



Target Mutation of CD80 Protein to Enhance Its Binding to CD28 Receptor

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Pesaran Afsharian N.¹ MSc,
Hajihassan Z.^{*1} PhD,
Ansari-Pour N.¹ PhD

How to cite this article

Pesaran Afsharian N, Hajihassan Z, Ansari-Pour N. Target Mutation of CD80 Protein to Enhance Its Binding to CD28 Receptor. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(1):1-11.

¹Life Science Engineering Department, New Sciences & Technologies Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: New Sciences & Technologies Faculty, North Kargar Street, Next to the Jalale Ale Ahmad Cross-roads, Tehran, Iran. Postal Code: 1439957131
Phone: +98 (21) 86093294
Fax: +98 (21) 88497324
hajihassan@ut.ac.ir

Article History

Received: September 16, 2018
Accepted: September 7, 2019
ePublished: March 14, 2020

ABSTRACT

The CD80 protein, a member of the super-family of immunoglobulin, is a transmembrane protein expressed on the surface of the antigen-presenting cells (APC). This protein has two receptors on the surface of T cells (CTLA-4 and CD28), due to the binding of this protein to these receptors, the inhibitory and stimulatory pathway in the T cells begin, respectively. Naturally, CD80 proteins tend to have more binding affinity to CTLA-4 than CD28, and this is a factor in the extinction of T cells in the immune system in order to prevent autoimmunity. The aim of the present study is to create a variant of the CD80 protein that has an increased binding affinity to CD28 to bind to this receptor more strongly and induce more simulate pathways than the wild type of this protein (primary CD80 protein) in T cells. To identify this variant, first, the ancestral sequence was mutated by R software at positions 31 and 92 with amino acids that play an important role in the formation of hydrogen bonds. The R software output sequences were modeled with the SWISS-MODEL server. Then, each output model was docked with the HADDOCK server; and finally, the electrostatic and van der Waals energies between the receptors and the ligands were calculated. Among all the built-in models, the mutated K31Y, R92F has the best electrostatic and van der Waals energies and has the ability to have a much better connection to its CD28 receptor compared to the ancestral type of CD80.

Keywords Homology Modeling; Mutation; Docking; CD80 Protein

CITATION LINKS

[1] Mechanisms for T cell receptor triggering [2] Understanding the CD28/CTLA-4 (CD152) pathway and its implications for costimulatory blockade [3] Immunoglobulin fold characteristics of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) [4] Anti-CTLA-4 antibody therapy: Immune monitoring during clinical development of a novel immunotherapy [5] Ipilimumab: An anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma [6] Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies: Systematic review and meta-analysis [7] Immune-mediated adverse events of anticytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody therapy in metastatic melanoma [8] Management of side effects of immune checkpoint blockade by anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies in metastatic melanoma [9] SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server [10] UniProt: A hub for protein information [11] UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis [12] HADDOCK: A protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information [13] Identification of protein-protein interfaces implicated in CD80-CD28 costimulatory signaling [14] Protein structure prediction and analysis using the Robetta server [15] R: A language for data analysis and graphics [16] Crystal structure of a soluble CD28-Fab complex [17] Directing evolution: The next revolution in drug discovery? [18] Engineering high-affinity PD-1 variants for optimized immunotherapy and immuno-PET imaging [19] Structure and dynamics of PD-L1 and an ultra-high-affinity PD-1 receptor mutant [20] CD86 variants with improved affinity for CTLA-4 [21] CD80 variant immunomodulatory proteins and uses thereof [22] The future of cancer treatment: Immunomodulation, CARs and combination immunotherapy [23] Directed evolution empowered redesign of natural proteins for the sustainable production of chemicals and pharmaceuticals

جهش‌زایی هدفمند پروتئین CD80 به‌منظور افزایش تمایل اتصال آن به گیرنده CD28

نسا پسران افشاریان MD

گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

زهرا حاجی‌حسن* MD

گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

ناصر انصاری‌پور PhD

گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

پروتئین CD80 به‌عنوان عضوی از ابرخانواده ایمنوگلوبولین‌ها، یک پروتئین تراغشایی است که در سطح سلول‌های ارایه‌کننده آنتی‌ژن (APC) بیان می‌شود. این پروتئین دارای دو گیرنده CTLA-4 و CD28 در سطح سلول‌های T است. بر اثر اتصال این پروتئین به این گیرنده‌ها به ترتیب مسیر مهاری و تحریکی در سلول‌های T آغاز می‌شود. در حالت طبیعی، پروتئین‌های CD80 دارای تمایل اتصال بیشتری به CTLA-4 نسبت به CD28 هستند و این از عوامل خاموش‌کننده سلول‌های T در سیستم ایمنی، به‌منظور جلوگیری از خودایمنی است. هدف از مطالعه حاضر، ایجاد واریانتی از پروتئین CD80 است که دارای تمایل اتصال افزایش‌یافته به CD28 است تا با قدرت بیشتری به این گیرنده متصل شود و مسیرهای تحریکی را بیشتر از نوع وحشی این پروتئین (پروتئین CD80 اولیه) در سلول‌های T القا کند. برای شناسایی این واریانت ابتدا توالی وحشی با کمک محیط برنامه‌نویسی R، در جایگاه‌های ۳۱ و ۹۲ با اسیدهای آمینه‌ای که نقش مهمی در شکل‌گیری پیوندهای هیدروژنی دارند، جهش داده شد. ۱۰۰ توالی خروجی نرم‌افزار R، با سرور SWISS-MODEL مدل‌سازی شدند. سپس مدل‌های خروجی، به‌صورت تک‌تک با سرور HADDOCK داک شدند و در نهایت انرژی‌های اتصال از جمله انرژی‌های الکترواستاتیک و واندروالسی بین گیرنده‌ها و لیگاندها محاسبه شدند. بین تمامی مدل‌های ساخته‌شده، توالی جهش‌یافته K31Y, R92F دارای بهترین انرژی الکترواستاتیک و واندروالسی است و در مقایسه با نوع وحشی پروتئین CD80، با قدرت بالاتری به پروتئین CD28 متصل می‌شود.

کلیدواژه‌ها: همولوژی مدلینگ، جهش‌زایی، داکینگ، پروتئین CD80

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۱۶

*نویسنده مسئول: hajihasan@ut.ac.ir

مقدمه

سلول‌های T انواعی از لنفوسیت‌ها هستند که نقش اصلی را در ایمنی وابسته به سلول بازی می‌کنند. این سلول‌ها دارای گیرنده‌های خاصی به نام گیرنده‌های سلول T (TCR) در سطح خود هستند که به واسطه این گیرنده‌ها از سایر لنفوسیت‌ها مثل لنفوسیت‌های B و یا سلول‌های کشنده طبیعی NK (NK Cells) متمایز می‌شوند. TCRها، در مرحله اول با اتصال به پپتیدهای آنتی‌ژنی متصل به مولکول‌های سازگاری نسجی (MHC) وجود سلول‌های بیگانه را

شناسایی می‌کنند و باعث تحریک اولیه سلول‌های T می‌شوند. بعد از این پیام، سلول‌های T تحریک می‌شوند و در انتظار سیگنال دوم هستند. این سیگنال دوم از یک گیرنده هم‌تحریکی مثل پروتئین شماره ۴ مرتبط با لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک (CTLA-4) یا خوشه تمایزی ۲۸ (CD28) مخابره می‌شود. اگر از تحریک اولیه سلول‌های T مدت زیادی بگذرد و پیام دوم مخابره نشود، این سلول‌ها دچار آنرزی می‌شوند و از بین می‌روند. گیرنده‌های CD28 زودتر از گیرنده‌های CTLA-4 در سطح سلول‌های T بیان می‌شوند. تحریک سلول‌های T بر اثر اتصالات بین گیرنده CD28 و لیگاندهای آن باعث پاسخ مثبت سلول‌های T و در عین حال تحریک بیان CTLA-4 می‌شود. این دو گیرنده دارای لیگاندهای مشترکی هستند و به‌دلیل اینکه تمایل اتصال این لیگاندها به CTLA-4 بسیار بیشتر است، با بیان این گیرنده اتصالات به CD28 به‌شدت کاهش می‌یابد و این امر منجر به غالب‌شدن فعالیت‌های مهاری CTLA-4 غالب می‌شود^[1]. از جمله لیگاندهایی که باعث تحریک گیرنده CD28 می‌شوند، پروتئین‌های CD80 و CD86 هستند. این پروتئین‌ها هر دو از اعضای ابرخانواده ایمنوگلوبولین‌ها هستند و با اتصالات خود به گیرنده CD28 باعث انتقال پیام‌های تحریکی به سلول‌های T می‌شوند^[2]. پروتئین CD80 شامل یک ناحیه خارج سلولی شامل پپتید نشانه (اسیدهای آمینه یک تا ۳۵) و ناحیه متصل‌شونده به گیرنده (اسیدهای آمینه ۳۵ تا ۲۴۲)، ناحیه ترانس‌ممبران (اسیدهای آمینه ۲۴۳ تا ۲۶۳) و ناحیه دم سیتوپلاسمی (اسیدهای آمینه ۲۶۴ تا ۲۸۸) است. همچنین این پروتئین در ساختار خود دو پیوند دی‌سولفیدی و هشت ناحیه گلیکوزیلیاسیون دارد^[3].

