

پیش‌بینی بهترین نواحی تحریک‌کننده سیستم ایمنی پروتئین Vif ویروس HIV در بیماران ایرانی مبتلا به ایدز

زهره حسن شاهی^۱، بهزاد دهقانی^۲، طیبه هاشم‌پور^{۳*}

- ۱- لیسانس زیست‌شناسی، مرکز تحقیقات ایدز شیراز، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۲- فوق لیسانس میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات ایدز شیراز، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۳- استادیار مرکز تحقیقات ایدز شیراز، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

* صندوق پستی ۷۱۶۵۹۸۳۸۸۵، شیراز، ایران
thashempour@sums.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۰۱

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۷

چکیده

ویروس HIV دارای حداقل شش ژن تنظیمی است که از بین آنها پروتئین Vif می‌تواند تکثیر ویروس را کنترل کند. این مطالعه برای اولین بار به بررسی جهش‌های مهم در پروتئین VIF در توالی‌های مربوط به بیماران ایرانی پرداخته است و با استفاده از دانش ایمونوفورماتیک، مناطق ثابت این پروتئین و توالی‌های اپی‌توپی B-Cell، T-CELL و CTL تعیین شدند. توالی‌های VIF از بانک ژنی NCBI جمع‌آوری شد و از طریق نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک، ساختار سوم و جایگاه‌های اپی‌توپی B-Cell، T-CELL و CTL آنها پیش‌بینی شد و خواص آنتی ژنیک و حساسیت‌زایی آنها مطالعه شد. بیشترین شیوع جهش‌ها به ترتیب مربوط به جایگاه‌های S 49 P (۹۰٪) و S 140 N و N 186 S (۸۰٪) بود. همچنین دو جابه‌جایی باقابلیت تأثیر در قدرت اتصال پروتئین VIF به فاکتور میزبان در جایگاه‌های ۴۱ و ۴۲ در این مطالعه معرفی شدند. سه منطقه به‌عنوان توالی‌های اپی‌توپی با تحریک‌کنندگی بالا و حساسیت‌زایی کم تعیین شد که از میان آنها ناحیه ۵-۳۲ به‌عنوان بهترین ناحیه برای طراحی واکسن پیشنهاد شد. این مطالعه به‌عنوان اولین مطالعه از ایران با به‌کاربردن ابزارهای بیوانفورماتیک یک ناحیه باقابلیت بالای تحریک سیستم‌های ایمنی همورال و سلولی و همچنین کمترین خواص حساسیت‌زایی معرفی شد، که می‌تواند در مطالعات آتی در زمینه واکسن‌های ضد HIV مورد استفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌گان: HIV، VIF، اپی‌توپ، بیوانفورماتیک

۱- مقدمه

عامل ایجاد بیماری نشانگان کمبود ایمنی اکتسابی^۱، ویروس نقص سیستم ایمنی انسان^۲ (HIV) است، که یکی از اعضای خانواده ویروس های رتروویریده^۳ است. پژوهشگران معتقدند منشأ این ویروس در خلال سده بیستم از آفریقا بوده است و امروزه افراد بسیاری در سراسر دنیا آلوده به این ویروس هستند که معضلات متعددی برای سیستم های بهداشتی در سراسر دنیا ایجاد کرده است [۱، ۲].

ژنوم ویروس HIV شامل دو رشته RNA ی یکسان با طول تقریبی ۹/۲ کیلو-باز است که برای تکثیر خود به آنزیمی به نام نسخه بردار معکوس (Reverse Transcriptase) وابسته است [۳].

این ویروس علاوه بر ژن های معمول رتروویروس (Gag, Pro, Pol, Env) که مسئول ساخت پروتئین های ساختاری و عملکردی مورد نیاز ویروس اند، حداقل شش ژن تنظیمی به نام های tat, rev, vif, nef, vpr, vpu دارد که فرآورده های آنها تکثیر ویروس را از راه های متفاوت تنظیم می کنند [۴].

پروتئین vif، پروتئینی تنظیمی به وزن تقریبی ۲۳ کیلو دالتون را کد می کند که در همانندسازی ژنوم ویروس در سلول های میزبان نظیر ماکروفاژ و لنفوسیت ها اهمیت دارد [۵]. با سرکوب این ژن تنظیمی می توان از همانندسازی و تکثیر ویروس HIV ممانعت کرد. پروتئین Vif توانایی مهار کردن پروتئین APOBEC3G را در سلول میزبان به عهده دارد با مهار این پروتئین سلولی فرایند جوانه زنی ویروس بدون مشکل انجام می پذیرد. Vif به کمک فرایند تخریب پروتئوزومال باعث می شود که APOBEC3G در طول فرایند جوانه زنی نتواند وارد ویروس شود. این پروتئین با اتصال هم زمان به APOBEC3G و یک پروتئین دیگر به نام Cullin5 E3 Ubiquitin Ligase باعث می شود

که APOBEC3G توسط لیگاز سلولی برای در جهت فرایند تخریب نشان دار شوند [۶].

یکی از نوپاترین شاخه های دانش ایمونولوژی، ایمونوفورماتیک است، که به عنوان روشی قدرتمند در جهت آنالیز، مدل سازی و پیشگویی عملکرد سیستم ایمنی مورد توجه قرار گرفته است. روش های قدیمی که در ارتباط با ایمونولوژی و طراحی واکسن استفاده می شدند، بسیار زمان بر و دارای ایمونوژنیسیته پایین اند که ایمونوفورماتیک با پیش بینی و استفاده از داده های زیستی توانسته است امکان خطا را کاهش دهد و واکسن های مناسبی را پیشنهاد کند [۷-۹]. برای بهبود عملکرد واکسن مهم است که آنتی ژن هایی را در نظر بگیریم که در میزبان پاسخ قوی ایجاد کنند که پیش بینی این جایگاه ها به وسیله برنامه های بیوانفورماتیکی امکان پذیر است [۱۰]. با توجه به موارد ذکر شده، در این مطالعه به بررسی تأثیر جهش ها بر عملکرد پروتئین Vif و تعیین اپی توپ های B-Cell، T-CELL و CTL موجود در این پروتئین به وسیله نرم افزارهای بیوانفورماتیکی پرداخته شده است، همچنین این مطالعه به عنوان اولین مطالعه ای که به بررسی توالی های اپی توپ در پروتئین Vif پرداخته، حائز اهمیت است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱ تجزیه و تحلیل توالی

