

DOI: 10.22034/AS.2021.25513.1424

طراحی واکسن پلی‌توپیک علیه انگل اکینوкокوس گرانولوزوس برای میزبان اصلی و واسط

محمد مصطفی پورسیف^۱، غلامعلی مقدم*^۲، حسین دقیق کیا^۲ و احمد نعمت الهی^۳

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵

^۱ دانش آموخته دکتری گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۲ استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۳ استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

*مسئول مکاتبه: Email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: انگل اکینوкокوس گرانولوزوس عامل بیماری زئونوتیک کیست هیداتیک است که در بسیاری از واحدهای دامپروری و بویژه در مناطق روستایی و حومه شهرها به لحاظ اپیدمیولوژی در وضعیت اندمیک شیوع قرار دارد. میزبان‌های طبیعی این پاتوژن انگلی به طور عمده سگ (به عنوان میزبان اصلی)، گوسفند و انسان (به عنوان میزبان واسط) هستند. امروزه کنترل و پیشگیری این بیماری عمدتاً محدود به اجرای برنامه‌های آموزشی، نظارتی و مدیریتی در مزارع دامپروری و کشتارگاه‌ها است. در دهه‌های اخیر به توسعه واکسن‌های پیشگیرانه توجه جدی شده است. هدف از این مطالعه طراحی واکسن با روش‌های بیوانفورماتیکی و علیه پاتوژن چند میزبانه اکینوкокوس گرانولوزوس می‌باشد. روش کار: در این مطالعه از ابزارهای پیشگویی اپی‌توپ مربوط به سیستم ایمنی سلولار و هومورال و نیز نرم افزارها و سرورهای مورد استفاده در مدلینگ ساختار سوم پروتئین‌ها برای طراحی واکسن استفاده خواهد شد. **نتایج:** شاخص‌های ایمونوژنیک مربوط به هر یک از آنتی‌ژن‌های حفاظتی مورد استفاده، در قالب یک سازه واکسن و توسط لینکرهای اختصاصی در کنار هم قرار گرفتند. سپس کدون‌های این سازه واکسن برای بیان در میزبان پروکاریوتی (*Escherichia coli* k12) بهینه گردید. **نتیجه‌گیری نهایی:** در این مطالعه بیوانفورماتیک، اطلاعات کلیدی در خصوص روش شناسی گام به گام طراحی از نو (*de novo*) واکسن علیه بیماری انگلی اکینوкокوس گرانولوزوس ارائه شده است که به نظر می‌رسد قابلیت حفاظت همزمان سگ و گوسفند در برابر این بیماری را داشته باشد.

واژگان کلیدی: اکینوкокوس گرانولوزوس، اپی‌توپ، ایمنی هومورال، ایمنی سلولار، واکسن

مقدمه

ویژه بیماری‌های مشترک انسان و دام (زئونوز) به وقوع می‌پیوندد (اکرت و دیپلازس ۲۰۰۴). بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و دام می‌توانند باکتریایی، ویروسی، قارچی و یا انگلی باشند. از جمله مهمترین

بیماری‌های عفونی انگلی همواره به عنوان مشکلی جدی در واحدهای دامپروری و نیز جمعیت‌های انسانی محسوب شده است. به طوری که درصد بالایی از مرگ و میر دام در واحدهای پرورش دام و نیز مرگ و میر در جوامع بشری به واسطه‌ی بیماری‌های عفونی به

اهمیت بالای این بیماری انگلی را آشکارتر می‌کند (مورو و سانچز ۲۰۰۹). بر اساس گزارش جدید سازمان بهداشت جهانی هزینه کنترل کیست هیداتیک سالانه بیش از ۳ میلیارد دلار آمریکا است، در حالی که شمار موارد آلوده شده به این عفونت انگلی در سراسر دنیا در حال افزایش است (گزارش سازمان بهداشت جهانی ۲۰۱۵).

در حال حاضر پیشگیری و درمان این بیماری عفونی به طور عمده بر پایه‌ی اجرای برنامه‌های آموزشی و نظارتی در خصوص رعایت بهداشت در کشتارگاه‌ها، در نظر گرفتن اصول بهداشتی در ارتباط انسان با حیوانات و استفاده از داروهای ضد انگلی همچون پرازیکوانتل، آلبندازول و مبندازول است (کن ۲۰۰۳). با این حال، مشکل عمده این داروها ایجاد مقاومت دارویی به دنبال مصرف دراز مدت دارو، هزینه‌های مربوط به خوراندن دوره‌ای داروهای ضد انگل مختلف و نیز ماهیت درمانی آن‌ها (نه پیشگیرانه) در مقابله با این عامل عفونی است (ورساچی و همکاران ۲۰۰۴). در موارد انسانی نیز جراحی مهمترین راه حل درمانی است که با مشکلات خاص خود همراه است، که از آن جمله می‌توان به عود مجدد عفونت پس از جراحی و طول دوره درمان اشاره کرد. توسعه درمان‌های پیشگیرانه از قبیل واکسن، موثرترین راهکار برای کنترل این عفونت انگلی خواهد بود. امروزه با پیشرفت ایمونولوژی محاسباتی و شناخت فیزیوایمونولوژی برهمکنش‌های میزبان-پاتوژن، دانشی نوین به نام واکسینومیکس^۴ تعریف و توسعه یافته است. در این شاخه از واکسن شناسی ضمن طراحی این سیلیکو سازه‌های متنوع واکسن، امکان شبیه‌سازی رایانه‌ای و پیشگویی رفتار واکسن‌های مختلف در بدن هر میزبان و نهایتاً تولید واکسن‌های مختص هر فرد فراهم شده است (پولند و همکاران ۲۰۱۷). از این رو توجه به مبارزه

