



Original Article

Modeling and Computational Design of a Bivalent Epitope-Based Immunogenic Vaccine Targeting Major Human Genital Mycoplasmas Using Bioinformatics Tools

Malihe Akbarzadeh Niaki^{1*}, PhD^{ORCID}

¹Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

Article Information

Article History:

Received: May 18, 2025

Accepted: September 15, 2025

*Corresponding Author:

Malihe Akbarzadeh Niaki, PhD;
Department of Microbial
Biotechnology, Faculty of
Biotechnology, Amol University of
Special Modern Technologies,
Amol, Iran
Email: malihe.akbarzade@gmail.com

Abstract

Introduction: Mycoplasma genitalium and Mycoplasma hominis are among the major pathogens of the human urogenital tract that play a significant role in infertility. This study aimed to design a bivalent vaccine containing epitopes derived from both pathogens and to evaluate its physicochemical properties and potential to stimulate host immune cells.

Methods: Using several bioinformatics tools, cell-surface proteins of both pathogens were selected, and their corresponding B-cell and T-cell epitopes were predicted. Specific, non-toxic, non-allergenic, and highly antigenic epitopes were identified and chosen for vaccine construction. The peptide linkers AAY, GPGPG, and KK were used to connect the selected epitopes, and the EAAK linker was used to attach the immunogenic β -defensin adjuvant to the final vaccine construct. Then, the structural characteristics of the designed vaccine, including secondary and tertiary structures, polarity, solubility, and molecular docking with host immune system receptors, were evaluated.

Results: Analysis of the secondary structure of the designed vaccine revealed favorable proportions of random coils, extended strands, and α -helices, indicating good stability and epitope-forming potential. Furthermore, evaluation of the three-dimensional structure confirmed the desirable polarity and solubility of the vaccine protein. Additionally, molecular docking results demonstrated the high potential of this vaccine to interact with host immune cell receptors.

Conclusion: The bivalent multi-epitope vaccine designed in this study exhibited favorable stability and a high potential to stimulate an immune response, suggesting its applicability in the development of targeted vaccines against these pathogens.

Keywords: Computational Biolog; Epitopes; Vaccines; Mycoplasma genitalium; Mycoplasma hominis

Please cite this article as:

Akbarzadeh Niaki M. Modeling and Computational Design of a Bivalent Epitope-Based Immunogenic Vaccine Targeting Major Human Genital Mycoplasmas Using Bioinformatics Tools. Sadra Med. Sci. J. 2026; 14(2): 290-300. doi: 10.30476/smsj.2026.107055.1638.



مجله علوم پزشکی صدرا

<https://smsj.sums.ac.ir/>



مقاله پژوهشی

مدل سازی و طراحی واکسن دوگانه ایمن زای مبتنی بر اپی توپ علیه مایکوپلاسماهای مهم دستگاه تناسلی انسان با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک

ملیحه اکبرزاده نیاکی^{۱*}

^۱گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۲۴

نویسنده مسئول:

ملیحه اکبرزاده نیاکی،
گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری،
دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران
پست الکترونیکی: malihe.akbarzade@gmail.com

مقدمه: باکتری های مایکوپلازما ژنی تالیوم^۱ و مایکوپلازما هومینیس^۲ از جمله پاتوژن های مهم دستگاه تناسلی انسان هستند که نقش مهمی در ایجاد ناباروری ایفا می کنند. هدف از انجام این پژوهش، طراحی یک واکسن دوگانه شامل اپی توپ های هر دو پاتوژن فوق و ارزیابی خواص فیزیکی شیمیایی و پتانسیل واکسن در تهیه سیستم سلول های ایمنی میزبان بود.

مواد و روش ها: با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک متعددی، پس از انتخاب پروتئین های سطح سلولی دو باکتری، اپی توپ های سلول های B و T مربوط به هر پروتئین تخمین زده شد. سپس اپی توپ های اختصاصی، غیر سمی، غیر آلرژن و با خاصیت آنتی ژنی بالا شناسایی و جهت ساخت واکسن انتخاب شدند. لینکرهای پپتیدی EAAK، AAY، GPGPG و KK جهت اتصال اپی توپ های منتخب و لینکر پپتیدی EAAK جهت اضافه نمودن ادجوانت ایمنی زای بتادفنسین به ساختار نهایی واکسن مورد استفاده قرار گرفت. سپس ویژگی های ساختاری واکسن طراحی شده، از جمله ساختار دوم و سوم، قطبیت، حلالیت و داکینگ مولکولی با گیرنده های سیستم ایمنی میزبان ارزیابی شد.

یافته ها: بر اساس داده های حاصل از تحلیل ساختار دوم واکسن طراحی شده، درصد حضور پیچ، صفحات و مارپیچ آلفا حاکی از پایداری و پتانسیل مناسب پروتئین در تشکیل اپی توپ بود و همچنین بررسی ساختار سه بعدی آن، قطبیت و حلالیت مطلوب پروتئین واکسن را تأیید نمود، همچنین نتایج حاصل از انجام داکینگ مولکولی، قابلیت بالای این واکسن را در برهم کنش با گیرنده های سلول های سیستم ایمنی میزبان نشان داد.

نتیجه گیری: واکسن دوگانه چند اپی توپی طراحی شده در این مطالعه، پایداری مطلوب و پتانسیل بالایی در تحریک پاسخ سیستم ایمنی میزبان دارد و می تواند جهت توسعه واکسن های هدفمند علیه این پاتوژن ها مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: بیوانفورماتیک؛ اپی توپ ها؛ واکسن ها؛ مایکوپلازما ژنی تالیوم؛ مایکوپلازما هومینیس

1. Mycoplasma genitalium
2. Mycoplasma hominis

لطفاً این مقاله را به این صورت استناد کنید:

اکبرزاده نیاکی م. مدل سازی و طراحی واکسن دوگانه ایمن زای مبتنی بر اپی توپ علیه مایکوپلاسماهای مهم دستگاه تناسلی انسان با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک. مجله علوم پزشکی صدرا، دوره ۱۴، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۵، ۲۹۰-۳۰۰.

