشی (540 bp)

بحث

لپتوسپیروز یک بیماری مشترک بین انسان و دام با پیامدهای سلامت جهانی است که توسط سرووارهای بیماریزای لپتوسپیرا ایجاد می شود و تهدیدی قابل توجه برای سلامت عمومی در سراسر جهان است (Hidalgo et al., 2020). تمرکز بر توسعه روش های تشخیصی سریع برای تسهیل تشخیص زود هنگام بیماری و توسعه واکسنی جهانی مسائل کلیدی اصلی برای فائق شدن بر بسیاری از جنبه های زیان آور بیماری لپتوسپیروز هستند. پروتئین های غشای خارجی (OMPs) لپتوسپیرا، اعضای خانواده ی بزرگی از پروتئین ها هستند که ارتباط مستقیمی با بیماریزایی دارند، بطوریکه می توانند نقش مهمی را در اتصال، عفونت اولیه و در نتیجه ایجاد بیماری ایفا کنند (Haake and Zückert, 2015).

یکی از لیوپروتئین های غشاء خارجی در لپتوسپیراهای بیماریزا Loa22 است که اولین بار توسط محققان ژاپنی شناسایی شد (Koizumi and Watanabe, 2003) و در ادامه نقش آن در بیماریزایی لپتوسپیرا با استفاده از سویه موتانت loa22 که از طریق موتاژن تصادفی ترانسپوزون Himar 1 ایجاد شد، نشان داده شد (Ristow et al., 2007).

این تحقیق با هدف مطالعه ویژگی های ساختاری و عملکردی پروتئین Loa22، ارزیابی پتانسیل آن به عنوان یک واکسن کاندید بر علیه لپتوسپیروز با استفاده از ابزارها و پایگاه های اطلاعاتی بیوانفورماتیک و مطالعات ایمونوانفورماتیک و در نهایت، بهینه سازی توالی آن جهت بیان مطلوب در میزبان E.coli انجام شد.

ابزارهای تجزیه و تحلیل توالی مانند BLAST را می توان برای شناسایی پروتئین های همولوگ با ساختارها یا عملکردهای شناخته شده مورد استفاده قرار داد و بینش هایی را در مورد مناطق حفاظت شده ارائه کرد که ممکن

است به عنوان اپی توپ های بالقوه عمل کنند. برای تحقق اهداف مطالعه، ۳۶ توالی آمینواسیدی مربوط به پروتئین Loa22 از سرووارهای بیماریزای بومی و غیر بومی لپتوسپیرا مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس آنالیز همترازی چندگانه (Multiple alignment)، تشابه توالی در سطح آمینواسیدی، بین ۹۸-۱۰۰ درصد در میان تمامی سرووارها گزارش شد که نشان می دهد، مطابق با مطالعات پیشین، توالی Loa22 بسیار حفاظت شده است (Yan et al., 2010, Mohammadi et al., 2022). تفاوت در میان سرووارهای کرشتری با دیگر سرووارهای بیماریزای مورد مطالعه تنها مربوط به تغییر در سه آمینواسید در طول توالی Loa22 بود. دو آمینواسید غیرقطبی آلانین (Ala⁸⁷) و والین (Val¹⁶⁵) در سرووارهای گریپوتیفوزا بترتیب جایگزین دو آمینواسید غیرقطبی پرولین (Pro⁸⁷) و آلانین (Ala¹⁶⁵) و آمینواسید غیرقطبی آلانین (Ala³⁷) در سرووارهای گریپوتیفوزا جایگزین آمینواسید قطبی ترئونین (Thr³⁷) در میان دیگر سرووارهای شده که در مجموع تغییر قابل ملاحظه ای در شکل فضایی و اپی توپ های پیش بینی شده در ساختار پروتئین Loa22 ایجاد نکرده است.