بیماری‌های انگلی می‌توان به کیست هیداتید اشاره کرد که توسط مرحله لاروی انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس^۵ ایجاد می‌شود. بیماری کیست اکینوکوکوسی به وسیله سستوهای آجنس اکینوکوکوس و گونه‌ی گرانولوزوس ایجاد می‌شود (اترو-آباد و تورگنسن ۲۰۱۳). چرخه زندگی^۶ گرانولوزوس به گونه‌ای است که در مراحل مختلف حیات خود نیاز به میزبان‌های مختلفی دارد. چرخه سرایت^۷ گرانولوزوس عمدتاً بین میزبان‌های اصلی (عمدتاً سگ) و میزبان واسط (انسان و حیوانات اهلی به ویژه نشخوارکنندگان) رخ می‌دهد. به طوری که کرم بالغ موجود در روده سگ، تخم انگل‌ها را همراه با مدفوع خود در محیط پراکنده می‌کند و میزبان‌های واسط نیز حین چرای مرتع، تخم‌های میکروسکوپی را می‌بلعد. میزبان اصلی نیز معمولاً با خوردن کبک و ریه آلوده به کیست هیداتید عفونت را دریافت می‌کند. این بیماری ژئوتیک در سراسر جهان پراکندگی دارد و صحرای جنوبی آفریقا، آسیای مرکزی، آمریکای جنوبی و نواحی مدیترانه‌ای از این حیث در وضعیت اندمیک هستند (پورسیف و همکاران ۲۰۱۸a).

مشخصه‌ی مرحله لاروی عفونت (بیماری هیداتید) رشد و توسعه‌ی دراز مدت کیست‌های متاسستود در میزبان‌های واسط به ویژه انسان و دام است. آلودگی با انگل اکینوکوکوس به طور عمده به واسطه^۸ گرانولوزوس و^۹ مولتی‌لوکیولاریس (عامل بیماری کیست هیداتید آلوئولار) ایجاد می‌شود. اگرچه تنها ۱ یا ۲ درصد موارد کیست هیداتیک کشنده هستند اما نگاهی جامع به میزان شیوع و پراکندگی بالای این بیماری عفونی در جمعیت‌های انسانی و حیوانی، هزینه‌های هنگفت اقتصادی تحمیلی بر فعالان حوزه دامپروری و مشکلات اجتماعی-اقتصادی وارد بر جوامع انسانی

^۵Hydatid cyst

^۶*Echinococcus granulosus*

^۷Cestodes

^۴Vaccinomics

میانکنش‌های اپی توپ-پاراتوپ به کار رود (پورسیف و همکاران ۲۰۱۸b).

۱. گرانولوزوس می‌تواند بیش از یک گونه را به عنوان میزبان داشته باشد و در هر میزبان شکل و ساختار متفاوتی به لحاظ مورفولوژیک بوجود آورد (شامل؛ تخم انگل، انکوسفر، پروتواسکولکس و کرم بالغ) و همچنین بیان پروتئین‌های خاص همان مرحله را بروز می‌دهد. سیستم نسبتاً هوشمند فرار این پاتوژن از سیستم ایمنی میزبان نیز از دیگر مشکلاتی است که ضرورت معرفی درمان‌های پیشگیرانه جدید نظیر واکسن‌های ترکیبی چندگانه را بیش از پیش نمایان می‌کند (پورسیف و همکاران ۲۰۲۱). به طور کلی، یک واکسن ایده‌آل باید قادر باشد تا از توسعه انکوسفر به کیست هیداتید در میزبان واسط (عمدتاً گوسفند) جلوگیری کند و همچنین از توسعه پروتواسکولکس‌ها به کرم بالغ در روده میزبان اصلی (عمدتاً سگ) پیشگیری کند. با توجه به سیستم نسبتاً سنتی پرورش گوسفند در ایران، در وهله نخست انتخاب استراتژی واکسیناسیون علیه این انگل چند میزبانه شبیه به قرار گرفتن در دوراهی انتخاب به نظر می‌رسد (اسدپور و همکاران ۲۰۱۲؛ پورسیف و همکاران ۲۰۱۲ و پورسیف و همکاران ۲۰۱۳). از طرفی واکسیناسیون گله‌های گوسفند آسان و در دسترس‌تر به نظر می‌رسد. با این حال مسبب اصلی پراکندگی بالای تخم انگل‌ها در مراتع سگ‌های آلوده هستند. یک سگ آلوده می‌تواند روزانه ۲۷۰۰ دام را آلوده کند (کرایگ، مک مانوس و همکاران ۲۰۰۷). با این تفاسیر به نظر می‌رسد واکسیناسیون همزمان سگ‌ها و گوسفندان یک استراتژی منطقی، اقتصادی و موثر باشد. از طرفی انتخاب یک آنتی‌ژن برای مقابله‌ی کارآمد بر علیه مراحل مختلف چرخه زندگی این انگل ممکن است به طور کامل موثر واقع نشود. طراحی واکسنی ترکیبی با استفاده از چندین

پیشگیرانه از طریق اجرای برنامه‌های واکسیناسیون برجسته‌تر از پیش شده است. یکی از اقدامات مقدماتی مهم در ساخت واکسن بر علیه پاتوژن‌های هوشمندی چون ۱. گرانولوزوس این است که متابولیسم و بیولوژی انگل به خوبی مطالعه گردد تا امکان انتخاب آنتی‌ژن‌های مهم و حیاتی برای طراحی واکسن فراهم گردد. آنتی‌ژن‌های متنوعی تاکنون برای ساخت واکسن‌های یک یا دوگانه (بر علیه انگل ۱. گرانولوزوس معرفی و مورد استفاده قرار گرفته‌اند و کارایی این آنتی‌ژن‌ها بر روی حیوانات مدل و نه میزبان‌های طبیعی این بیماری یعنی سگ و گوسفند، مورد بررسی قرار گرفته است (ما و همکاران ۲۰۱۳). در طراحی واکسن‌های چند اپی توپی عمدتاً از اپی توپ‌های مربوط به آنتی‌ژن‌های مختلف استفاده می‌شود که توسط لینکرهای (فاصله انداز) آمینواسیدی به یکدیگر متصل می‌شوند (فوناکوشی و هوختریسر ۲۰۰۹). در انتخاب لینکر مابین اپی توپ‌های B و T باید از لینکرهای متشکل از آمینواسیدهای استفاده کرد که با انعطاف پذیری کافی امکان پیش‌مستقل این اپی توپ‌ها را فراهم کند. برای انتخاب لینکر مابین اپی توپ‌های B نیز بهتر است از باقیمانده‌های آمینواسیدی چون گلاستین و سرین استفاده کرد تا احتمال تداخل فضایی اپی توپ‌ها بر روی یکدیگر به حداقل برسد (شاو و همکاران ۲۰۱۱). در میان روش‌های شبیه سازی‌های کامپیوتری، تکنیک داکینگ مولکولی با پیشگویی جهت گیری و ارتباطات فضایی دو مولکول نسبت به یکدیگر امکان تشکیل کمپلکس‌های پایدار را بررسی و تمایل اتصال این دو مولکول در موقعیت فضایی مناسب را بصورت انرژی میانکش گزارش می‌کند (کیچن و همکاران ۲۰۰۴). در فرآیند طراحی واکسن، این تکنیک می‌تواند برای نمایش ارتباطات اپی توپ و مولکول‌های MHC و نیز