منجر به کاهش شیوع بیماری‌های مقاربتی و عوارض ناشی از آن‌ها گردند، با کاهش شیوع عفونت‌های دستگاه تناسلی، خطر ابتلا به بیماری‌های التهابی لگن، ناباروری و عوارض بارداری را کاهش دهند و همچنین، با جلوگیری از ابتلا به عفونت‌های اولیه، بار درمان‌های آنتی‌بیوتیکی را کم و در نتیجه به کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی کمک کنند. از سوی دیگر، مطالعات نشان داده‌اند که واکسن‌های پیشگیرانه می‌توانند به‌طور مؤثری از عوارض جدی و مهمی مانند ناباروری جلوگیری کنند. بنابراین، توسعه واکسن‌هایی که بتوانند *M. genitalium* و *M. hominis* را هدف قرار دهند، یکی از اولویت‌های مهم در علم میکروبیولوژی پزشکی^۵ و بیوتکنولوژی میکروبی^۶ است. از این‌رو، تحقیقاتی که روی شناسایی نقاط هدف واکسن و طراحی روش‌های نوین برای پیشگیری از این عفونت‌ها تمرکز دارند، برای بهبود وضعیت سلامت جامعه و کاهش هزینه‌های درمانی ضروری هستند (۶-۸).

در سال‌های اخیر، تلفیق فناوری‌های محاسباتی با داده‌های حاصل از مطالعات تجربی، منجر به پیشرفت‌های قابل توجهی در حوزه زیست پزشکی شده و مسیر درک بهتر سازوکارهای زیستی را هموار ساخته است. ابزارهای محاسباتی، امکان انجام شبیه‌سازی‌های پیشرفته و تحلیل‌های درون رایانه‌ای^۷ را فراهم نموده است که در کشف داروهای هدفمند، طراحی واکسن‌های کارآمدتر با کاهش قابل توجه عوارض جانبی و پیش‌بینی ساختارهای پروتئینی نقش اساسی دارند (۹).

در این میان، واکسن‌های مبتنی بر اپی‌توپ^۸ به‌ویژه در زمینه مقابله با عفونت‌های مایکوپلازما^۹ مانند *M. genitalium* و *M. hominis* اهمیت زیادی دارند. اپی‌توپ‌ها بخش‌های خاصی از آنتی‌ژن‌های میکروارگانیسم‌ها^{۱۰} هستند که توسط آنتی‌بادی‌ها و گیرنده‌های سلول‌های B و T سیستم ایمنی بدن میزبان شناسایی شده و منجر به تولید پاسخ ایمنی می‌گردند. (۱۰).

در این مطالعه، با استفاده از تحلیل بیوانفورماتیک^{۱۱} پروتئین‌های سطحی *M. genitalium* و *M. hominis*، اپی‌توپ‌های ایمن‌زای منتخب انتخاب شد و یک واکسن چند اپی‌توپی طراحی گردید. کارایی ایمن‌زایی

باکتری‌های *M. genitalium* (M.) و *M. hominis* (M.) که به‌طور عمده در دستگاه تناسلی انسان یافت می‌شوند، به جنس مایکوپلازما تعلق دارند و هر کدام به نوعی مسئول عفونت‌های ادراری-تناسلی و بیماری‌های مرتبط با آن هستند. این باکتری‌ها به دلیل ساختار خاص خود که فاقد دیواره سلولی است، از دیگر باکتری‌ها متمایز می‌شوند. ژنوم این باکتری‌ها که در *M. genitalium* حاوی ۵۸۰ کیلو باز و در *M. hominis* با ۷۰۰ کیلو باز است، شامل تعداد محدودی ژن است که اکثر آن‌ها مربوط به پروتئین‌های سطحی و آنزیم‌های ضروری برای فعالیت‌های متابولیکی پایه‌ای هستند، مانند پروتئین‌های چسبنده‌ای که نقش مهمی در اتصال به سلول‌های میزبان و شروع فرآیندهای بیماری‌زایی و ایجاد عفونت‌های تناسلی و نوزادی ایفا می‌کنند (۱، ۲). عفونت ناشی از این باکتری‌ها معمولاً با علائم خفیف یا حتی بدون علامت شروع می‌شود و این ویژگی می‌تواند باعث عدم تشخیص زودهنگام و درمان به‌موقع و در نتیجه عواقب جدی‌تری همچون ناباروری در مردان و زنان، مشکلات بارداری، التهاب بافت رحم، عفونت خونی در جنین و عفونت داخل رحمی گردد که یک تهدید جدی برای سلامت مادر و نوزاد به شمار می‌رود (۳). از سوی دیگر، این باکتری‌ها به دلیل عدم حضور دیواره سلولی در ساختار خود، در برابر بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند. همچنین، مطالعات نشان داده است که مقاومت این پاتوژن‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولید^۱ مانند آزیترومایسین^۲ و فلوروکینولون‌ها^۳ که به‌طور رایج برای درمان عفونت‌های مایکوپلازمایی^۴ استفاده می‌شوند نیز رو به افزایش است. این مسئله، موجب پیچیدگی‌های روند درمان، افزایش خطر شیوع عفونت در جامعه و نیاز به روشی جایگزین جهت کنترل و حذف عفونت ناشی از این باکتری‌ها می‌گردد (۴، ۵).

