

ارزیابی بیوانفورماتیک و شناسایی نواحی اپی توپی پروتئین F ویروس بیماری نیوکاسل

مریم برخوردار^۱، معصومه باقری^{۲*}، محمدحسین خانی^۳، آزاده زحمت کش^۲

۱- گروه آموزشی سلولی-مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲- موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

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

دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۶

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۳

چکیده

ویروس بیماری نیوکاسل (NDV)، یکی از خطرناکترین عفونت های ویروسی را در بسیاری از پرندگان ایجاد می کند. مرگ و میر بالا و خسارت های اقتصادی بسیار، حاصل آلودگی به این ویروس است که در حال حاضر راه حلی برای آن وجود ندارد. ذخیره طبیعی این ویروس در بین پرندگان و گاهی غیر پرندگانی، مانند حیوانات مزرعه باقی می ماند. در کشورهای مانند ایران، این ویروس به یک وضعیت پایدار رسیده است. همچنین، این ویروس از طریق پرندگان مهاجر منتقل می شود. پروتئین F ویروس نیوکاسل یکی از عوامل مهم در بیماری زایی و تعیین سویه های بیماری زای این ویروس محسوب می شود که دارای نواحی مهمی در تعیین میزان بیماری زایی، تعیین میزان همجوشی ویروس و نکروز بافتی می باشد. در مطالعه حاضر، با بررسی محاسباتی پروتئین F ویروس نیوکاسل، برخی ویژگی های مربوط به پروتئین، مانند ناحیه شکست و نواحی اپی توپی مهم و حفاظت شده در ایمنی زایی پروتئین، گونه های آلوده در منطقه خاورمیانه و ویژگی های فیزیکوشیمیایی پروتئین بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که پروتئین F ویروس نیوکاسل دارای نواحی بسیار محافظت شده می باشد و همچنین همولوژی بالایی بین توالی ها مشاهده می شود. با وجود حضور حداکثری سویه های بیماری زا در ناحیه خاورمیانه، سویه های غیر بیماری زا هم در ذخیره طبیعی این ویروس دیده می شوند. در این پژوهش با بررسی جامعی که انجام شد نواحی مهم در ایمنی زایی و ایجاد اپی توپ ها، شناسایی شدند که می تواند در توسعه واکسن های نو ترکیب علیه این ویروس، استفاده شود.

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

۱-مقدمه

بیماری نیوکاسل توسط سویه‌های بیماری‌زای سروتایپ ۱ پارامیکس‌وویروس ماکیان APMV-1 یا ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) ایجاد می‌شود. این بیماری شیوع جهانی دارد [۲۴ و ۲۷]. عفونت ایجاد شده توسط ویروس بیماری نیوکاسل بسیار خطرناک بوده و با مرگ‌ومیر زیاد در پرندگان همراه است که خسارت اقتصادی بسیاری نیز، ایجاد می‌کند [۱]. این خسارت‌ها شامل کاهش تولید تخم، کاهش وزن، افزایش دوره پرورش و مرگ‌ومیر گله است. این بیماری، زیان‌های قابل توجهی در صنعت طیور مناطق مختلف جهان از جمله در کشور ایران ایجاد کرده است. آلودگی به ویروس نیوکاسل می‌تواند باعث مرگ‌ومیر تا ۱۰۰ درصد پرندگان آلوده به ویروس شود. همچنین، محدودیت در تجارت بین‌المللی محصولات ماکیان و تحریم کشورهای دارای شیوع نیوکاسل یکی از عوامل دیگر آسیب‌زای اقتصادی این بیماری است [۹].

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

قطر ویروس بیماری نیوکاسل حدود ۲۰۰-۳۰۰ نانومتر است که حاوی ژنومی در حدود ۱۵ کیلوباز از جنس RNA تک رشته‌ای است [۶]. پروتئین‌های ماتریس (M)، هم‌اگلوتینین-نورآمیزیداز (HN)، نوکلئوکپسید (NP)، فسفو پروتئین (P) و همجوشی (F) توسط ژنوم این ویروس، کد می‌شوند. لازم به ذکر است که پروتئین F دارای خواص ایمنی‌زایی بالایی است [۱۲، ۱۳، ۲۰].

