

طراحی واکسن مبتنی بر کامپیوتر: گزارش کوتاه

چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۷/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۲/۱۷

زمینه و هدف: اگرچه تا سال‌ها استفاده از روش‌های سنتی در تولید واکسن مرسوم بود، اما با پیدایش علوم‌ی مانند مهندسی ژنتیک و بیوانفورماتیک، فرصتی برای توسعه‌ی واکسن‌های جدید و بهبود یافته فراهم گردیده است. **روش بررسی:** طراحی واکسن معکوس اولین بار در تهیه‌ی واکسن علیه *نایسریا مننژیتیدیس* به کار برده شد. در این روش، ژنوم کامل یک پاتوژن به کمک آنالیزهای کامپیوتری بررسی می‌شود تا آنتی‌ژن‌هایی که بیش‌ترین احتمال ایمنی‌زایی را دارند، شناسایی شوند.

یافته‌ها: با استفاده از این روش پس از بررسی ژنوم باکتری *نایسریا مننژیتیدیس*، ۶۰۰ پروتیین سطحی یا ترشحی شناسایی گردیده که در این میان ۳۵۰ پروتیین بیان و خالص‌سازی شده‌اند. در نهایت هفت پروتیین شناسایی شده که قادر به ایجاد ایمنی در برابر طیف وسیعی از سویه‌ها می‌باشند.

نتیجه‌گیری: توسعه‌ی تکنیک‌های کامپیوتری محققان را قادر ساخته تا ویژگی‌های بیولوژیکی پیچیده را با اطمینان بالاتری پیش‌بینی کنند و زمینه‌ی حرکت به سمت زیست فناوری مبتنی بر کامپیوتر را فراهم نمایند.

کلمات کلیدی: واکسن، ایمونوفورماتیک، طراحی واکسن به روش معکوس.

راضیه قاسمی خوراسگانی^{*۱}مرضیه ثنائی^۱مجید محمدبیگی^۲

۱- گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین

۲- گروه مهندسی پزشکی، دانشکده فنی و مهندسی

دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

* نویسنده مسئول: اصفهان، خیابان هزار جریب،

دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی،

آزمایشگاه تحقیقاتی تلفن: ۰۳۱۱-۷۹۳۳۴۸۹

E-mail: rghasemi110@gmail.com

مقدمه

ژن‌هایی که در شرایط سلول زنده در طی بیماری‌زایی تولید می‌شوند، در شرایط آزمایشگاهی تولید نخواهند شد. از طرف دیگر چنین روش‌هایی در مورد میکروارگانیسم‌های غیرقابل کشت کارایی نخواهد داشت^{۱،۲} لذا امروزه پیشرفت در زمینه‌ی تعیین توالی ژنوم و پیدایش فناوری‌های زیستی وابسته به کامپیوتر روش‌های جدیدی به منظور بررسی آنتی‌ژن‌های محافظ، از جمله طراحی واکسن به روش معکوس را پیش رو گشوده است. در این روش پروتیین‌های سطحی احتمالی با یک روش معکوس که به جای میکروارگانیسم از ژنوم شروع می‌شود و با استفاده از روش‌های محاسباتی و تشخیص الگو، شناسایی خواهند شد. بنابراین، این روش علاوه بر شناسایی تمامی آنتی‌ژن‌هایی که با روش‌های مرسوم قابل بررسی‌اند، قادر به شناسایی آنتی‌ژن‌های جدید نیز می‌باشد که نقش مهمی در ایمنی‌زایی

با وجود پیشرفت‌هایی که در درمان بیماری‌های عفونی صورت گرفته، میکروارگانیسم‌های پاتوژن هنوز مهم‌ترین عامل تهدیدکننده‌ی سلامت عمومی‌اند و هر چند واکسن‌های مرسوم، در درمان یا ریشه کنی برخی عوامل بیماری‌زا نقش اساسی داشته‌اند، پیدایش بیماری‌های نوظهور نیازمند روش‌های جدیدی در زمینه‌ی طراحی واکسن می‌باشد. روش‌های مرسوم در تولید واکسن نیازمند کشت میکروارگانیسم پاتوژن و شناسایی اجزای ایمنی‌زای آن می‌باشد که روشی زمان‌بر بوده و تنها قادر به شناسایی آنتی‌ژن‌هایی است که به میزان زیادی تولید شده و قابلیت تخلیص بالایی دارند، در حالی که فراوانی پروتیین همواره به معنای ایمنی‌زایی نبوده و یا گاهی آنتی-

