از مسیر تاخوردگی هماگلوتینین تا شیوع آنفولانزا در ایران، رویکردی محاسباتی

حمید هادی علیجانوند*

ایران، زنجان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه، دانشکده علوم زیستی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۵

چکیده

ویروس آنفولانزا یکی از مرگبارترین ویروسهایی است که طی سالها جمعیت انسان را تهدید کرده است. قدرت همه گیری و شیوع ویروس آنفولانزا عامل بقاء آن و از مهمترین دلایل مرگبار بودن این ویروس است. سازوکارهایی که این ویروس برای افزایش همه گیری خود به آنها دست یافته مورد علاقه پژوهشگران بوده است. از کلیدی ترین پروتئینهای ویروس آنفولانزا در چرخه بقای این ویروس پروتئین هماگلوتینین (HA) است. در این مطالعه برای اولین بار پارامترهای ساختاری و فیزیکو شیمیایی کلیدی مسیر تاخوردگی این پروتئین غشایی برای نمونه های استخراج شده در بازه سالهای ۲۰۰۵ الی ۲۰۱۶ با رویکرد بیوفیزیک محاسباتی مورد بررسی قرار گرفت. به صورت ویژه رابطه پارامترهای مذکور با شیوع و همه گیری آنفولانزای انسانی در محدوده کشور ایران بررسی شده است. کارآیی مسیر تاخوردگی HA با میزان آنتی ژنیسیته این پروتئین و شدت همه گیری ویروس آنفولانزا جدا شده از بیماران ایرانی رابطه مستقیم دارد. بررسیهای این تحقیق نشان می دهند که میزان جایگیری پروتئین HA در غشاء با میزان آنتی ژنیسته این پروتئین مرتبط بوده و تغییرات در میزان آنتی ژنیسته این پروتئین همگام با تغییر در پایداری HA در غشاء تغییر کرده است. نتایج این مطالعه می تواند در طراحی مدلهایی برای پیش بینی همه گیریهای آتی استفاده شود و راهنمایی برای طراحی مولکولهایی برای مهار شدت شیوع آنفولانزا باشد.

واژه های کلیدی: ویروس آنفولانزا، تاخوردگی پروتئین، پروتئین غشایی، هماگلوتینین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۴۳۳۱۵۳۳۱۶، پست الکترونیکی: hhadi@iasbs.ac.ir

مقدمه

ویروس آنفولانزا به عنوان یکی از قاتلین بشر در طی قرنها به‌صورت پیوسته‌ای بقاء و تکامل یافته است (۲۲). بعد از توسعه علم و فناوری در طی قرن بیستم هنوز آنفولانزا یکی از مرگ آورترین بیماریها با قدرت همه گیری بالاست که قدرت همه گیری آن دانشمندان و محققان از رشته های مختلف علوم پایه و پزشکی را به چالش کشیده است. با این وجود امروزه هر ساله در همه گیریهای این ویروس تا نیم میلیون نفر جان خود را از عوارض آلودگی با این ویروس از دست می دهند (۴۱).

بررسیهای متعدد چند وجهی روی همه گیری، تکامل، مقاومت دارویی و توانایی ایجاد مرگ و میر این ویروس در کشورهای پیشرفته صورت گرفته است و نتایج آن مطالعات توسعه واکسنهای مفیدتر و طراحی داروهای کارآمد تر علیه آنفولانزا بوده است (۹، ۱۴، ۲۴ و ۳۹). به دلیل آمارهای نه چندان غنی در مورد همه گیریها و سویه های ویروس در ایران، مطالعات کمی در مورد میزان همه گیری و شیوع این بیماری در مقیاس مولکولی انجام گرفته است. خوشبختانه با دایر شدن مرکز مرجع بیماریهای واگیر در ایران به نمایندگی از سازمان بهداشت جهانی در طی دهه گذشته، اطلاعات دقیق تری از نوع ویروس و میزان پراکنش و همه گیری آنفولانزا در اختیار محققین قرار گرفته است (۱۸ و ۲۰).