واکسن‌های رایج بیماری نیوکاسل به دو گروه واکسن فعال (زنده) و واکسن غیرفعال تقسیم می‌شوند. واکسن‌های زنده، واکسن‌های حاوی ویروس‌های زنده‌ی ضعیف شده هستند، از این واکسن‌ها می‌توان به سویه‌های واکسن B1، V4، F، کو ماروف و La Sota اشاره کرد [۴، ۱۱]. واکسن غیرفعال توانایی تکثیر در بدن جاندار را نداشته، اما توانایی تحریک تولید پادتن در جاندار واکسینه شده را دارد [۲۹]. هر ساله برنامه‌های واکسیناسیون زیادی در مزرعه‌های پرورش ماکیان اجرا می‌شود، اما بسیاری از این برنامه‌ها با شکست مواجه می‌شوند. یکی از دلایل این عدم موفقیت، جهش‌های ویروسی است. از آنجایی که این ویروس دارای ژنوم RNA است، مستعد جهش‌های بیشتری است. لذا، عملکرد ضعیف واکسن‌های نیوکاسل به ویژه علیه سویه‌های نوظهور گزارش شده است [۸].

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

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

ساده سازی مقایسه‌ها و کاهش اثر جهش‌های خاموش در بررسی‌های بیوانفورماتیکی به توالی پروتئینی مربوطه تبدیل شدند. ترجمه توالی با رعایت قالب خوانش در سرور <https://web.expasy.org/translate/> [۱۶] انجام شد. همچنین، در ادامه، با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (ورژن ۷) جایگزینی‌های شایع آمینواسیدی که با بیماری‌زایی ویروس در ارتباط است، بررسی شدند.

۳-۲ پیش‌بینی اپی توپ‌های B Cell و آنتی‌ژن‌های حفاظت‌گر

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

۴-۲ پاتوتایپینگ (بررسی پاتوژنیسیته)

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

۵-۲ پیش‌بینی پارامترهای فیزیکوشیمیایی

سرور آنالین ProtParam [۱۵] با آدرس <http://web.expasy.org/protparam/> برای بررسی دقیق پارامترهای فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های F استفاده شد. این پارامترها شامل ترکیب آمینو اسیدها، متوسط هیدروپاتیکی (GRAVY)، شاخص بی‌ثباتی، نقطه ایزوالکتریک محاسباتی، وزن مولکولی نیمه عمر *in vitro* و *in vivo* و شاخص آلفاتیک می‌باشد.

با شناخت نواحی و توالی‌های ضروری این پروتئین انجام شده که پیش‌زمینه‌ی خوبی برای مطالعه این پروتئین در مناطق دیگر را ایجاد می‌کند. یکی از عوامل مهم بیماری‌زایی در ویروس نیوکاسل مرتبط با ناحیه شکست پروتئین F این ویروس است. پیش پروتئین F در سویه‌های بیماری‌زای ویروس توسط پروتئین‌های سلولی به قطعات F1 و F2 شکسته می‌شود. در سویه‌های بدون بیماری‌زایی یا با بیماری‌زایی اندک، این شکست به دلیل چند شکلی ژنی انجام نمی‌شود [۲۶]. هدف این پژوهش بررسی و مقایسه این پلی مورفیسم‌ها در پروتئین‌های F توالی‌یابی شده از سویه‌های جدا شده در منطقه خاورمیانه و بررسی پاتوژنیسیته (بیماری‌زایی) این سویه‌ها بود. بنابراین، در این مطالعه با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی سویه‌های ویروس نیوکاسل منتشر و موجود در منطقه خاورمیانه، بررسی شد. به کمک نتایج این مطالعه می‌توان اطلاعات جامع‌تری در رابطه با سویه‌های در گردش این ویروس در خاورمیانه به‌دست آورد که می‌تواند در کنترل اپیدمیولوژیک بیماری مؤثر واقع شود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ تهیه بانک توالی ژنی

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

۲-۲ همولوژی توالی‌ها و بررسی توالی‌های پروتئینی

بررسی همولوژی توالی‌ها بین جدایه‌های NDV با استفاده از پلتفرم BLAST [۲] از وبسایت NCBI و همچنین نرم افزار BioEdit (ورژن ۷) [۱۳] انجام شد. توالی ژن‌ها برای