آنتی‌ژن حفاظتی که برگرفته از مراحل مختلف چرخه زندگی انگل استخراج شده باشند (شامل EG95، P29، فریتین و Eg14-3-3) و نیز قابلیت پوشش جمعیت‌های مختلف در نواحی مختلف جغرافیایی را داشته باشد راهکار ایده‌آلی به نظر می‌رسد (شای و همکاران ۲۰۰۹، لی و همکاران ۲۰۱۲). در پژوهش حاضر هدف کلی این است که با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک، واکسنی پلی‌توپیک متشکل از دو آنتی‌ژن حفاظتی (EG95 و Eg14-3-3) طراحی گردد که قابلیت مبارزه پیشگیرانه علیه عفونت اکینوкок را در هر دو همزمان اصلی (سگ) و واسط (گوسفند) داشته باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از دو آنتی‌ژن EG95 (GenBank: AEA09024) و Eg14-3-3 (GenBank: AMX81438) برای طراحی واکسن استفاده شده است. سپس برخی خصوصیات بیوشیمیایی و ایمونولوژیک مهم در طراحی واکسن مورد پیشگویی قرار گرفتند که عبارتند از: نواحی آگزیز و تغییرات پس ترجمه ای احتمالی که توسط سرور ExPASy شناسایی شدند (<https://www.expasy.org/>)، نواحی ترانس ممبران و سیگنال نشانه که توسط سرور TOPCONS (<http://topcons.cbr.su.se/>) سیرینگوس و همکاران (۲۰۱۵) آنالیز گردید. ساختار سوم آنتی‌ژن‌های EG95 و Eg14-3-3 و نیز MHC آلل‌های مورد استفاده (OLA-DRB1*1202 و DLA-DRB1*01501) در فرآیند داکینگ توسط نرم افزار MODELLER پیشگویی شد (فایزر و سالی ۲۰۰۳). با استفاده از دیتابیس IEDB اپی‌توپ‌های B مورد پیشگویی قرار گرفتند (پارکر و همکاران ۱۹۸۶). برای پیشگویی اپی‌توپ‌های سلول T از تکنیک داکینگ مولکولی (نرم افزار Hex نسخه ۸،۰) استفاده شد. برای داکینگ از نرم افزار Hex ورژن 8.0 استفاده شد (ریچی ۲۰۰۸). نمایش دو بعدی برهم کنش‌های پروتئین-

پروتئین توسط نرم افزار LigPlot+ انجام گرفته است (لاسکوسکی و سویندلز ۲۰۱۱) و برای نمایش سه بعدی ساختارها و نیز برهمکنش‌های بین مولکولی از نرم افزار کایمرا استفاده شده است (Pettersen, Goddard et al. 2004). هر یک از آنتی ژن‌های EG95 و Eg14-3-3 برای انجام داکینگ با MHC آلل‌های عنوان شده، به پپتیدهایی با طول ۱۳ تا ۱۶ آمینواسید تقسیم شدند تا اینکه طی رویه ی داکینگ پروتئین-پپتید برای پیشگویی اپی توپ سلول T بکار گرفته شوند. ویژگی-های بیوشیمیایی سازه واکسن نهایی بر اساس ابزار ProtParam سرور ExPASy انجام گرفت و در آن نقطه ایزوالکتریک فرضی، نیمه عمر سازه درون لوله آزمایشگاهی (*in vitro*) و نیز درون بدن موجود زنده (*in vivo*) شاخص پایداری مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (گستیر و همکاران ۱۹۹۹).

نتایج و بحث

ویژگی‌های بیوشیمیایی ساختار اول آنتی‌ژن‌های

EG95 و Eg14-3-3

در هر یک از آنتی‌ژن‌ها، باقیمانده‌های آمینواسیدی که در آن‌ها تغییرات پس ترجمه ای، ناحیه عبور کننده از غشا (ترانس ممبران)، سیگنال نشانه و نیز نواحی آگزیز پیش بینی گردید در جدول ۱ آورده شده است. هر یک از نواحی آمینواسیدی پیش بینی شده به عنوان ترانس ممبران، سیگنال پپتید، نواحی آگزیز و نیز بخش‌های دارای تغییرات پس ترجمه‌ای در صورتیکه در توالی اولیه آنتی‌ژن‌ها وجود داشته باشد، نباید در طراحی واکسن لحاظ شوند. چرا که سیستم ایمنی قادر به شناسایی این نواحی نخواهد بود (پورسیف و همکاران 2019). آنزیم‌های سیگنال پپتیداز می‌توانند سیگنال نشانه را پس از ترجمه و یا همزمان با فرآیند ترجمه ژن برش دهند و جدا کنند و پروتئین بالغ را بوجود آورند. بنابراین سیگنال پپتید نمی‌تواند در برهمکنش‌های اپی توپ-پاراتوپ شرکت کند (دالبی و هیجن ۲۰۰۲).

Table 1- The biochemical features related to the used antigens that used for the vaccine designing

Biochemical parameters	The predicted residues considering to each antigens	
	Eg95	Eg14-3-3
Hydrophobic sites	85 – 90	169 – 182
Post-translational modifications	62 , 70	238, 233, 68, 3
Transmembrane topology	142 – 162	No
Signal peptide	1 - 22	No

مورد آنتی ژن Eg14-3-3 مقدار DOPE و GA431 به ترتیب ۱۹۱۸۸,۴۳- کیلوکالری بر مول و ۱,۰ بدست آمد. ارزش های بدست آمده برای پروتئین های مدل شده بیانگر کیفیت مطلوب ساختارهای مدل شده است.