بر اساس مطالعات بیوانفورماتیک، نتایج پیش بینی ساختمان و ساختار پروتئین Loa22، با نتایج مطالعات میکروسکوپ الکترونی، اتمی و کانفوکال از موقعیت و نحوه قرارگیری این پروتئین در غشاء لپتوسپیرا منطبق بود (Hsu et al., 2021) و این پروتئین دارای یک توالی سیگنال می باشد (Balamurugan et al., 2021). در این مطالعه، با استفاده از سرور آنلاین SignalP موقعیت قرارگیری پروتئین Loa22 بصورت خارج غشایی پیش بینی شد و همچنین بر اساس پیش بینی این سرور و نیز سرور TMHMM، یک توالی سیگنال در انتهای آمینی با جایگاه برش بین آمینواسیدهای Cys²⁴ و Ser²⁵ حضور



دارد. بر اساس مطالعات پیشین، پروتئین Loa22، یک لیپید اصلاح شده متصل به آمینواسید Cys²¹ و یک جایگاه برش در بین آمینواسیدهای ۲۱ و ۲۰ برای حذف سیگنال پپتید و ایجاد لیپوپروتئین بالغ دارد که با همترازی توالی این پروتئین در این مطالعات، آمینواسیدهای جایگاه برش، یکسان و بر هم منطبق بودند (Kaur et al., 2014, Hsu et al., 2021).

همچنین بر اساس پیش‌بینی، حذف توالی سیگنال از توالی پروتئین Loa22، منجر به یک پروتئین بالغ با حلالیت بیشتر می‌شود که همسو با مطالعات تجربی، از این نظر حمایت می‌کند که پروتئین بالغ، بدون پپتید سیگنال، در بخش محلول باقی می‌ماند (Zhang et al., 2010, Gharakhani et al., 2022). بهترین حالت بیان پروتئین در میزبان E.coli بصورت محلول می‌باشد که در ادامه نیاز به مراحل محلول سازی نباشد. بیان پروتئین‌ها به صورت محلول در اشرشیاکلی نقطه عطفی در تولید پروتئین است (Clark and Pazdernik, 2016).

ارزیابی سایر ویژگی‌های پروتئین Loa22، بر اساس تجزیه و تحلیل فیزیکوشیمیایی، مدل‌سازی همسانی و یافته‌های حاصل از مطالعات فیلوژنتیک، نشان داد که توالی بهینه شده این پروتئین، بقاء و پایداری بیشتری نسبت به توالی اصلی آن داشت، بطوریکه پس از بهینه سازی توالی، پایداری و نیمه عمر آن در میزبان پستاندار و E.coli افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان داد.

ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده برای پروتئین Loa22، بر اساس نتایج بدست آمده با استفاده از سرور Dali، بیشترین تشابه با ساختارهای کریستالوگرافی شده پروتئین‌های خانواده OMP در باکتری‌های دیگر مانند E.coli بوده که این پروتئین نیز عضوی از این خانواده می‌باشد. البته درصد تشابه پروتئینی بدلیل تفاوت آمینواسیدها، حدود ۳۰٪ است ولی عدد RMSD حدود

عدد ۲ (گستره ۲-۰ ایده آل است) بود که عدد قابل قبولی می‌باشد و عدد Z در بهترین حالت حدود ۱۴ بود که به دلیل وجود دنباله‌ای در انتهای آمینی این پروتئین است که ساختار آن قابل پیش‌بینی نبوده و تقریباً با هیچ ساختاری منطبق نمی‌شود. این موضوع نیز به این دلیل که در کریستالوگرافی اشعه X، یک چنین دنباله‌های طولی، بدلیل نوسان بالا، اصولاً در تعیین ساختار نمی‌گنجد.

