مقاله تحقیقی

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۶۹، شماره ۴، ۳۴۵-۳۳۵

Original Article

Journal of Veterinary Research. 69,4:335-345, 2014

بررسی ایمونوانفورماتیکی پروتئین تروپومیوزین کنه بوافیلوس

محمد مهدی رنجبر[۱] صدیقه نبیان[۲*] محمد طاهری[۳] غلامرضا نیکبخت[۴] علی نیک پی[۵]

۱) دانش آموخته ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران

۲) گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و مرکز کنه شناسی و بیماریهای منتقل شونده توسط آن، تهران- ایران

۳) آزمایشگاه مرکزی دکتر رستگار دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران

۴) گروه میکرو بیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران

۵) گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تخصصی فن آوری های نوین آمل، آمل- ایران

(دریافت مقاله: ۵ شهریور ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۱۲ آبان ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: کنه بوافیلوس سبب انتقال برخی از اجرام پاتوژن وکاهش تولید در گاو می‌شود. پروتئین تروپومیوزین، تنظیم گر فعالیت اکتین بوده و نقش مهمی در واکنش‌های ایمنی، آلرژی و تهیه واکسن دارد. **هدف:** روش‌های مرسوم شناسایی دقیق شاخص‌های آنتی ژنتیک (اپی توپ‌ها)، طاقت فرسا، زمان بر و پرهزینه است، لذا توجه ما در این مطالعه به سمت توسعه روش‌های سریع تر نظیر پیشگویی اپی توپ‌های احتمالی موردشناسایی سلول B و +TCD4، مبتنی بر توالی وساختار پروتئین می‌باشد. **روش کار:** از گستره وسیعی از برنامه‌ها و ابزارهای ایمونوانفورماتیک جهت آنالیز آنتی ژنسیتی، فراوانی ساختار ثانویه پروتئین و دومن‌ها، فاکتورهای فیزیکوشیمیایی مرتبط با مکان اپی توپ‌های خطی، اپی توپ‌های سلول B، قطعات پپتیدی متصل شونده به آلل های MHC کلاس ۲ گاو استفاده گردید. **نتایج:** آنالیز پروتئین با الگوریتم‌های مختلف و انتخاب اپی توپ‌های مورد توافق در بیشتر ابزارها منجر به به‌دست‌آمدن سه پپتید برگزیده با خاصیت اپی توپی برای سلول B (AA_{62-80} (NH2-EQLSQANSKLEEKDKALQA-COOH)، $AA_{170-185}$ (NH2-AMVEADLERAEERAETG-COOH) و $AA_{200-218}$ (NH2-VGNNLKSLEVSEEKALQKEET-COOH) و یک پپتید برای سلول T $AA_{192-207}$ (NH2-LEEELRVVGNNLKSL-COOH) گردید. **نتیجه گیری نهایی:** جهت تحریک رضایت بخش سیستم ایمنی تنها قطعاتی از پروتئین (اپی توپ‌ها) کافی می‌باشد. انتخاب اپی توپ‌های بهینه سبب تمرکز پاسخ ایمنی و تهیه واکسن مناسب شده و از پاسخ‌های آلرژیک و نامطلوب می‌کاهد.

واژه‌های کلیدی: کنه بوافیلوس، اپی توپ‌ها، ایمونوانفورماتیک، پروتئین تروپومیوزین

مقدمه

کنه‌های بوافیلوس، کنه‌هایی خونخوار اجباری می‌باشند که می‌توانند سبب ایجاد خسارات اقتصادی فراوان و انتقال برخی از عوامل بیماریزا از جمله بابزیا و آناپلاسما به دام‌ها گردند (۱). پروتئین تروپومیوزین، متصل شونده و تنظیم‌گر فعالیت اکتین بوده و برای عمل انقباض عضلات حائز اهمیت است. در بی مهرگان، ایزوفرم‌های متعددی از تروپومیوزین در بافت‌های عضلانی و غیر عضلانی یافت می‌شوند. در برخی موارد ایزوفرم‌های عضلانی در بافت‌های غیرعضلانی بیان می‌شوند. از سوی دیگر این پروتئین، نقش مهمی را در واکنش‌های ایمنی زایی و آلرژیک به کنه‌ها و جرب‌ها بازی می‌کند. از این رو این پروتئین در بسیاری از گونه‌های کنه، جرب و سایر انگل‌ها، انتخاب مناسبی جهت تهیه واکسن می‌باشد (۶،۱۳).

امروزه در فرایند تولید واکسن به دلایل بی خطربودن، آلرژنسیتی و تمرکز پاسخ ایمنی از واکسن‌های پپتیدی (واکسن‌های پلی توپی) که قادر به تولید پاسخ ایمنی بر علیه پاتوژن مورد نظر به طور اختصاصی باشند، استفاده می‌گردد (۲۴،۳۳).

در این راستا به منظور شناسایی دقیق شاخص‌های آنتی ژنتیک (اپی توپ‌ها) جهت ساخت پپتیدهای مصنوعی به عنوان واکسن‌های بالقوه، نیاز به به‌دست آوردن پروتئین مورد نظر از ارگانیسم، شناخت قطعات پپتیدی مشتق از آن و در نهایت شناسایی فعالیت ایمنی زایی آنها می‌باشد. این چنین مطالعاتی، طاقت فرسا، زمان بر و گران بوده، لذا تلاش و توجه محققین به سمت توسعه روش‌های سریع تر نظیر پیشگویی پپتیدهای ایمونوژن مبتنی بر توالی آمینو اسید پروتئین مورد بررسی و خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن، می‌باشد (۳۳،۳۹). با در دست داشتن اطلاعات کافی، دسترسی به تکنولوژی‌های جدید شناسایی، الگوریتم‌های طبقه‌بندی شده و ابزارهای محاسبه‌ای که مناطقی با آنتی ژنسیتی بالا را در پروتئین پیش بینی می‌کنند تقریباً با احتمال بالا می‌توان نواحی ایمونوژنیک برای سلول‌های B و T را در پروتئین مورد نظر شناسایی کرد (۳۲،۳۶). سپس همچنین می‌توان اپی توپ‌های با ایمونوژنسیتی بالا را جهت ساخت واکسن‌های پپتیدی، تشخیص بیماریها و درک مبنی مولکولی ایمنیت به کار گرفت. در حال حاضر تعدادی از واکسن‌های پپتیدی حاصل از اپی توپ‌ها بر علیه گستره‌ای از بیماریهای عفونی، سرطان‌ها و بیماریهای خود ایمن در مرحله آزمون بالینی می‌باشند (۱۱،۱۶،۲۷،۳۰،۳۴،۳۵).

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۷۲-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: nabian@ut.ac.ir

در ارزیابی اپی توپ‌ها یکی از موارد مهم، ساختار ثانویه پروتئین‌ها جهت بررسی محل قرارگیری اپی توپ در ساختار آنها می‌باشد. ساختار ثانویه پروتئین‌ها به دو صورت Helix-± و Sheet- و ساختارهای بینابینی این دو نظیر؛ turn- یا Coil می‌باشد. در این میان ساختارهای نوع و Coil به جهت احتمال وجود اپی توپ در ناحیه مربوط به آنها در پروتئین واجد اهمیت بیشتری هستند (۱۵).

آلل‌های ۱۰ *BoLA- DRB3، ۴۲*، ۱۸*، ۲۰*، ۲*، ۲۷* و تا حدودی ۲۶* با کاهش تعداد کنه در ارتباط می‌باشند (۲۶). همچنین Nikbakht و همکاران در سال ۲۰۱۲، در مطالعه فراوانی آلل‌های اگزون ۲ از ژن BoLA-DRB3 در گاوهای هلشتاین ایران مشاهده کردند که آلل‌های ۲۴*، ۱۶* و ۲۳* به ترتیب فراوان‌ترین آلل‌ها در جمعیت گاوهای هلشتاین مربوط به نقاط مختلف ایران می‌باشند (۲۶). لذا این آلل‌ها به عنوان کاندید جهت پیشگویی قطعات پپتیدی متصل شونده به آلل‌های BoLA-DRB3 مورد بررسی قرار می‌گیرند.