مطالعاتی که تا به امروز در جهان در زمینه ویروس آنفولانزا صورت گرفته است غالباً پیرامون تحلیل آماری همه گیریهای رخ داده، بررسی پراکنش انواع ویروس آنفولانزا در نواحی مختلف و تلاش برای ایجاد مدلهایی با قدرت پیش بینی زمان و جغرافیای همه گیری بوده است. مطالعات کمتری درباره سیر تکامل مولکولی ویروس با تمرکز بر مکانیسمهای جدید ویروس برای شیوع سریع تر و مرگ آوری بیشتر آنفولانزا منتشر شده است (۱، ۲، ۳، ۸، ۱۳، ۲۳ و ۲۶). در مطالعه حاضر، براساس حداکثر آگاهی که برای نویسنده در مورد موضوع بررسی حاضر ممکن بود، برای اولین بار در سطح بین المللی و ملی مکانیسم مولکولی محتمل به کارگرفته شده توسط ویروس آنفولانزای نمونه های جدا شده از بیماران ایرانی برای شیوع گسترده تر و قدرت آلوده کنندگی بالاتر با دیدگاه بیوفیزیک محاسباتی مورد مطالعه قرار گرفته است.

ویروس آنفولانزا دارای ژنومی از جنس RNA است. ساختار این ویروس متشکل است از کپسول خارجی، غشاء دولایه لیپیدی، لایه پروتئینی و یک بخش هسته ای متشکل از توده های پروتئین–ژنوم. بیرونی ترین بخش ویروس آنفولانزا که با محیط در تماس است همان کپسول خارجی پروتئینی است (۱۱). اکثر ترکیب این پوشش متشکل از دو نوع پروتئین هماگلوتینین (HA) و نورامینیداز (NA) است (۱۷). ذرات ویروس به واسطه نقش کلیدی پروتئین HA میزبان خود را انتخاب می کنند (۶)، به آن متصل و وارد سلول هدف می شوند. از آنجا که چرخه بقای این ویروس مستلزم تکثیر ویروس در سلول میزبان است، پس از بالغ شدن ویروس در میزبان از مهمترین پروتئینهایی که نقش کلیدی برای خروج ویروس بالغ از سلول آلوده را بازی می کند پر جمعیت ترین پروتئین کپسول خارجی یا همان HA است (۱۰ و ۳۶).

مولکول HA پروتئینی با طول ۵۴۰–۵۶۰ اسید آمینه است که به صورت نیزه هایی به طول ۱۳ نانومتر از ساختار ویروس بیرون زده اند و آماده اتصال به سیالیک اسید سلول میزبان هستند (۱۱، ۱۶، ۳۷ و ۴۰). اختصاصیت خانواده سه گانه ویروسهای آنفولانزا برای آلوده کردن گونه های خاص جانوری و بافت خاص آن موجودات، مربوط به تمایل انتخابی اندرکنش HA با سیالیک اسیدهای سلول هدف است. این پروتئین از طریق ناحیه ای آبگریز در غشایی که زیر ناحیه کپسول خارجی ویروس قرار دارد به دام افتاده است. از اجتماع سه زیر واحد HA در غشای مذکور شکل عملکردی این پروتئین ساخته می شود. تجمع زیر واحدهای HA در غشای لیپیدی، سر کروی بزرگی را می سازد که روی یک ساقه بیرون زده از ذره ویروسی قرار گرفته است. تا به امروز ۱۸ نوع HA در خانواده های ویروس آنفولانزا شناسایی شده است. انواع مذکور شباهتی بین ۴۰ الی ۸۰ درصد در سطح توالی پروتئین از خود نشان می دهند در حالی که ساختارهای فضایی به مراتب مشابه تری دارند (۱۱).

بخش کروی و ساقه مذکور در پروتئین HA به صورت فعال در ورود ویروس به سلول هدف و نیز خروج ویروس بالغ هنگام جوانه زدن ویروس از غشای سیتوپلاسمی سلول آلوده نقش ایفاء می کنند (۲۸). آنتی بادیها و داروهای امروزی غالباً بخش کروی تریمر پروتئین HA را مورد هدف قرار می دهند به امید آنکه یا مانع اتصال ویروس به سلول میزبان بشوند و یا مانع گسترش آلودگی از سلولی به سلول دیگر شوند (۵ و ۷). اخیرا بخش ساقه مانند و غشایی پروتئین HA برای طراحی داروهای کارآمد مورد توجه قرار گرفته است (۲۵).