ساختار سوم MHC آللهای OLA-DRB1*1202 و DLA-DRB1*01501

ساختمان سوم مربوط به هر یک از آللهای مورد استفاده در طراحی واکسن در شکل ۲ نشان داده است. ارزش DOPE و GA431 مربوط به آلل ۱۲۰۲ به ترتیب ۱۷۵۶۴,۸۲- و ۱,۰ و در مورد آلل ۰۱۵۰۱ به ترتیب ۱۸۲۱۳,۰۶- و ۱,۰ بود. این مقادیر ارزش کیفی نسبتا بالای مدلینگ ساختارهای MHC آلل مذکور را نشان می دهد.

ساختار سوم آنتی ژن EG95 و Eg14-3-3

ساختار سه بعدی مدل شده مربوط به هر یک از آنتی-ژن های EG95 و Eg14-3-3 بصورت نواری و سطحی در شکل ۱ نشان داده است. نرم افزار مدلر دو نوع نمره اعتبار سنجی مدلینگ فراهم می کند به نام DOPE و GA341. دامنه طبیعی ارزش شاخص GA341 بین ۰ تا ۱ است. بطوریکه مقادیر نزدیک به ۱ مربوط به پیش بهتر پروتئین مدل شده است. شاخص DOPE نرمال شده برای هر باقیمانده آمینواسیدی پروفایل انرژی های مربوط به میانکنش های اندروالس و الکترواستاتیک فراهم می کند و در آن مدل با ارزش DOPE منفی بزرگ تر با ثبات تر خواهد بود (پورسیف و همکاران ۲۰۱۷). در مورد آنتی ژن EG95 مقدار DOPE و GA431 به ترتیب ۱۶۶۷۷,۳۸kcal/mol- و ۰,۹۸ بوده است. در

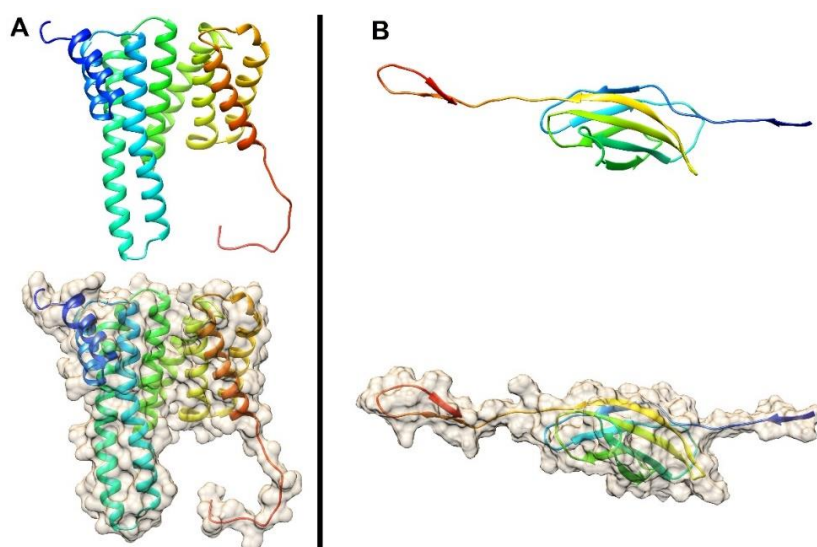


Figure 1- Three dimensional structure of the antigens that used for vaccine designing. A) Tertiary structure of Eg14-3-3 as ribbon (top) and surface (bottom) representation. B) Tertiary structure of EG95 as ribbon (top) and surface (bottom) representation. The structures represented using the Chimera software

سه بعدی در شکل ۳ آورده شده است. در پروتئین EG95 باقیمانده ۳۳ تا ۴۸ با انرژی برهمکنش $-۰.۸۴,۴۲$ کیلوکالری بر مول به عنوان بهترین پپتید به لحاظ برهمکنش با آلل ۱۲۰۲ انتخاب گردید. همچنین در مورد پروتئین Eg14-3-3 باقیمانده آمینواسیدی ۶۰ تا ۷۲ با کمترین انرژی برهمکنش ($-۰.۶۳۰,۸۸$ کیلوکالری بر مول) با مولکول ۰۱۵۰۱ به عنوان اپی توپ نهایی سلول T انتخاب گردید.

دایکینگ مولکولی برای شناسایی اپی توپ‌های سلول T ساختارهای MHC آلل مدل شده (Ovar-DRB1*1202 و DLA-DRB1*01501) که به ترتیب با قطعات ۱۶ آمینواسیدی پروتئین EG95 و ۱۳ آمینواسیدی Eg14-3-3 داک شدند براساس میزان انرژی برهمکنش (ΔG) بدست آمده انتخاب شدند. در این بین پپتیدهایی که کمترین انرژی برهمکنش را با مولکول‌های متناظر MHC خود داشتند انتخاب شدند. نتیجه این برهمکنش پروتئین-پپتید بصورت دو بعدی در شکل ۲ و بصورت