بر اساس مطالعات ایمونوفورماتیک، پروتئین Loa22 آنتی‌ژنیسیته بالایی داشته و در عین حال غیر توکسیک و فاقد ویژگی‌های آلرژیک بود که مجموع این ویژگی‌ها، آن را بعنوان کاندید مناسبی برای طراحی واکسن مطرح می‌کند. هدف نهایی واکسیناسیون در برابر بیماری‌های عفونی ایجاد یک پاسخ حافظه ایمونولوژیک موثر طولانی مدت متشکل از حافظه اختصاصی آنتی ژن T (ایمنی سلولی) و سلول‌های B (ایمنی هومورال) است (Grassmann et al., 2017). عفونت با لپتوسپیرو عمدتاً منجر به تولید آنتی‌بادیهای اختصاصی توسط سلول B می‌شود (Adler and Faine, 1977). از آنجا که سلولهای T در هر دو پاسخ ایمنی همورال و سلولی نقش دارند؛ لذا حضور اپی‌توپهای سلول B و اپی‌توپهای سلول T کمکی در میان توالی یک پروتئین می‌تواند موجب تحریک هر دو ایمنی سلولی و در نهایت افزایش ایمنی شود. بنابراین در این مطالعه پیشگویی اپی‌توپهای سلولهای B و T به صورت تواماً انجام شد.

الگوریتم‌های مختلفی مانند روش‌های مبتنی بر BepiPred، ABCpred و SVM می‌توانند اپی‌توپ‌های سلول B را بر اساس ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی یا الگوهای توالی پیش‌بینی کنند. الگوریتم‌های پیش‌بینی اپی‌توپ سلول T مانند NetMHCpan یا NetCTLpan



می‌توانند پپتیدهای بالقوه اتصال MHC کلاس I یا II را شناسایی کنند که پاسخ‌های ایمنی سلولی را فعال می‌کنند.

پیش تر Xu'ai Lin و همکارانش تاثیر واکسن مولتی اپی‌توپ r4R، متشکل از اپی‌توپ‌های سلول B و T پیش‌بینی شده در توالی پروتئین‌های غشاء بیرونی لپتوسپیرا شامل؛ LipL21 و LipL32، OmpL1 در القا، پاسخ ایمنی بر علیه لپتوسپیرا مورد بررسی و نتایج امیدوار کننده‌ای بدست آورده بودند (Lin et al., 2016). در ایران نظیفی و همکاران اپی‌توپ‌های ایمونوژن پروتئین‌های LipL32 و OmpL1 از سرووارهای بیماریزای لپتوسپیرا با قابلیت تحریک هر دو سلول T (MHCI و MHCII) و سلول B را جهت طراحی واکسنی نو ترکیب بر اساس اپی‌توپ‌های کایمیریک با استفاده از ابزار ایمونوآنفورماتیک مورد بررسی قرار دادند (Nazifi et al., 2018).

در مطالعه حاضر با استفاده از سروورهای IEDB و NetCTL و با در نظر گرفتن تمامی احتمالات، بر اساس رتبه صدک و حد آستانه آنها، توالی‌های FRFATSAPQ، YSELRANAV، FTLCSAEK، FRYPDGLTR پپتیدهای پیش‌بینی شده با احتمال بالای انطباق با HLA‌های هر دو کلاس MHC بودند. علاوه بر این، توالی DAKNRRVTF و FTLCSAEK برای انطباق با HLA‌های مربوط به MHC-I و توالی VKKILNLIL و LILLGAIAF نیز محتمل‌ترین پپتیدها برای قرارگیری در شیار MHC-II بودند. ویکتور و همکارانش چهار اپی‌توپ سلول‌های B در توالی پروتئین Loa22 پیش‌بینی کردند که با اپی‌توپهای DAIGPEQAEAGAKKG، MVKKILNLIL، VSGLDAKDA و FTLCSAEKE، پیش‌بینی شده در این مطالعه همپوشانی کامل داشتند (Victor et al., 2015).

در مجموع نتایج بدست آمده از بررسی توالی پروتئین L022، چندین اپی‌توپ شاخص با ضریب اطمینان بالا در هر دو گروه سلول‌های B و T پیش‌بینی شد که در برخی نواحی این اپی‌توپ‌ها همپوشانی داشتند. این نکته از این جهت حائز اهمیت است که در مطالعات دانگ و لین نشان داده شد که ظرفیت بالای القای پاسخ Th-1 در موش‌های BALB/C و تولید IgG2a می‌تواند بدلیل حضور ترکیبی از اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T در دومین‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های LipL41 و OmpL1 باشد (Dong et al., 2008, Lin et al., 2013).