در بدن انسان مدتی بعد از تحریک سیستم ایمنی، گیرنده مهاری CTLA-4 در سطح سلول T بیان و با اتصال به لیگاندهای خود باعث خاموش‌شدن این سلول می‌شود. این عمل به‌منظور جلوگیری از خودایمنی انجام می‌شود، اما اگر بتوان سیستم ایمنی را اندکی بیشتر فعال نگه داشت، کمک زیادی به درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان خواهد شد. مطالعات بسیاری در این مورد انجام شده است که از جمله آنها می‌توان به ساخت آنتی‌بادی‌هایی علیه CTLA-4 اشاره کرد^[4]. این آنتی‌بادی‌ها برای جلوگیری از اتصال لیگاندهای CTLA-4 به این گیرنده طراحی شده‌اند^[5]، ولی به‌دلیل عوارض ناشی از استفاده این آنتی‌بادی‌ها، مثل هپاتیت^[6]، درمان‌تیت^[7] و تیروئیدیت^[8] امروزه محققان به‌دنبال جایگزینی مناسب برای آنها هستند. واریانت‌های مهندسی‌شده گیرنده‌های سیستم ایمنی و یا لیگاندهای آنها از جمله کاندیدهای مناسب برای جایگزینی با آنتی‌بادی‌ها هستند.

بنابراین هدف از مطالعه حاضر، دستکاری توالی پروتئین CD80 به‌منظور دستیابی به یک واریانت مناسب از این پروتئین بود که دارای تمایل اتصال افزایش‌یافته به گیرنده تحریک‌کننده CD28 نسبت به نوع غیرجهش‌یافته آن باشد.

سلول به غشای سلول نقش دارد، برای مدل کردن این پروتئین فقط از ناحیه خارج سلولی آن بدون پپتید نشانه (یعنی اسیدهای آمینه ۱۹ تا ۱۵۲) استفاده شد. توالی پروتئین CD28 برای مدل شدن در اختیار سرور SWISS-MODEL قرار گرفت [9]. در این سرور با استفاده از ساختار سه بعدی سایر پروتئین‌های کریستالوگرافی شده به‌عنوان الگو، ساختار سه‌بعدی پروتئین CD28 ساخته شد. سپس مدل ساخته‌شده توسط نرم‌افزار UCSF Chimera 1.14 Build 42094 مینیمایز شد [11].

ساخت کمپلکس حاصل از میان‌کنش CD28 و CD80

پیش‌بینی ساختار چهارم بیومولکول‌های ماکرومولکولی، دارای اهمیت بسیاری در فهم فرآیندهای سلولی و همچنین در زمینه طراحی دارو است و در این روش سعی بر آن است که تا جایی که ممکن است اطلاعات آزمایشگاهی را در فرآیند تخمین به کار برد [12]. در پایگاه داده PDB هیچ ساختار سه بعدی از کمپلکس CD80 و CD28 ثبت نشده است. بنابراین در این مرحله مدل مربوط به کمپلکسی که پروتئین CD80 و CD28 با هم تشکیل می‌دهند، ساخته شد. برای این کار مدل سه بعدی مربوط به پروتئین CD80 از پایگاه داده PDB به شماره دسترسی 1DR9 گرفته شد و در مرحله بعد جایگاه‌های اتصال پروتئین CD80 به پروتئین CD28 شناسایی شد. طبق مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۴، جایگاه‌های ۳۱، ۳۸، ۴۱، ۴۳، ۸۳، ۸۵، ۸۹، ۹۱، ۹۲، ۹۳، ۹۴ و ۹۷ در پروتئین CD80 و جایگاه‌های ۱۲۰، ۱۱۸، ۱۰۹، ۱۰۵، ۱۰۴، ۱۰۳، ۱۰۲، ۱۰۱، ۱۰۰ و ۹۹ در پروتئین CD28، از جمله جایگاه‌هایی هستند که در اتصالات بین دو پروتئین نقش دارند [13]. در مطالعه حاضر برای داک کردن دو پروتئین، به عبارتی برای به‌دست آوردن کمپلکس حاصل از آنها از این نقاط به‌عنوان نقاط برهم‌کنش استفاده شد. بعد از شناسایی جایگاه‌های اتصال بین دو پروتئین، پروتئین CD28 مدل شده توسط SWISS-MODEL و ساختار سه بعدی CD80 استخراج شده از پایگاه داده برای ساخت کمپلکس حاصل از دو پروتئین با یکدیگر داک شدند.

مطالعات آلانین اسکینینگ

برهم‌کنش بین دو پروتئین از اجزای اصلی فرآیند انتقال پیام‌های داخل سلولی است. به‌صورتی که مطالعه این برهم‌کنش‌ها می‌تواند درک عمیق‌تری را در مورد مکانیزم‌های داخل سلولی، دلایل بسیاری از بیماری‌ها و سایر اتفاقات زیستی ایجاد کند. مطالعه مستقیم این برهم‌کنش‌ها در محیط آزمایشگاهی بسیار زمان‌بر و پرهزینه است. به همین دلیل مطالعات بسیاری در طول زمان برای شناسایی ماکرومولکول‌ها، سیستم‌های زیستی و مونومرهای تشکیل‌دهنده آنها از نظر بار، اندازه و سایر ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی انجام شد و تلاش‌های بسیاری در راستای استفاده از الگوریتم‌های متفاوت برای نوشتن برنامه‌ها و سرورهایی شد که بتوان با کمک آنها اثرات دستکاری در سیستم‌های زیستی را تخمین زد، به‌طوری که در بسیاری از موارد این تخمین‌ها بسیار به واقعیت نزدیک هستند و می‌توان به آنها اعتماد کرد. از جمله این سرورها می‌توان به سرور

مواد و روش‌ها

ساخت مدل CD28

پایگاه داده PDB (wwPDB) حاوی ساختارهای کریستالوگرافی شده بسیاری از پروتئین‌ها است. این ساختارها نشان‌دهنده ساختارهای دوم و سوم پروتئین، نواحی گلیکوزیلاسیون، برهم‌کنش‌های درون مولکولی و سایر عوامل مهم در کنفورماسیون یک پروتئین هستند. در چنین مطالعاتی در صورت امکان، معمولاً از ساختارهایی که به‌صورت آزمایشگاهی کریستالوگرافی شده‌اند استفاده می‌شود. اما در مواردی مثل پروتئین CD28 که ساختار سه بعدی آن در این پایگاه‌های داده موجود نیست، می‌توان از روش همولوژی مدلینگ برای تخمین ساختار سه بعدی پروتئین مورد نظر، از روی شباهت توالی آن با پروتئین‌هایی که ساختار سه بعدی آنها تعیین شده است، استفاده کرد [9]. در این مطالعه برای مدل کردن ساختار سه بعدی پروتئین از سرور SWISS-MODEL استفاده شد. در این سرور از دو فاکتور QMEAN و GMQE برای بررسی کیفیت مدل استفاده می‌شود. QMEAN یک تابع امتیازدهی بر پایه ساختار هندسی است و برای یک مدل، تخمین امتیاز را هم در سطح کلی و هم در سطح ناحیه‌ای انجام می‌دهد. این امتیاز نشان‌دهنده کیفیت مدل ساخته‌شده به نسبت مدل‌هایی است که به‌صورت آزمایشگاهی تعیین ساختار شده‌اند. اگر میزان این امتیاز کمتر از ۴- باشد، کیفیت کم مدل ساخته‌شده را نشان می‌دهد.

GMQE یک تابع امتیازدهی کلی است. این تابع درواقع میانگین امتیازات فاکتورهای QMEAN، کربن آلفا (Cα)، زاویه پیچش، میزان انحلال و تداخلات داخلی در مولکول است. اتم Cα مهم‌ترین جایگاه برای ارزیابی میزان انحرافات هندسی کووالان ساختارهای پروتئین است، چراکه این کربن هم به زنجیره‌های جانبی و هم به زنجیره اصلی پروتئین متصل می‌شود و با هر دو برهم‌کنش و سازگاری دارد. اگر هر کدام از این زنجیره‌ها، در جهت‌گیری نادرستی قرار بگیرند، به‌صورتی که دارای کمترین انرژی و پایدارترین حالت نباشند، مدل جهت‌گیری هندسی کربن آلفا در فرآیند اصلاحات برای بهبود جهت‌گیری زنجیره‌های جانبی یا زنجیره اصلی تغییر می‌کند. پس در ارزیابی ساختارهای سه بعدی ساخته‌شده باید سه عامل شامل کنفورماسیون زنجیره اصلی، کنفورماسیون زنجیره جانبی و جهت‌گیری هندسی Cα برای مدل کردن ساختار سه بعدی پروتئین CD28 را در نظر گرفت. ابتدا توالی پروتئین CD28 از سایت UNIPROT به شماره دسترسی P10747 استخراج شد [10]. پروتئین CD28 یک پروتئین تراغشایی است که دارای ناحیه خارج سلولی شامل پپتید نشانه (اسیدهای آمینه یک تا ۱۸) و ناحیه متصل‌شونده به لیگاند (اسیدهای آمینه ۱۹ تا ۱۵۲)، ناحیه ترانس‌ممبران (اسیدهای آمینه ۱۵۳ تا ۱۷۹) و ناحیه دم سیتوپلاسمی (اسیدهای آمینه ۱۸۰ تا ۲۲۰) است. از آنجایی که فقط ناحیه خارج سلولی این پروتئین در اتصالات آن به لیگاند شرکت دارد و توالی پپتید نشانه فقط برای هدایت این پروتئین از داخل