در زمان آلوده کردن سلول هدف، HA با اتصال به غشای میزبان نقش یک لنگر مولکولی را بازی می کند و همزمان با نفوذ در غشای میزبان و با همکاری پروتئینهای دیگر ویروسی و میزبان فرآیند ادغام و نفوذ ویروس به سلول قربانی را ممکن می سازد. از طرف دیگر هنگام بلوغ ذرات ویروسی و تجمع بخش ژنومی و پروتئین ویروس درون

سلول میزبان، قرارگیری HA در بسته های غشایی حاوی ذره ویروسی با همکاری پروتئینهایی از میزبان عامل جوانه زدن ویروس به خارج سلول است (۱۱, ۲۸). در واقع می توان گفت مهمترین پروتئین برای ورود ویروس آنفولانزا به سلول میزبان و خروج آن از سلول آلوده، پروتئینی غشایی به نام HA است که مسیر تاخوردگی ویژه پروتئینهای غشایی را طی می کند و همزمان در نفوذ ویروس به سلول و خروج آن از سلولهای آلوده نقش اساسی ایفاء می کند. در این مطالعه مسیر تاخوردگی پروتئین HA به کمک روشهای محاسباتی برای تمام گونه های ویروسی آنفولانزایی که در سطح جهان در بازه سالهای ۲۰۰۵-۲۰۱۶ گزارش شده است مورد بررسی قرار گرفته و به صورت ویژه تحلیلهای محاسباتی روی HA جدا شده از بیماران ایرانی در بازه زمانی مذکور انجام شده و ارائه گردیده است. امید است نتایج حاصل از این پژوهش راه را برای طراحی مدلهایی با قدرت پیش بینی همه گیریهای آتی بر مبنای داده های مولکولی به عنوان رویکردی تکمیلی در کنار داده های جمعیتی روشن تر نماید. سازوکار معرفی شده در این مطالعه برای توضیح همه گیری شدید آنفولانزا، می تواند برای طراحی مولکولهای سرکوبگر آنفولانزا نقشه راهی را ارائه نماید.

روشها

توالیهای پروتئین HA مربوط به ویروسهای آنفولانزا از طریق پایگاه داده ویروس آنفولانزا به صورت رایگان در اختیار همگان بوده است (۴). توالی پروتئینهای HA از ژنومهای ویروس آنفولانزای جدا شده از نمونه های افراد دارای تاییدیه های بالینی و سرولوژیکی ابتلا به آنفولانزا استخراج شده اند. نمونه ها از بیماران ایرانی در خلال سالهای ۲۰۰۹ الی ۲۰۱۶ جدا شده اند. این داده ها نتیجه گزارش واحد آنفولانزای مرکز بیماریهای واگیر ایران به مرکز بهداشت جهانی بوده است که به صورت رایگان در اختیارعموم قرار دارد. درمطالعه حاضر توالیهای پروتئینی مورد استفاده قرار گرفت که ژنوم ویروس متناظر آنها به صورت کامل تعیین توالی شده بود. داده های استفاده شده در این مطالعه شامل توالی کلیه پروتئینهای مربوط به HA جدا شده از افراد مبتلا به آنفولانزا (+_FLU) از شهرها و تاریخهای متفاوت در ایران بوده است. گروه دیگر مربوط به توالی HA جدا شده از نمونه های کلیه کشورها در بازه زمانی مورد نظر بوده است. مجموعه دیگر از توالیهای پروتئین HA مربوط به بیماران ایرانی مبتلا به آنفولانزا و دارای علائم بیماری حاد تنفسی بوده است. لازم به توضیح است که همراه بودن علائم حاد تنفسی با آنفولانزا می تواند نشانه ای از شدت بالای آنفولانزا باشد.

آمار افراد ایرانی که دارای علائم آنفولانزا و حامل حداقل یکی از گونه های ویروس آنفولانزا بوده اند به تفکیک شهر در پایگاه داده FluNet در دسترس می باشد (۱۵ و ۲۹). با استفاده ازسرویس VaxiJen (Vaxi) میزان آنتی ژنیسیته انواع HA محاسبه شد (۱۲). شدت پاسخی که سیستم دفاعی به پروتئینهای پاتوژن می دهد به کمک رویکردهای محاسباتی قابل پیش بینی است. در مطالعه حاضر این ویژگی از جمع شدت پاسخ پیش بینی شده به اپیتاپهای شناسایی شده توسط سرویس VaxiJen در توالیهای HA نمونه های ایرانی به دست آمده است.

پارامترهای بیوفیزیکی و ساختاری مربوط به مسیر تاخوردگی پروتئینها به کمک نرم افزار HAMDAM از روی توالیهای پروتئینی مورد نظر محاسبه و تحلیل شده است (۱۹). روشهای موفقی مبتنی به داده های ساختار اول پروتئینها برای پیش بینی جایگیری، توپولوژی و تمایل پروتئینها به غشاهای زیستی گزارش شده است. روشهایی از این میان در این مطالعه به کار رفته است که همگی بر اساس داده های آزمایشگاهی بنا شده اند و به عنوان کنترل خارجی از داده های آزمایشگاهی برای ارزیابی آنها استفاده شده است. نرم افزار HAMDAM با محاسبه پارامترهای فیزیکو شیمیایی وساختاری متعددی با رویکرد شناساگر

پنجره لغزان (Sliding window recognizer) از روی توالی پروتئین و به کار گیری ضرایب حاصله از تحلیل مولفه های اساسی (PCA) پارامترهای محاسبه شده اقدام به محاسبه پارامتر FP3mem می کند. پارامتر FP3mem مقیاسی برای تمایل جایگیری پایدار پروتئینها در غشاء است که نشان داده شده است با دقت بالایی داده های آزمایشگاهی جایگیری پروتئینهای نوترکیب در غشاء را بازسازی می کند.