بالقوه دارد. چندین روش برای استخراج و بررسی توالی‌های ژنومی می‌تواند استفاده شود و ارتباط مناسب الگوریتم‌های متنوع و ارزیابی و سنجش صحیح اطلاعات به‌دست آمده برای انتخاب مطلوب آنتی‌ژن‌ها ضروری هستند.^۵ گام اول در طراحی واکسن به روش معکوس بررسی توالی کامل نوکلئوتیدی ژنوم میکروارگانیسم بیماری‌زا به منظور شناسایی تمام توالی‌های کد کننده‌ی پروتئینی یا همان قالب‌های خواندن باز (Open Reading Frames, ORF) با استفاده از برنامه‌های کامپیوتری و الگوریتم‌های قادر به شناسایی ORF‌ها می‌باشد.^۶ گام دوم پس از شناسایی تمام ORF‌ها، بررسی همه‌ی ORF‌های پیش‌بینی شده با استفاده از برنامه‌هایی چون BLASTX, Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN), TBLASTX به منظور یافتن توالی‌های مشابه در پایگاه‌های داده و شناسایی قطعات DNA با نواحی کد کننده‌ی بالقوه می‌باشد. در این مرحله ORF‌های کد کننده‌ی پروتئین‌های سیتوپلاسمی و آنتی‌ژن‌های شناخته شده حذف شده و دیگر نواحی کد کننده برای آنالیزهای بیشتر انتخاب می‌شوند. گام سوم با هدف شناسایی ویژگی‌های پروتئین‌های مفروض و جایگاه سلولی آن‌ها (بررسی ویژگی ترشحی بودن یا سطحی بودن پروتئین) انجام می‌گیرد. بسته‌های نرم‌افزاری متنوعی در دسترس هستند که عملکرد ژن‌ها را مشخص کرده و جنبه‌های کلیدی مثل جایگاه سلولی، توپولوژی، وزن مولکولی، PI و حلالیت را پیش‌بینی می‌کنند. BLAST, FASTA, MOTIFS, FINDPATTERNS, PSORT و هم‌چنین پایگاه‌های داده‌ی ProDom, Pfam, Blocks و PROSITE برای شناسایی ویژگی‌های خاص پروتئین‌های سطحی مانند بخش‌های غشایی و پپتیدهای راهنما (Signal peptide)، تشابه با پروتئین‌های سطحی شناخته شده، نشانه‌های (Signature) لیبو پروتئینی، موتیف‌های گیر افتاده در غشای خارجی و بخش‌های متصل به سلول میزبان استفاده می‌شوند.

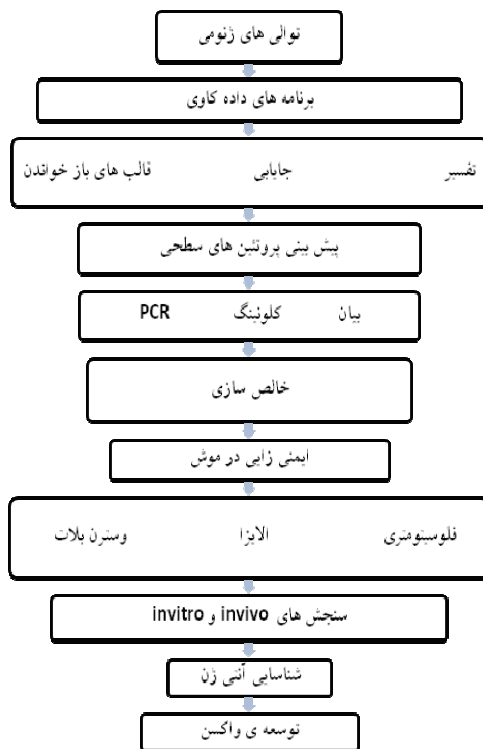
ژنوم بایستی برای پیدا کردن پروتئین‌های همولوگ با فاکتورهای بیماری‌زایی شناخته شده که قبلاً در دیگر ارگانیسم‌ها متمایز شده‌اند و نیز حضور توالی‌های تکراری پشت سر هم در انتهای ۵' که بیان‌گر ژن‌های بیماری‌زای مشخصی هستند، بررسی شود. PSORTb: برای پیش‌بینی جایگاه پروتئین‌ها در باکتری‌های گرم منفی (غشای سیتوپلاسمی، سیتوپلاسم، پرپلاسم و غشای خارجی یا فضای خارج سلولی).