تا به حال چندین تحقیق ایمونوانفورماتیکی بر روی پروتئین‌های ایمونوژن انگل‌ها نظیر؛ پروتئین TSOL18 در کرم *Taenia solium* (۴۳)، پروتئین غشاء راسی (Apical Membrane Antigen1(AMA-1)) در انگل *Plasmodium vivax* (۴)، پروتئین انکوسفر EG95 در سستودهای *Echinococcus granulosus* (۲۲،۴۰) و *Echinococcus multilocularis* (۱۰) صورت گرفته است.

در این مطالعه تلاش گردیده است از روش‌های بیوانفورماتیکی و ایمونوانفورماتیکی جهت شناسایی و آنالیز اپی توپ‌های آنتی ژنیک سلول B و T و همچنین ساختار پروتئین تروپومیوزین به عنوان گام نخست در سنتز واکسن پپتیدی بهره گرفته شود.

مواد و روش کار

آنالیز توالی پروتئین: از آنجایی که ایمنی زایی تروپومیوزین کنه بوافیلوس آنولاتوس بر اساس تحقیق انجام شده در بخش انگل شناسی دانشگاه تهران طی آلوده سازی تجربی گاو با کنه مشاهده شد (۲۳) و توالی پروتئینی تروپومیوزین این کنه در پایگاه‌های داده مرجع وجود نداشت، لذا توالی کامل پروتئین تروپومیوزین از کنه ری پی سفالوس (بوافیلوس میکروپولوس (گونه نزدیک) (*Boophilus microplus*) به طول ۲۸۴ اسید آمینه با شماره دسترسی O97162، به همراه توالی تروپومیوزین سایر کنه‌ها، جرب‌ها، کرم‌ها، حشرات و برخی مهره داران از پایگاه داده مرجع UniProtKB/Swiss-prot (http://www.expasy.org/uniprot) گرفته و ذخیره گردید. سپس با برنامه CLC Protein Workbench 6.6.2 و سرور آنلاین T-coffee همردیفی توالی تروپومیوزین کنه بوافیلوس میکروپولوس با سایر توالی‌ها انجام شده و میزان حفاظت شدگی و همولوژی بین توالی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز آنتی ژنسیتی: منحنی آنتی ژنسیتی پروتئین تروپومیوزین با روش (الگوریتم) سنجش Kolaskar-Tongaonkar با استفاده از امکانات پایگاه IEDB (http://tools.immuneepitope.org/main/html/analysis_tools.html) رسم گردید. این الگوریتم‌ها آن قطعاتی را که درون توالی پروتئین با احتمال زیاد آنتی ژنیک هستند و قادر به تحریک پاسخ ایمنی می‌باشند بر اساس جدولی از پیش تعریف شده، شناسایی می‌کنند (۱۷).

پیشگویی ساختار ثانویه پروتئین و دومن‌ها: ساختار ثانویه پروتئین و دومن‌ها با استفاده از سرورهای اینترنتی PSIPRED (http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/) مورد پیشگویی قرار گرفت. درک ساختار پروتئین در ارزیابی اپی توپ و مناطق ایمنوژنیک کمک کننده است.

پیشگویی فاکتورهای فیزیکو شیمیایی مرتبط با مکان اپی توپ‌های خطی: جدول و منحنی فاکتورهای (پروفایل‌های) فیزیکوشیمیایی مرتبط با مکان اپی توپ‌های خطی با به کارگیری سرورهای BcePred (http://www.imtech.res.in/cgibin/bcepred/bcepred.pl)، IEDB و ExPAsy - ProtScale (http://www.expasy.org) رسم گردید. فاکتورها مورد نظر شامل؛ هیدروپاتی، دسترسی، انعطاف پذیری، سطح در معرض بودند. در این بررسی پروفایل هیدروفیلی و هیدروفوبی را به ترتیب بر اساس اگوریتم که وسیله Hopp و Woods در سال ۱۹۸۱ و Keyte و Doolittle در سال ۱۹۸۲ معرفی شده‌اند، ارزیابی گردید (۱۲،۱۹).

همچنین دسترسی سطحی نیز با استفاده از الگوریتم Emini (۷) و انعطاف پذیری قسمت‌های مختلف پروتئین نیز با الگوریتم Karplus و Schulz (۱۴) انجام شد.

پیشگویی اپی توپ‌های خطی سلول B: جهت پیشگویی دقیق اپی توپ سلول B از سه سرور اینترنتی در دسترس BepiPred (۲۱)، ABCpred (۳۱) و Scratch، جهت پیشگویی اپی توپ‌های خطی سلول B استفاده شد و جهت صحت فرایند انتخاب اپی توپ‌ها، نتایج آنها با یکدیگر و از سوی دیگر با فاکتورهای فیزیکوشیمیایی مرتبط با مکان اپی توپ‌های خطی نیز به طور جداگانه مقایسه و مورد ارزیابی قرار گرفت.

پیش‌گویی قطعات متصل شونده به آلل‌های BoLA-DRB3: ژن‌های مجتمع اصلی سازگاری نسجی (MHC) یا BoLA (Bovine Leukocyte Antigen) کلاس در گاو، به واسطه ارتباط با پاسخ‌های ایمنی و مقاومت و یا حساسیت به بیماریها اهمیت ویژه‌ای دارند (۳۷). از این رو پیش‌گویی قطعات متصل شونده به آلل‌های BoLA می‌تواند نقش مهمی در بررسی ایمنی‌زایی و حساسیت/مقاومت به بیماریها و از سوی دیگر تهیه واکسن‌های مناسب داشته باشد (۲۱). جهت پیش‌گویی قطعات متصل شونده به BoLA-DRB3 از ابزار version 2.1 NetMHCIIpan متعلق به دانشگاه فنی دانمارک استفاده گردید. این ابزار از مدل شبکه عصبی مصنوعی استفاده کرده و اپی توپ‌های با ارزش بالای nM IC50 و امتیاز مناسب مورد انتخاب قرار می‌گیرند (۲۵).

جدول۱. نتایج پیشگویی فراوانی ساختار ثانویه پروتئین با سرور PSIPRED V3.0 و Scratch. [(a)] نتایج حاصل از سرور PSIPRED، [(b)] نتایج حاصل از سرور Scratch، [(*)] پیشگویی ساختار ثانویه (H=helix, C=coil).

پیشگویی ساختار ثانویه [(*)(a)]	CHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCC
پیشگویی ساختار ثانویه [(*)(b)]	CHHHHHHHHHHHHHHCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHCCCCCHHHHCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCEEEEH HHHHHHHCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCC

جدول۲. نتایج پیشگویی اپی توپ‌های سلول B.