نتایج و بحث

ساخت مدل CD28

ساخت مدل سه بعدی یک پروتئین توسط سرور SWISS-MODEL از چهار مرحله مهم تشکیل شده است: (۱) شناسایی الگوی مدل؛ (۲) هم‌ردیفی توالی پروتئین جدید با توالی الگویی که برای این کار استفاده می‌شود؛ (۳) ساخت مدل؛ (۴) ارزیابی مدل‌های ساخته‌شده. در مرحله اول، ابتدا باید الگویی که مدل از روی آن ساخته خواهد شد، تعیین شود^[4]. برای این کار با جست‌وجو در پایگاه داده PDB، مدلی یافت شد که در آن پروتئین CD28 به‌صورت یک کمپلکس با یک آنتی‌بادی میتوزن کریستالوگرافی شده بود. ساختار سه بعدی این مدل با کد دسترسی 1YJD از پایگاه PDB گرفته شد. این مدل یک کمپلکس حاصل از پروتئین CD28 و زنجیره سبک و سنگین یک آنتی‌بادی میتوزن است که در سال ۲۰۰۵ با تکنیک پراش پرتو ایکس تعیین شده بود^[16]. سرور SWISS-MODEL علاوه بر ساخت مدل‌ها، قادر است آنها را تا حدودی ارزیابی کند. برای مثال QMEAN و GMQE مربوط به مدل ساخته‌شده در این مطالعه به ترتیب برابر ۳/۱۳- و ۷۶٪ بود که این امتیاز کیفیت قابل قبول مدل را نشان داد (شکل ۱). میزان انحلال‌پذیری ساختار ساخته‌شده بستگی به اسیدهای آمینه تشکیل‌دهنده آن دارد و با توجه به ترکیب اسیدآمینه‌ای پروتئین CD28 می‌توان گفت که این پروتئین بیشتر دارای اسیدهای آمینه غیرقطبی و امتیاز میزان حلالیت آن در حد متوسط است. z-score مربوط به مدل ساختار CD28 به‌دست‌آمده، حدود یک است. z-score، میزان انحرافات استاندارد از میانگین داده یک نقطه است و مقدار آن معمولاً در بازه ۳ تا ۳- قرار دارد.

ساخت کمپلکس حاصل از برهم‌کنش دو پروتئین CD28 و CD80

برای ساخت کمپلکس حاصل از پروتئین‌های CD80 و CD28، ساختار سه بعدی پروتئین CD28 و همچنین جایگاه‌های اتصال در پروتئین CD28 یعنی جایگاه‌های ۱۲۰، ۱۱۸، ۱۰۹، ۱۰۵، ۱۰۴، ۱۰۳، ۱۰۲، ۱۰۱، ۱۰۰، ۹۹ و ۹۵ به سرور معرفی شدند. بعد از پروتئین CD28، پروتئین CD80 و جایگاه‌های اتصال این پروتئین به پروتئین CD28 یعنی جایگاه‌های ۳۱، ۳۸، ۴۱، ۴۳، ۸۳، ۸۵، ۸۹، ۹۱، ۹۲، ۹۳، ۹۴ و ۹۷ در سرور HADDOCK بارگذاری شدند. این سرور علاوه بر شکل سه بعدی کمپلکس، امتیازاتی را به‌منظور ارزیابی مدل ساخته‌شده معرفی می‌کند. این امتیازات که امتیاز HADDOCK نامیده می‌شوند، میانگینی از چهار فاکتور انرژی واندروالسی، انرژی الکترواستاتیک، انرژی حذف حلال و نواحی سطحی دفن‌شده (اندازه محل برهم‌کنش در یک کمپلکس پروتئینی) هستند. انرژی حذف حلال، اختلاف انرژی حاصل از حذف کردن اتصالات پروتئین و آب است. در داکینگ، این انرژی اشاره به تغییر انرژی حاصل از حذف مولکول‌های آب از محل برهم‌کنش بین دو پروتئین دارد که به‌منظور ایجاد برهم‌کنش بین دو پروتئین انجام می‌شود. سرور HADDOCK طی داک‌کردن، از دو پروتئین کمپلکس‌های مختلفی با کیفیت‌های متفاوت نیروی واندروالسی و الکترواستاتیک ایجاد می‌کند. این مدل‌ها براساس

ROBETTA اشاره کرد. سرور ROBETTA، یک ابزار آنالیز ساختار پروتئین است. یکی از خدمات این سرور، آلانین اسکینینگ در محل برهم‌کنش بین دو پروتئین در یک کمپلکس است^[14]. در روش آلانین اسکینینگ، تک‌تک اسیدهای آمینه‌ای که در کمپلکس پروتئین-پروتئین نقش اتصالی دارند، با اسیدآمینه آلانین جهش می‌یابند و بعد از جهش هر جایگاه، تغییرات انرژی آزاد اتصال حاصل از این جهش محاسبه می‌شود. به کمک این روش می‌توان مهم‌ترین اسیدهای آمینه موجود در این اتصالات را پیدا کرد. هدف مطالعه حاضر، ایجاد جهش در جایگاه‌هایی از پروتئین CD80 بود که حذف اسیدهای آمینه آنها بیشترین ضربه را بر برهم‌کنش بین دو پروتئین CD80 و CD28 وارد کند.

جهش‌زایی

از بین ۲۰ اسیدآمینه موجود در طبیعت، ۱۰ اسیدآمینه به‌دلیل ویژگی‌های ساختاری خود، مستقیماً وارد برهم‌کنش‌های هیدروژنی می‌شوند و یا در شرایط خاص پیوند هیدروژنی برقرار می‌کنند که از جمله آنها می‌توان اسیدهای آمینه لیزین (K)، تیروزین (Y)، آرژنین (R)، ترئونین (T)، آسپارژین (N)، گلوتامین (Q)، سرین (S)، هیستیدین (H)، اسیدآسپارتیک (D)، اسیدگلوتامیک (E) را نام برد. بعد از شناسایی اسیدهای آمینه مهم در اتصالات بین پروتئین CD80 و گیرنده CD28، اسیدهای آمینه شرکت‌کننده در برهم‌کنش‌های هیدروژنی جایگزین اسیدهای آمینه جایگاه‌های ۳۱ و ۹۲ شدند. در مطالعه حاضر، برای عمل جهش‌زایی از محیط برنامه‌نویسی R استفاده شد^[15]. حاصل این کار، ۱۰۰ توالی جهش‌یافته بود که تک‌تک مورد بررسی قرار گرفتند.

ساخت مدل سه بعدی جهش‌یافته‌ها

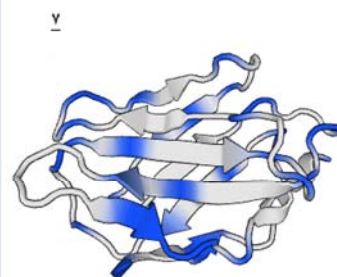
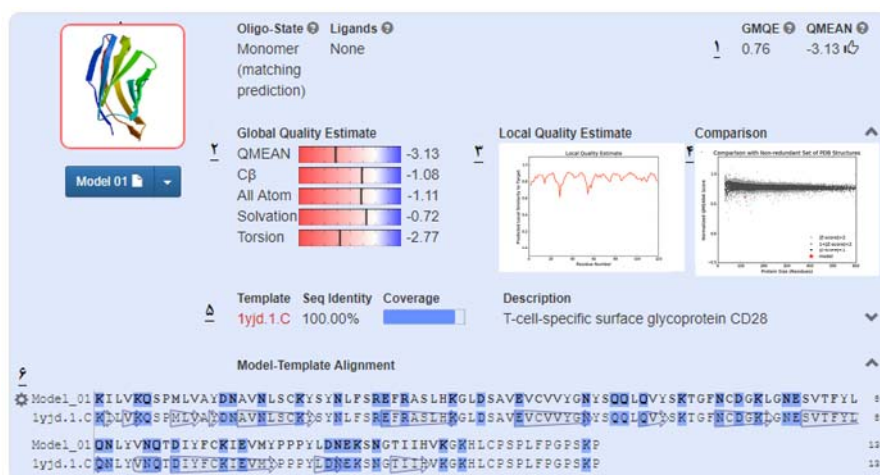
ساخت مدل‌های سه بعدی جهش‌یافته‌ها با استفاده از سرور SWISS-MODEL انجام شد^[9]. این سرور ساختار سه بعدی کریستالوگرافی‌شده پروتئین CD80 را به‌عنوان الگو استفاده و پروتئین‌های جهش‌یافته را به کمک آن مدل‌سازی کرد. سپس مدل‌ها توسط نرم‌افزار UCSF Chimera 1.14 Build 42094 مینیمایز شدند^[11].