واکسن‌های نسل جدید دارند.^۳ توسعه‌ی ابزارهای جدید مرتبط با حوزه‌ی طراحی واکسن به محققان کمک خواهد کرد تا پاسخ پرسش‌های مهمی را که با آن مواجه هستند، بیابند. پرسش‌هایی نظیر این‌که چگونه می‌توانیم ترکیب بهینه‌ای از کاندیداهای واکسن برای فرمولاسیون یک واکسن چند ظرفیتی را پیش‌بینی کنیم؟ بعد از اصلاحات پس ترجمه به خصوص در پاتوژن‌های یوکاریوتی چه تغییراتی در آنتی‌ژن رخ می‌دهد؟ آیا آنتی‌ژن‌های سطحی واقعاً در دسترس هستند یا بحث‌های مرتبط با پوشانده شدن آنتی‌ژن (Antigen masking) و تجزیه‌ی پروتئین نیز وجود دارد؟^۴

روش بررسی

این مطالعه یک مطالعه توصیفی و مروری بر نحوه‌ی استفاده از بیوانفورماتیک در طراحی واکسن می‌باشد که در سال ۱۳۹۰ در دانشکده علوم و فناوری‌های نوین دانشگاه اصفهان انجام گرفته است. از آن‌جا که اولین گام برای دست‌یابی به یک واکسن کارآمد، شناسایی ترکیب بهینه‌ای از آنتی‌ژن‌های ایمنی‌زا می‌باشد، تلاش‌های گسترده‌ای در جهت شناسایی آنتی‌ژن‌های پروتئینی صورت گرفته است. نتیجه‌ی این تلاش‌ها دست‌یابی به نشان‌گرهای InSilico است که اساس منطقی پیش‌بینی را فراهم می‌کند. برخی از این نشان‌گرها شامل الگوهای توالی مختص پروتئین‌های سطحی و ترشحی می‌باشند. لازم به ذکر است که شرط اول برای این‌که یک پروتئین باکتریایی به عنوان آنتی‌ژن در نظر گرفته شود، جایگاه سلولی آن است. در واقع پروتئین‌های محدود به اجزای سیتوپلاسمی، از نظر ایمنولوژی اهداف مناسبی نیستند، ولی پروتئین‌های سطحی یا ترشحی به دلیل این‌که برای اتصال به آنتی‌بادی در دسترس‌تر بوده، کاندیداهای ایده‌آل‌تری برای طراحی واکسن خواهند بود. روش‌های کامپیوتری و الگوریتم‌های متنوعی برای شناسایی پروتئین‌هایی با این ویژگی از بانک‌های اطلاعاتی وجود دارد. اگرچه اساس بیش‌تر برنامه‌های پیش‌بینی، شناسایی پروتئین‌های سطحی می‌باشد، در حال حاضر روش‌هایی به منظور شناسایی جایگاه پروتئین‌های درون سلولی نیز در دسترس می‌باشد.

موفقیت راهکارهای مبتنی بر ژنوم در طراحی واکسن بستگی زیادی به پارامتر مورد استفاده برای انتخاب InSilico آنتی‌ژن‌های



ساکاریدها و یا آنتی ژن های محدود به CD-1 مثل گلیکولپیدها نیز می توانند کاندیداهای خوبی برای تولید واکسن باشند. از طرف دیگر این تکنیک برای ارگانایسم های پروکاریوت کارآمدتر است، زیرا یوکاریوت ها دارای ژنومی بزرگ تر و بسیار پیچیده تر نسبت به پروکاریوت ها هستند.^۹ این رویکرد جدید در طراحی واکسن شامل آنالیز InSilico توالی ژنومی میکروبی اولین بار به طور موفقیت آمیز برای شناسایی آنتی ژن های ایمنی زا در تهیه ی واکسن علیه نایسریا مننژیتیدیس گروه سرولوژیک B که روش های سنتی طراحی واکسن نتوانسته بود یک واکسن مؤثر را برای آن فراهم کند، به کار برده شد.^{۱۰}

فلوچارت رویکرد مبتنی بر ژنوم برای طراحی واکسن: این شیوه شامل آنالیز InSilico توالی های ژنومی میکروبی و به دنبال آن بیان ژن مورد نظر می باشد.