توالیهای مربوط به گونه های پروتئین HA جدا شده از نمونه های ایرانی ازدید برخی ویژگیهای ساختاری قابل پیش بینی از روی توالی بررسی شدند. تعداد پیوندهایی غیر کوالانی که هر اسید آمینه می تواند در یک ساختار سه بعدی طبیعی با سایر اسیدهای آمینه تشکیل دهد از یک توزیع آماری پیروی می کند که مقادیر آن به صورت اعدادی بزرگتر (+) ویا کوچکتر (–) از مقدار معین شده برای قله توزیع تعداد پیوندها گزارش می شوند. مقادیر توزیع تعداد پیوندهای غیر کوالان هر اسید آمینه از آمارگیری روی ساختارهای کریستالوگرافی شده پایگاه PDB حاصل شده است. در مطالعه حاضر تعداد پیوندهای با برد متوسط از طریق بررسی پیوندهای حول هر اسید آمینه تا شعاع هشت انگسترمی پس از جایگیری در ساختار فضایی مورد مطالعه قرار گرفته است. این ویژگی از روی توالی به کمک رویکرد شناساگر پنجره لغزان به کار گرفته شده درمرجع (همدم) پیش بینی شده است.

مطالعات متعددی نشان می دهند که سرعت تاخوردگی پروتئین به میزان زیادی به تعداد و نوع اسیدهای آمینه تشکیل دهنده پروتئین نوعی وابستگی خطی دارد. در مطالعه حاضر بعد از محاسبه سهم رزیدوهای قطبی و غیر قطبی در سرعت تاخوردگی پروتئین از روی توالی به کمک رویکرد شناساگر پنجره لغزان به کار گرفته شده درمرجع (همدم)، سرعت تاخوردگی کلی پروتئین به صورت جمع جبری مقادیر محاسبه شده سهم رزیدوهای قطبی و غیر قطبی پیش بینی شده است.

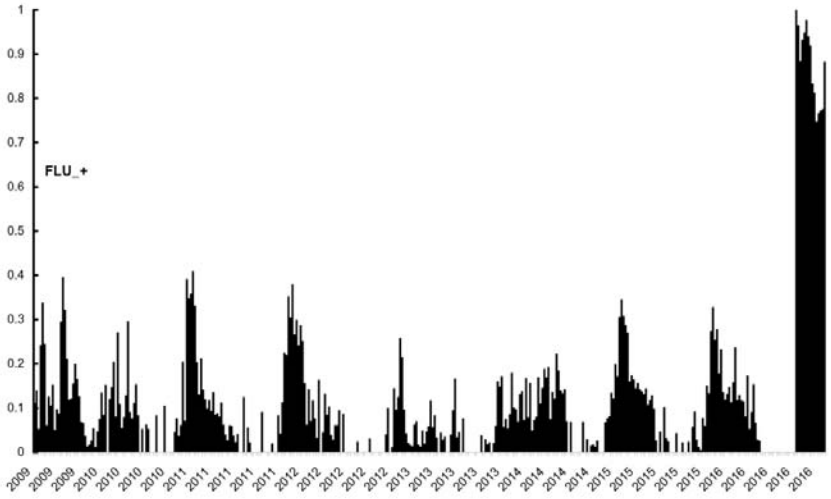
نتایج و بحث

همان طور که در مقدمه ذکر شد از فراوان ترین پروتئینهای ویروس آنفولانزا و از مهمترین پروتئینهای آن برای اتصال، نفوذ و ادغام با سلول میزبان، پروتئین غشایی HA است. در این بخش نتایج بررسی ارتباط احتمالی تغییرات مسیر تاخوردگی پروتئین HA طی سالهای ۲۰۰۵–۲۰۱۶ و میزان شیوع و همه گیری ویروس آنفولانزا در ایران ارائه می‌شود.

