بررسی مناطق با آنتی ژنسیتی بالا درژن آلفا توکسین باکتری کلستریدیوم نویی تیپ A

محسن فتحی نجفی[۱]، نجمه گردنوشهری[۲]، علی مخدومی کاخکی[۳]،مینا شعبان[٤]

۱ بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی–شعبه شمال شرق، هیات علمی

۲ گروه زیست شناسی– دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد ، دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی g.noshahri@gmail.com

۳ گروه زیست شناسی– دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد، هیات علمی

٤ گروه زیست شناسی– دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد ، دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی

چکیده مقاله:

باکتری کلستریدیوم نویی سیتوتوکسینی با نام آلفا توکسین تولید می کند که با وزن مولکولی ۲۵۰ کیلو دالتون دارای فعالیت آنزیمی است و بر روی گیرنده های Rho سلول های پستانداران تاثیر می گذارد.پیش بینی نواحی اتصال به MHC در یک آنتی ژن خاص در شناسایی بیماری ها و طراحی پپتید واکسن موثر است. روش های آزمایشگاهی برای شناسایی نواحی آنتی ژنیک سخت و زمان براست .استفاده ازروش های محاسباتی برای پیش بینی مناطق آنتی ژنیک این زمان را کاهش می دهد. در تحقیق حاضر نواحی با آنتی ژنسیتی [۱] بالا در آلفا توکسین به کمک ساختار دوم پروتئین ، نقشه هیدروفوبیسیته [۲] و الگوریتم Kolaskar- tongaonkar بررسی گردید. نتایج نشان داد که بیشترین قطعات با آنتی ژنسیته بالا در نیمه دوم پروتئین (اسید آمینه ۱۰۰۰+) است، بنابراین نیمه دوم می تواند برای ساخت قطعات کوچک با بیشترین احتمال آنتی ژنسیتی استفاده شود.

کلمات کلیدی : آلفا توکسین ، کلستریدیوم نویی ، ساختار دوم پروتئین، نواحی اپی توپی

مقدمه :

سویه های تیپ A کلستریدیوم نویی سبب عفونت های قانقاریایی در انسان ها و حیوانات می شود. در میان توکسین های مختلفی که توسط این پاتوژن تولید میشود ، آلفا توکسین پروتئین بزرگ ۲۵۰ کیلو دالتونی دارای ۲۱۷۸ آمینواسید با فعالیت سمی و ادمی درداخل بدن است (۲).

1. antigenicity
2. hydrophobicity

در شرایط آزمایشگاه آلفا توکسین یک سیتوتوکسین قوی است که سبب تغییرات مورفولوژی سلول میشود (۱) .بررسی های همولوژی توالی با توکسین های A و B کلستریدیوم دیفیسیل و توکسین کشنده کلستریدیوم سوردلی ، آلفا توکسین را در خانواده ی سیتوتوکسین های بزرگ کلستریدیوم قرار داد (٤).همه ی این توکسین ها گلیکوزیل ترانسفراز هستند که زیرخانواده های Rho و Ras از پروتئین های متصل شونده به GTP را غیرفعال می کنند که سبب مهار مسیر انتقال پیام می شود و نتیجه ی آن شکستن ساختار اسکلت سلولی است (۸) در مقابل موکول های MHC گیرنده های پروتئینی سطح سلولی هستند که بخش فعال در واکنش های ایمنی میزبان است و با ناحیه ی خاصی از آنتی ژن به نام اپی توپ متصل می شود..

سیتوتوکسین های بزرگ کلستریدیومی تصور می شود که شامل سه منطقه عملکردی هستند. انتهای C–ترمینال توکسین شامل توالی تکراری برای اتصال به گیرنده ، منطقه هیدروفوبیک در ناحیهی مرکزی دخیل در انتقال ویزیکول های اندوزومی به

سیتوزولی(۱۰) و قطعه ی N–ترمینال از توکسین B کلستریدیوم دیفیسیل وتوکسین کشنده کلستریدیوم سوردلی فعالیت گلوکوزیل ترانسفرازی از هالوتوکسین [1] را نشان می دهند(۳).

شناسایی اپی توپ ها ی روی پروتئین برای اهداف شناسایی و همچنین توسعه ی واکسن های پپتیدی مناسب است . هدف این تحقیق پیش بینی نواحی با آنتی ژنسیته بالا در توکسین آلفا باکتری کلستریدیوم نویی و بررسی بهترین منطقه تولید کننده آنتی بادی بر علیه توکسین اصلی است.

