زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس

ارزیابی بیوانفورماتیک و شناسایی نواحی اپی‌توپی پروتئین F ویروس بیماری نیوکاسل

مریم برخورداری[۱]، معصومه باقری*[۲]، محمدحسین خانی[۳]، آزاده زحمت کش[۲]

۱-گروه آموزشی سلولی-مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهرانف ایران
۲-موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۲-گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*صندوق پستی:۳۱۹۷۶۱۹۷۷۵۱، کرج، ایران.
m.bagheri@rvsri.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۶ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۳

چکیده

ویروس بیماری نیوکاسل (NDV)، یکی از خطرناکترین عفونت های ویروسی را در بسیاری از پرندگان ایجاد می‌کند. مرگ‌ومیر بالا و خسارت های اقتصادی بسیار، حاصل آلودگی به این ویروس است که در حال حاضر راه حلی برای آن وجود ندارد. ذخیره طبیعی این ویروس در بین پرندگان و گاهی غیر پرندگانی، مانند حیوانات مزرعه باقی می‌ماند. در کشورهایی مانند ایران، این ویروس به یک وضعیت پایدار ر سیده ا ست. همچنین، این ویروس از طریق پرندگان مهاجر منتقل می شود. پروتئین F ویروس نیوکاسل یکی از عوامل مهم در بیماری‌زایی و تعیین سویه‌های بیماری‌زای این ویروس محسوب می‌شود که دارای نواحی مهمی در تعیین میزان بیماری‌زایی، تعیین میزان همجوشی ویروس و نکروز بافتی می‌با شد. در مطالعه حا ضر، با برر سی محا سباتی پروتئین F ویروس نیوکا سل، برخی ویژگی‌های مربوط به پروتئین، مانند ناحیه شکست و نواحی اپی‌توپی مهم و حفاظت شده در ایمنی‌زایی پروتئین، گونه‌های آلوده در منطقه خاورمیانه و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که پروتئین F ویروس نیوکاسل دارای نواحی بسیار محافظت شده می‌باشد و همچنین همولوژی بالایی بین توالی‌ها مشاهده می شود. با وجود حضور حداکثری سویه‌های بیماری‌زا در ناحیه خاورمیانه، سویه‌های غیر بیماری‌زا هم در ذخیره طبیعی این ویروس دیده می‌شوند. در این پژوهش با برر سی جامعی که انجام شد نواحی مهم در ایمنی‌زایی و ایجاد اپی‌توپ‌ها، شنا سایی شدند که می‌تواند در توسعه واکسن‌های نوترکیب علیه این ویروس، استفاده شود.

کلید واژگان: ویروس بیماری نیوکاسل، پروتئین F، مطالعه بیوانفورماتیک، بیماری‌زایی

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

۱-مقدمه

بیماری نیوکاسل توسط سویه‌های بیماری‌زای سروتایپ ۱ پارامیکس‌وویروس ماکیان APMV-1 یا ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) ایجاد می‌شود. این بیماری شیوع جهانی دارد [۲٤و۲۷]. عفونت ایجاد شده توسط ویروس بیماری نیوکاسل بسیار خطرناک بوده و با مرگ‌ومیر زیاد در پرندگان همراه است که خسارت اقتصادی بسیاری نیز، ایجاد می‌کند [۱]. این خسارت‌ها شامل کاهش تولید تخم، کاهش وزن، افزایش دوره پرورش و مرگ‌ومیر گله است. این بیماری، زیان‌های قابل‌توجهی در صنعت طیور مناطق مختلف جهان از جمله در کشور ایران ایجاد کرده است. آلودگی به ویروس نیوکاسل می‌تواند باعث مرگ‌ومیر تا ۱۰۰ درصد پرندگان آلوده به ویروس شود. همچنین، محدودیت در تجارت بین‌المللی محصولات ماکیان و تحریم کشورهای دارای شیوع نیوکاسل یکی از عوامل دیگر آسیب‌زای اقتصادی این بیماری است [۹].

مهمترین راه انتقال ویروس از طریق تماس مستقیم با پرندگان آلوده است. علاوه بر این، از طریق تماس با ترشحات پرندگان آلوده نیز بیماری منتقل می شود. مسیر انتقال مهم دیگر، هوا است [۷]. این ویروس علاوه بر آلوده کردن طیور، به طور طبیعی در خوک، گوسفند و حتی انسان مشاهده شده است [۳۰]. همچنین، گزارش‌ها حاکی از آن است که بیماری نیوکاسل در بیش از ۲۰۰ گونه‌ی پرندگان مشاهده شده است [۲۲].

قطر ویروس بیماری نیوکاسل حدود ۲۰۰-۳۰۰ نانومتر است که حاوی ژنومی در حدود ۱۵ کیلوباز از جنس RNA تک رشته‌ای است [٦]. پروتئین های ماتریس (M)، هماگلوتینین-نورآمینیداز (HN)، نوکلئوکپسید (NP)، فسفوپروتئین (P) و همجوشی (F) توسط ژنوم این ویروس، کد می‌شوند. لازم به ذکر است که پروتئین F دارای خواص ایمنی‌زایی بالایی است [۲۰،۱۳،۱۲].