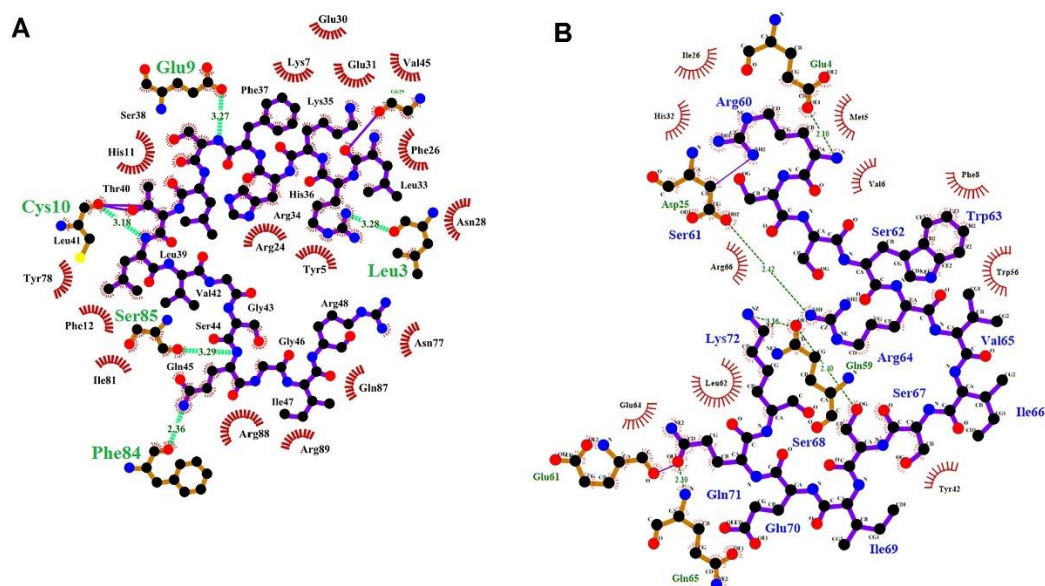


Figure 2- Two dimensional representation of intramolecular interactions between the 1202 and aa 33 to 48 of EG95 (A) and 01501 and aa 60-72 of Eg14-3-3 (B). The LigPlot software was used to plot the images

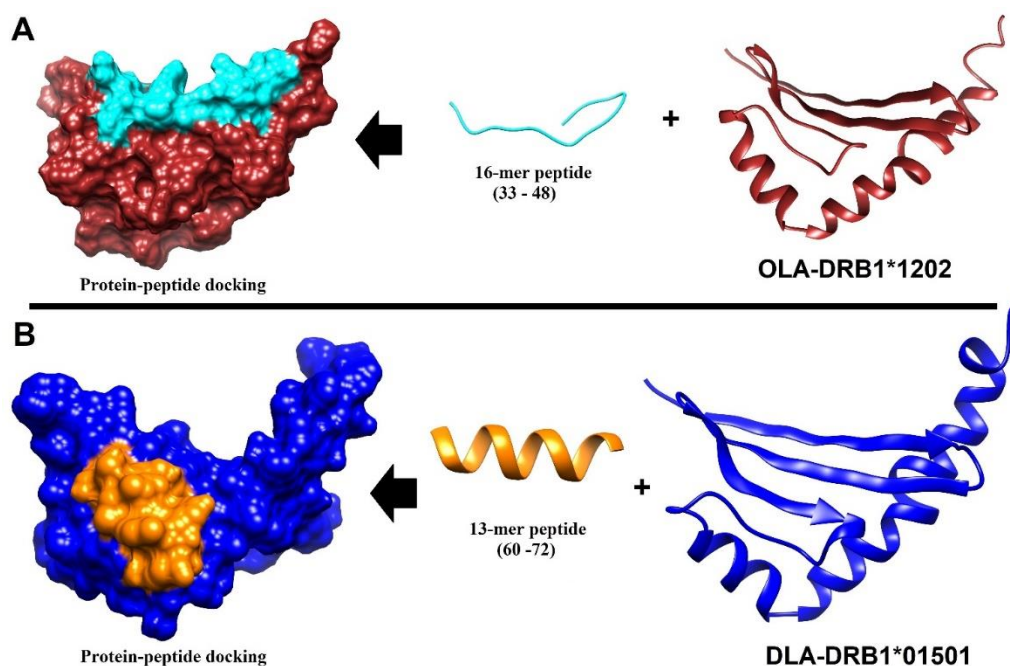


Figure 2- Visualization of the 3D structure of OLA-DRB1*1202 (A) and DLA-DRB1*01501 (B) alleles, and the docking between the MHC and final T cell epitopes

مبنا اپی توپ‌های سلول B نهایی انتخاب شده برای هر آنتی ژن به همراه موقعیت آنها در توالی خطی در جدول ۲ آمده است.

برخی از نواحی پروتئین EG95 که در مطالعه ما به عنوان اپی توپ سلول B شناسایی شدند با اپی توپ‌های شناسایی شده توسط پژوهشگران پیشین همخوانی دارد (ولارد و همکاران ۱۹۹۸).

در گوسفند و همچنین سگ آلوده به اکینوکوکوس گرانولوزوس، پاسخ ایمنی عمدتاً توام با تولید سطوح بالای آنتی‌بادی‌های اختصاصی پاتوژن است (دپلازس و همکاران ۱۹۹۴). بنابراین در اینجا مبنای طراحی واکسن بر پایه اپی توپ‌های سلول B نهاده شده است. با این وجود باید این نکته را در نظر گرفت که سلول‌های T کمک کننده در بسیاری از وظایف کلیدی ایمنی هومورال دخیل هستند و این امر اهمیت وجود اپی توپ‌های T کمک کننده در سازه واکسن را پررنگ تر می‌کند (جانوی و همکاران ۲۰۰۵ و پاترونوف و دایچینووا ۲۰۱۳).

پیشگویی اپی توپ سلول T کمک کننده برای طراحی واکسن علیه عفونت اکینوکوکوس گرانولوزوس با موانع تکنیکال متعددی روبرو است. متأسفانه، در سرورهای پیشگویی کننده کنونی الگوریتمی مربوط به MHC آلل-های سگ و گوسفند تعریف نشده است. بنابراین در این مطالعه برای شناسایی کامپیوتری اپی توپ T کمک کننده به سراغ روش داکینگ مولکولی رفتیم. در مطالعات مشابه پیشین طراحی‌های صورت گرفته یا بر اساس اپی توپ‌های سلول B بوده اند (لی و همکاران ۲۰۱۲، لو و همکاران ۲۰۱۰)، و یا از آلل‌های حیوانات مدل مثل موش برای طراحی واکسن بر مبنای سلول B و T استفاده شده بود (گان و همکاران ۲۰۱۰ و ما و همکاران ۲۰۱۳) که قاعدتاً چنین واکسنی برای میزبان‌های طبیعی این پاتوژن کارایی لازم را نخواهند داشت.