بررسی نمونه های گرفته شده از بیماران با علائم حاد تنفسی شبه آنفولانزا از نظر حضور ویروس آنفولانزا در آنها، (این نسبت مقیاسی از همه گیری ویروس مذکور می تواند باشد) نشان می دهد با گذشت زمان از سال ۲۰۰۹ میزان قدرت همه گیری این ویروس در گونه ایرانی آن به شدت افزایش یافته است (افزایش میزان موارد مبتلا به علائم حاد تنفسی و آلودگی به ویروس) به نحوی که میانگین موارد آلوده به ویروس افراد با علائم تنفسی در ماههای انتهایی سال ۲۰۱۶ بیش از ۵۰ درصد بوده است؛ لذا علائم حاد تنفسی آنها مربوط به آلودگی با ویروس آنفولانزا بوده است (شکل ۱) که این همگامی می تواند نشانگر افزایش قدرت ویروس در سال ۲۰۱۶ باشد . همان طور که در مقدمه اشاره شد برای انتشار ویروس از سلول آلوده پروتئین HA نقش کلیدی بازی می کند. بنابراین مطالعه در مورد ویژگیهای ساختاری و مسیر تاخوردگی این پروتئین غشایی طی بازه زمانی مذکور برای پیدا کردن سازوکار به کار گرفته شده توسط ویروس آنفولانزای ایرانی برای افزایش قدرت همه گیری مشاهده شده این ویروس در سال ۲۰۱۶ راهگشا به نظر می رسد.

از آنجا که نه تنها برای گونه ایرانی HA بلکه برای اکثر نمونه های دیگر این پروتئین ساختار سه بعدی تعیین نشده است و تعیین ساختار به کمک روشهای آزمایشگاهی برای

بیش از ۳۵۰ نوع HA نمونه های ایرانی رویکردی زمان بر و پرهزینه است به کارگیری روشهای محاسباتی کارآمد مبتنی بر توالی پروتئین می تواند در این مورد امید بخش باشد.



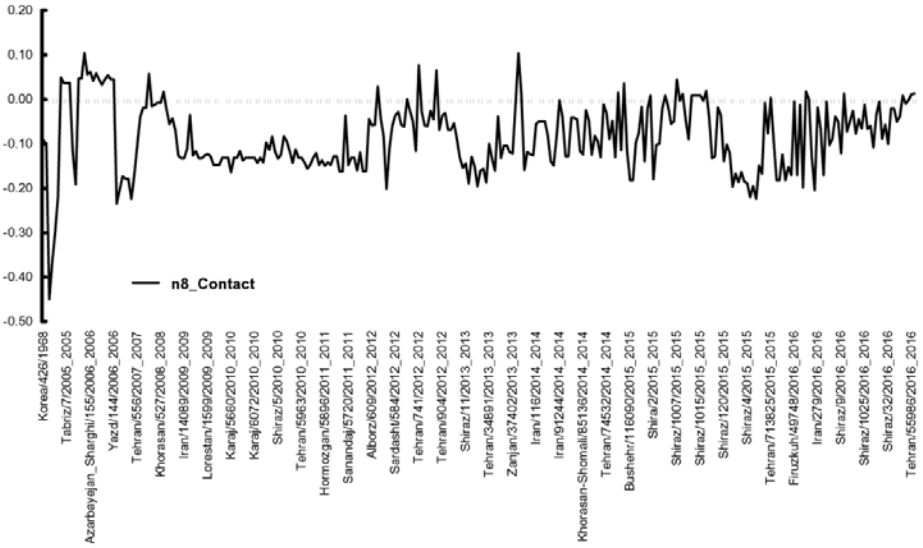
شکل ۱- میزان فراوانی (محور عمودی) موارد حامل ویروس آنفولانزا در ماههای مختلف مربوط به نمونه های گرفته شده از بیماران ایرانی ساکن در نقاط مختلف ایران.

بررسی مسیر تاخوردگی پروتئینها به کمک روشهای آزمایشگاهی، طاقت فرسا و گران است. حال آنکه برای پیدا کردن بخشی از پاسخ چرایی قدرت بالای همه گیری ویروس آنفولانزای ایرانی اخیر چنان مطالعاتی ضروری به نظر می رسد. در این بررسی با به کارگیری نرم افزار HAMDAM پارامترهای ترمودینامیکی و ساختاری کلیدی برای گامهای سه گانه تاخوردگی پروتئینهای غشایی برای همه نمونه های HA گزارش شده در تمام کشورها در بازه زمانی ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۶ با سرعت قابل قبولی بررسی و برای اولین بار گزارش می شود (۱۹).