شماره	توالی اپی توپ‌ها منتخب		پایگاه پردازش
۱	$AA_{۱۸-۲۹}$	AVDRAETAEQQS	BepiPred
۲	$AA_{۳۷-۴۲}$	EKAEEE	BepiPred
۳	$AA_{۵۵-۶۰}$	NELDQV	BepiPred
۴	$AA_{۶۲-۸۰}$	EQLSQANSKLEEKDKALQA	BepiPred
۵	$AA_{۱۱۴-۱۲۳}$	EEASQAADES	BepiPred
۶	$AA_{۱۵۵-۱۶۱}$	AEDADRK	BepiPred
۶	$AA_{۱۷۹-۱۸۶}$	AEERAETG	BepiPred
۷	$AA_{۲۱۲-۲۲۰}$	EKALQKEET	BepiPred
۱	$AA_{۱۳۲-۱۴۸}$	HRSITDEERMDGLEGQ	ABCpred
۲	$AA_{۲۵۸-۲۷۴}$	DELVQEKEKYKAISDE	ABCpred
۳	$AA_{۱۴۹-۱۶۵}$	KEARTMAEDADRKYDE	ABCpred
۴	$AA_{۱۲۳-۱۳۹}$	SERMRKMLEHRSITDE	ABCpred
۵	$AA_{۶-۲۲}$	KKMQAMKLEKDNAVDR	ABCpred
۶	$AA_{۱۱۷-۱۳۳}$	SQAADESERMRKMLEH	ABCpred
۷	$AA_{۱۶۹-۱۸۵}$	LAMVEADLERAEERAE	ABCpred
۱	$AA_{۰-۸}$	MEAIKKK	Scratch
۲	$AA_{۱۳۳-۱۳۹}$	SITDEE	Scratch
۳	$AA_{۲۰۵-۲۱۲}$	SLEVSEE	Scratch
۴	$AA_{۱۸۴-۱۹۱}$	TGETKIV	Scratch
۵	$AA_{۱۳۵-۱۴۲}$	TDEERMD	Scratch

فراوانی ساختارهای ثانویه پروتئین: فراوانی پروفایل ل-Helix و Sheet- با استفاده از الگوریتم Chou-Fasman و با استفاده از ابزارهای سرورهای ProtScale و IEDB انجام شد. این الگوریتم چندین فاکتور را در ساختار توالی آمینواسیدی و فضایی پروتئین مورد بررسی قرار می‌دهد (۵).

نتایج

نتایج آنالیز همردیفی توالی پروتئین: همانطور که در تصویر ۱ قابل مشاهده است، قسمتی از همردیفی توالی تروپومیوزین در چهار سطح مجزا شامل؛ کنه‌ها (۰)، جرب‌ها (۱)، کرم‌ها (۲) و در نهایت حشرات (۳) طبقه‌بندی شده است. ارزیابی کلی همردیفی توالی پروتئین تروپومیوزین حاکی از حفاظت شدگی این پروتئین بوده و از سوی دیگر توالی تروپومیوزین در کنه‌ها و جرب‌ها تشابه بیشتری به یکدیگر نسبت به کرم‌ها و حشرات دارند.

نتایج آنالیز آنتی ژنسیتی با روش Kolaskar و Tongaonkar: در تصویر ۲ منحنی پیشگویی آنتی ژنسیتی پروتئین تروپومیوزین نشان داده شده است. محور x (x-axis) تعداد امینواسید توالی را نشان می‌دهد و محور y میانگین تمایل ذاتی آنتی ژن بودن را نمایش می‌دهد. میانگین تمایل ذاتی این پروتئین برای آنتی ژنسیتی ۰/۹۹۸ است. ۸ شاخص آنتی ژنیک قابل ذکر با تمایل ذاتی متفاوت آنتی ژن بودن در توالی دیده می‌شود. بالاترین قله به ترتیب در محدوده اسید آمینه شماره ۲۰۲ تا ۲۱۵، ۵۵ تا ۷۲ و ۲۴۰ تا ۲۶۰ است. بالاترین قله‌های توالی نشان دهنده محل‌های با احتمال بالای اتصال آنتی بادی بوده و محل‌های پر اهمیت می‌باشند (تصویر ۲).

پیشگویی فراوانی ساختار ثانویه پروتئین و دومن‌ها: پیشگویی دومین‌های پروتئین (با سرور scratch)، نشان داد که این پروتئین از دو دومن الفا هلیکس (α-Helix) در ارتباط با یگدیگر تشکیل شده است. دومین اول و دوم به ترتیب از اسید آمینه شماره ۱ تا ۱۹۳ و ۱۹۴ تا ۲۸۴ امتداد

جدول۳. اپی توپ‌های پیش گویی شده سلول B با سرور.

روش مورد استفاده	نواحی شناخته شده بر اساس هر فاکتور فیزیکو شیمیایی به طور مجزا به عنوان شاخص آنتی ژنیک
هیدروفیلیسیتی	[1]MEAIKKKMQAMKLEKDNAVDRAETAEQQSREAALRAEKAEEEVRSLQKKIQQIENELDQVQEQLSQANSKLEEKDKALQ AAEAEVAAHNRRIQLLEEDLERSEERLKIATQKLEEASQAADESERMRKMLEHRSITDEERMDGLEGQLKEARTMAEDADR KYDEVARKLAMVEADLERAEERAETGETKIVELEEELRVVGNNLKSLEVSEEKALQKEETYEMQIRQMTNRLQEAEARAEF AERSVQKLQKEVDRLEDELVQEKEKYKAISDELDQTFSELTGY[284]
انعطاف پذیری	[1]MEAIKKKMQAMKLEKDNAVDRAETAEQQSREAALRAEKAEEEVRSLQKKIQQIENELDQVQEQLSQANSKLEEKDKALQ AAEAEVAAHNRRIQLLEEDLERSEERLKIATQKLEEASQAADESERMRKMLEHRSITDEERMDGLEGQLKEARTMAEDADR KYDEVARKLAMVEADLERAEERAETGETKIVELEEELRVVGNNLKSLEVSEEKALQKEETYEMQIRQMTNRLQEAEARAEF AERSVQKLQKEVDRLEDELVQEKEKYKAISDELDQTFSELTGY[284]
دسترسی	[1]MEAIKKKMQAMKLEKDNAVDRAETAEQQSREAALRAEKAEEEVRSLQKKIQQIENELDQVQEQLSQANSKLEEKDKALQ AAEAEVAAHNRRIQLLEEDLERSEERLKIATQKLEEASQAADESERMRKMLEHRSITDEERMDGLEGQLKEARTMAEDADR KYDEVARKLAMVEADLERAEERAETGETKIVELEEELRVVGNNLKSLEVSEEKALQKEETYEMQIRQMTNRLQEAEARAEF AERSVQKLQKEVDRLEDELVQEKEKYKAISDELDQTFSELTGY[284]
سطح در معرض	[1]MEAIKKKMQAMKLEKDNAVDRAETAEQQSREAALRAEKAEEEVRSLQKKIQQIENELDQVQEQLSQANSKLEEKDKALQ AAEAEVAAHNRRIQLLEEDLERSEERLKIATQKLEEASQAADESERMRKMLEHRSITDEERMDGLEGQLKEARTMAEDADR KYDEVARKLAMVEADLERAEERAETGETKIVELEEELRVVGNNLKSLEVSEEKALQKEETYEMQIRQMTNRLQEAEARAEF AERSVQKLQKEVDRLEDELVQEKEKYKAISDELDQTFSELTGY[284]

جدول۴. پیش گویی پپتیدهای متصل شونده به آلل های BoLA-DRB3.

توالی پپتید (اپی توپ‌های منتخب پیشگویی شده)	مکان پپتید	نوع شاخص (اپی توپ)	سلول هدف	کلاس MHC	آلل
LEEELRVVGNNLKSL, ETYEMQIRQMTNRLQ	192-207, 218-233	خطی	T CD4$^+$	Class II	BoLA-DRB3.2*2
EEELRVVGNNLKSLE, EMQIRQMTNRLQEAE	193-207, 221-236	خطی	T CD4$^+$	Class II	*20
LEEELRVVGNNLKSL	خطی192-207	خطی	T CD4$^+$	Class II	*27

یافته‌اند. نتایج پیشگویی ساختار ثانویه پروتئین نشان داد که دو کنفورماسیون Coil و Helix در ساختار پروتئین وجود دارد. با اینکه تفاوت‌هایی در نواحی Coil (C) و Helix (H) میان نتایج سرور V3.0 PSIPRED و Scratch وجود دارد اما، شباهت‌های کلی در نتایج دیده می‌شود که در ارزیابی کلی مد نظر قرار خواهد گرفت. نواحی واجد ساختار Coil (β-Turn) از مناطق غنی از احتمال حضور اپی توپ می‌باشند. جهت تفسیر از نتایج جدول و تصاویر به طور یکپارچه استفاده شده تا بهترین نتایج به‌دست آید (جدول۱) (تصویر۳-الف و ب).