نتیجه‌گیری نهایی

در سال‌های اخیر، بیوانفورماتیک و ایمونوآنفورماتیک به عنوان ابزار قدرتمندی برای طراحی واکسن ظاهر شده‌اند. این رویکردهای محاسباتی انتخاب و بررسی ساختار پروتئین‌های ایمونوژن و نیز غربالگری سریع اپی‌توپ‌های بالقوه موثر را با در نظر گرفتن ایمنی زایی، پروفایل ایمنی و حفاظت‌شدگی آنها در میان سویه‌ها یا گونه‌های مختلف امکان‌پذیر می‌کند. ادغام این فن‌آوری‌ها با اعتبارسنجی تجربی، نویدبخش توسعه واکسن‌های نو ترکیب مبتنی بر پروتئین‌های غشایی و یا واکسنی مرکب از اپی‌توپ‌های ایمونوژن این پروتئین‌ها، مؤثر علیه لپتوسپیروز و در عین حال کاهش زمان و هزینه تحقیقات آزمایشگاهی است.

سپاسگزاری

این مقاله قسمتی از طرح تحقیقاتی ارزیابی ایمنی‌زایی پروتئین‌های سطحی لپتوسپیرا مصوب موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی با کد ۹۶۰۴۵-۱۰۵-۱۸-۱۸-۰۱ و کد اخلاق IR.IAU.RASHT.REC.1402.042 مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان می‌باشد.

تعارض منافع



7. Dellagostin, O. A., Grassmann, A. A., Rizzi, C., Schuch, R. A., Jorge, S., Oliveira, T. L., et al. (2017). Reverse vaccinology: an approach for identifying leptospiral vaccine candidates. *Int J Mol Sci*, 18, 158. <https://doi.org/10.3390/ijms18010158>
8. Dhayabaran, V., Chidambaram, D. & Krishnaswamy, P. R. (2020). Identification of compounds for improved growth of *Leptospira* in culture and isolation. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 96, 114923. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114923>
9. Dong, H., Hu, Y., Xue, F., Sun, D., Ojcius, D. M., Mao, Y., et al. (2008). Characterization of the ompL1 gene of pathogenic *Leptospira* species in China and cross-immunogenicity of the OmpL1 protein. *BMC Microbiol*, 8, 1-12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-223>
10. Fraser, T. & Brown, P. D. (2017). Temperature and Oxidative Stress as Triggers for Virulence Gene Expression in Pathogenic *Leptospira* spp. *Front Microbiol*, 8, 783. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00783>
11. Gharakhani, M., Ghasemi, M. F., Khaki, P., Esmaelizad, M. & Tebianian, M. (2022). Improvement the Expression and Purification of Loa22: A Lipoprotein with OmpA domain from Pathogenic *Leptospira* Serovars. <https://doi.org/10.18502/ijm.v15i5.13873>
12. Grassmann, A. A., Souza, J. D. & McBride, A. J. A. (2017). A universal vaccine against leptospirosis: are we going in the right direction? *Front Immunol*, 8, 256.

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را در این پژوهش شناسایی نکردند.