پروتئین های نو ترکیب سپس برای ایمنی زایی در موش استفاده می شود و پس از آن سرم های گرفته شده از موش به منظور ارزیابی توانایی پلی پپتید برای افزایش یک پاسخ ایمنی به صورت کمی و کیفی مورد بررسی قرار می گیرند.^۵

PSORT: پیش بینی سیگنال های بسته بندی پروتئین در توالی های آمینواسیدی.

SignalP: پیش بینی حضور و جایگاه های شکست سیگنال پپتیداز (SPaseI) در انتهای N پروتئین های ترشحی در ارگانایسم های مختلف، پروکاریوت های گرم مثبت و گرم منفی و یوکاریوت ها.

TMpred: برای شناسایی هلیکس های انتهای N داخل غشایی جهت یابی آن.^{۷،۸} نتیجه ی این مراحل، انتخاب تعداد زیادی از ژن ها می باشد که پروتئین های خارج سلولی و ترشحی را کد می کنند. به منظور کاهش تعداد پپتیدهای مورد مطالعه، پپتیدهای بیماری زایی که می توانند به عنوان پپتیدهای خودی یا تا اندازه ای خودی در میزبان رفتار کنند، با استفاده از مطالعات مقایسه ای با پروتئوم انسان حذف می شوند. حال به فرایندهای ساده ای نیاز است تا اجازه دهد این تعداد ژن کلون شده و بیان گردد.

در نهایت پروتئین های نو ترکیب خالص شده برای ایمنی زایی در موش استفاده می شود و سرم موش برای تأیید جایگاه سطحی پیش بینی شده برای هر پلی پپتید و نیز توانایی آن برای ایجاد پاسخ ایمنی به صورت کیفی و کمی بررسی می شود. به منظور اثبات بیش تر حضور پروتئین ها در سطح باکتری و تعیین ایمنی زایی آن ها، سرم ها به وسیله ی Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) و Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) برای اندازه گیری تیتراژ آنتی بادی و تعیین توانایی آنتی سرم ها برای اتصال به سطح باکتری زنده آنالیز می شوند. یک راه مستقیم برای مطالعه ی اثر حفاظت بخشی آنتی ژن های کاندید، تست کردن سرم ایمن در یک مدل جانوری است که مکانیسم های ایمنی زایی در آن مشابه با انسان باشد. تصویر زیر خلاصه ای از مراحل طراحی واکسن به روش معکوس را نمایش می دهد.^۵ از مزایای این روش می توان عدم نیاز به کشت میکروارگانایسم و در نتیجه بررسی سویه های غیرقابل کشت را نام برد، به علاوه شناسایی پروفایل پروتئینی پاتوژن بدون توجه به فراوانی و زمان تولید مجموعه پروتئین ها در چرخه سلولی، امکان شناسایی آنتی ژن هایی را که به روش های سنتی شناسایی آن ها ممکن نمی باشد، را میسر کرده است.

البته این روش هم مانند سایر روش ها با محدودیت هایی روبه رو است، از جمله این که این روش تنها قادر به شناسایی آنتی ژن های پروتئینی است، در حالی که سایر اجزای ارگانایسم از جمله پلی-

یافته‌ها

اولین گام در کاربرد موفق طراحی واکسن به روش معکوس توسط Pizza برای باکتری *نایسریا مننژیتیدیس* عامل بیماری سپسیس و مننژیت منگوکوکی صورت گرفت.^{۱۱} این پاتوژن دارای پنج زیر گروه اصلی می‌باشد (A, B, C, Y, w135) که این زیر گروه‌ها به وسیله ترکیب شیمیایی پلی‌ساکاریدهای کپسولی از یکدیگر متمایز می‌شوند.