پیشگویی اپی توپ سلول B: پیشگویی اپی توپ‌های سلول B با سرورهای مختلف که از الگوریتم‌های متفاوت پیشگویی کننده استفاده می‌کنند در جدول آورده شده است. این نواحی پیشگویی شده واجد بالاترین امتیاز از نظر احتمال وجود اپی توپ بوده‌اند. توجه به این نکته لازم است که چینش نتایج سرورها در برخی از موارد بر اساس امتیاز صعودی به نزولی اپی توپ‌های پیش بینی شده، بوده است. علت تفاوت در طول اپی توپ به سبب محدودیت کاربر در انتخاب طول مورد نظر بوده و ابزارها به طور خودکار اقدام به انتخاب می‌کردند. (جدول۲).

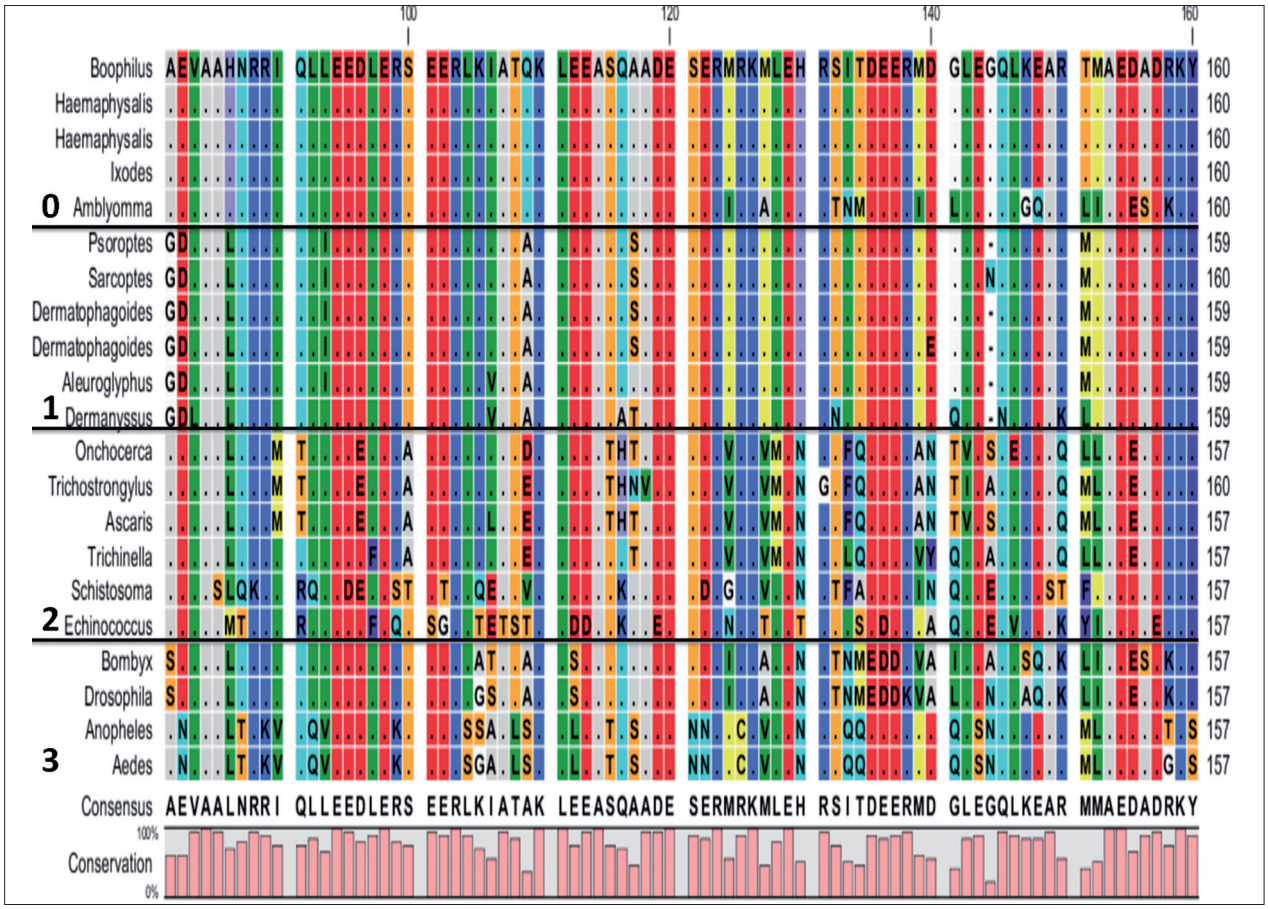
فاکتورهای فیزیکو شیمیایی مرتبط با مکان اپی توپ‌های خطی: پروفایل هیدروپاتی (هیدروفیلیسیتی و هیدروفوبی) یکی از مهمترین فاکتورهای در ارزیابی احتمال وجود مکان اپی توپ‌ها می‌باشد. مناطق با هیدروفیلیسیتی بالا مناطق مستعد از نظر احتمال وجود اپی توپ می‌باشند (تصویر۴-الف و ب، جدول۳).

همچنین یکی دیگر از فاکتورهای مورد نظر در این تحقیق بررسی پروفایل سطح دسترسی به محیط اطراف و انعطاف پذیری اسید آمینه‌ها در نواحی مختلف پروتئین بوده است (تصویر۵-الف و ب، جدول۳).

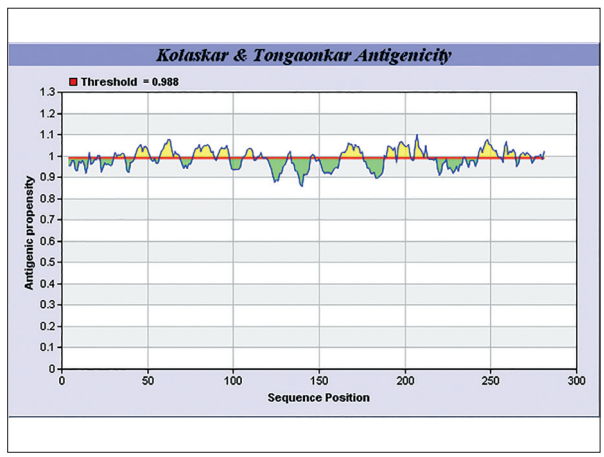
از میان قطعات اپی توپی معرفی شده توسط برنامه NetMHCIIpan version 2.1 متعلق به دانشگاه فنی دانمارک برای آلل های مقاومت به بوافیلوس و آلل های با فراوانی بالا در جمعیت گاوهای هلشتاین ایران، در نهایت ۵ قطعه پپتید با طول ۱۵ اسید آمینه انتخاب گردید. این قطعات واجد بالاترین امتیاز از جهت احتمال عرضه توسط BoLA-DRB3 بوده‌اند. محدوده اتصال قوی پپتیدها در ابزار، با پیش فرض ۵۰/۰۰۰ تعریف شده و امتیاز قابل قبول در این مطالعه برای پپتیدهای با اتصال قوی، ۰/۵۰۰ در نظر گرفته شد. نواحی اطرافی پررنگ تر از ناحیه مرکزی اپی توپ‌ها جهت تمایز دو ناحیه است. سه آلل ۱۰*، ۲۶*، ۴۲ *و همچنین ۲۴*، ۱۶* و ۲۳* قطعه پپتیدی متصل شونده با امتیاز بالا برایشان وجود نداشته است (جدول۴).