شبیه‌سازی داکینگ

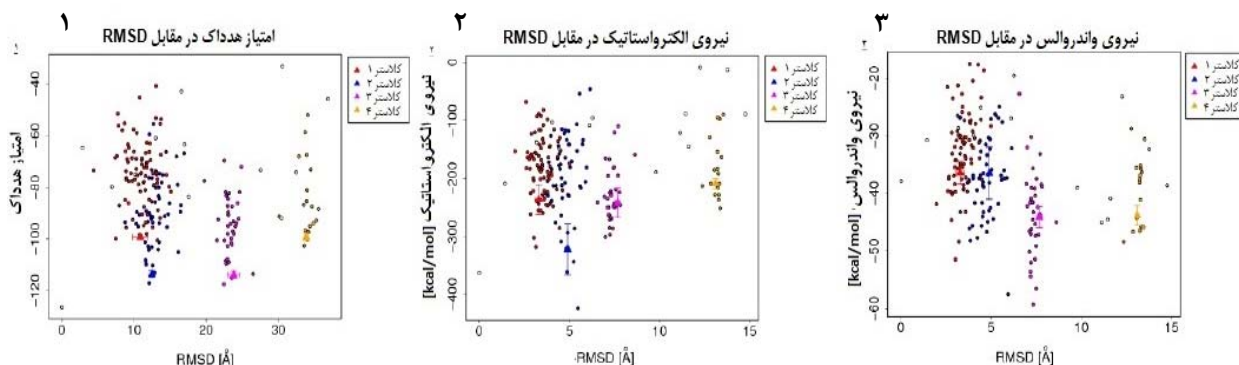
برای بررسی برهم‌کنش بین پروتئین CD80 جهش‌یافته و پروتئین CD28 از سرور HADDOCK استفاده شد^[12]. بعد از مدل‌سازی و مینیمایزکردن، مدل‌ها با گیرنده مورد نظر داک شدند. داکینگ درواقع فرآیند یافتن بهترین جهت‌گیری بین دو پروتئینی است که با یکدیگر برهم‌کنش دارند. کمپلکس‌ها توسط سرور HADDOCK داک شدند و از نظر کیفیت کمپلکس‌های ساخته‌شده، انرژی الکترواستاتیک، انرژی واندروالسی و انرژی حذف حلال مورد بررسی قرار گرفتند. به‌منظور بررسی میزان تغییرات در قدرت اتصالی ایجادشده بر اثر جهش، کمپلکس حاصل از داکینگ نوع جهش‌یافته پروتئین CD80 با پروتئین CD28 با کمپلکس حاصل از داکینگ نوع وحشی پروتئین CD80 با پروتئین CD28 مقایسه شدند.

می‌دهد و دیگری نیروی برهم‌کنش واندروالس است که قدرت کمتری نسبت به نیروی الکتروستاتیک دارد، اما به‌دلیل داشتن پیوندهای زیاد از اهمیت خاصی برخوردار است. نمودار مقایسه، نیروی الکتروستاتیک، کلاسترها و اعضای آنها را از نظر قدرت این نیرو مقایسه می‌کند. طبق این نمودار، اعضای کلاستر انتخابی از نظر قدرت انرژی الکتروستاتیک، به‌صورت میانگین از مقدار قابل توجهی برخوردار بودند، به‌طوری که کلاستر ۲ دارای بهترین نیروی الکتروستاتیک بود و بعد از آن به ترتیب کلاسترهای ۳، ۱ و ۴ قرار گرفتند (نمودار ۲-۱). نیروی بعدی که به کمک آن کمپلکس مورد نظر بررسی شد، نیروی واندروالسی بود. طبق مطالعات و بررسی‌هایی که انجام شد، اعضای کلاستر مورد نظر دارای بهترین نیروی واندروالسی نسبت به سایر کلاسترها و اعضای آنها بودند. درواقع بین این مدل‌ها کلاستر ۳ دارای بهترین نیروی واندروالسی و بعد از آن به ترتیب کلاسترهای ۴، ۲ و ۱ قرار می‌گیرند. از آنجایی که این مطالعه بیشتر روی اتصالات ایجادشده بر اثر نیروی الکتروستاتیک بود، اولویت انتخاب بهترین کمپلکس نیز این نیرو است (نمودار ۱-۳).

شباهت نیروی الکتروستاتیک و واندروالسی در گروه‌هایی دسته‌بندی می‌شوند که به هر گروه یک کلاستر می‌گویند. هر یک از این کلاسترها دارای یک امتیاز HADDOCK هستند. امتیازهای HADDOCK برای هر نمونه به‌صورت نمودار کشیده می‌شود و در این نمودارها بهترین مدل معرفی‌شده با سایر مدل‌های ساخته‌شده در سایر کلاسترها مقایسه می‌شود (نمودار ۱-۱). نمودار اول که مربوط به امتیازات HADDOCK است، نشان‌دهنده انحراف تمامی مدل‌ها از بهترین مدل ساخته‌شده با پایدارترین حالت و کمترین انرژی است. به‌طور کلی چهار کلاستر با مدل‌های متفاوت در آنها برای مدل اتصال پروتئین CD80 و CD28 معرفی شد و از جمعیت هر کلاستر یک عضو به‌عنوان بهترین مدل در هر کلاستر معرفی شد. طبق نمودار، کلاستر ۲ و ۳ دارای بهترین امتیاز بودند (هر چه امتیاز HADDOCK منفی‌تر باشد، بهتر است) و کلاستر ۳ بیشترین امتیاز HADDOCK را داشت (نمودار ۱-۱). بنابراین برای ادامه مطالعه، کمپلکس از اعضای این کلاستر انتخاب شد. در برهم‌کنش بین دو پروتئین دو نیروی اتصال مهم نقش دارند که یکی از این نیروها، نیروی الکتروستاتیک است که درواقع پیوند ایجادشده بین اسیدهای آمینه باردار بین دو پروتئین در یک کمپلکس را نشان



شکل ۱ صفحه نتایج برای همولوژی مدلینگ پروتئین CD28: ۱) امتیازات QMEAN و GMQE: امتیاز GMQE نشان‌دهنده کیفیت کلی مدل، با توجه به تمامی عواملی است که در تعیین این کیفیت نقش دارند و QMEAN نیز یک تابع امتیازدهی بر پایه ساختار هندسی است؛ ۲) نشان‌دهنده فاکتورهای دخیل در تعیین کیفیت کلی مدل است. بین تمامی این فاکتورها مقدار QMEAN و زاویه پیچش دارای امتیاز کمتری هستند و این امر نیاز این ساختار به مینیمایزیشن را نشان می‌دهد؛ ۳) نمودارهای تعیین کیفیت نقطه‌ای؛ این نمودار شباهت ساختاری اسیدآمینه هر نقطه از مدل ساخته‌شده با مدل وحشی یا الگو را نشان می‌دهد. در این نمودار محور X نشان‌دهنده شماره اسیدآمینه و محور Y نشان‌دهنده میزان شباهت است. این شباهت پیش‌بینی‌شده در بازه امتیاز صفر تا یک است که یک، شباهت و صفر عدم شباهت را نشان می‌دهد و تا زمانی که میزان نوسانات خط این نمودار بالای ۰/۶ باشد، بیانگر شباهت نسبی اسیدهای آمینه هر نقطه از مدل ساخته‌شده با الگو است. در صورتی که میزان این شباهت‌ها به زیر ۰/۶ برسد، بیانگر این است که میزان عدم شباهت در حدی است که ممکن است باعث متفاوت شدن کنفورماسیون مدل ساخته‌شده با مدل الگو شود؛ ۴) نشان‌دهنده نمودار تعیین کیفیت مقایسه‌ای است. این نمودار به مقایسه کیفیت مدل ساخته‌شده با ساختارهایی که به‌صورت آزمایشگاهی کریستالوگرافی شده‌اند می‌پردازد و کیفیت مدل‌ها را z-score نشان می‌دهد. در این نمودار محور X بیانگر تعداد اسیدهای آمینه پروتئین‌ها و محور Y بیانگر میزان امتیاز کلی جامعه آماری است. در این نمودار هر نقطه، یک مدل پروتئین را نشان می‌دهد و این مدل‌ها براساس مقدار z-score تقسیم‌بندی شده‌اند. مدل‌هایی که z-score آنها بین ۱- و ۱ است، به‌صورت نقطه‌های تیره، مدل‌های دارای z-score بین ۱ تا ۲ به رنگ خاکستری و مدل‌های دارای z-score بالاتر به‌صورت نقطه‌های خاکستری روشن دیده می‌شوند. مدل ساخته‌شده در مطالعه حاضر با رنگ قرمز نشان داده شده است و به‌راحتی می‌توان کیفیت آن را در مقایسه با سایر مدل‌ها ارزیابی کرد. لازم به ذکر است که اگر z-score در بازه بین ۱- و ۱ باشد، کیفیت مدل بالاتر است؛ ۵) نشان‌دهنده الگویی است که این مدل از روی آن ساخته شده است. این ساختار کمپلکس پروتئین CD28 با یک آنتی‌بادی میتوزن با شماره دسترسی 1YJD از پایگاه داده PDB است؛ ۶) نشان‌دهنده هم‌دیفی توالی داده‌شده به سرور SWISS-MODEL با توالی الگو است. رنگ‌آمیزی این هم‌دیفی براساس میزان قطبیت اسیدهای آمینه است. به‌صورتی که اسیدهای آمینه قطبی به رنگ آبی و اسیدهای آمینه غیرقطبی بی‌رنگ نشان داده شده‌اند؛ ۷) ساختار سه بعدی پروتئین ساخته‌شده مشاهده می‌شود و رنگ‌آمیزی این ساختار براساس جایگاه‌های دارای اسیدهای آمینه قطبی و غیرقطبی است.