واکسن‌های مبتنی بر پروتئین‌های کپسولی برای همه‌ی سروتایپ‌های *نایسریا* مورد استفاده قرار گرفتند، اما این واکسن‌ها به دو دلیل برای زیر گروه B مناسب نبودند، اول این‌که پلی‌ساکارید کپسولی دارای اجزای مشابه با بافت‌های انسانی بوده و بنابراین ایمنی‌زایی ضعیفی در انسان داشته و قادر به تحریک آنتی‌بادی‌های خودی و ایجاد یک پاسخ خود ایمن می‌باشد. از طرف دیگر واکسن‌های مبتنی بر پروتئین مشتق شده از آنتی‌ژن‌های متغیر، تنها قادر به ایجاد ایمنی در برابر تعداد محدودی از سویه‌های مننژیت B هستند.

در طراحی واکسن به روش معکوس برای MenB، در ابتدا ژنوم این زیر گروه برای یافتن ORF‌های مستعد بیماری‌زایی بررسی گردید. این بررسی بر اساس ویژگی‌های توالی ژنوم باکتری و حضور موتیف‌های آمینواسیدی که جایگاه نهایی پروتئین بالغ را مشخص می‌کنند، [غشای خارجی (بررسی حضور پپتیدهای مرتبط با انتقال پیام)، غشای دو لایه‌ی لیپیدی (لیپوپروتئین‌ها)، غشای داخلی (نواحی درون غشایی)] یا برای شناسایی و واکنش با ساختارهای میزبان انجام گرفت. نتیجه‌ی این گام، شناسایی ۶۰۰ پروتئین ترش‌حی یا سطحی بود. از میان این پروتئین‌های شناخته شده، ۳۵۰ پروتئین به طور موفقیت‌آمیزی در سیستم هترولوگ/شرشیاکلی بیان و سپس خالص‌سازی شدند.

گام بعدی، اطمینان یافتن از کارآمد بودن پروتئین‌های کاندید با بررسی ایجاد ایمنی در برابر سویه‌های هترولوگ باکتری بود که این کار با مقایسه‌ی حضور ژن‌های مرتبط با پروتئین‌های مفروض، تنوع فازی و توالی‌های حفاظت شده در میان ۲۲ سویه‌ی MenB انجام گرفت. در نهایت هفت پروتئین شناخته شد که قادر به ایجاد ایمنی در برابر طیف وسیعی از سویه‌ها بود که به دنبال آن آزمایشات تجربی

دیگر برای ایمنی‌زایی در موش و اطمینان از کارآمد بودن این پروتئین‌ها به عنوان واکسن مؤثر انجام گرفت. به دنبال این موفقیت بزرگ، طراحی واکسن به روش معکوس برای پاتوژن‌های دیگر از جمله *باسیلوس آنتراسیس* نیز به کار گرفته شد.

بحث

استفاده از راهکارهای بیوانفورماتیک برای یافتن اطلاعات عملکردی تأثیر زیادی بر ایمونولوژی مولکولی داشته است و محققان را قادر به حل مسائلی نموده که تنها با روش‌های آزمایشگاهی قابل حل نبوده و نیازمند استفاده از روش‌های *InSilico* می‌باشند.

در واقع در این روش با تکیه بر مطالعات *InSilico* زمان لازم برای طراحی و تولید واکسن به کم‌ترین زمان ممکن کاهش یافته است. شناسایی مجموعه پروتئین‌های سطحی یک سلول باکتریایی در واقع مرحله‌ی مهمی در شروع تاریخچه‌ی طراحی واکسن به روش معکوس بوده است و مثالی از چگونگی استفاده از روش‌های اقتصادی مبتنی بر کامپیوتر به جای روش‌های هزینه‌بر آزمایشگاهی است. بنابراین واضح است که پیشرفت روش‌های شناسایی و افزایش ضریب اطمینان آن‌ها در تشخیص پروتئین‌های سطحی، کمک شایانی به ادامه‌ی مسیر پروژه‌ی طراحی واکسن به روش معکوس خواهد کرد.

در واقع این نوع طراحی واکسن مثال موفق و کاملی از زیست فناوری مبتنی بر کامپیوتر می‌باشد که اولین بار به عنوان راهی برای رهایی از محدودیت‌های روش‌های قراردادی به کار برده شد. با توجه به این راهکارها، شاخه‌ای از بیوانفورماتیک با تمرکز بر ایمونولوژی و واکسن شناسی با نام ایمونوفورماتیک به وجود آمده است. در حال حاضر، ایمونوفورماتیک مثال قدرت‌مندی از راهکارهای بیوانفورماتیک کاربردی در زمینه‌ی ایمونولوژی می‌باشد و طراحی واکسن به روش معکوس نشان می‌دهد ایمونوفورماتیک چگونه می‌تواند تحقیقات مرتبط با زیست فناوری را حمایت و تأیید کند.^{۱۲} با تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست آمده از تحقیقات مرتبط با طراحی واکسن به روش معکوس در گذشته و تلاش برای پاسخ‌گویی به پرسش‌های پیش‌رو، روش‌های طراحی واکسن در آینده به میزان بیش‌تری توسعه خواهد یافت.