بحث

کنه‌ها، انگل های خارجی خونخوار انسان، حیوانات اهلی و وحشی می‌باشند که علاوه بر ایجاد خسارات مستقیم از جمله کاهش وزن، کم خونی، مسمومیت و فلجی، در دام‌های مختلف، قادر به انتقال اجرام

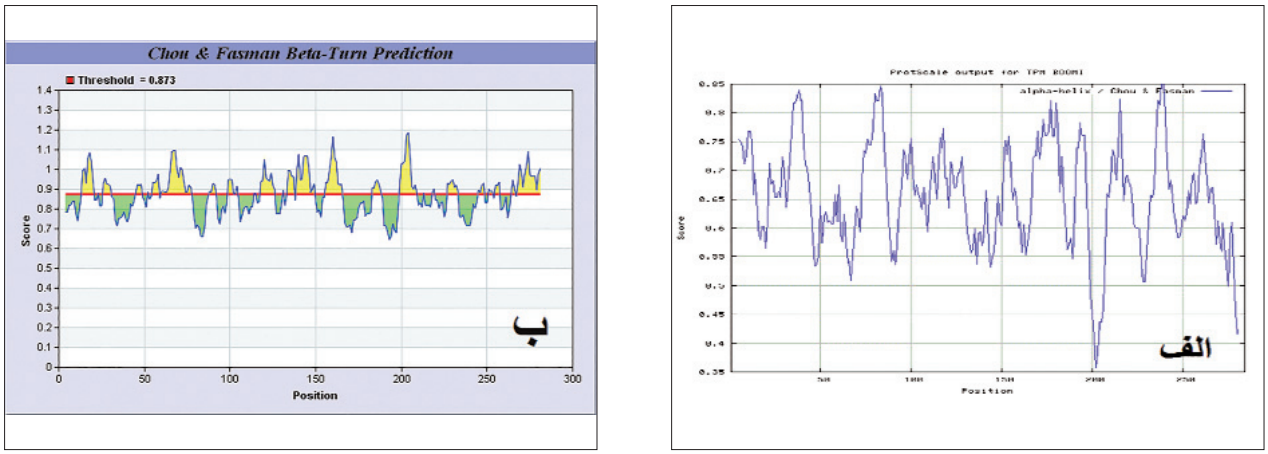


تصویر ۱. نتیجه همردیفی پروتئین ترو پومیوزین. در این تصویر همردیفی بخشی از توالی ترو پومیوزین کنه *Boophilus microplus* در مقایسه با توالی ترو پومیوزین مربوط به سایر کنه‌ها، جرب‌ها، کرم‌ها و برخی حشرات به تصویر کشیده شده است. در پائین تصویر همردیفی، ابتدا توالی مورد توافق (Consensus) و سپس میزان حفاظت شدگی (Conservation) در میان توالی‌ها نشان داده شده است.

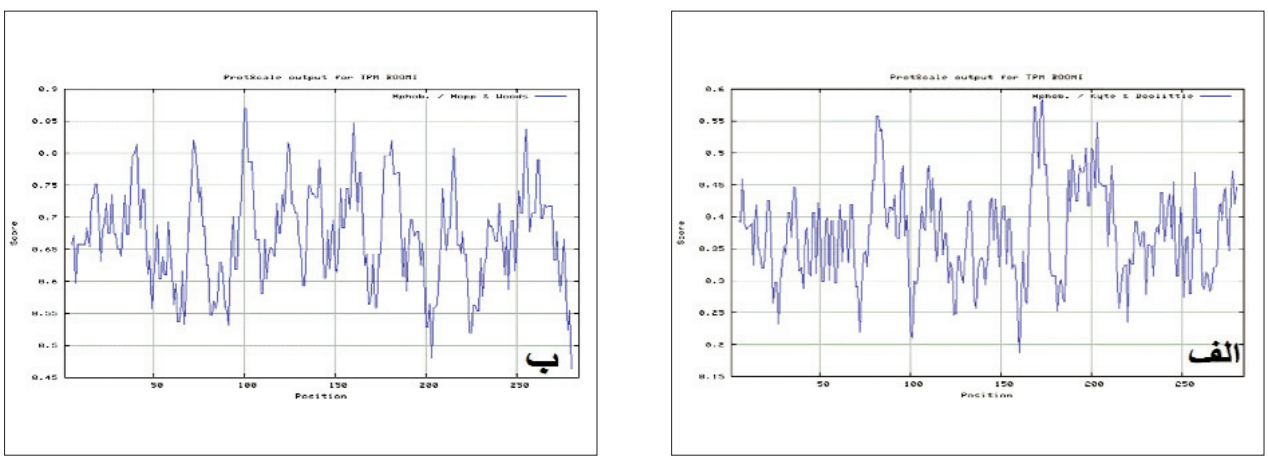


تصویر ۲. منحنی پیشگویی آنتی ژنسیتی پروتئین ترو پومیوزین با الگوریتم Kolaskar-Tongaonkar نقاط با تمایل ذاتی بالای ۱، را می‌توان مناطق آنتی ژنیک در نظر گرفت. حداکثر و حداقل آنتی ژنسیتی ۱/۰۹۸ و ۰/۸۵۸ است. مناطق با آنتی ژنسیتی قابل قبول به طور تقریبی از اسید آمینه شماره ۴۰ تا ۹۵، ۱۶۰ تا ۲۱۵ و ۲۴۰ تا ۲۸۰ می‌باشد.

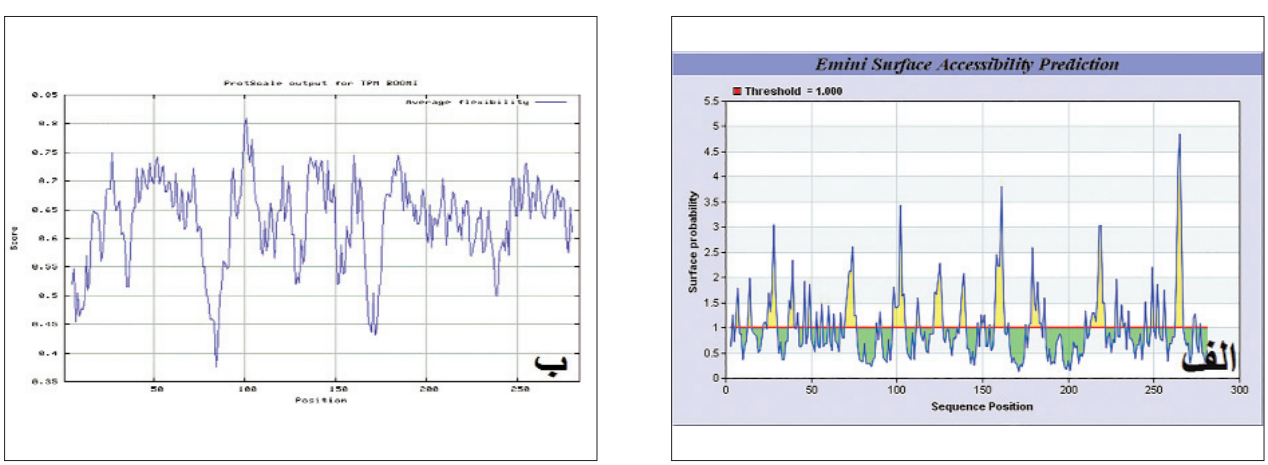
بیماریزای ویروسی، ریکتزیایی و انگلی به موجودات مختلف می‌باشند. امروزه با توجه به نقاط ضعف مصرف مواد شیمیایی، از جمله ایجاد مقاومت و باقیمانده‌های سموم، توجه خاصی به واکسیناسیون دام‌ها علیه کنه‌ها معطوف گردیده است. بی شک تهیه یک واکسن مناسب در گرو انتخاب پروتئین مناسب و کارآمی باشد که بتواند به قدر کافی سیستم ایمنی را علیه آلودگی کنه‌ای تحریک نماید (۳۹). ژنوم کنه بوافیلوس جزء نخستین ژنوم‌های کنه‌ای بوده که توالی یابی شده و با تکنولوژی‌های نوین تهیه واکسن مورد پایش قرار گرفته است (۳). همچنین پروتئین‌های کنه بوافیلوس جهت مصارف مختلف نظیر اهداف ساخت دارو (۱۸) و واکسن مورد توجه تحقیقات بیوانفورماتیک و ایمونوانفورماتیک قرار گرفته‌اند که از آن جمله می‌توان به پروتئین‌های روده‌ای کنه اشاره کرد (۲). Nabian و همکاران در سال ۲۰۱۲ با استفاده از روش‌های الکتروفورزیک و دو بعدی اقدام به شناسایی پروتئین‌های نوزاد کنه بوافیلوس آنولاتوس نمودند. آنها بر اساس روش اسپکترومتری جرمی و بر مبنای داده پردازهای موجود در NCBI و استفاده از نرم افزار Mascot، حضور پروتئین ایمونوژن تروپومیوزین با وزن مولکولی ۳۷kDa را نشان داده و ترادف اسید آمینه‌ای آن را مشخص نمودند (۲۳). با توجه به وجود منابع فراوانی در ارتباط با انتخاب بالقوه این پروتئین به‌عنوان