نمودار ۱) مقایسه مدل معرفی شده به عنوان بهترین مدل با مدل‌های ساخته شده در سایر کلاسترها (۱)؛ نمودار مقایسه انرژی الکترواستاتیک بین اعضای ۴ کلاستر (۲)؛ نمودار مقایسه انرژی واندروالسی بین مدل‌های ساخته شده (۳)

مطالعات آلانین اسکینینگ کمپلکس

در تکنیک آلانین اسکینینگ یک کمپلکس، اگر تغییرات انرژی آزاد اتصال ($\Delta\Delta G$) حاصل از جایگزینی اسیدآمینه آلانین با اسیدآمینه اصلی مثبت شود، یعنی زنجیره جانبی اسیدآمینه اصلی نقش قابل توجهی را در اتصالات دو پروتئین با یکدیگر داشته و حذف آن از کمپلکس باعث سست شدن این اتصالات شده است. در صورتی که بر اثر جایگزینی اسیدآمینه اصلی با اسیدآمینه آلانین تغییرات انرژی آزاد اتصال بین دو پروتئین منفی‌تر شود، یعنی زنجیره جانبی اسیدآمینه اصلی نقش قابل توجهی را در اتصالات بین دو پروتئین نداشته است و یا زنجیره جانبی آن باعث تداخلات فضایی داخل کمپلکس می‌شده که موجب سست شدن اتصالات بین دو پروتئین شده است. در مطالعه حاضر، بر اثر جایگزینی اسیدآمینه آلانین با اسیدهای آمینه جایگاه‌های ۹۱ و ۹۴ در پروتئین CD80، تغییرات انرژی آزاد اتصال منفی‌تر شد (جدول ۱). این نشان‌دهنده این است که اسیدهای آمینه‌ای که در نوع غیرجذب‌یافته پروتئین در این جایگاه‌ها بودند، نقش مهمی در این اتصالات نداشته‌اند و حذف آنها ضربه‌چندانی به قدرت اتصال بین دو پروتئین در کمپلکس وارد نمی‌کند. ولی در سایر جایگاه‌ها بر اثر این جایگزینی‌ها، انرژی آزاد اتصال بین دو پروتئین مثبت‌تر شد که این نشان‌دهنده اثرات منفی جایگزینی آلانین با اسیدآمینه اصلی بر تمایل اتصال بین دو پروتئین و در نتیجه ناپایداری کمپلکس است. بیشترین ضربه به انرژی آزاد اتصال بین دو پروتئین در هنگام جهش در جایگاه‌های ۳۱ و ۹۲ پروتئین CD80 وارد شد که اهمیت بسیار زیاد این جایگاه‌ها و اسیدهای آمینه واقع در این جایگاه‌ها را نشان داد. با شناسایی این جایگاه‌های مهم سعی بر آن شد که با روش تکامل هدایت‌شده واریانتی از پروتئین CD80 شناسایی شود که دارای تمایل اتصال بهتری به گیرنده CD28 نسبت به نوع وحشی باشد (جدول ۱).

جهش‌زایی و ساخت مدل سه بعدی جهش‌یافته‌ها

بعد از جهش‌دادن توالی‌ها و ساخت مدل‌های آنها نتایج حاصل بررسی شدند. فاکتور QMEAN برابر $-1/40$ بود (شکل ۲). فاکتور

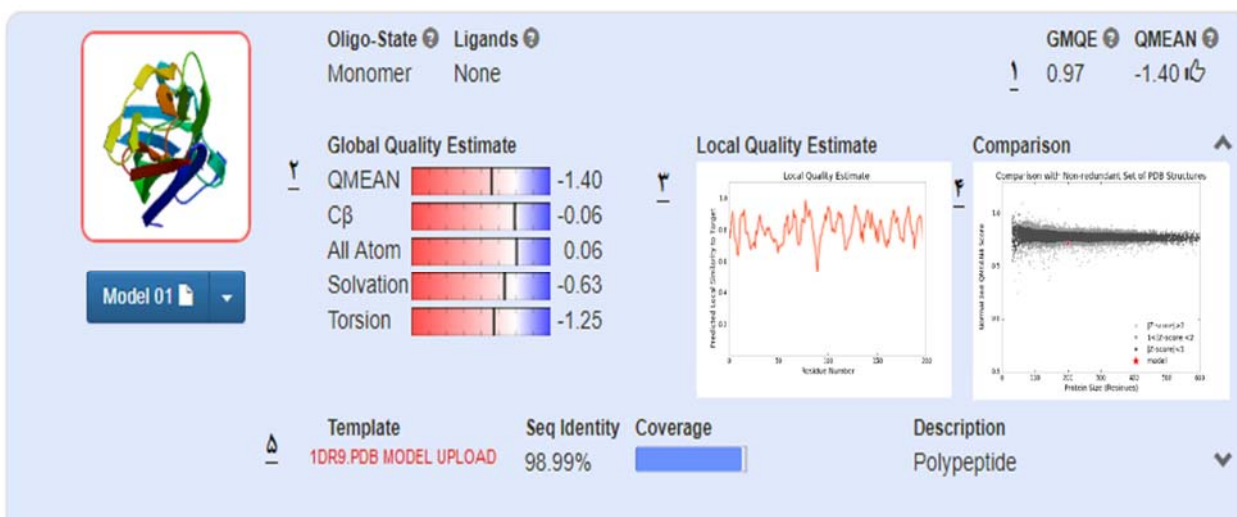
GMQE که میانگینی از QMEAN، میزان انحرافات کربن بتا، میزان تداخلات داخل مولکولی، میزان انحلال‌پذیری و زاویه پیچش است، امتیاز بسیار بالایی دارد. عوامل دخیل در مقدار GMQE به صورت انفرادی بررسی شدند و مشخص شد که تمامی عوامل از کیفیت متوسط به بالا برخوردار هستند. از بین فاکتورهای دخیل در تعیین کیفیت کلی مدل، QMEAN و زاویه پیچش دارای امتیاز کمتری بودند و این امر نیاز این ساختار به مینیمایزیشن را نشان داد (شکل ۲-۲). نمودار کیفیت محلی یا ناحیه‌ای میزان شباهت اسیدهای آمینه هر نقطه از مدل ساخته شده با الگو را نشان می‌دهد و تا زمانی که میزان نوسانات خط این نمودار بالای 6% باشد، بیانگر شباهت اسیدهای آمینه هر نقطه با نوع وحشی است. در نمودار کیفیت ناحیه‌ای، تقریباً تمامی پستی‌ها و بلندی‌ها بالای 6% بودند که شباهت نسبی ویژگی اسیدهای آمینه نوع جهش‌یافته با نوع وحشی در این جایگاه‌ها را نشان داد. البته در این نمودار، شکاف ایجاد شده در جایگاه ۹۲ بسیار عمیق بود و مقدار آن تا 5% رسید که علت آن جهش اعمال شده در این جایگاه بود. این شکاف بیانگر تفاوت اسیدآمینه وحشی (فنیل آلانین) از نظر ویژگی فیزیوشیمیایی با اسیدآمینه جهش‌یافته (آرژنین) در این جایگاه است (شکل ۲-۳). آرژنین یک اسیدآمینه یونی با بار مثبت و دارای pH ایزوالکتریک برابر $10/76$ و فنیل آلانین، اسیدآمینه‌ای غیرقطبی با یک حلقه فنیل و دارای pH ایزوالکتریک برابر $5/48$ است. این تفاوت زیاد در ویژگی اسیدآمینه جهش‌یافته با اسیدآمینه وحشی اثرات خود را در این نمودار نشان داد و همچنین انتظار می‌رود اثرات خود را در توانایی پروتئین جهش‌یافته در ایجاد پیوندهای اتصالی با پروتئین CD28 نیز نشان دهد. نمودار مقایسه‌ای نشان‌دهنده قابل قبول بودن کیفیت مدل ساخته شده در مقایسه با مدل‌هایی است که در آزمایشگاه کریستالوگرافی شده‌اند. درواقع نقطه قرمز در نمودار مقایسه‌ای، نشان‌دهنده میزان کیفیت مدل ساخته شده در مقایسه با مدل‌های دیگر است. در این نمودار، مدل CD80 جهش‌یافته در مرز بین نقاط بسیار تیره با نقاط خاکستری است که کیفیت قابل قبول را نشان می‌دهد و z-score آن حدود یک است (شکل ۲-۴). در قسمت

اسیدآمینه با بار منفی بود. در صورتی که نوع جهش‌یافته آن به‌صورت کلی بار مثبت، با ۲۷ اسیدآمینه با بار مثبت و ۲۶ اسیدآمینه با بار منفی داشت (شکل ۳-۲). در حالت بعدی اسیدهای آمینه براساس اندازه تقسیم‌بندی شده‌اند، به‌صورتی که اسیدهای آمینه کوچکتر و بزرگتر به ترتیب با رنگ سبز و قرمز نشان داده شده‌اند. با بررسی جایگاه‌های جهش‌یافته، مشاهده شد که اسیدهای آمینه جایگاه ۳۱ و ۹۲ نوع وحشی از نظر اندازه تقریباً برابر با اسیدهای آمینه این جایگاه‌ها در نوع جهش‌یافته هستند. بنابراین تخمین زده می‌شود که این جهش موجب هیچ تداخل فضایی ناشی از اندازه اسیدهای آمینه نشود (شکل ۳-۳).