واکسن‌های رایج بیماری نیوکاسل به دو گروه واکسن فعال (زنده) و واکسن غیرفعال تقسیم می‌شوند. واکسن‌های زنده، واکسن‌های حاوی ویروس‌های زنده‌ی ضعیف شده هستند، از این واکسن‌ها می‌توان به سویه‌های واکسن B1، V4، F، کوماروف و La Sota اشاره کرد [۱۱،٤]. واکسن غیرفعال توانایی تکثیر در بدن جاندار را نداشته، اما توانایی تحریک تولید پادتن در جاندار واکسینه شده را دارد [۲۹]. هر ساله برنامه‌های واکسیناسیون زیادی در مزرعه‌های پرورش ماکیان اجرا می‌شود، اما بسیاری از این برنامه ها با شکست مواجه می شوند. یکی از دلایل این عدم موفقیت، جهش‌های ویروسی است. از آنجایی‌که این ویروس دارای ژنوم RNA است، مستعد جهش‌های بیشتری است. لذا، عملکرد ضعیف واکسن‌های نیوکاسل به ویژه علیه سویه‌های نوظهور گزارش شده است [۸].

بررسی توالی‌های ویروس نیوکاسل بر اساس ناحیه جغرافیایی در گردش، یکی از روش‌های اصلی مطالعه این ویروس و تعیین ویژگی آن می‌باشد. در این راستا می‌توان به بسیاری از مالعات اخیر اشاره کرد که ناحیه‌های جغرافیایی خاصی مانند آفریقای غربی، آمریکای شمالی یا حتی شرق و جنوب شرق آسیا را در بر می‌گیرد [۲۵،۵،۳]. هرچند در مطالعات دیگر در مواردی ناحیه مورد مطالعه به یک کشور یا یک ناحیه از یک کشور خلاصه شده است. طراحی این‌گونه مطالعات نشان می‌دهد بررسی سویه‌های در گردش این ویروس وابستگی شدیدی به ناحیه جغرافیایی داشته و برای شناخت بهتر و آمادگی برای مقابله با این ویروس لازم است سویه‌های مرتبط با منطقه خاورمیانه مطالعه شود. متأسفانه در حال حاضر هیچ مطالعه جامعی در رابطه با این ویروس در منطقه خاورمیانه انجام نشده تا سویه‌های در گردش در این منطقه را مورد بررسی قرار دهد.

پروتئین F ویروس نیوکاسل یکی از مهمترین اجزای این ویروس در بیماری‌زایی می‌باشد. مطالعات زیادی در رابطه

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

با شناخت نواحی و توالی‌های ضروری این پروتئین انجام شـــده که پیش‌زمینه‌ی خوبی برای مطالعه این پروتئین در منـاطق دیگر را ایجـاد می‌کنـد. یکی از عوامـل مهم بیماری‌زایی در ویروس نیوکاسل مرتبط با ناحیه شکست پروتئین F این ویروس است. پیش پروتئین F در سویه‌های بیماری‌زای ویروس توسط پروتئازهای سلولی به قطعات F1 و F2 شکسته می‌شود. در سویه‌های بدون بیماری‌زایی یا با بیماری‌زایی اندک، این شـکسـت به‌دلیل چند شـکلی ژنی انجام نمی‌شـــود [۲۶]. هدف این پژوهش بررســی و مقایســه این پلی‌مورفیســم‌ها در پروتئین‌های F توالی‌یابی شده از سویه‌های جدا شده در منطقه خاورمیانه و بررسی پاتوژنیسیته (بیماری‌زایی) این سویه‌ها بود. بنابراین، در این مطالعه با اســتفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی ســویه‌های ویروس نیوکاســل منتشــر و موجود در منطقه خاورمیانه ، بررســی شــد. به کمک نتایج این مطالعه می‌توان اطلاعات جامع‌تری در رابطه با سویه‌های در گردش این ویروس در خـاورمیـانـه بـه‌دســـت آورد کـه می‌توانـد در کنترل اپیدمیولوژیک بیماری مؤثر واقع شود.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱ تهیه بانک توالی ژنی

توالی‌های ژنی ویروس نیوکاسل که بین سال‌های ۲۰۱۰ تا ۲۰۲۰ از منطقه خاورمیانه جدا سازی شده بودند از پایگاه داده نوکلئوتید وبسایت https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ تهیه شدند. زمان و مکان جداسازی در کشورهای مختلف خاورمیانه، فیلترهای انتخاب توالی بودند. سپس، توالی‌های ژنوم کامل، بخشـی از ژنوم، پروتئین‌های F کامل و ناقص در این پایگاه ژنی بررسی شدند (جدول ۱).

۲-۲ همولوژی توالی‌ها و بررسی توالی‌های پروتئینی

بررسی همولوژی توالی‌ها بین جدایه‌های NDV با استفاده از پلتفرم BLAST [۲] از وبســایت NCBI و همچنین نرم افزار BioEdit (ورژن ۷) [۱۳] انجام شد. توالی ژن‌ها برای ساده سازی مقایسه‌ها و کاهش اثر جهش‌های خاموش در بررســی های بیوانفورماتیکی به توالی پروتئینی مربوطه تبدیل شــدند. ترجمه توالی با رعایت قالب خوانش در ســرور https://web.expasy.org/translate/ [۱۶] انجام شــد. همچنین، در ادامه، با اســتفاده از نرم‌افزار BioEdit (ورژن ۷) جایگزینی های شــایع آمینواســیدی که با بیماری‌زایی ویروس در ارتباط است، بررسی شدند.