تصویر ۳ - منحنی پیشگویی فراوانی ساختار ثانویه αhelix و βturn در پروتئین ترو پومیوزین کنه بوافیلوس با استفاده از الگوریتم‌های Chou و Fasman. منحنی الف. حد مورد نظر جهت احتمال ساختار helix ± بودن 0.872 می‌باشد و مناطق بالای این حد ساختار αhelix می‌باشند و سایر مناطق βturn به حساب می‌آیند. اندازه پنجره انتخابی ۹ بوده است. منحنی ب. نواحی بالاتر از میانگین ۰/۸۷۳ را می توان به عنوان نواحی با احتمال زیاد βturn به حساب آورد.



تصویر ۴. منحنی پروفایل هیدروفوبیک و هیدروفیلیک به ترتیب با الگوریتم‌های Keyte و Doolittle(الف) و Hopp و Woods(ب) برای ترو پومیوزین کنه بوافیلوس. پنجره انتخابی ۹ بوده است. منحنی الف. نواحی چاله‌ای نشان دهنده مناطق هیدروفیلیک بوده و نواحی شاخص آنتی ژنیک به حساب می آیند که حدود ۹ ناحیه قابل قبول می‌باشد . منحنی ب .قله‌ها نواحی هیدروفوب بوده و به عنوان مناطق غیر آنتی ژنیک به حساب می آیند که حدود۹ ناحیه قابل قبول است. عموماً نواحی هیدروفیلیک در مجاورت هیدروفیلیک هستند.



تصویر۵. منحنی پیشگویی دسترسی سطحی با استفاده از الگوریتم Emini(الف) و انعطاف پذیری قسمت‌های مختلف پروتئین با الگوریتم Karplus و Schulz(ب). منحنی الف. محدوده مورد قبول که بالاتر از آن به عنوان سطح در دسترس می باشد، ۱ می‌باشد. اندازه پنجره۶ می باشد. منحنی ب. حداکثر و حداقل انعطاف پذیری به ترتیب ۰/۸۱۰ و ۰/۳۷۵ می‌باشد. محدوده قابل قبول برای انعطاف پذیری ۰/۶۵ در نظر گرفته شده است.

انتخاب واکسن در بی مهره گان مختلف (۱،۹،۲۹) و عدم نیاز به توالی کامل پروتئین جهت تحریک کارای سیستم ایمنی، انتخاب اپی توپ‌های مناسب سبب تمرکز و پاسخ بهتر و کارا تر سیستم ایمنی گردیده و از پاسخ‌های آلرژیک و نامطلوب آن می‌کاهد و از سویی دیگر در صورت مطالعات بیشتر، تهیه واکسن مناسب و بی خطری را جهت مقابله با انگل مقدور می‌نماید(۸). لذا در بررسی حاضر با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، اقدام به تجزیه و تحلیل اپی توپ‌های این پروتئین در جهت تهیه واکسنی پپتیدی گردیده است.

نتایج آنالیز توالی، بلاست و همردیفی حاکی از حفاظت شدگی و هومولوژی نسبتاً زیاد پروتئین تروپومیوزین در میان کنه‌ای و جرب‌ها و درمکان بعدی کرم‌ها و حشرات می‌باشد که این امر در مشابهت با مطالعات پیش در مورد این پروتئین می‌باشد (۲۸،۴۲). از سوی دیگر به سبب وجود حفاظت شدگی در گستره وسیعی از کنه‌ها و جرب‌ها، تروپومیوزین را می‌توان به عنوان یک انتخاب آنتی ژنی جهت واکسنی وسیع الطیف همانند پروتئین‌های میوزین و پارامیوزین مطرح کرد (۲۷،۴۲).

پیشگویی اپی توپ‌های خطی را می‌توان به سه دسته پیشگویی بر اساس خصوصیات فیزیکوشیمیایی، مدل مخفی مارکوف و شبکه عصبی مصنوعی تقسیم کرد (۲۱،۳۱،۳۲). در این بین دقت روش‌های هیبرید (چندگانه) بیشتر از روش‌های مبتنی بر یک روش است و نتایج بهتر پیشگویی را می‌توان از آنها انتظار داشت (۴۱). بدین منظور در بررسی حاضر از چندین رهیافت (سرورهای مختلف پیشگویی کننده، خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ساختار پروتئینی) در کنار هم جهت پیشگویی اپی توپ استفاده شده است. چندین روش، بر اساس برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین جهت پیشگویی مکان اپی توپ‌ها نظیر هیدروفیلیسیتی، دسترسی پپتید، نوع ساختار پروتئین، تحرک و انعطاف پذیری، قطبیت و غیره معرفی شده است. الگوریتم‌های متنوع مورد استفاده جهت پیشگویی اپی توپ، از ترکیبی از این خصوصیات استفاده می‌کنند، که در نهایت دقت آنها حدود ۶۰ تا ۸۰٪ است. Kolaskar و Tangaonkar در سال ۱۹۹۰(T.K.)، مقیاسی را ارائه کردند که از ترکیبی از هیدروفوبیسیتی، انعطاف پذیری و دسترسی سطحی پروتئین استفاده می‌کرد و به نام "مقیاس تمایل ذاتی آنتی ژنیک بودن" نامگذاری و به عنوان استاندارد طلایی در پیشگویی اپی اپی توپ معرفی شده که دقت آن حدود ۷۵٪ است (۱۷). شایان ذکر است که سلول لنفوسیت B اپی توپ‌های خطی و فضایی و سلول T تنها اپی توپ‌های خطی را شناسایی می‌کنند (۲۰،۳۷،۳۸). پروتئین تروپومیوزین واجد ساختار دوم پروتئین می‌باشد از این رو مراحل ارزیابی ایمونوانفورماتیکی آن تا اندازه‌ای آسان تر از پروتئین‌های واجد ساختار سوم یا چهارم می‌باشد.

چنانچه مشخص است به‌منظور واکنش آنتی بادی با آنتی ژن می‌بایست آنتی بادی به نواحی به خصوصی از آنتی ژن دسترسی داشته باشد. بیشترین مناطق در دسترس مولکول پروتئین، نواحی هستند که در سطح ساختار پروتئین و در تماس با محیط آبی اطراف خود بوده و عموماً هیدروفیلیک می‌باشند (۷). ارزیابی انعطاف پذیری قطعات پپتیدی نیز به سبب نقش مهم در شکل‌گیری کمپلکس آنتی بادی-آنتی ژن و نیاز به تغییر ساختاری شاخص‌های آنتی ژنیک به منظور حصول به بهترین حالت سودمند می‌باشد(۱۴). نتایج این تحقیق نشان داد که هیدروفیلیسیتی در سه منطقه از پروتئین به طور مطلوب وجود داشته و دسترسی به محیط اطرافی در دامنه‌ای وسیعی از نواحی مختلف پروتئین مشاهده و از سوی دیگر انعطاف پذیری در ساختار پروتیئن نیز در حد کافی دیده می‌شود، که این نتیجه این ارزیابی‌ها در مرحله انتخاب اپی توپ مناسب اعمال شد.