برای انجام این مطالعه ۱۰ توالی پروتئین Vif مربوط به بیماران ایرانی از بانک ژنی NCBI دریافت شد (با شماره دسترسی

AB703607- AB703616) و سپس به صورت فرمت FASTA در نرم افزار CLC Genomic Workbench version 20 ذخیره شدند. تمام توالی های مورد بررسی استخراج شده از نمونه های بیماران ایرانی بودند و همچنین به صورت کامل تعیین توالی شده بودند (complete CDS) و همه در سال ۲۰۱۳ در بانک ژنی ثبت

³ Retroviridae¹ Syndrome Immunodeficiency Acquired² Human Immunodeficiency Virus

شده بودند. برای تجزیه و تحلیل تغییرات در سطح اسیدهای آمینه از توالی مرجع معرفی شده در سایت NCBI به شماره ثبت EF158040 استفاده شد.

۲-۲ پیش‌بینی ساختار دوم و ساختار سوم پروتئین

برای تعیین ساختار دوم از نرم‌افزار بر خط "SOPMA version 1.0" با حد آستانه ۸ استفاده شد [۱۱, ۱۲]. پس از ثبت توالی در این نرم‌افزار چهار حالت تطابقی و همچنین آستانه تشابه برابر با هشت برای تعیین ساختار انتخاب شدند. همچنین، از نرم‌افزار "I-TASSER version 5.1" (۱۳) که به‌عنوان معتبرترین نرم‌افزار تعیین ساختار سوم در بسیاری از مطالعات مطرح شده است، برای پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین استفاده شد. پس از ثبت توالی اسیدآمینه نتایج توسط نرم‌افزار به صورت ایمیل ارسال شد و از میان نتایج پیشنهادشده، نتایج با C-score مثبت‌تر انتخاب شد و به صورت فرمت PDB ذخیره شدند. برای بهبود کیفیت ساختار سوم از نرم‌افزار GalaxyRefine استفاده شد. ابتدا بهترین ساختار معرفی شده توسط نرم‌افزار "I-TASSER" در نرم‌افزار آنلاین GalaxyRefine سابمیت شد. سپس، از پنج ساختار بهبود یافته، ساختار شماره یک که توسط خود نرم‌افزار به‌عنوان بهترین ساختار معرفی می‌شود به‌عنوان ساختار سوم نهایی مورد بررسی های بعدی قرار گرفت.

۲-۳ مشاهده اتصالات ملکولی با استفاده از نرم‌افزار

Discovery studio

در این مطالعه، ساختار تمام پروتئین‌ها که به صورت فرمت PDB ذخیره شده بودند، از طریق نرم‌افزار Discovery studio version 4.5 بررسی شدند.

۲-۴ پیش‌بینی جایگاه‌های اپی‌توپ‌های B-Cell

در این مطالعه از سه نرم‌افزار بر خط "IDEB Analysis" با حد آستانه ۵ [۱۴]، "ABCPred" با حد آستانه ۰/۸ [۱۵]، "BepiPred version 2.0" با حد آستانه ۰/۹ [۱۶]،

"BcePred" با حد آستانه ۲,۳۸ [۱۷] برای پیش‌بینی جایگاه‌های اپی‌توپ‌های B-cell استفاده شد. در این نرم‌افزارهای ابتدا توالی پروتئین Vif در نرم‌افزارها ثبت شد و سپس در نتایج ارسال شده توسط نرم‌افزارها مناطق بالاتر از مقدار آستانه به‌عنوان نواحی اپی‌تویی در نظر گرفته شدند.

۲-۵ پیش‌بینی جایگاه‌های اپی‌توپ‌های T-Cell

برای تعیین اپی‌توپ‌های T-Cell از ۵ نرم‌افزار بر خط معتبر استفاده شد که شامل "NetMHCIIpan version 3.2 Server" یا حد آستانه ۱ تا ۵ [۱۸]، "TepiTool version 2.24" با امتیاز دهی ۱ [۱۹]، "IEDB" [۱۴]، "MHCpred version 2.0" [۲۰] با در نظر گرفتن امتیازات بالاتر از ۰/۸، "NetMHC version 4.0 Server" [۲۱] با حد آستانه ۰/۵ تا ۲ بودند. برای انجام بررسی‌ها ابتدا توالی اسیدآمینه پروتئین، سپس آنالیزها با در نظر گرفتن سطح آستانه معرفی شده توسط نرم‌افزار و همچنین با در نظر گرفتن اپی‌توپ‌هایی با طول بزرگ‌تر از ۹ اسیدآمینه انجام شدند.

۲-۶ پیش‌بینی جایگاه‌های اپی‌توپ‌های CTL

از نرم‌افزار بر خط "CTLPred version 4.2" (۲۲) با حد آستانه ۰/۵۱ برای تعیین جایگاه‌های اپی‌توپ‌های CTL استفاده شد. پس از آنالیز توالی پروتئین توسط نرم‌افزار مناطق پیشنهاد شده با امتیاز بالاتر انتخاب شدند.

۲-۷ بررسی خواص آنتی‌ژنیک و حساسیت‌زایی توالی‌ها

برای تعیین خواص آنتی‌ژنیک پروتئین Vif از نرم‌افزارهای "VaxiJen v2.0" با حد آستانه ۰,۵ [۲۳] و "ANTIGENpro version 2.1" با حد آستانه ۰/۸، که از نرم‌افزارهای معتبر در این زمینه هستند، استفاده شد. برای استفاده از این نرم‌افزارها ابتدا توالی اسید آمینه‌ای پروتئین Vif ثبت شد، سپس از میان ارگاناسیم‌های پیشنهاد شده گزینه ویروس انتخاب شد.