به صورت خلاصه تاخوردگی یک پروتئین غشایی چند زیر واحدی از سه گام اصلی تشکیل شده است: جایگزینی پروتئین تازه ترجمه شده از سیتوپلاسم به مجاورت غشاء، ورود پروتئین شبه-تاخورده از محیط مجاور غشاء به داخل دولایه لیپیدی و در نهایت تاخوردن کامل و اتصال زیرواحدهای آن برای تولید یک پروتئین بالغ دارای عملکرد (۲۷، ۳۱، ۳۵ و ۳۸). مجموعه ای از پارامترهای فیزیکو شیمیایی و ساختاری هدایت هریک از این گامها را به عهده دارند. در این مطالعه، کلیدی ترین پارامترهای گام آخر تاخوردگی HA به عنوان یک پروتئین غشایی که به صورت تریمر در غشای سلول آلوده قرار می گیرد و فرآیند جوانه زدن ویروس از سلول را رهبری می کند ارائه شده است.

کیفیت تاخوردگی یک پروتئین از این منظر که آیا فشردگی ساختاری کلی پروتئین از الگوی میانگین سایر پروتئینها پیروی می کند یا خیر؟ می تواند نشانگری از ظهور نواحی بیرون زده از کره مفروض احاطه کننده پروتئین باشد. در مورد پروتئین HA آن نواحی بیرون زده می توانند نقش نواحی آنتی ژنی نوظهور را بازی کنند. در این رویکرد احتمالی، پروتئین با متحمل شدن کمترین میزان تغییرات در سطح ساختار اولیه، ویژگیهای ساختاری جدیدی را در شکل فضایی خود که هدف سیستم دفاعی میزبان می باشد ایجاد می کند. میانگین تعداد پیوندهای غیرکوالان احاطه کننده اسیدهای آمینه HA در ساختار سه بعدی می تواند مقیاسی از فشردگی ساختار پروتئین باشد (۳۰). به کمک رویکرد محاسباتی این ویژگی برای کره هایی به شعاع ۸

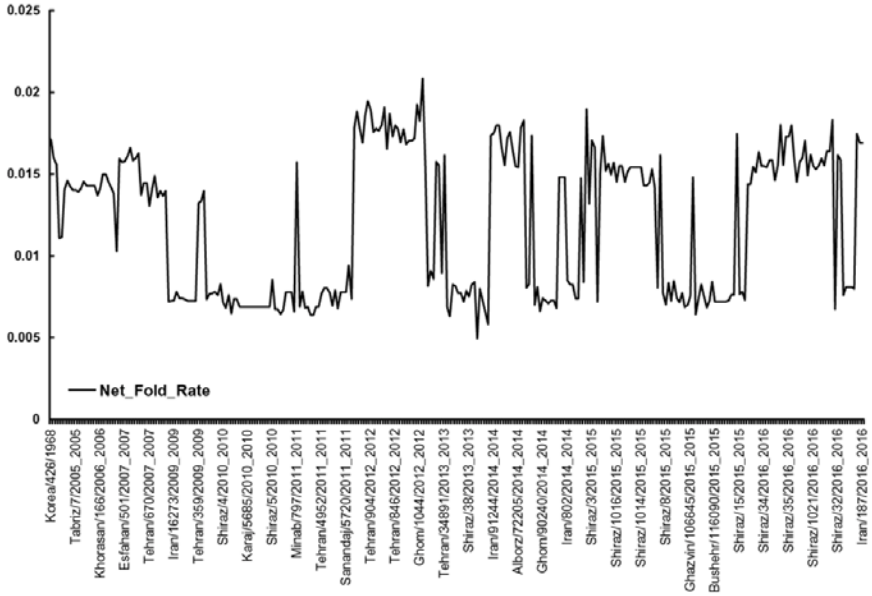
انگسترم حول اسیدهای آمینه HA های ایرانی محاسبه شد (شکل ۲). در شکل ۲ انحراف از میانگین تعداد پیوندهای غیر کوالان حول هر اسید آمینه با برد ۸ انگسترم برای HA مربوط به کشور کره که همه گیری مرگ آوری در سال۱۹۶۸ ایجاد کرده بود به عنوان مقایسه محاسبه و گزارش شده است. همان طور که در این شکل مشاهده می شود در سالهای ۲۰۱۲، ۲۰۱۴ و ۲۰۱۶ پروتئین HA ایرانی فشردگی فضایی جدیدی در مقایسه با نوع کره ای در ساختار خود تجربه می کند که شاید مناطق آنتی ژنی جدیدی باشند که ویروس در کوتاه ترین زمان برای فرار کردن از سیستم دفاعی ایجاد کرده است.