جدول ۱ اثرات حاصل از جایگزینی اسیدآمینه آلانین با اسیدآمینه‌های موثر در برهم‌کنش بین دو پروتئین در پروتئین CD80

جایگاه‌ها در فایل PDB	زنجیره	تغییرات انرژی آزاد اتصال
۳۱	A	۲/۱۸
۳۸	A	۰/۸۲
۴۱	A	۰/۵۹
۴۳	A	۰/۷۳
۸۳	A	۱/۷۹
۸۵	A	۱/۲۳
۸۹	A	۱/۹۰
۹۰	A	۰/۸۲
۹۱	A	-۰/۱۹
۹۲	A	۳/۶۹
۹۳	A	۰/۱۰
۹۴	A	-۰/۰۵
۹۷	A	۰/۵۵

انتهاهی شکل نام الگویی که این پروتئین از روی آن مدل شد و میزان شباهت توالی الگو با ساختار هدف نمایش داده شده است (شکل ۲-۵). در مطالعه حاضر برای بررسی بهتر مدل ساخته‌شده و مقایسه آن با مدل الگو، یک هم‌ردیفی بین توالی CD80 وحشی و نوع جهش‌یافته آن و همچنین ساختارهای سه بعدی آنها براساس سه عامل میزان قطبیت، بار الکتریکی و همچنین اندازه اسیدهای آمینه انجام شد (شکل ۳). در حالت اول اسیدهای آمینه براساس میزان قطبیت مشخص شده‌اند، به‌گونه‌ای که اسیدهای آمینه قطبی و غیرقطبی به ترتیب با رنگ آبی و بی‌رنگ نشان داده شده‌اند. ساختار کلی پروتئین CD80 بیشتر از اسیدهای آمینه غیرقطبی تشکیل شده است، به‌صورتی که از بین ۲۰۸ اسیدآمینه شرکت‌کننده در ساختار مدل، ۷۰ اسیدآمینه قطبی و بقیه آنها غیرقطبی هستند و این عامل می‌تواند دلیل بر میزان قدرت انحلال‌پذیری کمتر پروتئین CD80 باشد (شکل ۳-۱). به‌دنبال جهش ایجادشده در این مطالعه در جایگاه ۳۱، اسیدآمینه لیزین که یک اسیدآمینه یونی و باردار با بار مثبت است، جایگزین اسیدآمینه تیروزین و همچنین در جایگاه ۹۲، اسیدآمینه یونی و باردار آرژنین جایگزین فنیل آلانین غیرقطبی شد. این جایگزینی‌ها باعث قطبی‌تر شدن پروتئین و قدرت بیشتر آن در شکل‌دادن پل نمکی و درواقع پیوند هیدروژنی شد. پل نمکی ترکیبی از برهم‌کنش‌های یونی و پیوندهای هیدروژنی است. در حالت دوم اسیدهای آمینه براساس بار تقسیم‌بندی شده‌اند، به‌گونه‌ای که اسیدهای آمینه بدون بار به‌صورت بی‌رنگ، اسیدهای آمینه با بار مثبت با رنگ آبی و اسیدهای آمینه با بار منفی با رنگ قرمز نشان داده شده‌اند (شکل ۳-۲). نوع وحشی پروتئین CD80 به‌طور کلی دارای بار منفی، با ۲۵ اسیدآمینه با بار مثبت و ۲۶



شکل ۲ صفحه نتایج برای همولوژی مدلینگ پروتئین CD80 جهش‌یافته؛ ۱) امتیازات QMEAN و GMQE؛ امتیاز GMQE کیفیت کلی مدل با توجه به تمامی عواملی که در تعیین این کیفیت نقش دارند را نشان می‌دهد و QMEAN یک تابع امتیازدهی بر پایه ساختار هندسی است. این دو فاکتور برای یک مدل، هم تخمین امتیاز را در دو سطح کلی و محلی انجام می‌دهند. ۲) فاکتورهای دخیل در تعیین کیفیت کلی مدل؛ ۳) نمودار کیفیت محلی؛ ۴) نمودار مقایسه‌ای؛ ۵) این قسمت، نشان‌دهنده الگویی است که این مدل از روی آن ساخته شده است.



شکل ۳) هم‌دیفی توالی داده‌شده به سرور SWISS-MODEL و ساختار سه بعدی پروتئین CD80 استخراج‌شده از پایگاه PDB (۱)؛ روبه‌روی این هم‌دیفی ساختار سه بعدی پروتئین ساخته‌شده مشاهده می‌شود و رنگ‌بندی این ساختار براساس جایگاه‌های دارای اسیدهای آمینه قطبی و غیرقطبی است؛ هم‌دیفی توالی داده‌شده به سرور SWISS-MODEL و ساختار سه بعدی پروتئین CD80 استخراج‌شده از پایگاه PDB (۲)؛ روبه‌روی این هم‌دیفی ساختار سه بعدی پروتئین ساخته‌شده مشاهده می‌شود و رنگ‌آمیزی این ساختار براساس جایگاه‌های دارای اسیدهای آمینه با بار مثبت، منفی و بدون بار است؛ هم‌دیفی توالی داده‌شده به سرور SWISS-MODEL و ساختار سه بعدی پروتئین CD80 استخراج‌شده از پایگاه PDB (۳)؛ روبه‌روی این هم‌دیفی ساختار سه بعدی پروتئین ساخته‌شده مشاهده می‌شود و رنگ‌آمیزی این ساختار براساس جایگاه‌های دارای اسیدهای آمینه کوچک و بزرگ است.

داکینگ پروتئین CD80 جهش‌یافته با پروتئین CD28

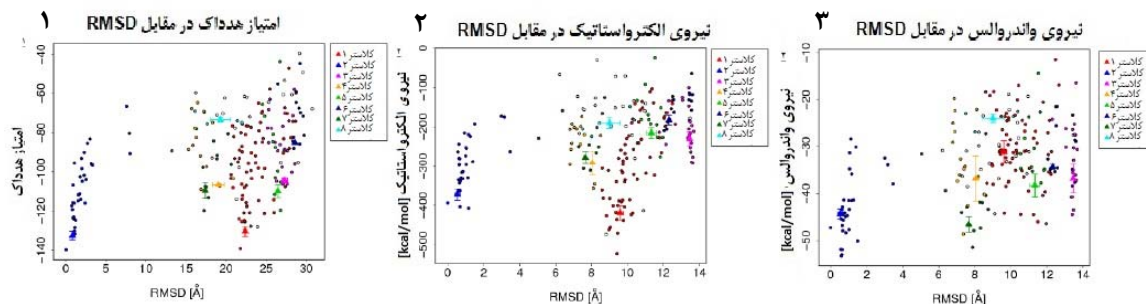
اسیدهای آمینه فنیل‌آلانین و تیروزین به ترتیب اسیدهای آمینه غیرقطبی و قطبی هستند. بنابراین فنیل‌آلانین قادر به ایجاد پیوند هیدروژنی نیست و از آنجایی که آرژنین و لیزین هر دو اسیدهای آمینه یونی با بار مثبت هستند، هر دو توانایی تشکیل پل نمکی را دارند. پل نمکی که توسط آرژنین و لیزین تشکیل می‌شود، به مراتب قوی‌تر از پیوندی است که تیروزین به‌تنهایی ایجاد می‌کند و طبق آنچه که پیش‌بینی و مشاهده شد، پیوندهای اتصالی ایجادشده توسط نوع جهش‌یافته بسیار قوی‌تر از نوع وحشی است. پروتئین CD28 بعد از حذف آب از محل برهم‌کنش‌های پروتئین CD80، در این ناحیه قرار می‌گیرد. این اتفاق برای هر دو نوع جهش‌یافته و وحشی یکسان، ولی انرژی حذف حلال آنها متفاوت است. این امر به‌دلیل تغییر توانایی خود پروتئین CD80 برای ایجاد پیوندهای اتصالی است. در نوع وحشی میزان اسیدهای آمینه یونی و قطبی به نسبت کمتر از نوع جهش‌یافته است. بنابراین وقتی آب از محیط حذف می‌شود، پروتئین نوع جهش‌یافته بهتر از نوع وحشی با پروتئین CD28 پیوندهای اتصالی ایجاد می‌کند و در نتیجه انرژی حذف حلال آن که درواقع بیانگر تغییرات ایجادشده بر اثر حذف آب از محل اتصال و جایگزین شدن آن با یک عامل متصل‌شونده دیگر است، کمتر می‌شود. هر چه انرژی حذف حلال کوچکتر باشد، توانایی پروتئین در ایجاد پیوندهای اتصالی، بالاتر و هر چقدر انرژی حذف حلال بالاتر باشد، توانایی پروتئین در شکل‌دادن کمپلکس پایین‌تر است و در مطالعه حاضر، انرژی حذف حلال نوع جهش‌یافته پایین‌تر از نوع غیرجهش‌یافته بود (جدول ۲). هر چه اتصالات بین دو پروتئین قوی‌تر باشد، میزان نواحی مدفون‌شده بین آنها نیز بیشتر می‌شود و طبق نتایج، این نواحی در نوع جهش‌یافته بیشتر از نوع وحشی بود.