۲-۳ پیش‌بینی اپی توپ های B Cell و آنتی‌ژن های حفاظت‌گر

در این مطالعه آنتی‌ژن‌های حفاظت‌گر و اپی‌توپ‌های B Cell از توالی‌های بومی ایران و دیگر کشورهای خاورمیانه بررســی شــد. اپی‌توپ‌های B Cell از طریق ابزارهای وبســایت IEDB پیش‌بینی شــدند [۲۱] و ایمنی‌زایی از طریق وبسایت VaxiJen (ورژن ۲) [۱۰] پیش‌بینی شد.

۲-٤ پاتوتایپینگ (بررسی پاتوژنیسیته)

همانطور که در مقدمه این مطالعه اشاره شد یکی از عوامل اصــلی بیماری‌زایی این ویروس در ارتباط با شــکســت پروتئین F است. در این رابطه آمینو اسیدهای ۱۱۲ تا ۱۱۷ که در موتیف برش پروتئین F دارای اهمیت هســتند، بررسی شدند. این بررسی توسط نرم‌افزار BioEdit (ورژن ۷) انجام شد.

۲-۵ پیش‌بینی پارامترهای فیزیکوشیمیایی

ســـرور آنـــلایـــن ProtParam [۱۵] بـــا آدرس http://web.expasy.org/protparam/ برای بررســی دقیق پارامترهای فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های F استفاده شد. این پارامترها شامل ترکیب آمینواسیدها، متوسط هیدروپاتیکی (GRAVY)، شــاخص بی‌ثباتی، نقطه ایزوالکتریک محاسباتی، وزن مولکولی نیمه عمر *in vitro* و *in vivo* و شاخص آلیفاتیک می‌باشد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

جدول ۱ توالی‌های ژنی کشورهای منطقه خاورمیانه بین سال های ۲۰۱۰ تا ۲۰۲۰

کد دسترسی GenBank	میزبان ویروس	کشور
MH247184.1; MH247186.1	مرغ	ایران
MK592884.1	کبوتر	ایران
MK495904.1	مرغ	مصر
MG717686.1	خوتکا	مصر
KY042129.1	کبوتر	مصر
MK495909.1	مرغ	مصر
MK561381.1; MK561382.1	هوبره آفریقایی	امارات
MK673997.1	شتر عربی	امارات
MK561383.1	گنجشک	امارات
MK253647.1;MK253646.1; MN901944.1; MN901945.1	مرغ	عراق
MG022112.1; MG022111.1	مرغ	عربستان
AY471786.1	کبوتر	عربستان
KT585628.1	مرغ	ترکیه
MK210596.1; MK210597.1	بوف کوچک	ترکیه
MH746217.1	مرغ خانگی	لبنان
MH746218.1	مرغ گوشتی	لبنان
KP719224.1	مرغ	لیبی
MK978147.1	مرغ	کویت
JQ176687.1	مرغ گوشتی	اردن

۲-٦ پیش‌بینی اپی توپ های B Cell و آنتی‌ژن های حفاظت‌گر

در این مطالعه آنتی‌ژن‌های حفاظت‌گر و اپی‌توپ‌های B Cell از توالی‌های بومی ایران و دیگر کشورهای خاورمیانه بررسی شدند. اپی‌توپ‌های B Cell از طریق ابزارهای وبسایت IEDB پیش‌بینی شدند[۲۱] و ایمنی‌زایی از طریق وبسایت VaxiJen (ورژن ۲) [۱۰] پیش‌بینی شد.

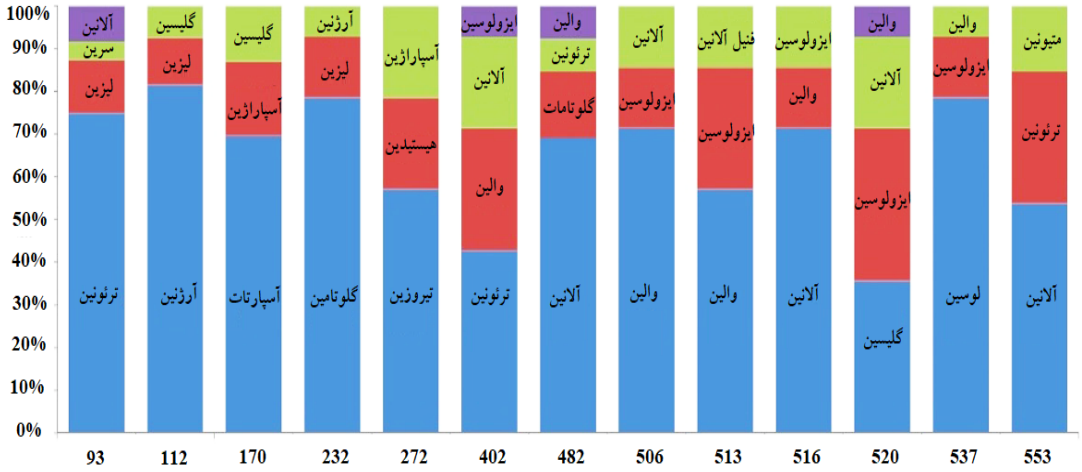
۳- نتایج و بحث

پس از بررسی توالی‌های استخراج شده، مشاهده شد که بیشتر سویه‌های ویروس نیوکاسل از مرغ جدا شده بودند. در توضیحات برخی از این توالی‌ها اشاره شده است که از