جدول ۱ آدرس URL نرم افزارهای برخط مورد استفاده در این مطالعه و عملکرد هر یک از آنها

عملکرد	آدرس URL	عنوان برنامه
تعیین ساختار دوم	http://npsapbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html	SOPMA
تعیین ساختار سوم	http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER	I-TASSER
تعیین اپی توپ B-Cell	http://tools.immuneepitope.org/bcell/	IDEB Analysis
تعیین اپی توپ B-Cell	http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/ABC_submission.html	ABCPred
تعیین اپی توپ B-Cell	http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/	BepiPred
تعیین اپی توپ B-Cell	http://crdd.osdd.net/raghava/bcepred/bcepred_submission.html	BcePred
تعیین اپی توپ ctl	http://crdd.osdd.net/raghava/ctlpred/	ctlpred
تعیین MHC II	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/	NetMHCIIpan
تعیین MHC II	http://tools.iedb.org/tepitool/	tepitool
تعیین MHC II	https://www.iedb.org/	IEDB
تعیین MHC II	http://www.ddg-pharmfac.net/mhcpred/MHCPred/	MHC PRED
تعیین MHC I	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/	NetMHC4.0
تعیین MHC I	https://www.iedb.org/	IEDB
تعیین MHC I	http://tools.iedb.org/tepitool/	TEPITOOLS
تعیین خواص آنتی ژنی	http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html	VaxiJen
تعیین خواص آنتی ژنی	http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/	ANTIGENpro
تعیین خواص حساسیت زایی	http://www.ddg-pharmfac.net/AllergenFP/	AllergenFP
تعیین خواص حساسیت زایی	http://crdd.osdd.net/raghava/algpred/	Algpred

برای تعیین خواص حساسیت زایی در پروتئین مورد بررسی، از دو نرم افزار بر خط "AllergenFP v.1.0" با حد آستانه ۰,۵ [۲۴]، "Algpred version 2" (۲۵) با حد آستانه های معرفی شده از ۰/۵ تا ۱ استفاده شد. برای انجام بررسی ها پس از ثبت توالی پروتئین، تمامی الگوریتم های معرفی شده توسط نرم افزار انتخاب شد که سبب شد نتایج بسیار دقیقی در این مورد دریافت شود. آدرس تمام سایت های استفاده شده در این مطالعه در جدول ۱ نشان داده شد.

۳-نتایج

۳-۱ آنالیز توالی ها

توالی های پروتئین Vif در مقایسه با توالی رفرنس جابه جایی های متعددی را نشان دادند که نتایج آنها در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که بیشترین شیوع موتاسیون در پروتئین Vif به ترتیب مربوط به جایگاه های S 49 P (۹۰ درصد)، S 140 N و N 186 S (۸۰ درصد)، L 39 V و R 41 K و N 48 H و R 92 K (۷۰ درصد) و K 50 R (۵۰ درصد) است. همچنین، بر اساس بررسی توالی ها و جهش های موجود، چندین منطقه به عنوان مناطقی با توالی ثابت و مناسب برای طراحی واکسن مشخص شد که نتایج آن در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۲ تغییرات در سطح اسیدآمینه پروتئین Vif، تغییرات با بالاترین فراوانی به‌صورت بولد نمایش داده‌شده است.

فراوانی	موتاسیون	فراوانی	موتاسیون	فراوانی	موتاسیون	فراوانی	موتاسیون
%۱۰	T 155 I	%۱۰	H 110 Q	%۱۰	H 56 Y	%۱۰	N 22 H
%۱۰	T 157 K	%۱۰	N 113 D	%۱۰	L 59 I	%۱۰	M 29 K
%۱۰	T 157 A	%۱۰	D 117 E	%۲۰	D 61 E	%۱۰	Y 30 H
%۱۰	T 157 V	%۱۰	S 118 T	%۳۰	R 63 K	%۱۰	V 31 I
%۱۰	K 158 T	%۱۰	S 118 F	%۱۰	I 64 L	%۲۰	A 35 T
%۱۰	I 159 R	%۳۰	K 122 R	%۱۰	V 66 I	%۱۰	K 36 T
%۱۰	I 166 V	%۱۰	K 122 G	%۲۰	R 67 K	%۱۰	G 37 K
%۱۰	R 167 K	%۱۰	I 124 L	%۱۰	H 73 Q	%۱۰	G 37 N
%۱۰	A 170 T	%۱۰	Q 127 K	%۱۰	H 73 N	%۱۰	G 37 D
%۲۰	K 176 E	%۲۰	V 128 I	%۱۰	T 74 P	%۱۰	L 39 F
%۱۰	K 179 T	%۱۰	V 129 I	%۱۰	K 77 R	%۱۰	L 39 S
%۱۰	K 179 R	%۱۰	S 130 R	%۳۰	D 78 E	%۷۰	L 39 V
%۲۰	T 180 I	%۱۰	P 131 C	%۱۰	L 91 Q	%۷۰	R 41 K
%۲۰	R 181 K	%۲۰	S 132 R	%۱۰	R 92 G	%۱۰	H 42 P
%۱۰	P 183 H	%۴۰	D 134 E	%۷۰	R 92 K	%۱۰	Y 44 F
%۱۰	P 183 L	%۱۰	D 134 N	%۱۰	R 93 K	%۱۰	R 47 W
%۱۰	R 184 K	%۲۰	Q 136 P	%۱۰	R 93 G	%۱۰	R 47 S
%۸۰	N 186 S	%۱۰	A 137 S	%۳۰	I 98 L	%۷۰	N 48 H
%۱۰	H 187 L	%۱۰	S 140 T	%۴۰	L 102 V	%۹۰	S 49 P
%۱۰	C 192 H	%۸۰	S 140 N	%۲۰	L 102 T	%۵۰	K 50 R
%۱۰	C 192 Y	%۱۰	L 153 I	%۱۰	L 102 M	%۱۰	V 51 A
		%۱۰	V 154 T	%۱۰	Q 105 R	%۱۰	V 55 I

جدول ۳ مناطقی که در پروتئین Vif از لحاظ ژنتیکی محافظت شده‌اند.