یکی از استراتژی‌های اصلی پیشگیری از عفونت‌های ناشی از *M. genitalium* و *M. hominis* و کاهش عواقب ناشی از وجود آن‌ها، توسعه واکسن‌های کارا و دقیق برای پیشگیری از بروز آن‌ها است. واکسن‌ها می‌توانند علاوه بر پیشگیری از ابتلا به این پاتوژن‌ها،

1. Macrolide antibiotics
2. Azithromycin
3. Fluoroquinolones
4. Mycoplasma infections

5. Medical Microbiology
6. Microbial biotechnology
7. in silico
8. Epitope
9. Mycoplasma infections
10. Antigens of microorganisms
11. Bioinformatics analysis

این واکسن به صورت درون رایانه‌ای ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

استخراج و تحلیل توالی‌های پروتئینی جهت تعیین کاندیدای مناسب اپی‌توپ

ابتدا توالی ژنوم دو باکتری *M. genitalium* و *M. hominis* از پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی^{۱۲} (NCBI) با فرمت FASTA استخراج شد و بعد با استفاده از سرور ORFfinder تمامی قاب‌های بازخوانی^{۱۳} (ORFs) موجود در توالی ژنوم استخراج شده، تعیین گردید. با توجه به اینکه از میان ORFs حاصل، تنها ORFs مربوط به پروتئین‌های خارج سلولی در معرض سیستم ایمنی میزبان هستند، با استفاده از نرم‌افزار پیش‌بینی موقعیت پروتئین (Psort) موقعیت سلولی هر یک از پروتئین‌های حاصل از ORFs تعیین شده تخمین زده شد و صرفاً ORFs مربوط به پروتئین‌های موجود در بخش‌های سطحی سلول انتخاب گردید (۱۱). جهت بررسی اختصاصی بودن پروتئین‌های حاصل برای دو باکتری *M. genitalium* و *M. hominis* بر توالی همه ORFs هم‌ترازی^{۱۴} (blast) انجام شد و ORFs حاوی همولوژی با پروتئین‌های میزبان (انسان) حذف گردید، سپس با کمک سرور VaxiJen، با در نظر گرفتن مدل «bacterial» و مقدار آستانه ۰/۸، همه پروتئین‌ها از نظر خاصیت ایمن‌زایی آنالیز شد و پروتئین‌هایی با امتیاز بالاتر جهت انجام مراحل بعدی انتخاب شدند (۱۲).

پیشگویی اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T

به منظور القای پاسخ ایمنی هومورال و سلولی^{۱۵}، اپی‌توپ‌های سلول‌های B، سلول‌های T سیتوتوکسیک^{۱۶} و سلول‌های T کمکی شناسایی شد که همگی در طراحی واکسن مورد استفاده قرار گرفتند. در این راستا، اپی‌توپ‌های خطی و فضایی سلول‌های B و اپی‌توپ‌های سلول‌های T مربوط به مجموعه اصلی سازگاری با بافت^{۱۷} (MHC) کلاس یک و دو از هر یک از پروتئین‌های حاصل با استفاده از سرور پایگاه داده اپی‌توپ‌های ایمنی^{۱۸} (IEDB) تخمین زده شد. جهت پیش‌بینی اپی‌توپ‌های

12. National Center for Biotechnology Information (NCBI)
13. Open Reading Frame
14. Basic Local Alignment Search Tool
15. Humoral and cellular immune response
16. Cytotoxic
17. Major Histocompatibility Complex
18. The Immune Epitope Database

خطی سلول‌های B، از ابزار BepiPred-۲،۰ با مقدار آستانه ۰/۵ و جهت پیش‌بینی اپی‌توپ‌های فضایی و ساختاری، از ابزار ElliPro با شاخص برآمدگی^{۱۹} ۰/۵ استفاده شد. همچنین اپی‌توپ‌های سلول‌های T مربوط به MHC کلاس یک و دو به ترتیب توسط ابزارهای NetMHCpan 4.1 و NetMHCpan 4.1 EL پیش‌بینی شدند (۱۳). در این دو ابزار، به ترتیب اسید آمینه‌هایی با مقدار آستانه^{۲۰} زیر ۰/۵ و ۲ درصد به عنوان اتصال‌دهنده‌های قوی و اپی‌توپ‌های نهایی در نظر گرفته می‌شوند.

ارزیابی و انتخاب اپی‌توپ‌های مناسب و طراحی سازه واکسن چند اپی‌توپی

با استفاده از سرورهای اختصاصی، اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده از نظر فاکتورهای ایمن‌زایی با نرم‌افزار VaxiJen، آلرژن بودن با نرم‌افزار AllerTOP و سمیت با نرم‌افزار ToxinPred، تجزیه و تحلیل شدند. در استفاده از ابزارهای AllerTop که بر پایه الگوریتم (k-NN) k-nearest neighbor و ToxinPred که با الگوریتم support vector machine (SVM) عمل می‌کنند، پارامترهای پیش‌فرض حفظ گردید. سپس، مناسب‌ترین اپی‌توپ‌ها برای ساخت پروتئین چند اپی‌توپی نهایی انتخاب شد و با استفاده از لینکرهای AAY، GPGPG و KK به یکدیگر متصل شدند. به منظور تقویت خاصیت ایمن‌زایی، توالی پپتید بتادفنسین^{۲۱} (Accession number: NP_999607.1) به عنوان ادجوانت^{۲۲} از طریق لینکر انعطاف‌پذیر^{۲۳} EAAK به سازه چند اپی‌توپی متصل شد.

تعیین ساختار دوم واکسن چند اپی‌توپی

با استفاده از نرم‌افزار آنالین SOPMA^{۲۴} پروتئین چند اپی‌توپی حاصل از نظر ساختار دوبعدی مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی آمینواسیدی پروتئین چند اپی‌توپی به عنوان ورودی ثبت شد و درصد حضور ساختارهایی از قبیل پیچ^{۲۵}، صفحات^{۲۶} و مارپیچ آلفا^{۲۷} با در نظر گرفتن مقدار آستانه مشابهت^{۲۸} ۸ پیش‌بینی گردید (۱۴).

19. Protrusion Index

20. EL Rank

21. Betadefensin peptide

22. Adjuvant

23. Flexible linker

24. Self-Optimized Prediction Method with Alignment

25. Random coil

26. Extended strand

27. α Helices

28. Similarity threshold

GNHTNSSGSSGPIKTAYPVKKDQKSTVK

SATTDSSSKP

اپی توپ‌های خطی سلول B

LIVGESGEWKTTIKYDADGIGPEKVKDLELTIRDAKGNIDLQAF

VPYSGNHTNSSGSSGPIKT

SSSSSSSSSS

اپی توپ‌های فضایی سلول B

GQGIDAKSDLPANASIND

LEAKGVGFSQVGGDETESGKT

و توالی‌های موجود در پایگاه‌های داده مد نظر قرار گرفت.