در مطالعه حاضر، تاثیر جهش‌های اعمال‌شده روی پروتئین CD80 بر برهم‌کنش‌های بین این پروتئین با گیرنده CD28 بررسی شد

بعد از ساخت مدل پروتئین CD28، شناسایی جایگاه‌های اتصالی پروتئین CD80 با این پروتئین، شناسایی جایگاه‌های مناسب برای جهش پروتئین و ساخت ساختار سه بعدی توالی‌های جهش‌یافته، این دو پروتئین به یکدیگر متصل شدند. از بین تمامی مدل‌های پیشنهادی برای کمپلکس حاصل از پروتئین CD80 و CD28، کلاستر ۲ دارای بهترین امتیاز بود، در نتیجه این کلاستر برای بررسی بیشتر انتخاب شد (نمودار ۲). در این مرحله علاوه بر بررسی نتایج حاصل از داک‌کردن مدل پروتئین جهش‌یافته با پروتئین CD28، به مقایسه نتایج حاصل از داکینگ نوع وحشی با نوع جهش‌یافته پرداخته و دلایل بهبود انرژی اتصال بین نوع جهش‌یافته پروتئین CD80 و پروتئین CD28 بررسی شد. از بین تمامی جهش‌یافته‌های ساخته‌شده از پروتئین CD80، جهش‌یافته Y31K-F92R دارای بهترین انرژی اتصال به گیرنده خود بود. همچنین چهار فاکتور دخیل در امتیاز HADDOCK بین کمپلکس جهش‌یافته و وحشی مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۲). امتیاز HADDOCK که یک میانگین کلی از تمامی عوامل مهم در اتصالات بین دو پروتئین است، در نوع جهش‌یافته به نسبت منفی‌تر از نوع وحشی بود و این مساله بهبود قدرت اتصال بین این دو پروتئین را نشان داد. در بررسی تغییرات انرژی واندروالسی بین نوع وحشی و جهش‌یافته و گیرنده‌های آنها مشاهده شد که این انرژی بین این دو کمپلکس تغییر خاصی نکرده است. در این مطالعه فنیل‌آلانین و تیروزین حذف شد و به‌جای آنها اسیدهای آمینه آرژنین و لیزین قرار داده شد که هر دو از اسیدهای آمینه یونی با توانایی ایجاد پل نمکی هستند (پل نمکی حاصل از برهم‌کنش‌های یونی و پیوندهای هیدروژنی است). طبق این یافته‌ها، عدم تغییر در قدرت اتصالات واندروالسی کاملاً قابل پیش‌بینی و توجیه است.

اگر این اسیدآمینه با آلانین جایگزین شود باعث سستی کمپلکس تشکیل‌شده توسط CD80 و CD28 می‌شود. این حالت ایجادشده حاکی از آن است که فنیل‌آلانین با پیوندهای واندروالسی بسیاری که ایجاد می‌کند، باعث کمک به استحکام اتصالات بین پروتئین‌های CD80 و CD28 می‌شود، اما در صورت حذف این پیوندها، قدرت اتصال در کمپلکس کاهش می‌یابد.

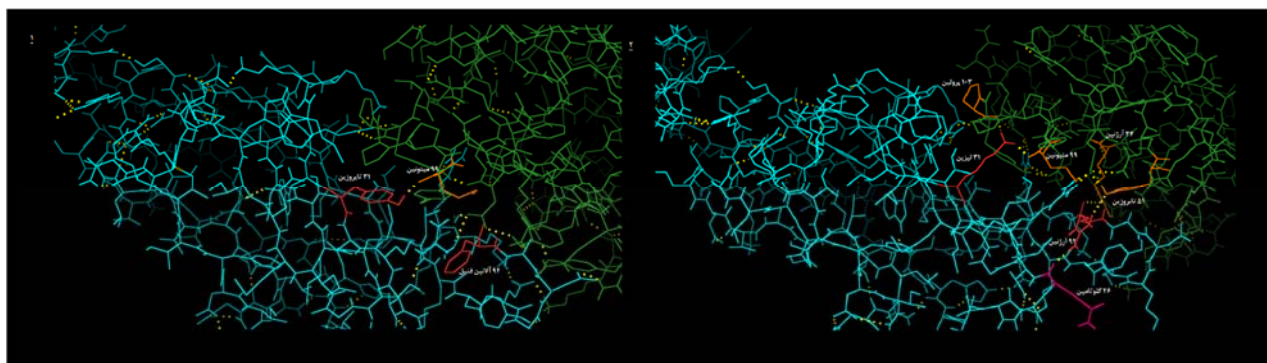
(شکل ۴). در شکل ۱-۴ اسیدآمینه تیروزین در جایگاه ۳۱ پروتئین CD80، یک پیوند هیدروژنی با اسیدآمینه متیونین در جایگاه ۹۹ پروتئین CD28 تشکیل داده است و برخلاف آن، اسیدآمینه فنیل‌آلانین هیچ پیوند الکترواستاتیکی با هیدروژنی با هیچ یک از اسیدهای آمینه CD28 تشکیل نداده است (شکل ۱-۴). با این حال، طبق تخمین سرور ROSETTA این اسیدآمینه از عوامل مهم در ایجاد کمپلکس بین پروتئین CD80 و CD28 است، به‌صورتی که



نمودار ۲ (۱) مقایسه مدل معرفی‌شده به‌عنوان بهترین مدل با مدل‌های ساخته‌شده در سایر کلاسترها؛ در این نمودار کلاستر ۱ و ۲ دارای بهترین امتیاز هستند (هر چقدر امتیاز HADDOCK منفی‌تر باشد بهتر است)؛ (۲) نمودار مقایسه نیروی الکترواستاتیک بین اعضای ۸ کلاستر؛ در این مقایسه کلاستر ۲ دارای بهترین نیروی الکترواستاتیک است و بعد از این کلاستر به ترتیب کلاسترهای ۱، ۴، ۷، ۳، ۵، ۸ و ۶ قرار می‌گیرند؛ (۳) نمودار مقایسه نیروی واندروالسی بین مدل‌های ساخته‌شده؛ از بین این مدل‌ها کلاستر ۷ دارای بهترین انرژی واندروالسی است و بعد از این کلاستر به ترتیب کلاسترهای ۲، ۵، ۴، ۳، ۶ و ۸ قرار می‌گیرند. از آنجایی که این مطالعه بیشتر روی اتصالات ایجادشده بر اثر انرژی الکترواستاتیک است، اولویت انتخاب بهترین کمپلکس، کمپلکسی است که بهترین انرژی الکترواستاتیک را دارد.

جدول ۲ بررسی انرژی واندروالسی، الکترواستاتیک، انرژی حاصل از حذف مولکول‌های آب در محل اتصال بین دو پروتئین و انرژی نواحی سطحی مدفون‌شده بر اثر اتصال

کمپلکس حاصل از پروتئین CD80 و وحشی و CD28	کمپلکس حاصل از پروتئین جهش‌یافته CD80 و CD28	
$-113 \pm 2/9$	$-132 \pm 4/4$	امتیاز HADDOCK
$-44/1 \pm 3/7$	$-44/3 \pm 2/1$	انرژی واندروالسی
$-242/2 \pm 01/7$	$-227/7 \pm 82/8$	انرژی الکترواستاتیک
$-18/7 \pm 6/2$	$-20 \pm 9/7$	انرژی حذف حلال
$143 \pm 0 \pm 0/8$	$1588/6 \pm 44/7$	نواحی سطحی مدفون‌شده



شکل ۴ اسیدهای آمینه مورد مطالعه در برهم‌کنش بین دو پروتئین CD80 و CD28؛ در این شکل ساختار پروتئین CD80 به رنگ آبی و ساختار پروتئین CD28 به رنگ سبز مشاهده می‌شود. پیوندهای هیدروژنی داخل مولکولی و بین مولکولی با رنگ زرد نشان داده شده‌اند و همچنین اسیدهای آمینه‌ای از CD80 که در این مطالعه دستکاری شده‌اند، با رنگ قرمز و اسیدهای آمینه‌ای که در CD28 با این اسیدهای آمینه در برهم‌کنش هستند، با رنگ نارنجی نشان داده شده‌اند. اسیدآمینه‌ای که به رنگ ارغوانی نشان داده شده، گلوتامین در جایگاه ۲۶ است. همچنین اسیدهای آمینه جایگاه ۳۱ و ۹۲ در پروتئین CD80 وحشی و برهم‌کنش‌های آنها (۱) و اسیدهای آمینه جایگاه ۳۱ و ۹۲ در پروتئین CD80 جهش‌یافته و برهم‌کنش‌های آنها (۲) نیز مشاهده می‌شود.

بر اثر این جهش، علاوه بر پیوندهای هیدروژنی که از قبل در نوع وحشی بودند، یک پیوند هیدروژنی جدید به کمپلکس اضافه شد. از طرف دیگر اسیدآمینه آرژنین که در جایگاه ۹۲ پروتئین CD80 قرار

شکل ۲-۴ اتصالات ایجادشده با اسیدهای آمینه جهش‌یافته را نشان می‌دهد. اسیدآمینه لیزین در جایگاه ۳۱ با دو اسیدآمینه متیونین ۹۹ و پرولین ۱۰۳ در پروتئین CD28 دو پیوند هیدروژنی ایجادکرد.

دارد، با دو اسید آمینه پروتئین CD28 شامل تیروزین در جایگاه ۵۱ و آرژنین در جایگاه ۳۴ دو پیوند هیدروژنی ایجاد کرد. علاوه بر این پیوندهای بین مولکولی، جهش فنیل آلانین به آرژنین باعث ایجاد یک پیوند هیدروژنی درون مولکولی جدید در پروتئین CD80 شد که این پیوند، بین اسید آمینه آرژنین ۹۲ با اسید آمینه گلوتامین ۲۶ بود (شکل ۲-۴). این پیوندها بیانگر این هستند که جهش فنیل آلانین به آرژنین نه تنها باعث افزایش قدرت اتصال پروتئین CD80 به پروتئین CD28 شده، بلکه به استحکام بیشتر پروتئین CD80 نیز کمک کرده است. به طور کلی بر اثر این جهش سه پیوند هیدروژنی جدید به اتصالات درون مولکولی CD80 اضافه شد.