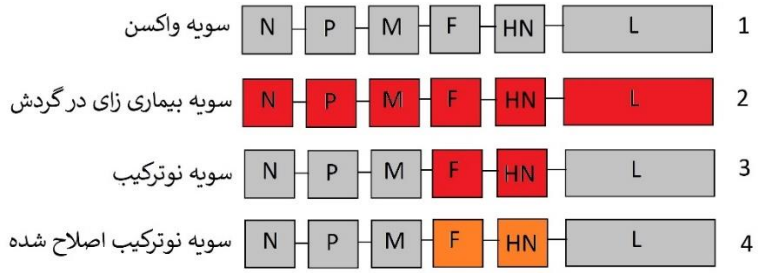
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

مرغ‌های پرورشی گوشتی یا مرغ‌های بومی، جداسازی ویروس انجام شده است. به جز یک مورد پستاندار (شتر)، تمام توالی‌های به‌دست آمده، از پرندگان بودند که برخی از این پرندگان مانند خوتکا توانایی مهاجرت دارند. البته نمی‌توان به‌طور قطع در رابطه با مهاجرت یک پرنده بیمار نظر داد، زیرا، بیماری نیوکاسل در شکل‌های با بیماری‌زایی کم نیز می‌تواند پرنده را زمین‌گیر کند. نتایج نشان داد پروتئین‌های مورد برر سی دارای همولوژی بالایی بودند تا جایی که بین ۸۸,۷۵–۹۶,۱ درصد یکسان بودند و تمام توالی‌ها بدون فاصله همپوشانی داشتند. موقعیت‌های متغیر در شکل ۱ نشان داده شده است.

موقعیت ۹۳ با چهار آمینواسید متنوع TASN، موقعیت ۱۱۲ با سه آمینواسید RKG، موقعیت ۱۷۰ با سه آمینواسیدNDG، موقعیت ۲۳۲ با سه آمینواسید QRK، موقعیت ۲۷۲ با سه آمینواسید YNH و موقعیت ٤٠٢ با چهار آمینواسید TAVI، موقعیت ٤٨٢ با چهار آمینواسید ATEV، موقعیت ٥٠٦ با سه آمینواسید VAI، موقعیت ٥١٣ با سه آمینواسید VAF، موقعیت ٥١٦ با سه آمینواسید AVI، موقعیت ٥٢٠ با چهار آمینواسید GAVI، موقعیت ٥٣٧ با سه آمینواسید LIV، موقعیت ٥٥٣ با سه آمینواسید ATM نقاط متغیر را داشتند.



شکل ۱ موقعیت‌های متغیر پروتئین‌های مورد بررسی. محور افقی نشان دهنده جایگاه آمینواسید متغیر در پروتئین F ویروس نیوکاسل بوده و محور عمودی فراوانی هر آمینواسید در جایگاه مشخص را بر حسب درصد نمایش می‌دهد.



شکل ۲ مراحل پیشنهادی برای تولید سویه واکسن بومی نوترکیب

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

مراحل پیشنهادی برای تولید سویه واکسن بومی نوترکیب در شکل ۲ نشان داده شده است: ۱) ترتیب و نحوه قرارگیری ژن‌های سویه واکسن موجود و مورد استفاده، ۲) ترتیب و نحوه قرار گیری ژن‌های سویه بیماری‌زای در گردش، ۳) نوترکیب‌سازی سویه‌های واکسن و بیماری‌زای جدید بر اساس مطالعات انجام شده روی توالی‌های تغییر یافته، و ٤) تغییر در توالی هایی که بیماری‌زایی ویروس نیوکاسل را القا می‌کنند، مانند تغییر در ناحیه ۱۱۲ تا ۱۱۷ پروتئین F و تغییر آن به نوع غیر بیماری‌زا. نوع بیماری‌زایی و توالی برش در آمینو اسیدهای ۱۱۲ تا ۱۱۷ در جدول ۲ نشان داده شده است. جدول ۳ ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین F ویروس بیماری نیوکاسل را نشان می‌دهد. پیش‌بینی اپی‌توپ سلول‌های B نشان داد که تقریبا ۱۲ ناحیه اپی‌توپی برای پروتئین‌های F وجود دارد. بررسی ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی این پروتئین نشان می دهد که این پروتئین با داشتن ۵۵۳ آمینو اسید و وزن مولکولی حدود ۵۹ کیلو دالتون یک پروتئین با وزن متوسط است که توالی هیدروفوب بالایی دارد.