پیشگویی اپی توپ بر پایه سلول‌های B

پیشگویی شاخص‌های آنتی‌ژنیک اختصاصی هر آنتی-ژن هم با استفاده از خصوصیات فیزیکو-شیمیایی و هم بر پایه آموزش ماشین انجام گرفته است و بر همین

Table 2- The Predicted B cell epitopes for the EG95 and Eg14-3-3 antigens

Antigens	Epitopes sequence	Position	Length
EG95	GRGIETKTTESP	21 – 32	12
	YMGEKESTV	131 – 139	9
	KAVNPSDPLAYKQRQAPF	67 – 84	18
Eg14-3-3	LTLWNSDAGDTDAEPPKAD	228 – 247	20
	FCTGDERKQASDNS	135 – 148	14
	RKAFDDAVAELDTLPEESYKD	196 – 216	21

پایداری آن نیز ۳۹/۵۵ محاسبه شد که بیانگر این است که پروتئین مذکور در شرایط آزمایشگاهی تقریباً نیمه پایدار خواهد بود. به طور کلی پروتئینی که شاخص پایداری کوچکتر از ۴۰ داشته باشد و pH ایزوالکتریک آن در محدوده pH خنثی باشد به عنوان پروتئین پایدار در لوله آزمایشگاهی پیش بینی می‌گردد (گستیر و همکاران ۱۹۹۹).

طراحی سازه واکسن ایمونوژنیک و بررسی خصوصیات فیزیکیوشیمیایی آن اپی توپ‌های سلول‌های B و T مربوط به هر یک از آنتی‌ژن‌ها با استفاده از لینکرهای اختصاصی GPSL، آنتی‌ژن‌ها با استفاده از لینکرهای اختصاصی GPSL، EAAAK و GSGS در کنار یکدیگر سازماندهی شدند (شکل ۴). نقطه ایزوالکتریک فرضی سازه واکسن طراحی شده ۹/۶۹ محاسبه شد و شاخص

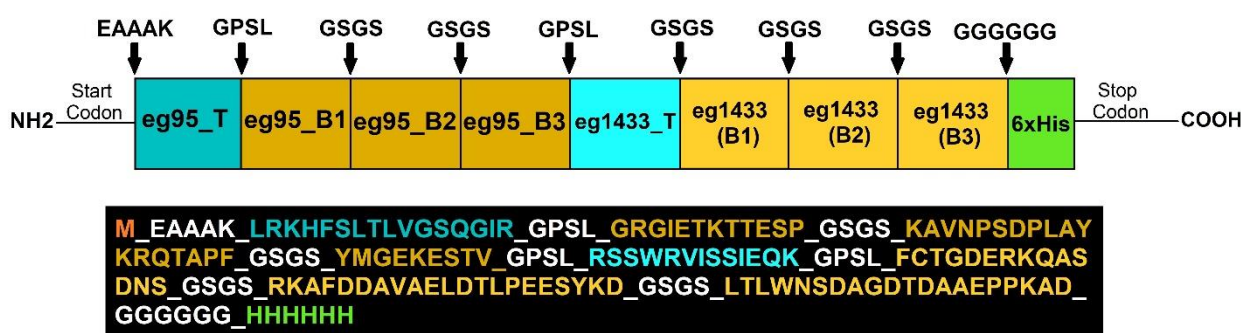


Figure 4- The multi-epitopic vaccine construct that designed based on the EG95 and Eg14-3-3 antigens. B: B-cell epitope; T: T-cell epitope

روی میزبان‌های اصلی این بیماری یعنی سگ و گوسفند مورد آزمایش قرار گیرد تا اثر بخشی احتمالی آن مورد تایید قرار گیرد.

نتیجه گیری

این روش طراحی واکسن می‌تواند نویدبخش تولید سازه‌های واکسن ایمونوژنیک اختصاصی نه تنها علیه انگل اکینوکیوکوس گرانولوزوس باشد، بلکه سایر پاتوژن‌های دارای چرخه زندگی چند مرحله ای نیز

مطالعات بیوانفورماتیک مختلفی طراحی‌های واکسن علیه پاتوژن‌های گوناگون را معرفی کرده اند (کنگ و همکاران ۲۰۱۳ و پرویزپور و همکاران ۲۰۲۰)، در این مطالعه برای نخستین بار طراحی واکسنی دو منظوره برای مبارزه پیشگیرانه علیه اکینوکیوکوس گرانولوزوس را در هر دو میزبان سگ و گوسفند به طور همزمان معرفی می‌کند. با این حال، نیاز است تا سلامت، آلرژی زایی و ایمنی زایی موثر واکسن طراحی شده به روشهای بیوانفورماتیکی، بصورت آزمایشگاهی نیز بر

می‌توانند با این روش به طور همزمان هدف طراحی و تولید واکسن قرار گیرند.