• این تحقیق حاصل طرح مصوب در دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل با شماره ۱۴/۲۰/۳۱۲۶ و عنوان «بررسی پروفایل پروتئین‌های مایکوپلاسمای تناسلی به منظور طراحی کاندید واکسن برای پیشگیری از عفونت‌های مرتبط» است.

یافته‌ها

استخراج و تحلیل توالی‌های پروتئینی جهت تعیین کاندیدی مناسب اپی توپ

پس از استخراج ORFs ژنوم دو باکتری M. genitalium و M. hominis توسط سرور ORFfinder، پروتئین‌های خارج سلولی به علت موقعیت سلولی این پروتئین‌ها و در دسترس بودن آن‌ها برای سیستم ایمنی میزبان، با استفاده از سرور Psort انتخاب شدند. پس از بررسی اختصاصی بودن و خاصیت ایمن‌زایی پروتئین‌ها در نهایت سه ORF جهت تعیین اپی توپ‌های سلول‌های B و T مورد استفاده قرار گرفتند.

تخمین و ارزیابی اپی توپ‌های سلول‌های B و T و طراحی سازه واکسن با اپی توپ‌های منتخب

(جدول ۱) و (جدول ۲) به ترتیب اپی توپ‌های سلول‌های B و T پیش‌گویی شده که غیر سمی، غیر آلرژن و با بالاترین خاصیت آنتی‌ژنی بودند را به عنوان اپی توپ‌های منتخب جهت ساخت پروتئین چند اپی توپی نشان می‌دهد.

با اتصال اپی توپ‌های برگزیده شده با لینکرهای GPGPG، AAY و KK و اتصال توالی پپتیدی بتادفنسین به عنوان ادجوانت از طریق لینکر EAAK پروتئین چند اپی توپی مورد نظر ساخته شد و به عنوان واکسن پیشنهادی ارزیابی گردید.

تعیین ساختار سوم و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی واکسن چند اپی توپی

با استفاده از سرور Phyre2^{۲۹}، فایل PDB^{۳۰} که مربوط به ساختار سوم پروتئین طراحی شده است، استخراج گردید، سپس بر اساس ساختار سه بعدی حاصل و با استفاده از نرم افزار Protein-sol patches نسبت نواحی قطبی و غیر قطبی در پروتئین با استفاده از مقیاس NPP^{۳۱} از ۰/۶ (قطبی تر) به ۲/۵ (غیر قطبی تر) پیش‌بینی شد. نرم افزار آنالین Protein-sol که بر اساس توالی آمینواسیدی پروتئین چند اپی توپی طراحی شده است، میزان حلالیت آن را در مقایسه با میزان میانگین حلالیت مناسب پروتئین‌های محلول باکتری E. coli که شاخص ۰/۴۵ دارد، محاسبه نمود. اعداد بالاتر از این شاخص به معنای وضعیت مطلوب حلالیت پروتئین مورد نظر است (۱۵).

داکینگ مولکولی واکسن و گیرنده سلول‌های ایمنی

به منظور پیش‌بینی و شبیه‌سازی تعاملات مولکولی میان واکسن چند اپی توپی طراحی شده و سیستم ایمنی میزبان، داکینگ پروتئین واکسن (به عنوان لیگاند) با پروتئین‌های MHC کلاس یک (PDB ID: 5YXU) و MHC کلاس دو (PDB ID: 4MD4) (به عنوان گیرنده) با استفاده از ابزار آنالین HDock انجام شد. این سرور از الگوریتمی ترکیبی بهره می‌گیرد که شامل مدل سازی مبتنی بر الگو^{۳۲} و داکینگ آزاد^{۳۳} است. در این مطالعه، پارامترهای پیش فرض سرور برای انجام داکینگ استفاده شد و در نهایت، یک مدل بهینه بر اساس کمترین انرژی اتصال به عنوان خروجی داکینگ به دست آمد (۱۶).

ملاحظات اخلاقی

• تمامی ملاحظات مربوط به استفاده از منابع

29. Protein Homology/analogy Recognition Engine

30. Protein Data Bank

31. The ratio of non-polar to polar SASA (NPP ratio) values

32. Template-based modeling

33. Free Docking

MHC آلل *	توالی اپی توپ پیش بینی شده
HLA-A*02:01	FLPSMWYWV
HLA-A*02:01	IQDTFSFVV
HLA-A*02:01	GLGQNLKEL
HLA-A*02:01	ALFMEWFGI
HLA-A*02:01	LLNKKSAEV
HLA-A*02:01	KIADENLKI
HLA-DRB1*01:01	SSGWSSTEATTAKND
HLA-DRB1*01:01	MWYWVVERSATTDSS
HLA-DRB1*01:01	GGVYWTLTAKSGETD
HLA-DRB1*01:01	KGVGFSQVGDETES
HLA-DRB1*01:01	EKKFKIDVSFKEQLK
HLA-DRB1*01:01	LAEIKAEDDKKLAEE

[illegible]

SOPMA :