جدول ۲ نوع بیماری‌زایی و توالی برش در آمینو اسیدهای ۱۱۲ تا ۱۱۷

کد دسترسی	توالی برش در پروتئین F	نوع بیماری‌زایی
MH247184.1	RRQKRF	Virulent
MH247185.1	RRQKRF	Virulent
MH247186.1	RRQKRF	Virulent
MK495904.1	RRQKRF	Virulent
AY471786.1	RRQKRF	Virulent
KP719224.1	RRQKRF	Virulent
MK978147.1	RRQKRF	Virulent
MK561381.1	RRQKRF	Virulent
MK561382.1	RRQKRF	Virulent
MK673997.1	KRQKRF	Virulent
MK561383.1	RRQKRF	Virulent
MK253647.1	RRQKRF	Virulent
MK253646.1	GRQGRL	Avirulent
MK592884.1	KRQKRF	Virulent
MH247189.1	GRQGRL	Avirulent
MG717686.1	RRQKRF	Virulent
KY042129.1	KRQKRF	Virulent
MK495909.1	RRQKRF	Virulent
KT585628.1	RRQKRF	Virulent
MK210596.1	RRQKRF	Virulent
MK210597.1	RRQKRF	Virulent
MG022112.1	RRQKRF	Virulent
MG022114.1	RRQKRF	Virulent
MG022111.1	RRQKRF	Virulent
MN901944.1	RRQKRF	Virulent
MN901945.1	RRQKRF	Virulent

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

جدول ۳ ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین F ویروس بیماری نیوکاسل

Instability index	isoelectric point	Aliphatic index	Mostly amino acids	Gravy	molecular weight	Number of amino acids	کد دسترسی GenBank
33.03 stable	8.34	108.30	Leu; Thr; Ser	0.180	59018.04	553	MH247184.1
32.17 stable	8.34	109.01	Leu; Thr; Ser	0.185	59057.12	553	MH247185.1
33.06 stable	8.34	109.01	Leu; Thr; Ser	0.195	59017.10	553	MH247186.1
31.32	8.34	109.56	Leu; Thr; Ser	0.216	58879.03	551	KP719224.1
33.64	8.32	110.40	Leu; Thr; Ser	0.222	59018.24	553	MK978147.1
35.48	8.58	110.78	Leu; Thr; Ser	0.214	58932.11	553	MK673997.1
32.03	8.48	109.53	Leu; Thr; Ser	0.211	59120.32	553	MK253647.1
37.00	8.66	109.51	Leu; Thr; Ser	0.190	59023.41	553	MK253646.1
34.32	8.32	109.89	Leu; Thr; Ser	0.215	58892.00	553	MK592884.1
37.64	8.56	109.17	Leu; Thr; Ser	0.193	58896.22	553	MH247189.1
32.26	8.61	108.48	Leu; Thr; Ser	0.175	59160.27	553	MG717686.1

حضور آمینو اسید لوسین در توالی‌های هپتاد این پروتئین که در عملکرد همجوشی آن بسیار مهم است، یکی از دلایل هیدروفوب بودن این پروتئین است. این اپی‌توپ‌ها شامل اپی‌توپ های خطی و ساختاری می شوند. خلاصه نواحی اپی‌توپی این پروتئین که حفاظت شدگی قابل توجهی بین بیشتر سویه‌ها دارند، در جدول ٤ مشاهده می‌شود. همچنین، در این بررسی، ناحیه پپتید نشانه به‌عنوان اپی‌توپ معرفی شد ولی مورد تایید قرار نگرفت.آمینو اسیدهایی که با رنگ قرمز مشخص شده اند در پپتید حفاظت شده نیستند. موقعیت‌های مشخص شده با علامت "زیرخط" قرمز رنگ جایگاه‌هایی را نشان می دهند که امتیاز لازم را جهت حضور در اپی‌توپ کسب نکرده‌اند. این نواحی ممکن است به‌صورت اپی‌توپ ساختاری حضور داشته باشند.

پروتئین F ویروس بیماری نیوکاسل یکی از دو گلیکوپروتئین سطحی این ویروس است که در ورود ویروس نیوکاسل به سلول میزبان با همجوشی غشای پلاسمایی سلول میزبان و ویروس نقش دارد. پروتئین F یک پیش ساز ۵۵۳ آمینواسیدی دارد که باید به دو قطعه که با باند دی‌سولفیدی به هم متصل هستند، شکسته شود تا پروتئین فعال ایجاد شود [۲۳]. شکست پروتئولیتیک این پروتئین وابسته به پروتئازهای سلول میزبان است که ممکن است در ناحیه شناسایی خود متفاوت باشند. برخی از این پروتئازها توالی‌های آمینو سیدی یک بازی و برخی چند بازی را به‌عنوان سوبسترا شناسایی می‌کنند [١٤]. نتایج بررسی ناحیه شکست پروتئولیتیک پیش پروتئین F که میزان بیماری‌زایی سویه را مشخص می‌کند، نشان داد که اکثر سویه‌های بررسی شده ناحیه‌ی شکست مرتبط با سویه بیماری‌زا را دارند. از این میان، دو مورد MH247189.1 و MK253646.1 توالی شکست متفاوتی داشتند که مرتبط با سویه‌های غیر بیماری‌زا بود. حضور آمینواسید فنیل آلانین در موقعیت ۱۱۷ یکی از عوامل احتمالی ایجاد کننده اثرات عصبی در این ویروس است، که با نتایج محمد و همکاران [۲۲] مطابقت داشت. تمام توالی‌های مورد بررسی به جز دو مورد MH247189.1 و MK253646.1 دارای این آمینواسید در موقعیت ۱۱۷ هستند. شکست پروتئولیتیک پروتئین پیش ساز F به میزانی در بیماری‌زایی ویروس نیوکاسل اهمیت دارد که