منطقه	اسیدآمینه ابتدایی	اسیدآمینه پایانی
۱	۱	۲۸
۲	۷۹	۹۰
۳	۱۰۳	۱۱۲
۴	۱۴۱	۱۵۲
۵	۱۶۰	۱۶۵
۶	۱۶۸	۱۷۵

جدول ۴ لیست مناطق پیشنهادی برای اپی توپ‌های B-Cell توسط چهار نرم‌افزار و در نهایت ۵ ناحیه نهایی پیشنهادی

مناطق انتخابی	BepiPred	BcePred	ABCPred	Antibody Epitope Prediction
۵۰-۳۱، ۷۳-۸۵، ۹۴-۱۰۴، ۱۲۸-۱۲۸	۲۹-۳۶، ۹۵-۱۰۵، ۱۷۵-۱۷۵	۶-۲۲، ۳۷-۵۳، ۷۴-۹۰	۷۴-۸۰، ۹۶-۱۰۳، ۴۴-۵۲	۱۶۵-۱۵۷
۱۸۵-۱۷۱، ۱۶۵-۱۵۵	۱-۲۴، ۴۲-۵۲، ۱۷۲-۱۸۵		۱۱-۱۲، ۹۳-۱۰۳، ۶۹-۸۶	۱۴۰-۱۲۸
	۲۸-۵۴، ۷۲-۸۱، ۸۷-۱۰۵		۴۱-۵۱، ۹۰-۹۸، ۱۱۲-۱۱۹	۱۸۳-۱۷۱
	۱۱۶-۱۲۲، ۱۳۴-۱۴۱	۱۵۴-۱۹۰	۳۱-۳۸، ۷۲-۸۰، ۱۷۴-۱۸۷	۱۸۷-۱۷۲
	۶-۱۳، ۲۳-۳۱، ۱۶۸-۱۸۳		۷-۱۲، ۶۲-۶۹، ۱۵۵-۱۶۳	۱۶۷-۱۶۰
	۳۸-۴۵، ۴۹-۷۰، ۸۰-۸۷		۲۴-۲۳، ۴۹-۵۹، ۱۰۳-۱۱۴	۱۳۶-۱۲۶
	۴-۱۱، ۱۰۴-۱۱۶، ۱۲۴-۱۳۵		۳۱-۳۷، ۹۵-۱۰۵، ۱۳۰-۱۳۰	۱۵۷-۱۴۴، ۱۴۰
	۱۲-۵۶، ۷۱-۹۶، ۱۶۵-۱۹۰		۱۷۵-۱۹۱	

۲-۳ پیش‌بینی اپی توپ‌های B-Cell

نتایج چهار نرم‌افزار مورد استفاده برای پیش‌بینی اپی توپ‌های B-Cell در جدول ۴ خلاصه شده است. پس از بررسی تمام مناطق پیشنهاد شده، مناطقی با بیشترین امتیاز دریافت شده در نتایج نرم‌افزارها، انتخاب شدند و در نهایت مناطقی مشترک بین هر چهار نرم‌افزار به‌عنوان مناطق انتخاب‌شده نهایی در نظر گرفته شدند.

۳-۳ پیش‌بینی اپی توپ‌های T-Cell

نتایج پیش‌بینی اپی توپ‌های T-Cell در توسط نرم‌افزارهای معرفی‌شده در جدول ۵ خلاصه شده است. نتایج برای MHC کلاس I و II ابتدا با توجه به امتیازهای بالاتر انتخاب شد سپس، با توجه به نواحی مشترک معرفی شده، مناطق انتخابی نهایی به‌عنوان اپی توپ‌های T-Cell نهایی انتخاب شدند.

۴-۳ پیش‌بینی اپی توپ‌های CTL

نتایج نهایی دو نرم‌افزار استفاده شده برای بررسی اپی توپ‌های CTL در جدول ۶ نمایش‌دهنده دو ناحیه ۲۲ تا ۳۰ و ۱۰۱ تا ۱۱۰ به‌عنوان مناطق نهایی انتخاب‌شده به‌عنوان اپی توپ‌های CTL در پروتئین Vif هست.

۵-۳ انتخاب توالی نهایی اپی توپ مورد استفاده در طراحی واکسن

برای انتخاب ناحیه نهایی پیشنهاد شده برای استفاده در واکسن، ابتدا نتایج نهایی بررسی اپی توپ‌های B-cell، T-cell و CTL جمع‌بندی شدند و مناطق مشترک آن با مناطق حافظت شده ژنتیکی مقایسه شد و در نهایت سه ناحیه به‌عنوان نامزدهای اولیه انتخاب شدند. در ادامه این مناطق با پنج نرم‌افزار آنالیز شدند تا خواص آنتی‌ژنی و حساسیت‌زایی آنها بررسی شود و در نهایت با توجه به نتایج این بررسی‌های یک ناحیه (۵-۳۲) به‌عنوان ناحیه پیشنهادی نهایی معرفی شد (جدول ۷).

پیش‌بینی بهترین نواحی... _____ حسن شاهی و همکاران

جدول ۵ لیست نواحی پیش‌بینی شده به‌عنوان اپی‌توپ T-Cell (MHC I و MHC II) توسط چهار نرم‌افزار معتبر و درنهایت نواحی انتخابی برای هر کلاس نمایش داده شده است.