شکل ۲- انحراف میانگین تعداد پیوندهای غیرکوالان (محور عمودی) احاطه کننده هر اسید آمینه در کره ای به شعاع هشت انگسترم مربوط به پروتئین هماگلوتینین ویروس آنفولانزای انسانی جدا شده از نمونه های ایرانی به تفکیک شهر و سال.

توجیه دیگر برای ایجاد ساختارهای فشرده جدید می تواند راهکاری برای افزایش سرعت تاخوردن پروتئین یا عبور از مناطق با کمترین سطح انرژی در مسیر تاخوردگی برای گریز از ایجاد تجمعات ناکارا باشد. به همین منظور حداکثر سرعت تاخوردگی HA های مورد بررسی در این مطالعه به صورت کیفی محاسبه و در شکل ۳ گزارش شده است (۲۱ و ۳۲). مقایسه سرعت گونه های ایرانی با گونه مرگبار مربوط به کشور کره نشان می دهد در سالهای ۲۰۱۲، ۲۰۱۴ و ۲۰۱۶ سرعت تاخوردگی HA های ایرانی به شدت افزایش یافته و به مقدار سرعت تاخوردگی گونه کره ای رسیده است. یکی از مکانیسمهای به کار گرفته شده در ویروس کره ای برای انتشار سریع ویروس بالغ از سلول آلوده به سایر سلولها می تواند سریع تر کردن سرعت تاخوردگی کلیدی ترین پروتئین انتشار آلودگی یا همان HA بوده باشد. ویژگیهای محاسبه شده در این بخش همگی مربوط به تغییراتی است که پروتئین در فاز آبی سلول طی کرده است در حالی که پروتئین HA به صورت یک پروتئین غشایی دارای پیچیدگی خاص پروتئینهای غشایی است که در ادامه به برخی از مهمترین آنها پرداخته شده است.

برای آنکه HA شکل عملکردی خود را در ساختار ویروس به دست بیاورد الزاماً باید به صورتی در غشاء قرار گیرد که برای در معرض قرار دادن دمین متصل شونده به سلول میزبان پایه ای را فراهم کند تا ناحیه متصل شونده به میزبان بیش ترین فاصله را از سطح ویروس داشته باشد.



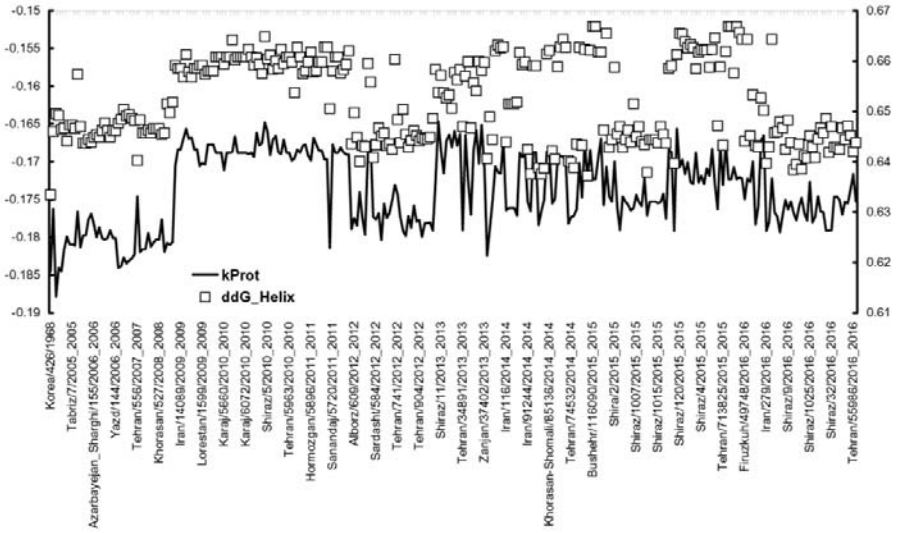
شکل ۳- حداکثر نسبی سرعت تاخوردگی پروتئین هماگلوتینین ویروس آنفولانزای انسانی (محور عمودی) جدا شده از نمونه های ایرانی به تفکیک شهر و سال. مقادیر بزرگتر پارامتر Net Fold Rate، تاخوردگی سریع تر را نشان می دهند.