جدول ۱ توالی‌های ژنی کشورهای منطقه خاورمیانه بین سال‌های ۲۰۱۰ تا ۲۰۲۰

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

۶-۲ پیش‌بینی اپی توپ‌های B Cell و آنتی‌ژن‌های حفاظت‌گر

در این مطالعه آنتی‌ژن‌های حفاظت‌گر و اپی‌توپ‌های B Cell از توالی‌های بومی ایران و دیگر کشورهای خاورمیانه بررسی شدند. اپی‌توپ‌های B Cell از طریق ابزارهای

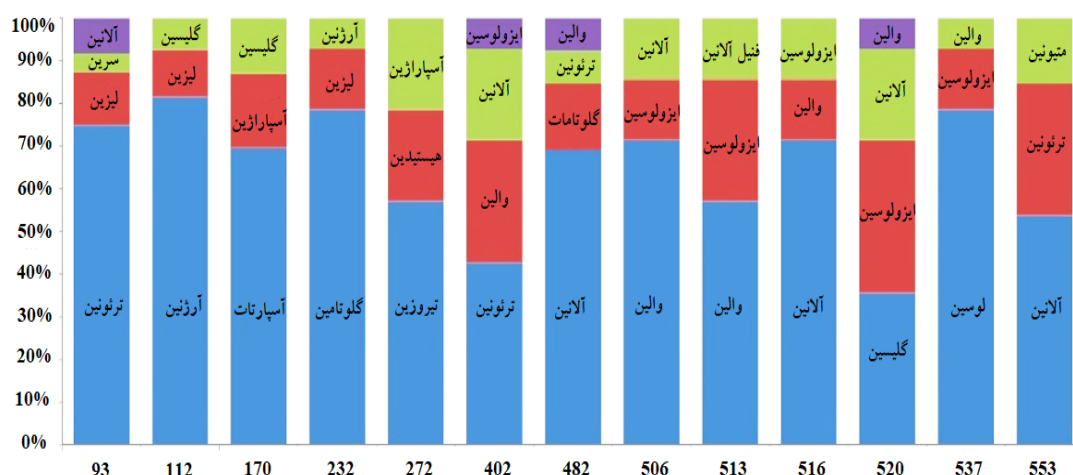
وبسایت IEDB پیش‌بینی شدند [۲۱] و ایمنی‌زایی از طریق وبسایت VaxiJen (ورژن ۲) [۱۰] پیش‌بینی شد.

۳- نتایج و بحث

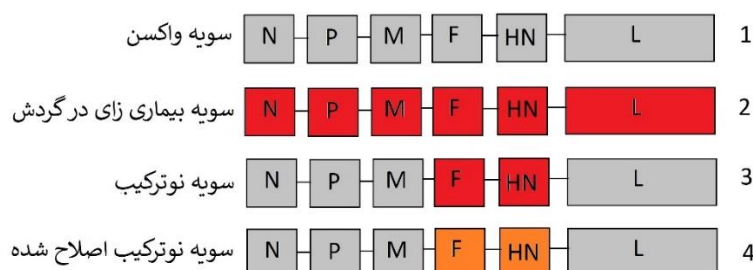
پس از بررسی توالی‌های استخراج شده، مشاهده شد که بیشتر سویه‌های ویروس نیوکاسل از مرغ جدا شده بودند. در توضیحات برخی از این توالی‌ها اشاره شده است که از

موقعیت ۹۳ با چهار آمینواسید متنوع TASN، موقعیت ۱۱۲ با سه آمینواسید RKG، موقعیت ۱۷۰ با سه آمینواسید NDG، موقعیت ۲۳۲ با سه آمینواسید QRK، موقعیت ۲۷۲ با سه آمینواسید YNH و موقعیت ۴۰۲ با چهار آمینواسید TAVI، موقعیت ۴۸۲ با چهار آمینواسید ATEV، موقعیت ۵۰۶ با سه آمینواسید VAI، موقعیت ۵۱۳ با سه آمینواسید VAF، موقعیت ۵۱۶ با سه آمینواسید AVI، موقعیت ۵۲۰ با چهار آمینواسید GAVI، موقعیت ۵۳۷ با سه آمینواسید LIV، موقعیت ۵۵۳ با سه آمینواسید ATM نقاط متغیر را داشتند.