MHCI	NetMHC	IEDB	TEPITOOLS	مناطق انتخابی	
	۱۳۳-۱۴۱ , ۱۵۰-۱۵۸	۱۱۴-۱۲۲ , ۱۶۲-۱۷۳ , ۹۹-۱۰۸ , ۷۳-۸۳	۱۸۹-۱۸۱ , ۱۱۵-۱۰۷ , ۷۲-۶۴	-۱۶۵ , ۱۰۰-۱۰۸ , ۷۴-۸۵ , ۴۸-۵۵ ۱۷۰-۱۸۷ , ۱۲۹-۱۳۹ , ۱۵۰	
	۱۵۴-۱۴۵ , ۱۱۴-۱۰۵ , ۹-۱	۱۹۲-۱۷۶ , ۱۳۲-۱۱۶ , ۱۰۵-۶۵ , ۶۳-۵۲	۱۵۴-۱۴۶ , ۱۲۰-۱۱۲ , ۹-۱		
	۱۷۰-۱۶	۱۸۰-۱۷۰ , ۱۶۰-۱۵۱ , ۵۶-۴۸ , ۳۶-۲۱	۱۱۴-۱۰۶		
		۱۸۷-۱۶۸ , ۱۰۸-۱۰۰ , ۸۵-۷۴ , ۸۳-۷۱			
		۱۸۳-۱۶۹ , ۱۶۴-۱۵۶ , ۱۴۳-۱۲۹ , ۱۵-۸			
		۱۸۸-۱۸۱ , ۱۷۳-۱۵۹ , ۱۳۹-۱۲۷ , ۵۶-۴۷			
		۱۸۳-۱۷۰ , ۹۳-۷۵ , ۵۳-۴۵			
MHC II	NetMHCIIpan	IEDB	TEPITOOLS	MHC PRED	مناطق انتخابی
	۱۶۱-۱۴۴ , ۴۰-۱۶ , ۲۹-۱۵	۱۱۸-۹۶ , ۱۸۰-۱۶۱ , ۸۵-۶۸ , ۷۵-۵۷ , ۲۴-۸	۱۵۴-۱۶۸ , ۱۴۵-۱۵۹ , ۴۱-۵۵	۱۷۸-۱۸۶ , ۱۵۶-۱۶۴ , ۱۴۲-۱۵۳	۱۶۰-۱۲۰ , ۱۰۸-۱۰۰ , ۷۵-۶۷ , ۳۰-۶
	۱۶۲-۱۴۵ , ۳۴-۶ , ۱۵-۲۹	۱۴۵-۱۳۰ , ۱۲۲-۱۰۳ , ۹۱-۶۳ , ۵۰-۳۳	۱۳۴-۱۲۰ , ۱۰۶-۹۲ , ۲۴-۱۰	۱۵۴-۱۴۶ , ۱۴۹-۱۴۱ , ۱۳۷-۱۲۹	
		۱۷۶-۱۹۱ , ۱۱۸-۱۴۹ , ۱۱۴-۹۰ , ۶۴-۴۷	۲۵-۳۹ , ۱۷-۳ , ۲۰-۶	۱۴۹-۱۴۱ , ۱۰۰-۹۲ , ۹۰-۸۲	
				۱۲۷-۱۱۹ , ۱۳۱-۱۲۳ , ۸۱-۷۳ ۱۵۰-۱۴۲	
				۵۷-۶۷ , ۶۴-۷۲ , ۲۷-۱۹ , ۱۸-۱۰	
				۱۴۷-۱۳۹ , ۱۳۴-۱۲۶ , ۱۰۸-۱۰۰ ۱۱۸-۱۲۶ , ۱۳۰-۱۲۲	

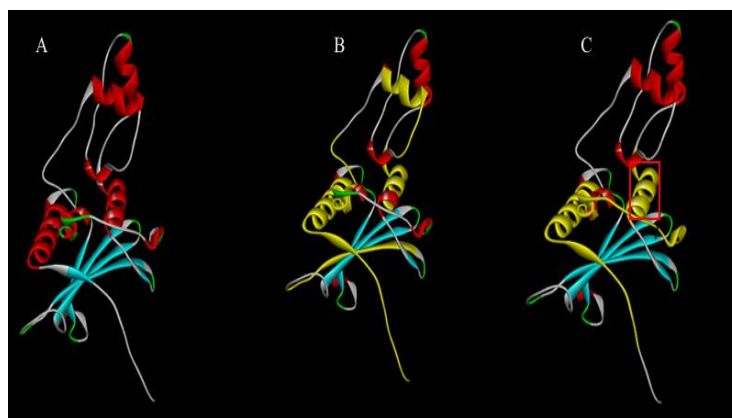
جدول ۶ توالی های پیش بینی شده به عنوان اپی توپ CTL توسط دو نرم افزار مربوطه و دو ناحیه انتخابی نهایی

مناطق انتخابی	NET CTL	CTL PRED
۱۰۱-۱۱۰, ۲۲-۳۰	۱۲۷-۱۳۵, ۱۰۲-۸۶, ۱۱۰-۹۴, ۷۳-۸۱, ۲۲-۳۰	۱۱۰-۱۰۱, ۳۱-۲۳, ۲۴-۱۶

جدول ۷ بررسی خواص آنتی ژنی و خواص حساسیت زایی سه ناحیه نامزد برای انتخاب نهایی ناحیه پیشنهاد شده برای واکسن

ناحیه نهایی انتخاب شده	ANTIGENpro	Vaxijen	Algpred	AllergenFP	IFNepitope	نواحی انتخاب شده
-	۰/۴۲	آنتی ژن	غیر آلرژن	غیر آلرژن	-۱/۰۳	PDVADQLIHLHYF(۱۱۲-۱۰۰)
-	۰/۳۵۳	آنتی ژن	غیر آلرژن	غیر آلرژن	-۰/۲۷	AEDRWNPQKTRGPRESH (۱۸۷-۱۷۰)
*	۰/۵۳۳	آنتی ژن	غیر آلرژن	غیر آلرژن	۲/۵۵	QVMIVWQVDRMRIRTWNSLVKHHMY (۳۲-۵)

تصویر ۱ ساختار سوم پروتئین Vif (A)، نواحی حفاظت شده ژنتیکی در این پروتئین (B) و سه ناحیه پیشنهادی برای تهیه واکسن و ناحیه انتخابی نهایی در کادر قرمز رنگ مشخص شده است (C).