مواد و روش ها :

آنالیز توالی پروتئینی:

توالی های مختلف پروتئینی آلفا توکسین کلستریدیوم نویی از پایگاه اطلاعاتی NCBI بازیابی شد سپس شباهت ها و تفاوت های توالی ها با کمک نرم افزار مگا ۵ و بلاست مورد بررسی قرار گرفت بهترین توالی که دارای تفاوت کمتری نسبت به سایرتوالی هاست با شماره gi|755724|emb|CAA88565.1| بازیابی گردید. در مرحله بعد توالی نوکلوتیدی ژن آلفا توکسین با کمک نرم افزار ExPASy ترجمه و فریم اصلی ترجمه ی آن مشخص گردید. . سپس نواحی هضم آنزیمی به وسیلهی نرم افزار CLC در توالی نوکلئوتیدی آلفا توکسین مشخص شد .

پیش بینی ساختار دوم پروتئین:

ساختار دوم (نواحی آلفا هلیکس [2] و صفحات بتا [3]) توالی اسید آمینه توکسین آلفا با استفاده از نرم افزار CLC پیش بینی گردید.

1.holotoxin
2.α-helix
3.β-sheet

پیش بینی نواحی آنتی ژنیک :

نقشه آنتی ژنیک با استفاده از الگوریتم Kolaskar- tongaonkar در نرم افزار CLC تعیین گردید. این برنامه قطعاتی از توالی پروتئین آلفا توکسین که احتمالا آنتی ژنیک هستند را توسط استخراج پاسخ آنتی بادی پیش بینی می کند. . پیش بینی براساس استفاده از اطلاعات تعیین شده از طریق آزمایشگاهی و خصوصیات فیزیکو شیمیایی آمینواسیدها بر اساس محاسبات بیوانفورماتیک می باشد(٦).

بررسی نواحی هیدروفیل:

با استفاده از الگوریتم kyte-doolittle در نرم افزارCLC نقشه هیدروفوبیسیته مشخص می شود که می توان به وسیلهی آن نواحی سطحی پروتئین که دارای پتانسیل آنتی ژنسیتی بالا هستند را مشخص نمود..

نتیجه و بحث :

از آنجا که بیشتر مطالعات روی واکسن ها توسط غیرفعال سازی توکسن با فرمالین است وتوکسیدها مشکلات بالقوه ای نظیر غیرفعال شدن ناکامل ، تفاوت خصوصیات از یک بچ به بچ دیگر و جداشدن توکسین از فرمالین دارند به نظر می رسد استفاده از واکسن های زیرواحدی یا پپتیدهای سنتزی بر این مشکلات فایق می آید .آنتی بادی ها بیش از آن که برای کل مولکول آنتی ژن اختصاصی باشند ، برای اپی توپ ها اختصاصی اند(۹). بنابراین پیش بینی نواحی آنتی ژنی روی یک توالی مهم است .

انطباق نتایج بدست آمده از نمودار آنتی ژنسیتی و ساختار دوم توکسین آلفا نشان داد که نواحی صفحات بتا بیشترین پاسخ آنتی ژنسیته را نسبت به نواحی هلیکس دارند که با بررسی های صورت گرفته توسط اینگل تطبیق دارد(۵). پپتید هایی که خارج از نواحی هلیکس و در نواحی لوپ قرار دارند ، پپتیدهای آنتی ژنیک بوده و باعث افزایش تمایل آنتی بادی جهت شناسایی پروتئین طبیعی می شوند. با استفاده از الگوریتم Kolaskar -Tongaonkar قطعات آنتی ژنیک متصل شونده به گیرنده های MHC پیش بینی شد ، از آنجا که منطقه کربوکسی ترمینال به خاطر اتصال به رسپتور سلولی بسیار ایمونوژنیک است(۷).. تمرکز آنتی ژنسیته ی در نیمه ی دوم پروتئین (اسید آمینه ۱۰۰۰+) بیشتراست .با بررسی نقشه آنتی ژنسیته ۱۷ ناحیه آنتی ژنیک مشخص گردید که بیشترین آنها در ناحیه ۱۰۶۲–۱۰۳۷، ۱۱۳۵–۱۰۷۸ ، ۱۲۲٤– ۱۱۸٦ ، ۱٦۱۰–۱۵۸۷دیده شدند. احتمال داده می شود ناحیه N–ترمینال که فعالیت آنزیمی دارد از نظر آنتی ژنسیته پایینتر نسبت به ناحیه C–ترمینال است .

فرض شده است که نواحی آنتی ژنیک در سطح پروتئین قرار دارند در نتیجه باید در مناطق هیدروفیل واقع شده باشند .