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



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



شکل ۲ مراحل پیشنهادی برای تولید سویه واکسن بومی نو ترکیب

مراحل پیشنهادی برای تولید سویه واکسن بومی نو ترکیب در شکل ۲ نشان داده شده است: (۱) ترتیب و نحوه قرارگیری ژن های سویه واکسن موجود و مورد استفاده، (۲) ترتیب و نحوه قرار گیری ژن های سویه بیماری زای گردش، (۳) نو ترکیب سازی سویه های واکسن و بیماری زای جدید بر اساس مطالعات انجام شده روی توالی های تغییر یافته، و (۴) تغییر در توالی هایی که بیماری زایی و وروس نیوکاسل را القا می کنند، مانند تغییر در ناحیه ۱۱۲ تا ۱۱۷ پروتئین F و تغییر آن به نوع غیر بیماری زا. نوع

بیماری زایی و توالی برش در آمینو اسیدهای ۱۱۲ تا ۱۱۷ در جدول ۲ نشان داده شده است. جدول ۳ ویژگی های فیزیکوشیمیایی پروتئین F و وروس بیماری نیوکاسل را نشان می دهد. پیش بینی اپی توپ سلول های B نشان داد که تقریباً ۱۲ ناحیه اپی توپی برای پروتئین های F وجود دارد. بررسی ویژگی های فیزیکوشیمیایی این پروتئین نشان می دهد که این پروتئین با داشتن ۵۵۳ آمینو اسید و وزن مولکولی حدود ۵۹ کیلو دالتون یک پروتئین با وزن متوسط است که توالی هیدروفوب بالایی دارد.

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

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

جدول ۳ ویژگی های فیزیکوشیمیایی پروتئین F و ویروس بیماری نیوکاسل

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

حضور آمینو اسید لو سین در توالی های هپتاد این پروتئین که در عملکرد همجوشی آن بسیار مهم است، یکی از دلایل هیدروفوب بودن این پروتئین است. این اپی توپ ها شامل اپی توپ های خطی و ساختاری می شوند. خلاصه نواحی اپی توپی این پروتئین که حفاظت شدگی قابل توجهی بین بیشتر سویه ها دارند، در جدول ۴ مشاهده می شود. همچنین، در این بررسی، ناحیه پپتید نشانه به عنوان اپی توپ معرفی شد ولی مورد تایید قرار نگرفت. آمینو اسیدهایی که با رنگ قرمز مشخص شده اند در پپتید حفاظت شده نیستند. موقعیت های مشخص شده با علامت "زیر خط" قرمز رنگ جایگاه هایی را نشان می دهند که امتیاز لازم را جهت حضور در اپی توپ کسب نکرده اند. این نواحی ممکن است به صورت اپی توپ ساختاری حضور داشته باشند.

پروتئین F ویروس بیماری نیوکاسل یکی از دو گلیکوپروتئین سطحی این ویروس است که در ورود ویروس نیوکاسل به سلول میزبان با همجوشی غشای پلاسمایی سلول میزبان و ویروس نقش دارد. پروتئین F یک پیش ساز ۵۵۳ آمینو اسیدی دارد که باید به دو قطعه

که با باند دی سولفیدی به هم متصل هستند، شکسته شود تا پروتئین فعال ایجاد شود [۲۳]. شکست پروتئولیتیک این پروتئین وابسته به پروتئازهای سلول میزبان است که ممکن است در ناحیه شناسایی خود متفاوت باشند. برخی از این پروتئازها توالی های آمینو اسیدی یک بازی و برخی چند بازی را به عنوان سوبسترا شناسایی می کنند [۱۴]. نتایج بررسی ناحیه شکست پروتئولیتیک پیش پروتئین F که میزان بیماری زایی سویه را مشخص می کند، نشان داد که اکثر سویه های بررسی شده ناحیه شکست مرتبط با سویه بیماری زا را دارند. از این میان، دو مورد MH247189.1 و MK253646.1 توالی شکست متفاوتی داشتند که مرتبط با سویه های غیر بیماری زا بود. حضور آمینو اسید فنیل آلانین در موقعیت ۱۱۷ یکی از عوامل احتمالی ایجاد کننده اثرات عصبی در این ویروس است، که با نتایج محمد و همکاران [۲۲] مطابقت داشت. تمام توالی های مورد بررسی به جز دو مورد MH247189.1 و MK253646.1 دارای این آمینو اسید در موقعیت ۱۱۷ هستند. شکست پروتئولیتیک پروتئین پیش ساز F به میزانی در بیماری زایی ویروس نیوکاسل اهمیت دارد که