نامزد برای تهیه واکسن نیز به صورت نواحی زرد رنگ مشخص شده است.

۴- بحث

۳-۶ ساختار سوم

ساختار نهایی ساختار سوم پروتئین Vif در تصویر ۱ نمایش داده شده است. همچنین، نواحی حفاظت شده و سه ناحیه

این مطالعه به‌عنوان اولین مطالعه از ایران با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی به بررسی خواص ایمنی‌زایی این پروتئین در توالی‌های مربوط به بیماران ایرانی پرداخته است. به‌صورت کلی، نتایج این مطالعه توانست یک ناحیه (۵ تا ۳۲) را به‌عنوان منطقه‌ای به بالاترین توانایی تحریک سیستم‌های ایمنی همورال و سلولی و درعین‌حال با بیشترین خواص آنتی‌ژنی و کمترین احتمال حساسیت‌زایی معرفی کند.

روند بررسی‌ها به‌صورت پلکانی ابتدا برای یافتن بهترین اپی توپ‌های B-cell شروع شد و پس از انتخاب بهترین اپی توپ‌های B-cell این روند برای اپی توپ‌های T-cell و CTL نیز انجام شد. در نهایت تمام این مناطق در کنار یکدیگر قرار گرفتند که سه منطقه به‌عنوان بهترین نامزدهایی برای تحریک هر دو سیستم ایمنی انتخاب شدند.

سه ناحیه (۵-۳۲، ۱۰۰-۱۱۳، ۱۶۹-۱۸۷) معرفی شده در پروتئین Vif به‌عنوان از نظر آلرژن و آنتی‌ژن بودن مورد بررسی قرار گرفتند که از میان آن‌ها منطقه‌ای که کمترین میزان حساسیت‌زایی و بیشترین میزان خواص آنتی‌ژنی را داشت به‌عنوان بهترین اپی توپ تحریک‌کننده و بهترین ناحیه برای طراحی واکسن (ناحیه ۵ تا ۳۲) انتخاب شد.

مقایسه ناحیه پیشنهادشده با نتایج مقالات خارجی که به بررسی پروتئین Vif پرداخته بودند نشان داد که در تاکنون اشاره‌ای به پتانسیل ناحیه ۵-۳۲ در پروتئین Vif به‌عنوان تحریک سیستم ایمنی میزبان نشده است، و این ناحیه برای اولین بار به‌عنوان ناحیه‌ای با پتانسیل بالا برای استفاده در واکسن‌های ضد HIV پیشنهادشده است.

مشابه با پیش‌بینی‌های مطالعه حاضر Du و همکاران در سال ۲۰۱۳ قابلیت بالای تحریک ایمنی همورال و تولید آنتی‌بادی در نمونه‌های حیوانی را تأیید کردند [۲۶].

مشابه با نتایج این مطالعه Wieland و همکاران در سال ۲۰۰۹ ناحیه‌هایی نزدیک به ناحیه ۱۶۹-۱۸۷ که در مطالعه حاضر پیشنهادشده است را به‌عنوان ناحیه تحریک‌کننده سیستم ایمنی همورال پیشنهاد دادند. در مطالعه‌ی Wieland و همکاران از آنتی‌بادی‌های مختص مناطق ویژه‌ای از پروتئین Vif استفاده شد و نتایج نشان‌دهنده‌ی اپی توپ با توالی‌های IEWRKKRY (۹۴-۸۷) و DRWNKPQ (۱۷۸-۱۷۲) در پروتئین Vif وجود بود که در ۹۰ درصد بیماران ثابت است و می‌تواند پاسخ ایمنی ایجاد کند [۲۷].

Nami Iwamoto و همکاران در سال ۲۰۱۴ یک واکسن را با استفاده از اپی توپ‌های جدا شده از پروتئین‌های Gag و Vif و ویروس HIV معرفی کردند، که توانست بر علیه ویروس SIV در حیوانات آزمایشگاهی ایمنی مناسبی را نشان دهد و محققان این مطالعه پیشنهاد استفاده از آن را بر علیه ویروس HIV مطرح کرده‌اند. در مطالعه‌ی Iwamoto سه ناحیه اسیدآمین‌های شامل نواحی اسیدآمین‌های ۷۶-۶۵، ۱۳۲-۱۱۳ و ۱۴۶-۱۳۴ از پروتئین Vif به‌عنوان نواحی پیشنهادی برای استفاده در واکسن مطرح شده است که هیچ‌کدام از این نواحی، مشابه با نواحی پیشنهادی در مطالعه حاضر نبود. علت این اختلاف می‌تواند به روش‌های متفاوت در مطالعه حاضر و مطالعه‌ی Iwamoto و همچنین تفاوت در ساب تایپ‌های ویروس ایدز مورد بررسی در دو مطالعه مربوط باشد؛ گرچه این دو مطالعه موید کارایی واکسن‌های برپایه پروتئین Vif برای کنترل ویروس HIV هستند [۲۸].

همچنین، در مطالعه دیگری که توسط Martins و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شد، ناحیه ۱۰۰ تا ۱۰۹ پروتئین Vif به‌عنوان ناحیه پیشنهادی برای تهیه واکسن علیه ویروس HIV در مدل‌های حیوانی پیشنهاد شد [۲۹]. نتایج مطالعه Martins نشان‌دهنده پتانسیل بالای این ناحیه برای تحریک ایمنی سلولی و کاهش وایرال لوود در نمونه‌ها بود. هرچند

توالی‌های مورد مطالعه می‌باشد که می‌تواند موضوع جالبی برای مطالعات آتی برای تعیین تأثیر این موتاسیون بر عملکرد این پروتئین در نهایت بیماری‌زایی ویروس HIV باشد.