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

یکی از مراحل تولید واکسن ویروس نیوکاسل تغییر توالی آمینواسیدی در ناحیه شکست، به توالی ای است که قابلیت شکست نداشته باشد[۱۹]. در این راستا، مراحل تولید یک واکسن می‌تواند شامل استفاده از یک سویه واکسن رایج به‌عنوان قالب اصلی کار و جاگزینی ژن های تغییر یافته در سویه‌های در گردش باشد (شکل ۱). به همین دلیل مطالعه دقیق سویه‌های در گردش در یک ناحیه ی جغرافیایی برای ویروس نیوکاسل توصیه می‌شود.

در چند مطالعه [۱۸،۱۷] حضور آمینواسیدهای بازی در ناحیه شکست پروتئین یکی از عوامل مهم در بیماری‌زایی سویه ویروس نیوکا سل معرفی شده است. در مطالعات تکمیلی نشان داده شده است که حضور دو جفت آمینوا سید بازی که تو سط یک گلوتامین از هم جدا شده اند، در فعال‌سازی پروتئازهای سلولی بسیار مؤثر عمل می کنند تا جایی که جایگزینی هر یک از این آمینواسیدها می‌توا ند عملکرد پروتئاز ها را مختل کند. نتایج این پژوهش کاملا با نتایج پژوهش‌های پیشین همسو بوده و در این پژوهش تمام توالی‌های RRQKRF و KRQKRF الگوی جفت آمینواسید بازی را نشان دادند که در طبقه بندی ویروس‌های بیماری‌زا قرار گرفتند. لازم به ذکر است که در این پژوهش الگوی RRQRRF مشاهده نشد. الگوی RRQRRF در کشورهایی مانند سوییس، سوئد، آلمان و روسیه در سال‌های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۱ مشاهده شده است [۲۸]. علاوه بر این، فشار تکاملی و نیاز به حفاظت شدگی توالی برش در بیماری‌زایی ویروس نیوکاسل باعث شده است که تغییرات آمینواسیدی از یک آمینواسید بازی (لایزین) به یک آمینواسید بازی دیگر (آرژنین) انجام شود. همچنین، پس از هر اپیدمی ویروس نیوکاسل یا دیگر ویروس‌ها، مطالعات بسیاری در رابطه با سویه عامل اپیدمی منتشر می‌شود. در این مطالعات ویژگی های ویروس نیوکاسل مربوطه با دقت بسیار شرح داده شده و تمام عوامل شناخته شده در رابطه با بیماری‌زایی سویه نوظهور بررسی می‌شود.

جدول ٤ نواحی اپی‌توپی حفاظت شده‌ی پروتئین F

شماره	موقعیت در پروتئین	پپتید
۱	۳۵-۳۰	SSLDGR
۲	۸٦-٦۹	MPRDKEACAKAPLEAYNR
۳	۱۱٤-۱۰۳	QGSVSTSGGRRQ
٤	۱۹۷-۱۸۷	NDQ_NNT__EL_CIK
۵	۲۲۳-۲۲۲	GPQITSPALTQL
٦	۲٦۰-۲۵۱	TKLGIGNNQL
۷	۳٤۰-۳۲۸	SVIEELDTSYCIE
۸	۳۵۷-۳٤۸	TRIVTFPMSP
۹	۳۸۰-۳٦۷	TSAC_YSKTEGALT
۱۰	٤۱۳-٤۰۷	IISQNYG
۱۱	٤٦٤-٤٤۱	DATYQKNISILDSQVIVTGNLDIS
۱۲	۵٤۹-۵۳۰	KAQQKTLIGLGNNTLDQMRA

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

روش‌هایی که در مطالعه حاضر به‌کار رفته‌اند، می‌تواند برای سویه‌های هر اپیدمی جدید و استخراج اطلاعات جدید از سویه‌ها استفاده شوند.

ارزیابی بیوانفورماتیک توالی‌های اپی‌توپی برای تهیه واکسن‌های نوترکیب و ساب یونیت اهمیت زیادی دارد. در یک مطالعه‌ی *in silico*، با ارزیابی ایمونوانفورماتیک اپی‌توپ‌های ایمونوژن و حفاظت شده‌ی گلیکوپروتئین های F و HN ویروس نیوکاسل ارزیابی شدند و برای تهیه ی واکسن نیوکا سل ساب یونیت خوراکی بررسی شدند. نتایج مطالعات ساختاری و عملکردی مناسب بودن این واکسن را برای تجویز خوراکی در مرغ‌ها نشان داد [۳۱].

در مطالعه‌ی حاضر، نواحی اپی‌توپی حفاظت شده B-cellدر پروتئین F در سویه‌های در گردش ویروس نیوکاسل تعیین شده و همچنین ناحیه شکست پروتئولیتیک این پروتئین هم در سویه‌های موردنظر بررسی شده است. اطلاعات به‌دست آمده می‌تواند برای تهیه واکسن *in silico* استفاده شود.