منابع

1. Adler, B. (2015). Vaccines against leptospirosis. *Leptospira and leptospirosis*, 251-272. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-45059-8_10
2. Adler, B. & Faine, S. (1977). Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. *Infect Immun*, 17, 67-72. <https://doi.org/10.1128/iai.17.1.67-72.1977>
3. Balamurugan, V., Thirumalesh, S., Alamuri, A., SowjanyaKumari, S., Vinod Kumar, K., Linshamol, L., et al. (2021). Evaluation of the diagnostic potential of recombinant leptospiral OMP A-like protein (Loa22) and transmembrane (OmpL37) protein in latex agglutination test for serodiagnosis of leptospirosis in animals. *Lett Appl Microbiol*, 72, 730-740. <https://doi.org/10.1111/lam.13461>
4. Cerqueira, G. M., Souza, N. M., Araújo, E. R., Barros, A. T., Moraes, Z. M., Vasconcellos, S. A., et al. (2011). Development of transcriptional fusions to assess *Leptospira interrogans* promoter activity. *PLoS One*, 6, e17409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017409>
5. Clark, D. P. & Pazdernik, N. J. (2016). *Recombinant Proteins. Biotechnology. Second Edition* ed. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385015-7.00001-6>
6. Clifford, J. N., Høie, M. H., Deleuran, S., Peters, B., Nielsen, M. & Marcatili, P. (2022). BepiPred-3.0: Improved B-cell epitope prediction using protein language models. *Protein Science*, 31, e4497. <https://doi.org/10.1002/pro.4497>



19. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596, 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
20. Kaur, D., Verma, R., Kumar, B., Deka, D. & Agrawal, R. K. (2014). Cloning, Phylogenetic Analysis and Expression of Recombinant LipL41, Loa22 and LipL21 Proteins from *Leptospira interrogans*. *Int J Environ Agric Biotechnol*, 7, 409-420. <http://dx.doi.org/10.5958/2230-732X.2014.01345.X>
21. Koizumi, N. & Watanabe, H. (2003). Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. *FEMS Microbiol Lett*, 226, 215-219. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00619-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00619-0)
22. Lin, M.H., Chang, Y.C., Hsiao, C.D., Huang, S.-H., Wang, M.-S., Ko, Y.-C., et al. (2013). LipL41, a hemin binding protein from *Leptospira santarosai* serovar Shermani. *PLoS One*, 8, e83246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083246>
23. Lin, X. a., Xiao, G., Luo, D., Kong, L., Chen, X., Sun, D., et al. (2016). Chimeric epitope vaccine against *Leptospira interrogans* infection and induced specific immunity in guinea pigs. *BMC Microbiol*, 16, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0852-y>
24. Mohammadi, Y. M., Khaki, P., Bidhendi, S. M. & Nofeli, M. (2022). Evaluation of the Presence of Gene Encoding Loa22 in Pathogenic *Leptospira* Serovars. *Iran J Med Microbiol*, 16(5), 392-398. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00256>
13. Haake, D. A. & Matsunaga, J. (2010). *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. *Molecular microbiology*, 77, 805-814. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07262.x>
14. Haake, D. A. & Zückert, W. R. (2015). The leptospiral outer membrane. *Leptospira and Leptospirosis*, 187-221. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_8
15. Hallgren, J., Tsirigos, K. D., Pedersen, M. D., Almagro Armenteros, J. J., Marcatili, P., Nielsen, H., et al. (2022). DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *BioRxiv*, 2022.04.08.487609. <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>
16. Hidalgo, J., Rodriguez-Vega, G. M. & Arriaga, P. (2020). *Leptospirosis. Evidence-Based Critical Care: A Case Study Approach*. Cham: Springer International Publishing. 10.1007/978-3-030-26710-0_66
17. Hsu, S.H., Chang, M.Y., Lin, S.M., Ko, Y.-C., Chou, L.-F., Tian, Y.-C., et al. (2021). Peptidoglycan mediates *Leptospira* outer membrane protein Loa22 to toll-like receptor 2 for inflammatory interaction: a novel innate immune recognition. *Scientific reports*, 11, 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79662-8>
18. Hsu, S.H. & Yang, C.W. (2022). Insight into the structure, functions, and dynamics of the leptospira outer membrane proteins with the pathogenicity. *Membranes*, 12, 300. <https://doi.org/10.3390/membranes12030300>