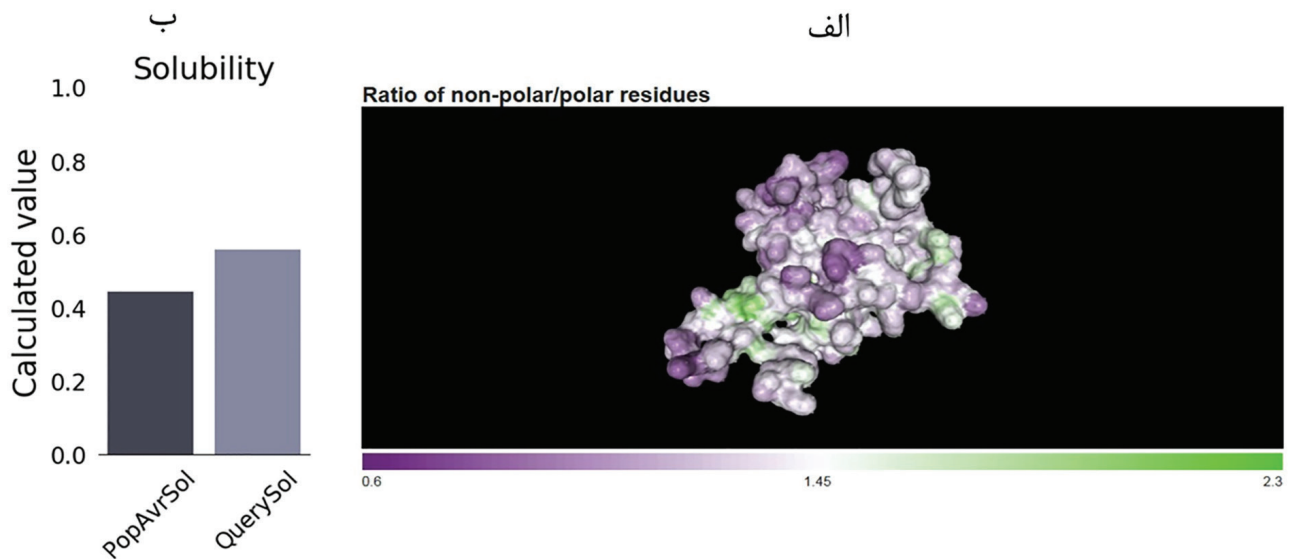
Alpha helix	(Hh)	:	115	is	27.00%
3 ₁₀ helix	(Gg)	:	0	is	0.00%
Pi helix	(Ii)	:	0	is	0.00%
Beta bridge	(Bb)	:	0	is	0.00%
Extended strand	(Ee)	:	71	is	16.67%
Beta turn	(Tt)	:	0	is	0.00%
Bend region	(Ss)	:	0	is	0.00%
Random coil	(Cc)	:	240	is	56.34%
Ambiguous states (?)		:	0	is	0.00%
Other states		:	0	is	0.00%

تعیین ساختار سوم و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی واکسن چند اپی‌توپی

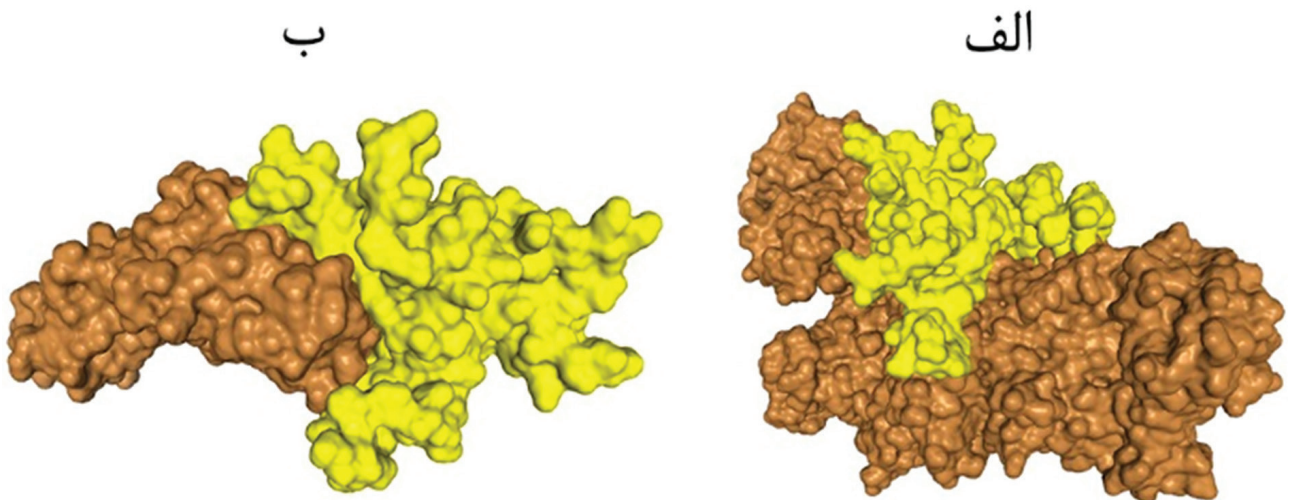
ساختار سوم واکسن چند اپی توپی طراحی شده توسط سرور Phyre2 پیش‌بینی شد و با استفاده از نرم‌افزار آنالاین Protein-sol patches بر اساس فرمت

تعیین ساختار دوم واکسن چند اپی توپی

بر اساس بررسی ساختار دوم واکسن چند اپی توپی طراحی شده درصد حضور ساختارهای پیچ، صفحات و مارپیچ آلفا به ترتیب ۵۶/۳۴ درصد، ۱۶/۶۷ درصد و ۲۷ درصد است که در (شکل ۱) نمایش داده شده است.



شکل ۲. (الف) تعیین نواحی قطبی و غیر قطبی در ساختار سه بعدی واکسن چند اپی توپی طراحی شده با استفاده از نرم افزار Protein-sol patches. (ب) تعیین میزان حلالیت واکسن چند اپی توپی طراحی شده (QuerySol) توسط نرم افزار Pro-Sol.



شکل ۳. داکینگ مولکولی واکسن چند اپی توپی طراحی شده (زرد) با گیرنده سلولهای سیستم ایمنی (قهوه‌ای). (الف) داکینگ میان مولکول واکسن و MHC کلاس یک (PDB ID: 5YXU). (ب) داکینگ میان مولکول واکسن و MHC کلاس دو (PDB ID: 4MD4).

طراحی شده با پروتئین‌های MHC کلاس یک و دو در (شکل ۳) نمایش داده شده است. انرژی اتصال مربوط به داکینگ واکسن و پروتئین MHC کلاس یک برابر با $-244/62$ کیلوکالری بر مول و انرژی اتصال مربوط به داکینگ واکسن و پروتئین MHC کلاس دو برابر با $-238/32$ کیلوکالری بر مول تخمین زده شد که حاکی از برهم‌کنش قوی لیگاند^{۳۵} (واکسن طراحی شده) با جایگاه فعال گیرنده (سلول‌های سیستم ایمنی میزبان) است.