نتیجه گیری

با اینکه گیرنده TCR از تنظیم کننده های اصلی فعالیت لنفوسیت های T به شمار می رود، ولی فعالیت این لنفوسیت ها توسط یک سری مسیرهای پیچیده تحریکی، هم تحریکی و مهاری کنترل می شود. بالانس بین مسیرهای سیگنالی مثبت و منفی عاملی است که باعث تنظیم پاسخ های این لنفوسیت ها در برهم کنش آنها با کمپلکس های MHC می شود. در بیماری سرطان، برخورد بین MHC سلول های APC با گیرنده TCR، باعث فعال شدن سلول T می شود و بعد از این مرحله، برهم کنش بین لیگاند های CD80 و CD86 در سطح APC با گیرنده CD28 باعث انتقال پیام تحریکی به داخل سلول T می شود. مدتی بعد از تحریک سلول T، گیرنده های CTLA-4 در سطح سلول های T بیان می شوند و چون تمایل اتصال بالاتری به CD80 و CD86 دارند، با اتصال به آنها مانع اتصال بیشتر این پروتئین ها به CD28 می شوند. بر اثر این برهم کنش ها، سلول T خاموش می شود. این مکانیزم به منظور جلوگیری از تحریک بیش از حد سیستم ایمنی و جلوگیری از خودایمنی است. مطالعات بسیاری برای جلوگیری از سرکوب سیستم ایمنی، بر اثر اتصالات بین گیرنده CTLA-4 و پروتئین های CD80 و CD28 انجام شده است. آنتی بادی های یکی از عواملی بودند که به منظور مسدود کردن جایگاه های اتصال CTLA-4 به کار گرفته شدند، اما به دلیل عوارض ناشی از مصرف، محققان در سال های اخیر به دنبال جایگزینی برای آنها بودند. به عنوان مثال مطالعات فراوانی برای طراحی پروتئین ها و داروهایی که آنتی بادی نیستند، اما خاصیت مهارکنندگی گیرنده های سطح سلولی را دارند انجام شده است [17]. از جمله این مطالعات، می توان به مطالعه ای که در سال ۲۰۱۵ در دانشگاه ییل انجام شد، اشاره کرد. در این مطالعه واریانتی از گیرنده PD-1 طراحی شد که دارای تمایل اتصال افزایش یافته به لیگاند PDL1 بود [18]. برای طراحی این واریانت، نوع وحشی پروتئین PD-1 در ۱۰ جایگاه با ۲۰ اسید آمینه جهش داده شد و از بین صدها واریانتی که بر اثر این جهش ها ایجاد شدند، سرانجام واریانتی که انرژی اتصالی آن، ۱۰ برابر بیشتر از نوع وحشی شده بود، به عنوان واریانت نهایی معرفی شد [19]. همچنین در سال ۲۰۱۷

واریانتی از پروتئین CD86 طراحی شد که دارای تمایل اتصالی افزایش یافته به اندازه ۱۰ تا ۳۰ برابر به گیرنده CTLA-4 بود که در نتیجه اتصال به این گیرنده، مانع از اتصال پروتئین های CD86 طبیعی به آن و در نتیجه عدم ارسال پیام های مهاری به داخل سلول T شد [20]. در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۸ روی گیرنده CD155 انجام شد، مانند مطالعات قبلی، واریانتی از CD155 طراحی شد که دارای تمایل اتصالی افزایش یافته به TIGIT، واقع در سطح سلول های T بود. در این مطالعه، جهش ها بر روی ۸ تا ۲۰ جایگاه در سطح پروتئین انجام شد و تک تک واریانت ها از نظر پایداری ساختار و افزایش تمایل اتصالی به گیرنده مورد نظر مورد بررسی قرار گرفتند. از بین تمامی واریانت ها، در نهایت واریانتی به عنوان محصول نهایی انتخاب شد که تمایل اتصالی آن بیش از ۱۰ برابر به گیرنده هدف افزایش پیدا کرده بود [21]. این مطالعات مثال های اندکی از صدها مطالعه ای هستند که در زمینه تکامل هدایت شده پروتئین ها به هدف طراحی داروهای نوین برای ایمنی درمانی سرطان انجام شده است [22] و پیش بینی می شود که روش تکامل هدایت شده و بررسی اثرات ناشی از آنها، تبدیل به یکی از اصلی ترین روش ها در زمینه طراحی دارو برای درمان بیماری هایی از جمله سرطان و خودایمنی شود [23].

در مطالعه حاضر برای اولین بار ایده تحریک بیشتر گیرنده CD28 به جای سرکوب کردن CTLA-4 مطرح شد. همچنین جهش یافته ای از پروتئین CD80 معرفی شد که دارای قدرت اتصال افزایش یافته به گیرنده CD28 است. در صورت ارزیابی آزمایشگاهی این پروتئین و انجام تست های مقایسه ای قدرت اتصال آن به پروتئین CD28 نسبت به نوع وحشی آن، می توان گفت که این نوع جهش یافته می تواند با قدرت اتصال بالاتری منحصرأ به CD28 متصل شود و در نتیجه می توان از آن به عنوان یک عامل کمک کننده در درمان سرطان استفاده کرد. برای مطالعات تکمیلی می توان این پروتئین جهش یافته را در محیط آزمایشگاه بیان کرد، قدرت اتصالی آن را اندازه گرفت و در نهایت میزان اثربخشی آن را با مطالعات گسترده تر روی موش های سرطانی شده بررسی کرد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از دانشگاه تهران به دلیل فراهم کردن امکانات پژوهشی این طرح کمال تشکر را دارند.

تاییدیه اخلاقی: مطالعه حاضر توسط همه نویسندگان تایید شده است. همچنین این مطالعه در نشریه دیگری به زبان فارسی، انگلیسی یا زبان دیگری چاپ نشده یا به طور همزمان برای نشریه دیگری ارسال نشده است.

تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: نسا پسران افشاریان (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۴۰٪)؛ زهره حاجی حسن (نویسنده دوم)، پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۳۰٪)؛ ناصر انصاری پور (نویسنده سوم)، روش شناس/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۳۰٪).

visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25(13):1605-12.

12- Dominguez C, Boelens R, Bonvin AM. HADDOCK: A protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc*. 2003;125(7):1731-7.

13- Sørensen P, Kussmann M, Rosén A, Bennett KL, Da Graça Thrige D, Uvebrant K, et al. Identification of protein-protein interfaces implicated in CD80-CD28 costimulatory signaling. *J Immunol*. 2004;172(11):6803-9.

14- Kim DE, Chivian D, Baker D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(suppl-2):W526-31.

15- Ihaka R, Gentleman R. R: A language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Stat*. 1996;5(3):299-314.

16- Evans EJ, Esnouf RM, Manso-Sancho R, Gilbert RJ, James JR, Yu C, et al. Crystal structure of a soluble CD28-Fab complex. *Nat Immunol*. 2005;6(3):271-9.

17- Davis AM, Plowright AT, Valeur E. Directing evolution: The next revolution in drug discovery?. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(10):681-98.

18- Maute RL, Gordon SR, Mayer AT, McCracken MN, Natarajan A, Ring NG, et al. Engineering high-affinity PD-1 variants for optimized immunotherapy and immuno-PET imaging. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(47):E6506-14.

19- Pascolutti R, Sun X, Kao J, Maute RL, Ring AM, Bowman GR, et al. Structure and dynamics of PD-L1 and an ultra-high-affinity PD-1 receptor mutant. *Structure*. 2016;24(10):1719-28.

20- Ellmark P, Furebring C, Dahlen E, inventors. CD86 variants with improved affinity for CTLA-4. U.S. Patent No. 9834589. 2017.

21- Swanson R, Kornacker M, Demonte DW, Maurer MF, inventors. CD80 variant immunomodulatory proteins and uses thereof. U.S. Patent Application No. 16320981. 2019.

22- Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. The future of cancer treatment: Immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(5):273-90.

23- Bornscheuer UT, Hauer B, Jaeger KE, Schwaneberg U. Directed evolution empowered redesign of natural proteins for the sustainable production of chemicals and pharmaceuticals. *Angew Chem Int Ed*. 2019;58(1):36-40.

منابع مالی: مطالعه حاضر از محل اعتبار پژوهشی شماره گرنت ۱۲/۰۶/۲۸۶۶۹ دانشگاه تهران تامین شده است.

منابع

- 1- Van Der Merwe PA, Dushek O. Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(1):47-55.
- 2- Gardner D, Jeffery LE, Sansom DM. Understanding the CD28/CTLA-4 (CD152) pathway and its implications for costimulatory blockade. *Am J Transplant*. 2014;14(9):1985-91.
- 3- Bajorath J, Peach RJ, Linsley PS. Immunoglobulin fold characteristics of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86). *Protein Sci*. 1994;3(11):2148-50.
- 4- Callahan MK, Wolchok JD, Allison JP. Anti-CTLA-4 antibody therapy: Immune monitoring during clinical development of a novel immunotherapy. *Semin Oncol*. 37(5):473-84.
- 5- Lipson EJ, Drake CG. Ipilimumab: An anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2011;17(22):6958-62.
- 6- Bertrand A, Kostine M, Barnette T, Truchetet ME, Schaefferbeke T. Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies: Systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2015;13(1):211.
- 7- Quirk SK, Shure AK, Agrawal DK. Immune-mediated adverse events of anticytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody therapy in metastatic melanoma. *Transl Res*. 2015;166(5):412-24.
- 8- Kähler KC, Hassel JC, Heinzerling L, Loquai C, Mössner R, Ugurel S, et al. Management of side effects of immune checkpoint blockade by anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies in metastatic melanoma. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2016;14(7):662-81.
- 9- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3381-5.
- 10- UniProt Consortium. UniProt: A hub for protein information. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D204-12.
- 11- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera-a