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

در چند مطالعه [۱۷، ۱۸] حضور آمینواسیدهای بازی در ناحیه شکست پروتئین یکی از عوامل مهم در بیماری‌زایی سویه ویروس نیوکاسل معرفی شده است. در مطالعات تکمیلی نشان داده شده است که حضور دو جفت آمینوا سید بازی که توسط یک گلوتامین از هم جدا شده اند، در فعال‌سازی پروتئین‌های سلولی بسیار مؤثر عمل می‌کنند تا جایی که جایگزینی هر یک از این آمینواسیدها می‌تواند عملکرد پروتئین‌ها را مختل کند. نتایج این پژوهش کاملاً با نتایج پژوهش‌های پیشین همسو بوده و

در این پژوهش تمام توالی‌های RRQKRF و KRQKRF الگوی جفت آمینواسید بازی را نشان دادند که در طبقه بندی ویروس‌های بیماری‌زا قرار گرفتند. لازم به ذکر است که در این پژوهش الگوی RRQRRF مشاهده نشد. الگوی RRQRRF در کشورهایی مانند سوئیس، سوئد، آلمان و روسیه در سال‌های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۱ مشاهده شده است [۲۸]. علاوه بر این، فشار تکاملی و نیاز به حفاظت شدگی توالی برش در بیماری‌زایی ویروس نیوکاسل باعث شده است که تغییرات آمینواسیدی از یک آمینواسید بازی (لایزین) به یک آمینواسید بازی دیگر (آرژنین) انجام شود. همچنین، پس از هر اپیدمی ویروس نیوکاسل یا دیگر ویروس‌ها، مطالعات بسیاری در رابطه با سویه عامل اپیدمی منتشر می‌شود. در این مطالعات ویژگی‌های ویروس نیوکاسل مربوطه با دقت بسیار شرح داده شده و تمام عوامل شناخته شده در رابطه با بیماری‌زایی سویه نوظهور بررسی می‌شود.

جدول ۴ نواحی اپی‌توپی حفاظت شده ی پروتئین F

شماره	موقعیت در پروتئین	پپتید
۱	۳۵-۳۰	SSLDGR
۲	۸۶-۶۹	MPRDKEACAKAPLEAYNR
۳	۱۱۴-۱۰۳	QGSVSTSGGRRQ
۴	۱۹۷-۱۸۷	NDQ_NNT_EL_CIK
۵	۲۲۳-۲۲۲	GPQITSPALTQL
۶	۲۶۰-۲۵۱	TKLGIGNQL
۷	۳۴۰-۳۲۸	SVIEELDTSYCIE
۸	۳۵۷-۳۴۸	TRIVTFPMSP
۹	۳۸۰-۳۶۷	TSAC_YSKTEGALT
۱۰	۴۱۳-۴۰۷	IISQNYG
۱۱	۴۶۴-۴۴۱	DATYQKNISILDSQVIVTGNLDIS
۱۲	۵۴۹-۵۳۰	KAQKTLIGLGNTLDQMRA

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

ارزیابی بیوانفورماتیک توالی‌های اپی‌توپی برای تهیه واکسن‌های نو ترکیب و ساب یونیت اهمیت زیادی دارد. در یک مطالعه‌ی *in silico* با ارزیابی ایمونوآنفورماتیک اپی‌توپ‌های ایمونوژن و حفاظت شده‌ی گلیکوپروتئین‌های F و HN ویروس نیوکاسل ارزیابی شدند و برای تهیه‌ی واکسن نیوکاسل ساب یونیت خوراکی بررسی شدند. نتایج مطالعات ساختاری و عملکردی مناسب بودن این واکسن را برای تجویز خوراکی در مرغ‌ها نشان داد [۳۱]. در مطالعه‌ی حاضر، نواحی اپی‌توپی حفاظت شده B-cell در پروتئین F در سویه‌های در گردش ویروس نیوکاسل تعیین شده و همچنین ناحیه شکست پروتئولیتیک این پروتئین هم در سویه‌های موردنظر بررسی شده است. اطلاعات به دست آمده می‌تواند برای تهیه واکسن *in silico* استفاده شود.