بحث

اهمیت بالینی پاتوژن‌ها

با توجه به توانایی دو باکتری *M. genitalium* و *M. hominis* در ایجاد عفونت‌های پایدار منجر به ناباروری،

PDB به نسبت نواحی قطبی و غیر قطبی در پروتئین چند اپی توپی طراحی گردید که در (شکل ۲. الف) با استفاده از مقیاس NPP از $0/6$ (قطبی‌تر به رنگ بنفش) به $2/5$ (غیر قطبی‌تر به رنگ سبز) نشان داده شده است. همچنین میزان حلالیت واکسن چند اپی توپی طراحی شده توسط نرم افزار Pro-Sol تخمین زده شد. آنالیز حلالیت این پروتئین میزان حلالیت^{۳۴} واکسن طراحی شده را $0/55$ تخمین زده است که در مقایسه با میانگین حلالیت مناسب پروتئین‌های محلول باکتری *E. coli*، که برگرفته از داده‌های تجربی است، در وضعیت مطلوبی قرار دارد (شکل ۲. ب).

داکینگ مولکولی واکسن چند اپی توپی طراحی شده و گیرنده سلول‌های ایمنی

نتیجه حاصل از داکینگ ساختار سه بعدی واکسن

ساختارهای دوم و سوم، خصوصیات فیزیکوشیمیایی^{۳۸} و تعامل با سیستم ایمنی میزبان، قابلیت و پتانسیل این واکسن را تقویت کرد.

در این مطالعه ساختار دوم پروتئین طراحی شده مورد آنالیز قرار گرفت، زیرا ساختار دوم یک پروتئین، ارتباط نزدیکی با توزیع اپی توپ‌های آن نشان می‌دهد. ماریچ آلفا و صفحات در ساختار درونی پروتئین قرار دارند و موجب استحکام آن می‌گردند درحالی‌که پیچ به قرارگیری در سطوح خارجی پروتئین تمایل دارد و در نتیجه ساختارهای مناسب‌تری برای اتصال به لیگاند محسوب می‌شود (۲۰). در سال ۲۰۲۴، کوار^{۳۹} و همکاران، طراحی یک واکسن چند اپی‌توپی علیه ویروس آبله میمون را با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی انجام دادند. یکی از مراحل کلیدی پژوهش آن‌ها، پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین واکسن با استفاده از ابزار SOPMA بود که امکان تحلیل محتوای ساختاری پروتئین را فراهم می‌نماید. استفاده از این نرم‌افزار، امکان تحلیل دقیق‌تری از پتانسیل ساختاری و ایمن‌زایی واکسن را فراهم می‌کند و گامی اساسی در طراحی واکسن‌های مبتنی بر اپی‌توپ محسوب می‌شود (۲۱). در مطالعه حاضر نیز با استفاده از ابزار SOPMA، درصد حضور پیچ، صفحات و ماریچ آلفا به ترتیب ۵۶/۳۴ درصد، ۱۶/۶۷ درصد و ۲۷ درصد پیش‌بینی شد که احتمالاً می‌تواند حاکی از پتانسیل مناسب تشکیل اپی‌توپ و همچنین پایداری قابل قبول پروتئین طراحی‌شده باشد.

نسبت نواحی قطبی و غیر قطبی در ساختار سه‌بعدی واکسن چند اپی‌توپی، با استفاده از نرم‌افزار Protein-sol patches و همچنین میزان حلالیت آن توسط نرم‌افزار Protein-Sol تخمین زده شد. به‌طورکلی آمینواسیدها به دو گروه غیر قطبی یا آب‌گریز و قطبی یا آب‌دوست طبقه‌بندی می‌شوند. آمینواسیدهای غیر قطبی بیشتر در بخش‌های درونی پروتئین متمرکز می‌شوند درحالی‌که آمینواسیدهای قطبی تمایل بیشتری برای تمرکز بر سطح خارجی پروتئین دارند. گیرنده‌های غشائی لنفوسیت‌های B و T و آنتی‌بادی‌ها، آنتی‌ژن‌هایی که حلالیت بالاتری دارند و آب‌دوست‌ترند را شناسایی می‌کنند (۲۲). بنابراین حضور نواحی آب‌دوست با حلالیت بالا در پروتئین با احتمال حضور اپی‌توپ‌ها و تمایل آنتی‌ژنی بالای پروتئین مرتبط است. با توجه به (شکل ۲. الف) که نواحی قطبی پروتئین چند اپی‌توپی را به رنگ

توسعه واکسن‌های مؤثر در برابر این پاتوژن‌ها نه‌تنها می‌تواند از ابتدا به عفونت‌های تناسلی جلوگیری کند، بلکه می‌تواند در کاهش هزینه‌های درمانی و بار سیستم‌های بهداشتی نیز مؤثر واقع شود. با توجه به چالش‌های موجود در درمان و پیشگیری از این عفونت‌ها، نیاز به تحقیقات بیشتر و طراحی واکسن‌های مؤثر برای کنترل شیوع این بیماری‌ها بیش از همیشه احساس می‌شود. این تحقیقات می‌تواند به شناسایی روش‌های جدید درمانی و پیشگیرانه کمک کند و در نهایت سبب کاهش تأثیرات منفی این بیماری‌ها در جامعه گردد (۱).