با در نظر گرفتن فاکتورهای مختلف نظیر آنتی ژنسیتی، اپی توپ‌های پیشنهاد شده توسط سرورهای اختصاصی سلول B، فاکتورهای فیزیکوشیمیایی به طور مجزا و ساختار پروتئین در نهایت سه پپتید AA_{62-80} (NH$_2$-EQLSQANSKLEEKDKALQA-COOH) (به سبب حضور در نتایج سرور BepiPred و امتیاز مناسب از نظر T.K.، هیدروفیلیسیتی، انعطاف پذیری، دسترسی و سطح در معرض) و $AA_{170-185}$ (NH2-AMVEADLERAEERAETG-COOH) (به سبب حضور در نتایج سرور BepiPred و ABCpred و امتیاز مناسب از نظر T.K.، هیدروفیلیسیتی، انعطاف پذیری، دسترسی) $AA_{200-218}$ (NH2-VGNNLKSLEVSEEKALQKEET-COOH) (به سبب حضور در نتایج سرور BepiPred و Scratch و امتیاز مناسب از نظر T.K.، هیدروفیلیسیتی، انعطاف پذیری، دسترسی و سطح در معرض) به عنوان اپی توپ‌های واجد خصوصیات بهینه انتخاب شدند. همچنین در کنار تمام این فاکتور سعی شد قطعه پپتید انتخابی جهت موفقیت بیشتر در ایمن سازی تا اندازه‌ای بلند تر در نظر گرفته شود.

پیشگویی اپی توپ‌های متصل شونده به MHC کلاس ۲ و لحاظ کردن آن در سازه واکسنی در کنار اپی توپ‌های سلول B، می‌تواند کمک شایانی به تقویت هر چه بیشتر پاسخ ایمنی هومورال بنماید (۲۵). در ارزیابی اپی توپ‌های قابل عرضه به سلول T، به سبب شباهت‌های قابل مشاهده قطعه پپتیدی اتصالی در آلل‌های مختلف BoLA-DRB3 از پروتئین تروپومیوزین، تکه انتخابی قطعه پپتیدی $AA_{192-207}$ (COOH-NH2-LEEELRVVGNNLKSL) تعیین شد.

در مطالعه حاضر سعی شده از ابزارهای گوناگون و خصوصیات مختلف پروتئین جهت پیشگویی اپی توپ‌ها بهره گرفته شود و حتی المقدور اپی توپ‌های مورد توافق در بیشتر ابزارها به عنوان اپی توب برگزیده انتخاب شوند. گام بعدی جهت پیشبرد این تحقیق می‌تواند طراحی سازه پلی توپی، کنار هم قرار دادن اپی توپ‌ها در ترتیب مناسب، ساخت شیمیایی توالی آنها و در نهایت آزمون in vitro و in vivo سازه مورد نظر جهت ارزیابی میزان کارایی و فعالیت ایمنی زایشان باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و دانشکده دامپزشکی به سبب حمایت‌های مالی و معنویشان در انجام این طرح تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Aki, T., Kodama, T., Fujikawa, A., Miura, K., Shigeta, S., Wada, T., Jyo, T., Murooka, Y., Oka, S., Ono, K. (1995) Immunochemical characterization of recombinant and native tropomyosins as a new allergen from the house dust mite, Dermatophagoides farina. J Allergy Clin Immunol. 96: 74-83.
2. Andreotti, R., Pedroso, M.S., Caetano, A.R., Martins, N.F. (2008) Comparison of predicted binders in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* intestine protein variants Bm86 Campo Grande strain, Bm86 and Bm95. Rev Bras Parasitol Vet.17: 93-8.
3. Bellgard, M.I., Moolhuijzen, P.M., Guerrero, F., Schibeci, D., Rodriguez-Valle, M., Peterson, D.G., Dowd, S.E., Barrero, R., Hunter, A., Miller, R., Lew-Tabor, A. (2012) CattleTickBase: An integrated Internet- based bioinformatics resource for *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. Int J Parasitol. 42: 161-169.
4. Bueno, L.L., Lobo, F.P., Morais, C.G., Moura˜o, L.C., de A´ vila RAM.,Soares, I.S., Fontes, C.J. (2011) Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within plasmodium vivax apical membrane antigen 1 (AMA-1). PLoS ONE. 6: 1-9.
5. Chou, P.Y., Fasman, G.D. (1979) Prediction of β-turns. Biophys J. 26: 367-384.
6. Chu, K.H, Wong, S.H, Leung, P.S.C. (2000) Tropomyosin is the major mollusk allergen: reverse transcriptase polymerase chain reaction, expression and IgE reactivity. Mar Biotechnol. 2: 499-509.
7. Emini, E.A., Hughes, J.V., Perlow, D.S., Boger, J. (1985) Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. J Virol. 55: 836-839.
8. Flower, D.R. (2003) Towards in silico prediction of immunogenic epitopes. Trends Immunol. 24: 667-674.
9. Folkard, S.G., Taylor, M.J., Butcher, G.A., Bianco, A.E. (1997) Protective responses against skin-dwelling microfilariae of *Onchocerca lienalis* in severe combined immunodeficient mice. Int Immunol. 65: 2846-2851.
10. Gomase, V.S., Chitlange, N.R. (2012) Prediction of MHC class antigen peptides from: Application of computer intelligence. Sci Rep. 1: 191.
11. Gross, D.M., Forsthuber T., Tary-Lehmann, M., Etling C., Ito, K., Nagy, Z.A., Field, J.A., Steere, A.C., Huber B. (1998) Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant Lyme arthritis. Science. 281:703-706.
12. Hopp, T.P., Woods, K.R. (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. Proc Natl Acad Sci USA.78: 3824-8.
13. Jenkins, R.E., Taylor, M.J., Gilvary, N.J., Bianco, A.E. (1998) Tropomyosin implicated in host protective responses to microfilariae in onchocerciasis. Proc Natl Acad Sci USA. 95: 7550-7555.
14. Karplus, P.A., Schulz, G.E. (1985) Prediction of chain flexibility in proteins - A tool for the selection of peptide antigens. Naturwissenschafren. 72: 212-213.
15. Kaur, H., Raghava, G.P. (2002) An evaluation of β-turn prediction methods. Bioinformatics. 18: 1508-1514.
16. Kieber-Emmons, T., Luo, P., Qiu, J., Chang, TY., Insung, O., Blaszczyk- Thurin, M., Steplewski, Z. (1999) Vaccination with carbohydrate peptide mimotopes promotes anti-tumor responses. Nat Biotechnol. 17: 660-665.
17. Kolaskar, A.S., Tongaonkar, P.C. (1990) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. FEBS Lett. 276: 172-174.
18. Krasky, A., Rohwer, A., Schroeder, J., Selzer, P.M. (2007) A combined bioinformatics and chemoinformatics approach for the development of new antiparasitic drugs. Genomics. 89: 36-43.
19. Kyte, J., Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol.157: 105-32.