References

1. Mora M, Donati C, Medini D, Covacci A, Rappuoli R. Microbial genomes and vaccine design: refinements to the classical reverse vaccinology approach. *Curr Opin Microbiol* 2006;9(5):532-6.
2. Arnon R, Ben-Yedidia T. Old and new vaccine approaches. *Int Immunopharmacol* 2003;3(8):1195-204.
3. Davies MN, Flower DR. Harnessing bioinformatics to discover new vaccines. *Drug Discov Today* 2007;12(9-10):389-95.
4. Vivona S, Gardy JL, Ramachandran S, Brinkman FS, Raghava GP, Flower DR, et al. Computer-aided biotechnology: from immuno-informatics to reverse vaccinology. *Trends Biotechnol* 2008;26(4):190-200.
5. Mora M, Veggi D, Santini L, Pizza M, Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Drug Discov Today* 2003;8(10):459-64.
6. Rinaldo CD, Telford JL, Rappuoli R, Seib KL. Vaccinology in the genome era. *J Clin Invest* 2009;119(9):2515-25.
7. Capecchi B, Serruto D, Adu-Bobie J, Rappuoli R, Pizza M. The genome revolution in vaccine research. *Curr Issues Mol Biol* 2004;6(1):17-27.
8. Movahedi AR, Hampson DJ. New ways to identify novel bacterial antigens for vaccine development. *Vet Microbiol* 2008;131(1-2):1-13.
9. Serruto D, Serino L, Masignani V, Pizza M. Genome-based approaches to develop vaccines against bacterial pathogens. *Vaccine* 2009;27(25-26):3245-50.
10. Seib KL, Dougan G, Rappuoli R. The key role of genomics in modern vaccine and drug design for emerging infectious diseases. *PLoS Genet* 2009;5(10):e1000612.
11. Serino L, Bambini S, Comanducci M, Pizza M, Rappuoli R. Meningococcal diseases: From genomes to vaccines. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 2006;3(2):129-36.

Computer-aided vaccine design: a brief report

Razieh Ghasemi Khorasgani
M.Sc.^{1*}
Marzieh Sanaei M.Sc.¹
Majid Mohammad Beigi Ph.D.²

1- Department of Microbial
Biotechnology, Faculty of Advanced
Sciences and Technology,
University of Isfahan, Isfahan, Iran.
2- Department of Biomedical
Engineering, Faculty of
Engineering, University of Isfahan,
Isfahan, Iran.

* Corresponding author: Department of
Biology, Faculty of Sciences, University
of Isfahan, Hezarjerib St., Isfahan, Iran.
Tel: +98- 311- 7932489
E-mail: rghasemi110@gmail.com

Abstract

Received: September 26, 2011 Accepted: April 21, 2012

Background: Although the conventional vaccines have been instrumented in the incidence of many infectious diseases, the advances in genetic engineering and bioinformatics have provided the opportunity for developing improved and new vaccines.

Methods: Reverse vaccinology was pioneered by a group of researchers investigating development of a vaccine against serogroup B *Neisseria meningitidis*. Reverse vaccinology analyzes the entire genome of a pathogen with the aid of computational programs to identify potentially antigenic extracellular proteins.

Results: Using this method for *Neisseria meningitidis* genome analysis, 600 secretory or surface-exposed proteins were identified and, subsequently, 350 proteins were expressed and purified. Finally, seven proteins capable of activating the immune system against a range of strains were identified.

Conclusion: Improved computational techniques are now able to provide researchers with high-confidence predictions for complex biological characteristics. This will herald a move to computer-aided biotechnology in which time-consuming and expensive large-scale experimental approaches are progressively replaced by functional bioinformatic investigations.

Keywords: immunoinformatics, reverse vaccinology, vaccine.