۵- نتیجه‌گیری

به‌صورت کلی بررسی‌های انجام شده در این مطالعه توانست سه ناحیه مهم پروتئین Vif ویروس HIV با توانایی بالایی در تحریک سیستم ایمنی همورال و سلولی را معرفی کند که در نهایت یک ناحیه (۵-۳۲) به‌عنوان ناحیه نهایی معرفی شد که علاوه بر توانایی تحریک سیستم ایمنی، بسیار محافظت شده می‌باشد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود این ناحیه در تحقیقات آتی برای تهیه واکسن مخصوصاً برای بیماران ایرانی مورد بررسی‌های آزمایشگاهی قرار گیرد.

علاوه بر نتایج مربوط به بحث ایمنی‌شناسی پروتئین Vif، بررسی‌های تغییرات در سطح اسیدهای آمینه این پروتئین نیز نشان داد که در توالی‌های مورد بررسی، اسید آمینه ۴۱ با فراوانی بالا دچار تغییر شده است و این تغییر می‌تواند بر ساختار و عملکرد این پروتئین موثر واقع شود. بنابراین، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی بررسی‌های بیشتری روی این موتاسیون انجام شود و مطالعات دیگری نیز برای تعیین تأثیر این موتاسیون بر روی بیماری‌زایی ویروس HIV انجام شود.

تشکر و قدردانی: نویسنده‌گان از مسئولین محترم دانشگاه علوم پزشکی شیراز به ویژه معاونت پژوهشی کمال تشکر را دارند.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: هیچگونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زهرا حسن شاهی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۴۰٪)، بهزاد دهقانی (نویسنده دوم)،

این مطالعه ناحیه (۵ تا ۳۲) را به‌عنوان پیشنهاد نهایی مطرح کرد، ناحیه ۱۰۰ تا ۱۰۹ پیشنهادی توسط Martins و همکاران، در میان سه ناحیه پیشنهادی مطالعه حاضر وجود داشت که اهمیت و کارایی این ناحیه در تحریک سیستم ایمنی و همچنین محافظت شده بودن آن از لحاظ ژنتیکی را تأیید می‌کند.

در این مطالعه به بررسی جهش‌های موجود در چندین توالی پروتئین Vif پرداخته شده است و به‌جز دو جابجایی R-K و H-P که به‌ترتیب در جایگاه‌های ۴۱ و ۴۲ وجود دارد، در هیچ‌کدام از مطالعات پیشین این جابجایی‌ها گزارش نشده‌اند. بنابراین، می‌توان پیشنهاد داد که وجود این جابجایی‌ها می‌تواند در اتصال بین پروتئین Vif ایرانی و پروتئین‌های میزبان تغییر ایجاد کند و میزان پاتوژنسیته را تحت تأثیر قرار دهد.

در مطالعه‌ای انجام شده توسط Pery و همکارانش در سال ۲۰۰۹ چندین منطقه از جمله ۴۴YRHHY و ۱۷QVDRMR در پروتئین Vif مشخص شد که این مناطق می‌توانند به پروتئین‌های میزبان متصل شوند و آنها را مهار کنند [۳۰]. علاوه بر آنها یک موتیف حفاظت شده جدید با توالی ۶۹ YXXLV نیز در Vif وجود دارد که به چندین پروتئین مهم میزبان متصل می‌شود و از طریق Tyr ۶۹ و Leu ۷۲ اثر تخریبی بسیاری زیادی بر آنها می‌گذارد، در نتیجه این موتیف به‌عنوان یک هدف برای مهارکننده‌های کوچک مولکولی است که از طریق اتصال به آن مانع از تعامل پروتئین Vif با سایر پروتئین‌های میزبان می‌شود و تکثیر ویروس HIV می‌تواند کاهش یابد.

با مقایسه نتایج مطالعه حاضر و مطالعه Pery می‌توان نتیجه گرفت موتاسیون‌های ۴۱ و ۴۲ می‌تواند تأثیر چشم‌گیری در بیماری‌زایی و خواص پاتوژنی ویروس HIV داشته باشند. نکته قابل توجه فراوانی (۷۰ درصد) موتاسیون ۴۱ در

Induced Gag- and Vif-Specific CD8⁺ T Cells. *Journal of Virology*. 2014;88(1):425-33.

[11] Geourjon C, Deléage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Computer applications in the biosciences* : CABIOS. 1995;11(6):681-4.

[12] Dehghani B, Hashempour T, Hasanshahi Z. Interaction of human herpesvirus 8 viral interleukin-6 with human interleukin-6 receptor using in silico approach: the potential role in HHV-8 pathogenesis. *Current Proteomics*. 2020;17(2):107-16.

[13] Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*. 2010;5(4):725-38.

[14] Vita R, Mahajan S, Overton JA, Dhanda SK, Martini S, Cantrell JR, et al. The immune epitope database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D339-D43.

[15] Saha S, Raghava GPS. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2006;65(1):40-8.

[16] Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(W1):W24-w9.

[17] Saha S, Raghava GPS, editors. BcePred: prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. *International Conference on Artificial Immune Systems*; 2004: Springer.

[18] Jensen KK, Andreatta M, Marcatili P, Buus S, Greenbaum JA, Yan Z, et al. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology*. 2018;154(3):394-406.

[19] Paul S, Sidney J, Sette A, Peters B. TepiTool: A Pipeline for Computational Prediction of T Cell Epitope Candidates. *Current protocols in immunology*. 2016;114:18.9.1-.9.24.

[20] Guan P, Doytchinova IA, Zygori C, Flower DR. MHCpred: A server for quantitative prediction of peptide-MHC binding. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3621-4.