20. Langeveld, J.P., Martinez-Torrecuadrada, J., boshuizen, R.S., Meloen, R.H., Ignacio, C.J. (2001) Characterisation of a protective linear B cell epitope against feline parvoviruses. Vaccine. 19: 2352-2360.
21. Larsen, P., Jens, E., Lund, O., Nielsen, M. (2006) Improved method for predicting linear B-cell epitopes. Immunome Res. 2: 2.
22. Lightowlers, M.W., Gauci C.G., Chow, C., Drew, D.R., Gauci, S.M., Heath, D.D., Jackson, D.C, Dadley-Moore, D.L., Read, A.J. (2003) Review. Molecular and genetic characterisation of the host-protective oncosphere antigens of taeniid cestode parasites. Int J Parasitol. 33: 1207-17.
23. Nabian, S., Taheri, M., Fard, R.M., Aramoon, M. (2013) Identification of Tropomyosin and Its Immunological Properties from Larvae of Cattle Tick, *Boophilus annulatus*. Iran J Parasitol. 8: 242-8.
24. Nardin, E., Calvo-Calle, J., Oliveira, G., Nussenzweig, R., Schneider, M., Tiercy, J., Loutan, L., Hochstrasser, D., Rose, K. (2001) A totally synthetic polyoxime malaria vaccine containing *Plasmodium falciparum* B cell and universal T cell epitopes elicits immune response in volunteers of diverse HLA types. J Immunol. 166: 481-489.
25. Nielsen, M., Lundegaard, C., Justesen, S., Lund, O., Buus, S. (2010) NetMHCIIpan-2.0 - Improved pan-specific HLA-DR predictions using a novel concurrent alignment and weight optimization training procedure. Immun Res. 6: 9.
26. Nikbakht, Gh., Ranjbar, M.M., Ghasemi, F., Asadian, F. (2012) Allelic polymorphism in exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in Iranian Holstein cows. Animal Production Research. (In Persian). 1: 33- 41.
27. Nisbet, A., Huntley, J., Mackellar, A., Sparks, N., McDevitt, R. (2006) A house dust mite allergen homologue from poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer). Parasite Immunol. 28: 401-405.
28. Reese, G., Ayuso, R., Lehre, S.B. (1999) Tropomyosin: An Invertebrate Pan-allergen. Int Arch Allergy Immunol. 119: 247-258.
29. Rosalind, E.J., Taylor, M.J., Gilvary, N.J., Bianco, A.E. (1998) Tropomyosin implicated in host protective responses to microfilariae in onchocerciasis. Proc Natl Acad Sci USA. 95: 7550-7555.
30. Sabhanini, L., Manocha, M., Sridevi, K., Shashikiran, D., Rayanade, R., Rao, D.N. (2003) Developing subunit immunogens using B and T cell epitopes and their constructs derived from F1 antigen of *Yersinia pestis* using novel delivery vehicles. FEMS Immunol Med Microbiol. 1579: 1-15.
31. Saha, S., Raghava, G.P. (2004) BcePred: Prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. ICARIS, Springer. Heidelberg. 409: 197-204.
32. Saha, S., Raghava, G.P. (2006) Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. Proteins. 65: 40-48.
33. Schellekens, G., Visser, H., de Jong, B., van den Hoogen, F., Hazes, J., Breedveld, F., van Venrooij, W. (2000) The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. Arthritis Rheumatol.43:155-163.
34. Seib, KL., Dougan, G., Rappuoli, R. (2009) The key role of genomics in modern vaccine and drug design for emerging infectious diseases. PLoS Genet. 5: 1-8.
35. Stassar, M.J., Raddrizzani, L., Hammer, J., Zöller, M. (2001) T-helper cell-response to MHC class II-binding peptides of the renal cell carcinoma-associated antigen RAGE-1. Immunobiology. 203: 743-55.
36. Sweredoski, M.J., Baldi, P. (2009) COBEpro: a novel system for predicting continuous B-cell epitopes. Protein Eng Des Sel. 22:113-120.
37. Tizard, I.R. (2009) Acquired Immunity: Antigen-Presenting Receptors. Veterinary Immunology. (7^{th} ed.) Saunders Company. Philadelphia, USA.
38. Van Regenmortel, M.H. (1993) Synthetic peptides versus natural antigens in immunoassaya. Ann Biol Clin (Paris). 51: 39-41.
39. Wiladsen, P. (2004) A anti- tick vaccine. Parasitology. 129: 367-387.
40. Woollard, D.J., Gauci, C.G., Heath. D.D., Lightowlers, M.W. (2000) Protection against hydatid disease induced with the EG95 vaccine is associated with

conformational epitopes. Vaccine. 19: 498-507.

41. Yang, X., Yu, X. (2009) An introduction to epitope prediction methods and software. Rev Med Virol. 19: 77-96.
42. Zhang, R., Jise, Q., Zheng, W., Ren, Y., Nong, X., Wu, X., Gu, X., Wang, S., Peng, X., Lai, S., Yang, G. (2012) Characterization and evaluation of a *Sarcoptes scabiei* allergen as a candidate vaccine. Parasit Vectors. 5: 176.
43. Zimic, M., Gutiérrez, A.H., Gilman, R.H., López, C., Quiliano, M., Evangelista, W., Gonzales, A., García, H.H., Sheen, P. (2011) Immunoinformatics prediction of linear epitopes from *Taenia solium* TSOL18. Bioinformation. 6: 271-4.

Immunoinformatic survey of *Boophilus* tick tropomyosin protein

Ranjbar, M.M.[1], Nabian, S.[2*], Taheri, M.[3], Nikbakht, Gh.R.[4], Nikpei, A.[5]

[1]*Department of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran*

[2]*Department of Parasitology and Tick and Tick Born Diseases center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.*

[3]*Rastegar Central Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.*

[4]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran*

[5]*Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technology, Amol-Iran*

(Received 27 August 2014, Accepted 3 November 2014)

Abstract:

BACKGROUND: *Boophilus* tick is responsible for the transmission of some pathogens (types of germs) and the reduction of fertility in Cattles. Tropomyosin protein plays an important role in regulating actin function, immune and allergic reactions and vaccine production. **OBJECTIVES:** Accurate identification of antigenic determinants (epitopes) is difficult, time consuming and not economic, thus we focused on development of rapid methods such as prediction based on sequence and structure of protein. **METHODS:** A wide array of Immunoinformatics softwares and tools were used for the analysis of antigenicity, frequency in protein secondary structure and domains, physic-chemical factors related to region of linear epitopes, B cell epitopes, and binding peptide segments to MHC II alleles in cattle. **RESULTS:** Protein analysis with different algorithms and evaluated accuracy of our result with different profiles of protein results in 3 selected epitopes (AA_{62-80}(NH_2-EQLSQANSKLEEKDKALQA-COOH), $AA_{170-185}$(NH_2-AMVEADLERAEERAETG-COOH) and $AA_{200-218}$ (NH_2-VGNNLKSLEVSEEKALQKEET-COOH)) for B cell and a epitope $AA_{192-207}$(NH_2-LEEELRVVGNNLKSL-COOH) for T cell. **CONCLUSIONS:** For desirable stimulation of immune system, only some segments of protein (epitopes) are enough. Selecting efficient epitopes causes concentration immune responses, preparation suitable vaccine and reduces allergic and adverse responses.

Key words: *Boophilus* tick, epitopes, immunoinformatic, tropomyosin protein

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Frequency results of secondary structure prediction by using of PSIPRED V3.0 and Scratch servers. a Results of PSIPRED server, b Results of Scratch server, (*) Prediction of secondary structure (H=helix, C=coil).

Table 2. Prediction results of B cell epitopes.

Table 3. Predicted epitopes for B cell by using of BcePred server.

Table 4. prediction of binding peptides to BoLA-DRB3 alleles.

Figure 1. Partial alignment results in Tropomysoine protein of *Boophilus microplus* tick compared with ticks, mites, worms and insects.

Figure 2. Antigenicity prediction diagram of Tropomysin protein, using Kolaskar-Tongaonkar algorithm. Regions with Antigenic Propensity scale upper 1, are antigenic regions.

Figure 3. Frequency diagrams of secondary structure prediction of α helix and Coil (β turn) structures in Tropomyosin of Boophilus tick, using Chou & Fasman algorithms.

Figure 4. Hydrophobic and Hydrophilic profile diagrams, using Keyte and Doolittle (A) and Hopp and Woods (B) algorithms for *Boophilus* tick tropomyosin, respectively.

Figure 5. Surface accessibility prediction diagram, using Emini algorithm (A) and Flexibility different regions of protein, using Karplus and Schulz algorithm (B).

***Corresponding author's email: nabian@ut.ac.ir, Tel: 021-61117072, Fax: 021-66933222**