در سال‌های اخیر با توسعه علم بیوانفورماتیک و با توجه به زمان‌بر و پرهزینه بودن مراحل تجربی تولید واکسن‌های مبتنی بر اپی‌توپ، استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی برای پیش‌بینی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، آنتی‌ژنی و اپی‌توپ‌های پروتئین، پیش از آزمایش‌های عملی، مورد استقبال بسیاری از مطالعات قرار گرفت (۱۷). در مطالعه حاضر با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی متعدد یک واکسن چند اپی‌توپی بر علیه دو باکتری *M. genitalium* و *M. hominis* طراحی شد و برهم‌کنش آن با سیستم ایمنی میزبان بررسی گردید. این تحقیق نخستین مطالعه‌ای است که در آن یک واکسن دوگانه برای مقابله هم‌زمان با دو باکتری *M. genitalium* و *M. hominis* طراحی شده است. خلید^{۳۶} و همکاران در سال ۲۰۲۲، با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، یک واکسن چند اپی‌توپی مؤثر علیه *M. genitalium* شامل اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T محافظت‌شده طراحی کردند و توانایی القای پاسخ ایمنی، پایداری و قابلیت بیان این واکسن را به‌صورت درون رایانه‌ای ارزیابی و تأیید نمودند (۱۸). همچنین مطالعه شیراگانوار^{۳۷} و همکاران در سال ۲۰۲۰، با بهره‌گیری از روش‌های بیوانفورماتیکی، اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T مربوط به پروتئین‌های غشایی باکتری *M. hominis* را شناسایی و از میان آن‌ها اپی‌توپ‌هایی با خاصیت آنتی‌ژنی بالا، پوشش جمعیتی گسترده و تعامل مناسب با سلول‌های سیستم ایمنی به‌عنوان کاندیدهای بالقوه برای طراحی واکسن پیشنهاد کردند (۱۹). به‌طور هم‌سو با مطالعات ذکر شده، در این مطالعه نیز با انتخاب مطلوب‌ترین اپی‌توپ‌های هر دو نوع باکتری، یک کاندید واکسن هم‌زمان علیه عفونت‌های ناشی از این دو عامل طراحی و پیشنهاد شد. ارزیابی‌های جزئی‌تر ساختاری، شامل بررسی

38. Physicochemical properties

39. Kaur

36. Khalid

37. hiragannavar

نیز انجام شده که با به کارگیری داکینگ مولکولی نشان داده‌اند که برهم‌کنش مناسب پروتئین‌های طراحی شده، با گیرنده‌های سلول‌های ایمنی میزبان اختصاصی هر باکتری، شاخص مناسبی برای تخمین ایجاد پاسخ ایمنی پایدار و تشکیل صحیح کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی است (۲۴-۲۷).

محدودیت‌های پژوهش

عدم انجام مراحل تجربی جهت تایید واکسن از محدودیت‌های این پژوهش بود.

پیشنهادهای پژوهش

کلیه ارزیابی‌های واکسن طراحی شده در مطالعه حاضر، تنها بر پایه آنالیزهای درون رایانه‌ای است و مطالعات بیشتر شامل بیان و خالص‌سازی پروتئین واکسن و بررسی خاصیت ایمن‌زایی آن در شرایط برون تنی^{۴۲} و درون تنی^{۴۳} می‌تواند به صحت‌سنجی و تأیید کارایی نهایی واکسن کمک کند و در نهایت منتج به توسعه یک واکسن مؤثر و ایمن گردد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که واکسن دوگانه چند اپی‌توپی طراحی شده علیه *M. genitalium* و *M. hominis* از نظر توانایی ایمن‌زایی، پایداری ساختاری و قابلیت تعامل با مولکول‌های MHC عملکرد مطلوبی دارد. واکسن طراحی شده پیشنهادی، پتانسیل تحریک سیستم ایمنی را دارد و می‌تواند به عنوان یک کاندید مناسب برای تحقیقات بیشتر در شرایط آزمایشگاهی و بالینی در جهت پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این پاتوژن‌ها مورد توجه قرار گیرد. با این حال، انجام مطالعات آزمایشگاهی و تجربی برای اعتبارسنجی عملکرد این واکسن در محیط زنده ضروری است.

تشکر و سپاس‌گزاری

از همراهی و همکاری تمامی افرادی که در اجرای این پژوهش نقش داشتند، صمیمانه قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

هیچ گونه تضاد منافی وجود ندارد.

بنفش و نواحی غیر قطبی آن را به رنگ سبز نشان می‌دهد، می‌توان نتیجه گرفت که این پروتئین نوترکیب از نظر داشتن نواحی قطبی در وضعیت مطلوبی قرار دارد. همچنین با توجه به (شکل ۲. ب) که میزان حلالیت این پروتئین را در مقایسه با میزان حلالیت پروتئین‌های محلول باکتری *E. coli* به عنوان یک شاخص نشان می‌دهد، می‌توان استنباط نمود که واکسن طراحی شده حلالیت مناسبی دارد.

در این مطالعه از پروتئین بتادفنسین به عنوان ادجوانت و به منظور تقویت پاسخ سیستم ایمنی میزبان به واکسن پیشنهادی استفاده شد. بتادفنسین به عنوان یکی از پپتیدهای ضد میکروبی^{۴۰} مهم، نه تنها در ایمنی ذاتی نقش اساسی ایفا می‌کند، بلکه به عنوان اولین خط دفاعی میزبان علیه پاتوژن‌های خارجی شناخته می‌شود. خواص کاتیونی^{۴۱} و فعالیت ضد باکتری، ضدویروسی و ضد قارچی آن، همچنین شواهد متعدد از نقش آن به عنوان ادجوانت در تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال، آن را به گزینه‌ای مناسب برای به کارگیری در طراحی واکسن‌های چند اپی‌توپی تبدیل کرده است (۲۳).

به منظور بررسی پتانسیل پروتئین چند اپی‌توپی طراحی شده در تحریک سیستم ایمنی میزبان، با استفاده از سرور HDock، داکینگ مولکولی بین ساختار سه بعدی واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده به عنوان لیگاند و ساختار سه بعدی پروتئین‌های MHC کلاس یک و دو به عنوان گیرنده انجام گرفت. این سرور با آنالیز برهم‌کنش‌های بیوفیزیکی و بیوشیمیایی، داکینگ بین دو مولکول را ارزیابی می‌کند. بر اساس نتایج حاصل، تعامل مطلوب بین واکسن پیشنهادی و پروتئین‌های MHC کلاس یک و دو نشان می‌دهد که اپی‌توپ‌های موجود در ساختار واکسن توسط سلول‌های سیستم ایمنی میزبان قابل شناسایی است و گیرنده‌های سیستم ایمنی و آنتی‌بادی‌های تولیدشده در میزبان توانایی تشکیل کمپلکس با این پروتئین چند اپی‌توپی را دارند. این قابلیت، احتمالاً حاکی از پتانسیل قابل قبول واکسن فوق در تهییج سیستم ایمنی میزبان و ایجاد پاسخ ایمنی مناسب است. در توافق با یافته‌های مقاله حاضر، مطالعات متعددی در زمینه طراحی و تولید پروتئین‌های چند اپی‌توپی در توسعه واکسن بر علیه سایر گونه‌های میکوپلازما از قبیل *M. bovis*، *M. gallisepticum*، *M. pneumoniae* و *M. synoviae* انجام شده است.