[21] Andreatta M, Nielsen M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics*. 2016;32(4):511-7.

[22] Bhasin M, Raghava GP. Prediction of CTL epitopes using QM, SVM and ANN techniques. *Vaccine*. 2004;22(23-24):3195-204.

روشن‌شناس/پژوهشگر کمکی (۳۰٪)، طیب هاشم پور

(نویسنده سوم) تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۰٪).

منابع مالی: مطالعه حاضر با حمایت مالی دانشگاه علوم

پزشکی شیراز و طرح مصوب به شماره ۹۷-۰۱-۵۹-۱۷۶۶۴

انجام شد.

۶- منابع

[1] Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual review of immunology*. 1999;17(1):657-700.

[2] Dehghani B, Hasanshahi Z, Hashempour T. HIV Capsid and Protease, New Targets of Melittin. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2020.

[3] Hasanshahi Z, Dehghani B, Hashempour T. Bioinformatics Study of HIV-1 Integrase Gene Sequences in Iranian Patients. *Pathobiology Research*. 2020;23(2):57-65

[4] Nielsen MH, Pedersen FS, Kjems J. Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. *Retrovirology*. 2005;2:10-. [5] Reddy K, Ooms M, Letko M, Garrett N, Simon V, Ndung'u T. Functional characterization of Vif proteins from HIV-1 infected patients with different APOBEC3G haplotypes. *AIDS*. 2016;30(11):1723-9.

[6] da Costa KS, Leal E, dos Santos AM, Lima e Lima AH, Alves CN, Lameira J. Structural analysis of viral infectivity factor of HIV type 1 and its interaction with A3G, EloC and EloB. *PLoS One*. 2014;9(2):e89116-e.

[7] Hashempour T, Dehghani B, Mousavi Z, Yahaghi M, Hasanshahi Z, Moayed J, et al. Evaluating drug resistant mutations to HCV NS3 protease inhibitors in Iranian Naïve patients. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2019;1-12.

[8] Tayebbeh H, Behzad D, Zahra M, Tahereh A, Zahra H, Javad M, et al. Association of mutations in the NS5A-PKRBD region and IFNL4 genotypes with hepatitis C interferon responsiveness and its functional and structural analysis. *Current Proteomics*. 2020;17:1-.

[9] Dehghani B, Hasanshahi Z, Hashempour T, Motamedifar M. The possible regions to design Human Papilloma Viruses vaccine in Iranian L1 protein. *Biologia*. 2019;1-11.

[10] Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, et al. Control of Simian Immunodeficiency Virus Replication by Vaccine-

- [28] Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, et al. Control of simian immunodeficiency virus replication by vaccine-induced Gag-and Vif-specific CD8+ T cells. *Journal of virology*. 2014;88(1):425-33.
- [29] Martins MA, Wilson NA, Piaskowski SM, Weisgrau KL, Furlott JR, Bonaldo MC, et al. Vaccination with Gag, Vif, and Nef gene fragments affords partial control of viral replication after mucosal challenge with SIVmac239. *Journal of virology*. 2014;88(13):7493-516.
- [30] Pery E, Sheehy A, Nebane NM, Brazier AJ, Misra V, Rajendran KS, et al. Identification of a novel HIV-1 inhibitor targeting Vif-dependent degradation of human APOBEC3G protein. *J Biol Chem*. 2015;290(16):10504-17.
- [23] Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC bioinformatics*. 2007;8(1):4.
- [24] Dimitrov I, Naneva L, Doytchinova I, Bangov I. AllergenFP: allergenicity prediction by descriptor fingerprints. *Bioinformatics*. 2014;30(6):846-51.
- [25] Saha S, Raghava G. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(suppl_2):W202-W9.
- [26] Du J, Wu X, Long F, Wen J, Hao W, Chen R, et al. Improvement in efficacy of DNA vaccine encoding HIV-1 Vif by LIGHT gene adjuvant. *Viral immunology*. 2013;26(1):68-74.
- [27] WIELAND U, KRATSCHMANN H, KEHM R, KÜHN JE, NÄHER H, KRAMER MD, et al. Antigenic domains of the HIV-1 vif protein as recognized by human sera and murine monoclonal antibodies. *AIDS research and human retroviruses*. 1991;7(11):861-7.

Predicting the best immune system stimulating regions of HIV Vif protein in Iranian patients

Zahra Hasanshahi ¹, Behzad Dehghani ¹, Tayebbeh Hashempour^{1*}

1. Bachelor of Biology, Shiraz HIV/AIDS Research Center, Institute of Health, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran,
2. Msc of Microbiology, Shiraz HIV/AIDS Research Center, Institute of Health, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
3. PhD of Virology, Shiraz HIV/AIDS Research Center, Institute of Health, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

thashem@sums.ac.ir

Receipt: 2020/09/22

Accepted: 2021/11/08

Abstract

HIV has at least six regulatory genes, among which the Vif protein can control HIV replication. This study, as the first report, investigated the important mutations in VIF protein in sequences from Iranian patients and using immunoinformatics, conserved regions of this protein and B-Cell, T-Cell and CTL epitopes to stimulate the immune system, were determined. VIF sequences were obtained from NCBI GenBank, and tertiary structures, B-Cell, T-Cell and CTL epitopes were predicted by bioinformatics tools; besides, their antigenic and allergenic properties were studied. The most prevalent mutations in Vif protein were related to S 49 P (90%), S 140 N and N 186 S (80%). Two substitutions at positions 41 and 42 were introduced which have an effect on Vif binding to host factor. In addition, three regions were identified as the best epitope sequences with high potential to induce immune system and the lowest allergic properties, among which 5-32 region was suggested as the best vaccine candidate regions. This study as the first study from Iran using immunoinformatics tools to introduce a region with the high potential to induce humoral and cellular immune systems and lowest allergenic properties, which can be used for further studies on HIV vaccines.

Keywords: HIV, VIF, Epitopes, Bioinformatics