در مطالعه‌ای، نواحی اپی‌توپی پروتئین HN ویروس نیوکاسل در ۱۵ ویروس نیوکاسل جداسازی شده از چین شرقی به کمک آنتی‌بادی مونوکلونال و تست ممانعت هماگلوتیناسیون (HI) تعیین شد و خطر احتمالی این سویه‌ها در صنعت مرغداری بررسی شد [۳۲]. اهمیت ارزیابی اپی‌توپ‌های پروتئینی از طریق آنالیز بیوانفورماتیک این است که با محدود کردن دامنه‌ی برخی فاکتورها، فشار کار و زمان آزمایشات بعدی *in vitro* را کاهش می‌دهد و دقت نتایج را بالا می‌برد. نتایج این پژوهش می‌تواند برای آزمایشات تکمیلی *in vitro* استفاده شود.

٤- نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تفاوت بین توالی های مشاهده شده در کشورهایی از منطقه خاورمیانه که فاصله جغرافیایی کم و ارتباط بیشتری دارند، احتمال فرضیه گسترش اختصاصی جغرافیایی ویروس نیوکاسل را افزایش می‌دهد. همچنین، از آنجا که نیمه انتهای کربوکسیلی پروتئین F بررسی شده در سویه‌های جدا شده در منطقه خاورمیانه، در برر سی‌های بیوانفورماتیکی، امتیاز بالایی از لحاظ اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده کسب کرد، برای تهیه واکسن‌های نوترکیب و کیت‌های تشخیصی ویروس نیوکاسل توصیه می‌شود.

٥- منابع

[1] Alexander, D.J., Aldous, E.W., and Fuller. C.M.)2012)The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathol.* 41(4), 329-35.

[2] Altschul, S.F., Gish, W. Miller, W. Myers, E.W. and Lipman, D.J.)1990)Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3), 403-10.

[3] Ansori, A.N., and Kharisma, V.D. (2020)Characterization of Newcastle disease virus in Southeast Asia and East Asia: Fusion protein gene. *EKSAKTA: J. Sci. Data Anal.* 20(1), 14-20.

[4] Ayala, A.J., Dimitrov, K.M., Becker, C.R., Goraichuk, I.V., Arns, C.W., Bolotin, V.I., Ferreira, H.L., Gerilovych, A.P., Goujgoulova, G.V., Martini, M.C., and Muzyka, D.V. (2016) Presence of vaccine-derived Newcastle disease viruses in wild birds. *PloS one* 11(9), e0162484.

[5] Brown, V.R., and Bevins, S.N. (2017) A review of virulent Newcastle disease viruses in the United States and the role of wild birds in viral persistence and spread. *Vet. Res.* 48(1), 1-5.

[6] de Leeuw, O., and Peeters, B. (1999) Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J. Gen. Virol.* 80(1), 131-6.

[7] Dimitrov, K.M., Ferreira, H.L., Pantin-Jackwood, M.J., Taylor, T.L., Goraichuk, I.V., Crossley, B.M., Killian, M.L., Bergeson, N.H., Torchetti, M.K., Afonso, C.L., and Suarez, D.L. (2019) Pathogenicity and transmission of virulent Newcastle disease virus from the 2018–2019 California outbreak and related viruses in young and adult chickens. *Virology* 531, 203-18.

[8] Dimitrov, K.M., Afonso, C.L., Yu, Q., and Miller, P.J. 2017. Newcastle disease vaccines—

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

Newcastle disease virus. *Arch. Virol.* 150(3), 611-8.

[19] Kim, S.H., Wanasen, N., Paldurai, A., Xiao, S., Collins, P.L., and Samal, S.K. (2013.) Newcastle disease virus fusion protein is the major contributor to protective immunity of genotype-matched vaccine. *PloS one* 8(8), e74022.

[20] Kim, L.M., Suarez, D.L., and Afonso, C.L. (2008) Detection of a broad range of class I and II Newcastle disease viruses using a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20(4), 414-25.

[21] Larsen, J.E., Lund, O., and Nielsen, M. 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res.* 2(1): 1-7.

[22] Mohamed, M.H., Kumar, S., Paldurai, A., and Samal, S.K. (2011) Sequence analysis of fusion protein gene of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in Egypt during 2006. *Virol. J.* 8(1), 1-4.

[23] Morrison, T.G. (2003) Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 1614(1), 73-84.

[24] Pedersen, J.C., Senne, D.A., Woolcock, P.R., Kinde, H., King, D.J., Wise, M.G., Panigrahy, B., and Seal, B.S. (2004) Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America. *J. Clin. Microbiol* 42(5), 2329-34.

[25] Snoeck, C.J., Adeyanju, A.T., Owoade, A.A., Couacy-Hymann, E., Alkali, B.R., Ottosson, U., Muller, C.P. (2013) Genetic diversity of Newcastle disease virus in wild birds and pigeons in West Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(24), 7867-74.

[26] Swanson, K., Wen, X., Leser, G.P., Paterson, R.G., Lamb, R.A., and Jardetzky, T.S. (2010) Structure of the Newcastle disease virus F protein in the post-fusion conformation. *Virology* 402(2), 372-9.