42. in vitro

43. in vivo

40. Antimicrobial peptides

41. Cationic properties

منابع

1. Tantengco OAG, de Castro Silva M, Velayo CL. The role of genital mycoplasma infection in female infertility: a systematic review and meta-analysis. *Am J Reprod Immunol*. 2021;85(6):e13390.
2. Moridi K, Hemmaty M, Azimian A, Fallah MH, Khaneghahi Abyaneh H, Ghazvini K. Epidemiology of genital infections caused by *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in Iran; a systematic review and meta-analysis study (2000–2019). *BMC Public Health*. 2020;20(1):1020.
3. Ona S, Molina RL, Diouf K. *Mycoplasma genitalium*: an overlooked sexually transmitted pathogen in women? *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2016;2016:4513089.
4. Ljubin-Sternak S, Mestrovic T, Marijan T, Anusic M, Suto S, Vranes J. Detection of macrolide and/or fluoroquinolone resistance genes in *Mycoplasma genitalium* strains isolated from men in the northwest region of Croatia in 2018–2023. *Genes (Basel)*. 2024;15(4):470.
5. Machalek DA, Tao Y, Shilling H, Jensen JS, Unemo M, Murray G, et al. Prevalence of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones in *Mycoplasma genitalium*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(11):1302-14.
6. Shiragannavar SJ, Madagi SB. Identification of vaccine candidate proteins in *Ureaplasma urealyticum* causing infertility. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*. 2021;42(2):95-100.
7. Ali S, Ali S, Javed SO, Shoukat S, Ahmad S, Ali SS, et al. Proteome wide vaccine targets prioritization and designing of antigenic vaccine candidate to trigger the host immune response against the *Mycoplasma genitalium* infection. *Microb Pathog*. 2021;152:104771.
8. Cheng C, Chen X, Song Y, Wang S, Pan Y, Niu S, et al. Genital mycoplasma infection: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Health*. 2023;20(1):136.
9. Ahmad S, Ali SS, Iqbal A, Ali S, Hussain Z, Khan I, et al. Using a dual immunoinformatics and bioinformatics approach to design a novel and effective multi-epitope vaccine against human torovirus disease. *Comput Biol Chem*. 2024;113:108213.
10. Peters B, Nielsen M, Sette A. T cell epitope predictions. *Annu Rev Immunol*. 2020;38:123-45.
11. Horton P, Park KJ, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Suppl 1):W585-7.
12. Zaharieva N, Dimitrov I, Flower D, Doytchinova I. Immunogenicity prediction by VaxiJen: a ten year overview. *J Proteom Bioinform*. 2017;10(11):253-60.
13. Dhanda SK, Mahajan S, Paul S, Yan Z, Kim H, Jespersen MC, et al. IEDB-AR: immune epitope database-analysis resource in 2019. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(Suppl 1):W502-6.
14. Angamuthu K, Piramanayagam S. Evaluation of in silico protein secondary structure prediction methods by employing statistical techniques. *Biomed Biotechnol Res J*. 2017;1(1):29-36.
15. Hebditch M, Warwicker J. Web-based display of protein surface and pH-dependent properties for assessing the developability of biotherapeutics. *Sci Rep*. 2019;9(1):1969.
16. Yan Y, Tao H, He J, Huang SY. The HDock server for integrated protein-protein docking. *Nat Protoc*. 2020;15(5):1829-52.
17. Akbarzadeh-Niaki M, Derakhshandeh A, Kazemipour N, Hemmatzadeh F. A novel fusion protein candidate for the serodiagnosis of *Mycoplasma agalactiae* infection. *BMC Vet Res*. 2022;18(1):456.
18. Khalid K, Hussain T, Jamil Z, Alrokayan KS, Ahmad B, Waheed Y. Vaccinomics-aided development of a next-generation chimeric vaccine against an emerging threat: *Mycoplasma genitalium*. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(10):1720.
19. Shiragannavar S, Madagi S. In silico vaccine design against *Mycoplasma hominis* infections. *Biomed Pharmacol J*. 2020;13(1):457-68.
20. Forouharmehr A, Nassiry M. B and T-cell epitopes prediction of the P40 antigen for developing mycoplasma agalactiae vaccine using bioinformatic tools. *J Cell Mol Res*. 2015;13(1):3954-61.
21. Kaur A, Kumar A, Kumari G, Muduli R, Das M, Kundu R, et al. Rational design and computational evaluation of a multi-epitope

- vaccine for monkeypox virus: insights into binding stability and immunological memory. *Heliyon*. 2024;10(16):e36154.
22. Sanchez-Trincado JL, Gomez-Perosanz M, Reche PA. Fundamentals and methods for T- and B-cell epitope prediction. *J Immunol Res*. 2017;2017:2680160.
 23. Zheng J, Yang J, Zhang Z, Liang X, Liu S, Pan Y, et al. An improved oral vaccine with molecular adjuvant beta-defensin protects grouper against nervous necrosis virus infection. *Fish Shellfish Immunol*. 2023;136:108709.
 24. Ali I, Shoukat T, Parveen T, Raza S, Jamil F, Kanwal S, et al. Multi epitope based vaccine design and analysis against *Mycoplasma bovis* using immunoinformatic approaches. *Pak Vet J*. 2022;42(1):1-8.
 25. Zhang G, Han L, Zhao Y, Li Q, Wang S, Shi H. Development and evaluation of a multi-epitope subunit vaccine against *Mycoplasma synoviae* infection. *Int J Biol Macromol*. 2023;253(Pt 2):126685.
 26. Mugunthan SP, Harish MC. Multi-epitope-Based Vaccine Designed by Targeting Cytoadherence Proteins of *Mycoplasma gallisepticum*. *ACS Omega*. 2021;6(21):13742-55.
 27. Shi W, Zhao L, Li S, Xu G, Zeng Y. Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection by using the mimic epitopes. *World J Microbiol Biotechnol*. 2018;34(6):82.