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

۴- نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تفاوت بین توالی‌های مشاهده شده در کشورهای از منطقه خاورمیانه که فاصله جغرافیایی کم و ارتباط بیشتری دارند، احتمال فرضیه گسترش اختصاصی جغرافیایی ویروس نیوکاسل را

افزایش می‌دهد. همچنین، از آنجا که نیمه انتهایی کربوکسیلی پروتئین F بررسی شده در سویه‌های جدا شده در منطقه خاورمیانه، در بررسی‌های بیوانفورماتیکی، امتیاز بالایی از لحاظ اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده کسب کرد، برای تهیه واکسن‌های نو ترکیب و کیت‌های تشخیصی ویروس نیوکاسل توصیه می‌شود.

۵- منابع

- [1] Alexander, D.J., Aldous, E.W., and Fuller, C.M. (2012) The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathol.* 41(4), 329-35.
- [2] Altschul, S.F., Gish, W. Miller, W. Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3), 403-10.
- [3] Ansori, A.N., and Kharisma, V.D. (2020) Characterization of Newcastle disease virus in Southeast Asia and East Asia: Fusion protein gene. *EKSAKTA: J. Sci. Data Anal.* 20(1), 14-20.
- [4] Ayala, A.J., Dimitrov, K.M., Becker, C.R., Goraichuk, I.V., Arns, C.W., Bolotin, V.I., Ferreira, H.L., Gerilovych, A.P., Goujgoulova, G.V., Martini, M.C., and Muzyka, D.V. (2016) Presence of vaccine-derived Newcastle disease viruses in wild birds. *PloS one* 11(9), e0162484.
- [5] Brown, V.R., and Bevins, S.N. (2017) A review of virulent Newcastle disease viruses in the United States and the role of wild birds in viral persistence and spread. *Vet. Res.* 48(1), 1-5.
- [6] de Leeuw, O., and Peeters, B. (1999) Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J. Gen. Virol.* 80(1), 131-6.
- [7] Dimitrov, K.M., Ferreira, H.L., Pantin-Jackwood, M.J., Taylor, T.L., Goraichuk, I.V., Crossley, B.M., Killian, M.L., Bergeson, N.H., Torchetti, M.K., Afonso, C.L., and Suarez, D.L. (2019) Pathogenicity and transmission of virulent Newcastle disease virus from the 2018–2019 California outbreak and related viruses in young and adult chickens. *Virology* 531, 203-18.
- [8] Dimitrov, K.M., Afonso, C.L., Yu, Q., and Miller, P.J. 2017. Newcastle disease vaccines—