بررسی نقشه هیدروفوبیسیته و شناسایی نواحی که کمترین هیدروفوبیسیته را دارند و انطباق آن با نقشه آنتی ژنسیته احتمال آنتی ژنیک بودن این مناطق را افزایش می دهد .

در مرحله ی بعد می توان با مقایسه نتایج حاصل از الگوریتم Kolaskar- Tongaonkar و سایر الگوریتم های موجود صحت نواحی آنتی ژنیک را بررسی کرد همچنین با بررسی آزمایشگاهی قطعات آنتی ژنیک پیش بینی شده و مقایسه تیتر آنتی بادی تولید شده توسط این قطعات با آنتی بادی حاصل از توکسین اصلی ایمنی زایی آن ها را ارزیابی نماییم.

بنابراین بر اساس مطا لعات این تحقیق و مطالعات بعدی می توان احتمال داد که یک قطعهی کوچک از آنتی ژن قادر است پاسخ ایمنی علیه کل آنتی ژن را القا نماید. این ادعا نیاز به بررسی های بیو انفورماتیکی و آزمایشگاهی بیشتری دارد..

مراجع:

1- **BETTE, P., OKSCHE, A., MAULER, F., EICHEL-STREIBER, C., POPOFF, M. & HABERMANN, E. 1991**. A comparative biochemical, pharmacological and immunological study of< i> Clostridium novyi</i> α-toxin, C. difficile toxin B and< i> C. sordellii</i> lethal toxin. *Toxicon*, 29**,** 877-887.
2- **HATHEWAY, C. L. 1990**. Toxigenic clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*, 3**,** 66.
3- **HOFMANN, F., BUSCH, C. & AKTORIES, K. 1998**. Chimeric clostridial cytotoxins: identification of the N-terminal region involved in protein substrate recognition. *Infection and immunity*, 66**,** 1076-1081.
4- **HOFMANN, F., HERRMANN, A., HABERMANN, E. & EICHEL-STREIBER, C. 1995**. Sequencing and analysis of the gene encoding the α-toxin of Clostridium novyi proves its homology to toxins A and B of Clostridium difficile. *Molecular and General Genetics MGG*, 247**,** 670-679.
5- **INGALE, A. 2010**. Antigenic epitopes prediction and MHC binder of a paralytic insecticidal toxin (ITX-1) of Tegenaria agrestis (hobo spider). *Open Access Bioinformatics*, 2**,** 97-103.
6- **KOLASKAR, A. & TONGAONKAR, P. C. 1990**. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS letters*, 276**,** 172-174.
7- **LYERLY, D. M., PHELPS, C. J., TOTH, J. & WILKINS, T. D. 1986**. Characterization of toxins A and B of Clostridium difficile with monoclonal antibodies. *Infection and immunity*, 54**,** 70-76.
8- **MULLER, H., VON EICHEL-STREIBER, C. & HABERMANN, E. 1992**. Morphological changes of cultured endothelial cells after microinjection of toxins that act on the cytoskeleton. *Infection and immunity*, 60**,** 3007-3010.

9- **MALE, D., BROSTOFF, J., ROTH, D. & ROITT, I. 2006**. Immunology, Mosby, 544 p. ISBN
10- **VON EICHEL-STREIBER, C., BOQUET, P., SAUERBORN, M. & THELESTAM, M. 1996**. Large clostridial cytotoxins—a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends in microbiology*, 4**,** 375-382.

Prediction of high antigenic regions of *Clostridium novyi* alpha-toxin

Mohsen Fathi Nagafi[1],Najme Gord Noshahri[2],Ali Makhdoumi-Kakhki[2],Mina Shaban[2]
1.Razi *vaccine and serum research institute, Mashhad, Iran*.
2. Department of biology, Faculty of Science ,Ferdowsi University, Mashhad, Iran
g.noshahri@gmail.com

Abstract:
Alpha-toxin produced by *clostridium novyi* with 250kDa molecular weight has enzymatic activity and effects on Rho protein family of mammalian cells. Predicting MHC binding sites on a specific antigen is a critical step in recognizing diseases and designing peptide vaccine. The experimental approaches used for detecting antigenic regions are laborious and time-consuming. Thus, computational methods for the prediction of the regions with high antigenicity save time. In this study, antigenic region of alpha-toxin were analyzed by using secondary structure, hydrophobicity plot and Kolaskar-tongaonkar algorithm. The results showed that highest antigenic places are at second part (+1000 amino acid) of the protein, therefore it can be used for production of different small fragments with most expected antigenic properties.

Keyword: alpha-toxin, *Clostridium novyi*, protein secondary structure, epitopic regions.