- Ave, P., et al. (2007). The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog*, 3, e97. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030097>
29. Victor, A. A. R., Abraham, S., Tennyson, J. & Pradhan, N. (2015). In silico prediction and threading based epitope mapping of OmpA-like outer membrane Leptospiral Lipoprotein Loa22. *Int J Sci Eng Res*, 6, 477-485.
30. Yan, W., Faisal, S. M., McDonough, S. P., Chang, C.-F., Pan, M.-J., Akey, B., et al. (2010). Identification and characterization of OmpA-like proteins as novel vaccine candidates for Leptospirosis. *Vaccine*, 28, 2277-2283. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.12.071>
31. Zhang, Y., Bao, L., Zhu, H., Huang, B. & Zhang, H. (2010). OmpA-like protein Loa22 from *Leptospira interrogans* serovar Lai is cytotoxic to cultured rat renal cells and promotes inflammatory responses. *Acta Biochim Biophys Sin*, 42, 70-79. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmp109>
- <http://dx.doi.org/10.30699/ijmm.16.5.392>
25. Monaris, D., Sbrogio-Almeida, M., Dib, C., Canhamero, T., Souza, G., Vasconcellos, S., et al. (2015). Protective immunity and reduced renal colonization induced by vaccines containing recombinant *Leptospira interrogans* outer membrane proteins and flagellin adjuvant. *Clin Vaccine Immunol*, 22, 965-973. <https://doi.org/10.1128/CVI.00285-15>
26. Nazifi, N., Mousavi, S. M., Moradi, S., Jaydari, A., Jahandar, M. H. & Forouharmehr, A. (2018). In Silico B Cell and T Cell epitopes evaluation of lipL32 and OmpL1 proteins for designing a recombinant multi-epitope vaccine against leptospirosis. *International Journal of Infection*, 5. <https://doi.org/10.5812/iji.63255>
27. Raja, V. & Natarajaseenivasan, K. (2015). Pathogenic, diagnostic and vaccine potential of leptospiral outer membrane proteins (OMPs). *Crit Rev Microbiol*, 41, 1-17. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.787387>
28. Ristow, P., Bourhy, P., McBride, F. W. d. C., Figueira, C. P., Huerre, M.,



In Silico Designing and Optimization of Loa22 Protein in Pathogenic Leptospira Serovars for Use in Recombinant Vaccine

Mehdi Gharakhani¹, Mohammad Faezi Ghasemi², Pejvak khaki^{3*}, Majid Esmaelizad⁴, Majid Tebianian⁵

1. PhD Student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran
2. Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran
3. Associate Professor, Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4. Associate Professor, Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
5. Associate Professor, Department of Immunology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Abstract

Leptospirosis, caused by pathogenic *Leptospira* species, is a globally prevalent zoonotic disease with significant public health implications. Developing an effective vaccine against leptospirosis remains a challenge due to the complex nature of the pathogen and its outer membrane proteins (OMPs). The outer membrane protein Loa22 has been proposed as a potential vaccine due to its immunogenic properties. The study aims to explore the application of bioinformatics and immunoinformatics in studying the Loa22 protein, elucidating its structural and functional characteristics, and assessing its potential as a vaccine candidate for leptospirosis. Based on the findings of multiple sequence alignment, Loa22 protein showed more than 99% convergence in different strains of pathogenic leptospira. The evaluation of different features of this protein showed it to be an immunogenic, non-toxic, and non-allergenic antigen that can induce immune responses against *Leptospira* infection. Also, based on the predictions, it was shown that Loa22 protein is a stable structure, soluble, and has antigenic areas of T and B cell epitopes, which are conserved in all pathogenic serovars and can be used in the design of the recombinant vaccine or the use of its immunogenic epitopes in the combination with the immunogen epitopes of other conserved proteins of *Leptospira* outer membrane should be used in the design of multi-epitope vaccine.

Keywords: Leptospirosis, Leptospira, Protein Loa22, Bioinformatics, Immunoinformatics

*Corresponding author: Pejvak khaki

Address: Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
E. mail: khakipejvak53@gmail.com