[27] Toyoda, T., Sakaguchi, T., Imai, K., Inocencio, N.M., Gotoh, B., Hamaguchi, M., and Nagai, Y. (1987) Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus. *Virology* 158(1), 242-7.

A solved problem or a continuous challenge? *Vet. Microbiol.* 206: 126-36.

[9] Dortmans, J.C., Koch, G., Rottier, P.J., and Peeters, B.P. (2011) Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? *Vet. Res.* 42(1), 122.

[10] Doytchinova, I.A., and Flower, D.R. (2007) VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumor antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinform.* 8(1), 4.

[11] Elamin, M.G., Khalafalla, A.I., and Ahmed, S.M. (1993) Observations on the use of Komarov strain of Newcastle disease vaccine in the Sudan. *Trop. Anim. Health Prod.* 25(3), 151-4.

[12] Errington, W., and Emmerson, P.T. (1997) Assembly of recombinant Newcastle disease virus nucleocapsid protein into nucleocapsid-like structures is inhibited by the phosphoprotein. *J. Gen. Virol.* 78(9), 2335-9.

[13] Hall, T.A., (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: Nucleic Acids Symposium Series 41. PP 95-98.

[14] Heiden, S., Grund, C., Röder, A., Granzow, H., Kühnel, D., and Mettenleiter, T.C. 2014. Römer-Oberdörfer A. Different regions of the newcastle disease virus fusion protein modulate pathogenicity. *PLoS One* 9(12), e113344.

[15] Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M.R., Appel, RD., and Bairoch, A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. PP 571-607. In: J.M. Walker (ed) The Proteomics Protocols Handbook. Springer Protocols Handbooks. Humana Press.

[16] Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31(13), 3784-3788.

[17] Glickman, R.L., Syddall, R.J., Iorio, R.M., Sheehan, J.P., and Bratt,M.A.. (1988) Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *J. Virol* 62(1), 354-6.

[18] Jahanshiri, F., Eshaghi, M., and Yusoff, K. (2005) Identification of phosphoprotein: phosphoprotein and phosphoprotein: nucleocapsid protein interaction domains of the

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

[28] Wang, J.Y., Liu, W.H., Ren, J.J., Tang, P., Wu, N., Wu, H.Y., Ching, C.D., and Liu, H.J. (2015) Characterization of emerging Newcastle disease virus isolates in China. *Virol. J.* 12(1), 1-21.
[29] Winterfield, R.W., Dhillon, A.S., and Alby, L.J. (1980) Vaccination of chickens against Newcastle disease with live and inactivated Newcastle disease virus. *Poult. Sci.* 59(2), 240-6.
[30] Yuan, X., Wang, Y., Yang, J., Xu, H., Zhang, Y., Qin, Z., Ai, H., and Wang, J. (2012) Genetic and biological characterizations of a Newcastle disease virus from swine in china. *Virol. J.* 9(1), 129.
[31] Mozafari, A., Amani, J., Shahsavandi, S., Hatef Salmanian, A. (2022) A Novel Multi-Epitope Edible Vaccine Candidate for Newcastle Disease Virus: In Silico Approach. *Iran J Biotechnol*. 20(2):e3119.
[32] Hu, S., Wang, T., Liu, Y., Meng, C., Wang, X., Wu, Y., Liu, X. (2010) Identification of a variable epitope on the Newcastle disease virus hemagglutinin–neuraminidase protein, *Vet. Microbiol.* 140(1), 92-97.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــ ـــ ـــ ـــ ـــ ـــ

Maryam Barkhordari[1], Masoumeh Bagheri[2*], Mohammad-Hosein Khani[3], Azadeh Zahmatkesh[2]

1. Cell & Molecular Biology Department, Biological Sciences Faculty, Kharazmi University, Tehran, Iran.
2. Razi Vaccine and Serum Research Institute (RVSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
3. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

m.bagheri@rvsri.ac.ir

Receipt: 2023/04/15 Accepted: 2024/08/24

Abstract

Newcastle disease virus (NDV) causes one of the most dangerous infections in birds. High economic losses and high mortality are outcomes of this virus, which does not have any immediate cure. The natural reservoir of this virus can remain among bird and non-bird animals like farm animals. In Iran, this virus has reached a steady situation. Also, it should be mentioned that migrating birds can transfer the virus. The F protein of the virus is essential in pathogenicity and determination of pathogenic strain of NDVs, which has the regions that are essential in pathogenicity, immunogenicity, cell fusibility, and tissue necrosis. In this study, with computational analysis of this protein, some features related to this protein such as protein cleavage site, the conserved region in immunogenicity, infected species in Middle Eastern countries, and physicochemical properties of protein were determined. Results showed that the F protein of NDV consists of highly conserved regions that show a high rate of similarity and identity. Despite the majority of strains characterized as pathogenic, there were still non-pathogenic strains circulating in the Middle East. In this comprehensive study, protein regions essential in immunogenicity and epitope formation were identified, which may be used in the development of recombinant vaccines against this virus.

Keywords: Newcastle disease virus, F protein, Bioinformatics study, Pathogenicity

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]