منابع مورد استفاده

- Bethony JM, Cole RN, Guo X, Kamhawi S, Lightowers MW and Loukas A, 2011. Vaccines to combat the neglected tropical diseases. *Immunology Review* 239(6) 237-70.
- Bingham GM, Budke CM, Larrieu E, Del Carpio M, Mujica G and Slater MR, 2014. A community-based study to examine the epidemiology of human cystic echinococcosis in Rio Negro Province, Argentina. *Acta Tropical* 136(4) 81-8.
- Carmena D and Cardona GA, 2014. Echinococcosis in wild carnivorous species: epidemiology, genotypic diversity, and implications for veterinary public health. *Veterinary Parasitology* 202: 69-94.
- Cong H, Zhang M, Zhang Q, Gong J, Cong H, Xin Q and He S, 2013. Analysis of structures and epitopes of surface antigen glycoproteins expressed in bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Biomedical Research International* 89(3)165342.
- Craig PS, McManus DP, Lightowers MW, Chabalgoity JA, Garcia HH, Gavidia CM, Gilman RH, Gonzalez AE, Lorca M, Naquira C, Nieto A, and Schantz PM, 2007. Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infection Diseases* 7(6)385-394.
- Dalbey R and Von Heijne G, 2002. Protein targeting, transport, and translocation, Academic Press.
- Deplazes P, Thompson RC, Constantine CC, and Penhale WJ, 1994. Primary infection of dogs with *Echinococcus granulosus*: systemic and local (Peyer's patches) immune responses. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 40(2) 171-184.
- Eckert J and Deplazes P, 2004. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clinical Microbiology Review* 17(1) 107-135.
- Fiser A and Sali A, 2003. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods in Enzymology* 374: 461-491.
- Funakoshi M and Hochstrasser M, 2009. Small epitope-linker modules for PCR-based C-terminal tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 26(3) 185-92.
- Gan W, Zhao G, Xu H, Wu W, Du W, Huang J, Yu X, and Hu X, 2010. Reverse vaccinology approach identify an *Echinococcus granulosus* tegumental membrane protein enolase as vaccine candidate. *Parasitology Research* 106(4) 873-882.
- Gori A, Longhi R, Peri C and Colombo G, 2013. Peptides for immunological purposes: design, strategies and applications. *Amino Acids* 45: 257-68.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, and Shlomchik M, 2005. Immunobiology: the immune system in health and disease. New York: Garland Science.
- Kern P, 2003. *Echinococcus granulosus* infection: clinical presentation, medical treatment and outcome. *The Archives of Surgery* 388(6) 413-420.
- Kitchen DB, Decornez H, Furr JR and Bajorath J, 2004. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 3(11): 935-49.
- Laskowski RA and Swindells MB, 2011. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling* 51(10) 2778-2786.
- Li YJ, Yang J, Zhao H, Jia HY, Zhang LN, Liu XX, Ma XM, Wen H, and Ding JB, 2012. Bioinformatics prediction of egA31 recombinant antigen epitopes of *Echinococcus granulosus*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 30(1) 78-80.
- Li ZJ, Wang YN, Wang Q, and Zhao W, 2012. *Echinococcus granulosus* 14-3-3 protein: a potential vaccine candidate against challenge with *Echinococcus granulosus* in mice. *Biomedical Environmental Sciences* 25(3) 352-358.
- Lu G, Lu Y, Li L, Wu L, Fan Z, Shi D, Wang H, and Han X, 2010. Identification and bioinformatics analysis of lactate dehydrogenase genes from *Echinococcus granulosus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3(10) 757-761.

- Ma X, Zhou X, Zhu Y, Li Y, Wang H, Mamuti W, Li Y, Wen H, and Ding J, 2013. The prediction of T- and B-combined epitope and tertiary structure of the Eg95 antigen of *Echinococcus granulosus*. *Experimental and Therapeutic Medicine* 6(3) 657-662.
- Moro P and Schantz PM, 2009. Echinococcosis: a review. *International Journal of Infection Diseases* 13(2) 125-133.
- Otero-Abad B and Torgerson PR, 2013. A systematic review of the epidemiology of echinococcosis in domestic and wild animals. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7(6) 2249.
- Parker JM, Guo D, and Hodges RS, 1986. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 25(19) 5425-5432.
- Parvizpour S, Pourseif MM, Razmara J, Rafi MA and Omid Y, 2020. Epitope-based vaccine design: a comprehensive overview of bioinformatics approaches. *Drug Discovery Today* 25(6) 1034-1042.
- Patronov A and Doytchinova I, 2013. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. *Open Biology* 3(1) 120-139.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, and Ferrin TE, 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25(13) 1605-1612.
- Poland GA, Ovsyannikova IG, and Kennedy RB, 2017. Personalized vaccinology: A review. *Vaccine* (In Press).
- Pourseif MM, Moghaddam Gh, Naghili B, Saeedi N, Parvizpour S, Nematollahi A, and Omid Y, 2018. A novel *in silico* minigene vaccine based on CD4(+) T-helper and B-cell epitopes of EG95 isolates for vaccination against cystic echinococcosis. *Computational Biological and Chemistry* 72: 150-163.
- Pourseif MM, Moghaddam Gh, Saeedi N, Barzegari A, Dehghani J, and Omid Y, 2018. Current status and future prospective of vaccine development against *Echinococcus granulosus*. *Biologicals* 51: 1-11.
- Pourseif MM, Moghaddam Gh, Daghighkia H, Nematollahi A, Omid Y, 2018b. A novel B- and helper T-cell epitopes-based prophylactic vaccine against *Echinococcus granulosus*. *BioImpacts* 8(1) 39-52.
- Pourseif MM, Yousefpour M, Aminianfar M, Moghaddam Gh, Nematollahi A, 2019. A multi-method and structure-based *in silico* vaccine designing against *Echinococcus granulosus* through investigating enolase protein. *BioImpacts* 9(3) 131-144.
- Pourseif MM, Moghaddam Gh, Nematollahi A, Khordadmehr M, Naghili B, Dehghani J, Omid Y, 2021. Vaccination with rEGVac elicits immunoprotection against different stages of *Echinococcus granulosus* life cycle: A pilot study. *Acta Tropica* 218: 105883.
- Ritchie DW, 2008. Recent progress and future directions in protein-protein docking. *Current Protein Peptide Science* 9(1) 15-1.
- Reverberi R and Reverberi L, 2007. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfusion* 5(4): 227-240.
- Shao JJ, Wong CK, Lin T, Lee SK, Cong GZ, Sin FW, Du JZ, Gao SD, Liu XT, Cai XP, Xie Y, Chang HY, Liu JX, 2011. Promising multiple-epitope recombinant vaccine against foot-and-mouth disease virus type O in swine. *Clinical and Vaccine Immunology* 18(1) 143-9.
- Shi Z, Wang Y, Li Z, Li Z, Bo Y, Ma R, and Zhao W, 2009. Cloning, expression, and protective immunity in mice of a gene encoding the diagnostic antigen P-29 of *Echinococcus granulosus*. *Biochimica et Biophysica Acta(Shanghai)* 41(1) 79-85.
- Toussaint NC and Kohlbacher O, 2009. Towards in silico design of epitope-based vaccine. *Expert Opinion Drug Discovery* 4(10) 1047-1060.
- Tsirigos KD, Peters C, Shu N, Kall L, and Elofsson A, 2015. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic Acids Research* 43: 401-407.
- Vercruyse J, Knox DP, Schettters TP, and Willadsen P, 2004. Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. *Trends Parasitol* 20(10) 488-492.