- Newcastle disease virus. *Arch. Virol.* 150(3), 611-8.
- [19] Kim, S.H., Wanasen, N., Paldurai, A., Xiao, S., Collins, P.L., and Samal, S.K. (2013.) Newcastle disease virus fusion protein is the major contributor to protective immunity of genotype-matched vaccine. *PloS one* 8(8), e74022.
- [20] Kim, L.M., Suarez, D.L., and Afonso, C.L. (2008) Detection of a broad range of class I and II Newcastle disease viruses using a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20(4), 414-25.
- [21] Larsen, J.E., Lund, O., and Nielsen, M. 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res.* 2(1): 1-7.
- [22] Mohamed, M.H., Kumar, S., Paldurai, A., and Samal, S.K. (2011) Sequence analysis of fusion protein gene of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in Egypt during 2006. *Virol. J.* 8(1), 1-4.
- [23] Morrison, T.G. (2003) Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 1614(1), 73-84.
- [24] Pedersen, J.C., Senne, D.A., Woolcock, P.R., Kinde, H., King, D.J., Wise, M.G., Panigrahy, B., and Seal, B.S. (2004) Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America. *J. Clin. Microbiol* 42(5), 2329-34.
- [25] Snoeck, C.J., Adeyanju, A.T., Owoade, A.A., Couacy-Hymann, E., Alkali, B.R., Ottosson, U., Muller, C.P. (2013) Genetic diversity of Newcastle disease virus in wild birds and pigeons in West Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(24), 7867-74.
- [26] Swanson, K., Wen, X., Leser, G.P., Paterson, R.G., Lamb, R.A., and Jardetzky, T.S. (2010) Structure of the Newcastle disease virus F protein in the post-fusion conformation. *Virology* 402(2), 372-9.
- [27] Toyoda, T., Sakaguchi, T., Imai, K., Inocencio, N.M., Gotoh, B., Hamaguchi, M., and Nagai, Y. (1987) Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus. *Virology* 158(1), 242-7.
- A solved problem or a continuous challenge? *Vet. Microbiol.* 206: 126-36.
- [9] Dortmans, J.C., Koch, G., Rottier, P.J., and Peeters, B.P. (2011) Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? *Vet. Res.* 42(1), 122.
- [10] Doytchinova, I.A., and Flower, D.R. (2007) VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumor antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinform.* 8(1), 4.
- [11] Elamin, M.G., Khalafalla, A.I., and Ahmed, S.M. (1993) Observations on the use of Komarov strain of Newcastle disease vaccine in the Sudan. *Trop. Anim. Health Prod.* 25(3), 151-4.
- [12] Errington, W., and Emmerson, P.T. (1997) Assembly of recombinant Newcastle disease virus nucleocapsid protein into nucleocapsid-like structures is inhibited by the phosphoprotein. *J. Gen. Virol.* 78(9), 2335-9.
- [13] Hall, T.A., (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic Acids Symposium Series* 41. PP 95-98.
- [14] Heiden, S., Grund, C., Röder, A., Granzow, H., Kühnel, D., and Mettenleiter, T.C. 2014. Römer-Oberdörfer A. Different regions of the newcastle disease virus fusion protein modulate pathogenicity. *PLoS One* 9(12), e113344.
- [15] Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M.R., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. PP 571-607. In: J.M. Walker (ed) *The Proteomics Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press.
- [16] Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31(13), 3784-3788.
- [17] Glickman, R.L., Syddall, R.J., Iorio, R.M., Sheehan, J.P., and Bratt, M.A.. (1988) Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *J. Virol* 62(1), 354-6.
- [18] Jahanshiri, F., Eshaghi, M., and Yusoff, K. (2005) Identification of phosphoprotein: phosphoprotein and phosphoprotein: nucleocapsid protein interaction domains of the

Newcastle disease virus from swine in china. *Virol. J.* 9(1), 129.

[31] Mozafari, A., Amani, J., Shahsavandi, S., Hatef Salmanian, A. (2022) A Novel Multi-Epitope Edible Vaccine Candidate for Newcastle Disease Virus: In Silico Approach. *Iran J Biotechnol.* 20(2):e3119.

[32] Hu, S., Wang, T., Liu, Y., Meng, C., Wang, X., Wu, Y., Liu, X. (2010) Identification of a variable epitope on the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein, *Vet. Microbiol.* 140(1), 92-97.

[28] Wang, J.Y., Liu, W.H., Ren, J.J., Tang, P., Wu, N., Wu, H.Y., Ching, C.D., and Liu, H.J. (2015) Characterization of emerging Newcastle disease virus isolates in China. *Virol. J.* 12(1), 1-21.

[29] Winterfield, R.W., Dhillon, A.S., and Alby, L.J. (1980) Vaccination of chickens against Newcastle disease with live and inactivated Newcastle disease virus. *Poult. Sci.* 59(2), 240-6.

[30] Yuan, X., Wang, Y., Yang, J., Xu, H., Zhang, Y., Qin, Z., Ai, H., and Wang, J. (2012) Genetic and biological characterizations of a

Bioinformatic Analysis and Identification of Epitopic Regions of Newcastle Disease Virus F Protein

Maryam Barkhordari¹, Masoumeh Bagheri^{2*}, Mohammad-Hosein Khani³, Azadeh Zahmatkesh²

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

m.bagheri@rvsri.ac.ir

Receipt: 2023/04/15

Accepted: 2024/08/24

Abstract

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

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