- World Health Organization (WHO),2017.Echinococcosis. Available at:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs377/en/>.
- Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD and Hochstrasser DF, 1999. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in Molecular Biology* 112: 531-552.
- Woollard DJ, Gauci CG, Heath DD, and Lightowlers MW, 1998. Epitope specificities and antibody responses to the EG95 hydatid vaccine. *Parasite Immunology* 20(11) 535-540.

Polytopic vaccine designing against *Echinococcus granulosus* for the definitive and intermediate hosts

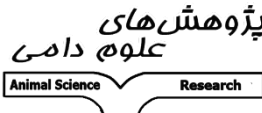

M M Pourseif¹, Gh Moghaddam², H Daghighkia² and A Nematollahi³

Received: February 25, 2018 Accepted: March 6, 2019

¹PhD Graduated Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

 <p>پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Research</p>	<p>Journal of Animal Science/vol.31 No.2/ 2021/pp 15-27 https://animalscience.tabrizu.ac.ir</p>	 <p>OPEN ACCESS</p>
<p>© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/) DOI: 10.22034/AS.2021.25513.1424</p>		

Introduction: The hydatid disease is one of the most important zoonotic parasitic infections worldwide. The main part of *Echinococcus granulosus* life cycle depends upon the growth and differentiation of protoscoleces (PSCs) within the intestine of definitive hosts (Carmena and Cardona 2014). Moreover, the survival of organism is mainly dependent on its indirect transmission cycle from the definitive hosts (particularly dogs) to the intermediate hosts, including sheep and human. According to the latest World Health Organization (WHO) report (March 2017), there may be over one million infected cases with echinococcosis at any time (WHO, 2017). A hydatid cyst (HC) encompasses numerous PSCs and cyst fluid and is formed in visceral organs (liver and lung) of the infected intermediate hosts (Bingham et al. 2014). Morphogenesis of PSCs from the cystic viscera into worm's head occurs on the surface of the small intestine of the definitive host, and then the head-like structure attaches to epithelial lining of the gut and develops into an adult worm within ~50 days (Moro and Schantz 2009). The currently used treatment modalities against echinococcosis, as multi-stage parasitic infection, are based on the anthelmintic drugs such as praziquantel. In this case there is an emergency to improve preventive interventions such as vaccination in addition to hygiene practices. Several constraining factors may influence the vaccine development against such multi-stage pathogens, including economic and socio-cultural issues (Bethony et al. 2011). Thus, it is necessary to implement a rationalized approach towards construction of multipotent vaccines. *In silico* modeling of vaccines provides a cost- and time-effective approach hence improving such development of effective vaccines (Gori et al. 2013). Ideally, a highly effective vaccine construct, should encompass several parts including epitopes of one/more VCAs, B-cells epitope and T-cells epitopes (BEs and TEs, respectively) (Pourseif et al. 2021). Altogether, epitope-based vaccines (EVs) seem to be one of the most effective vaccines. The aim of this study was to design a novel multi-epitope B- and helper T-cell based vaccine construct for immunization of both dog and sheep against this multi-host parasite.

Material and methods: After antigen sequence selection (GenBank: AEA09024 for EG95 and GenBank: AMX81438 for Eg14-3-3), three-dimensional structure of the antigens was modeled and multilaterally validated. The preliminary parameters for B-cell epitope prediction such as probably transmembrane helix, signal peptide, post-translational modifications were implemented. The high ranked B-cell epitopes derived from several online web-servers (e.g., BepiPred v1.0, BcePred, ABCpred, SVMTrip, IEDB algorithms, SEPPA v2.0 and Discotope v2.0) were utilized for multiple sequence alignment and then for engineering the vaccine construct. T-helper based epitopes were predicted by docking between the high frequent Ovar class II allele (Ovar-DRB1*1202) and Dog class II allele (DLA-DRB1*01501) and hexadecamer fragments of the antigens. We formulated the first bi-valent vaccine based on T-helper epitope with high-binding affinity to

sheep and dog MHC alleles by immune-informatics tools. The final vaccine construct was formed by using the molecular spacers and then analyzed for different physicochemical properties.

Results and discussion: The results of different predictor tools showed that there were four and two potential glycosylation sites in Eg14-3-3 and EG95 antigens, respectively. We did not observe any transmembrane topology and signal peptide in the protein sequence of Eg14-3-3 antigen, however a signal peptid residue (aa 1 - 17) and transmembrane fragment (¹⁴⁰-MTSGSALTSALAIAGFVFSCIVVVL-¹⁶²) were observed in EG95 antigens. Based on immune system properties in response to the accessible part of the antigens, but we did not consider the transmembrane and signal peptide regions for epitope prediction. The post-translational modification in Eg14-3-3 (aa 3, 68, 233, and 238) and EG95 (aa 62 and 70) were also filtered during *in silico* epitope mapping. These post translationally modified residues are covered by different types of carbohydrate chains and can not likely interact with the immune system elements (Reverberi and Lorenzo 2007). The modeling quality indices (DOPE score and GA431) of the EG95 antigen respectively were -16677.38 kcal/mol and 0.98. The quality scores for Eg14-3-3 were -19188.43 kcal/mol and 1.0. These values showed that the structure modeling is implemented with high quality. Some of our predicted epitopes of EG95 antigen were previously reported by Woollard et al. (1998) based on the wet-lab epitope mapping methods (Woollard et al. 1998). However, we for the first time predicted and reported the Eg14-3-3-based epitopes. T-cell epitopes of EG95 and Eg14-3-3 (aa 33 – 48 and aa 60 – 72, respectively) were the residues that we predicted by docking-based methods. This type of *in silico* epitope mapping against *E. granulosus* antigens had not previously been reported. The overall processes for establishing such EBVs are as follows: (i) identification and selection of the best antigen from the local and/or global strains, (ii) utilization of bioinformatics tools for *in silico* analysis of different parameters of selected antigen(s), (iii) computational-based epitope prediction, and lastly (iv) linking the epitopes using proper molecular linkers (Toussaint and Kohlbacher 2009).

Conclusion: In this *in silico* study, we represented key data on the step-by-step methodologies used for designing this minigene vaccine. Our findings, can be a promising platform for the production of broadly protective host-specific vaccine against *E. granulosus*.

Keywords: Cellular immunity, *Echinococcus granulosus*, Epitope, Humoral immunity, Vaccine