پارامتر kPROT امکان پیش بینی مکانیسم قرار گیری پروتئین مورد مطالعه را در غشاء دارد (۳۴). این پارامتر پیش بینی می کند که پروتئین به واسطه حضور نواحی متعدد گذرنده از غشاء در غشاء جای گرفته یا به واسطه ناحیه منفرد گذرنده از غشاء. محاسبات این مطالعه ما نشان می دهد که تقریباً بعد از سال ۲۰۱۱ پروتئین HA ایرانی از مکانیسمی برای قرار گیری در غشاء استفاده می کند که شباهت زیادی به گونه مرگبار کره ای دارد (محور سمت چپ در شکل ۴). مقادیر مثبت پارامتر ddG_Helix نشان می دهند (۳۳) که این پروتئین مشکلی برای وارد شدن به فاز غشایی درحین تاخوردگی ندارد (محور سمت راست در شکل ۴) ولی در مقایسه با هم، گونه های ایرانی سالهای ۲۰۱۲ و ۲۰۱۶ تمایل نفوذ به غشایی کمتر از گونه های سالهای دیگر اما مشابه با گونه مرگبار کره ای دارند. همان طور که توضیح داده شد مسیر تاخوردگی یک پروتئین غشایی از سه گام اصلی تشکیل شده است که کارآیی نهایی یک پروتئین برای جایگیری در غشاء تا کسب شکل نهایی و عملکردی را برآیند آنها تعیین می‌کند.

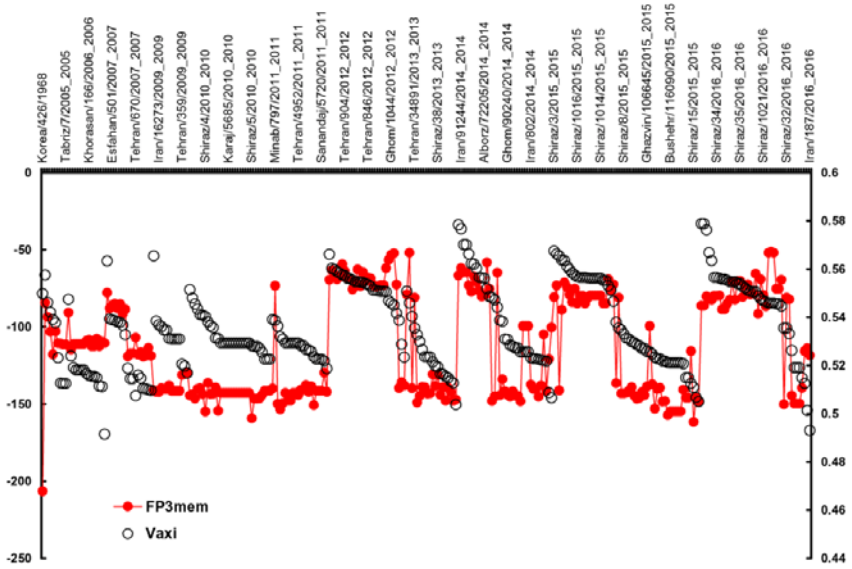
محاسبه پارامتر FP3mem به کمک نرم افزار HAMDAM این امکان را فراهم می کند که به صورت کمی، کیفیت تاخوردگی پروتئین غشایی HA در گونه های ایرانی و سایر کشورها در خلال سالهای ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۶ مورد مطالعه قرار گیرد (محور عمودی سمت چپ در شکل ۵). بررسیها نشان می دهند که تمام نمونه های HA آنفولانزای سالهای ۲۰۱۲و ۲۰۱۶ و برخی از نمونه های سالهای ۲۰۱۴و ۲۰۱۵ توانایی چشمگیری برای قرار گیری در غشاء پیدا کرده اند و پروتئینهایی به مراتب ساختار یافته تر و با تمایل بیشتر به غشاء در مقایسه با گونه کره ای سال ۱۹۶۸ هستند. از آنجا که پارامتر FP3mem تمام مراحل تاخوردگی پروتئین تا جایگیری و تجمع زیر واحدها در غشاء را در نظر می گیرد (۱۹) می توان گفت HA مربوط به سالهای ۲۰۱۲، ۲۰۱۴ و۲۰۱۶ از منظر جایگیری پایدار در غشاء از بالغ ترین HA ایرانی هستند که ویروس آنفولانزا در بازه ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۶ تولید کرده است.

آیا تاخوردگی کامل و تمایل زیادتر پروتئینهای HA که حاکی از کارآیی بیشتر این پروتئین برای طی کردن مراحل خروج از سلول آلوده یا ورود به سلول میزبان است با

میزان آنتی ژنیسیته این پروتئین مرتبط است؟ نتایج محاسبه میزان آنتی ژنیسیته به کمک الگوریتم Vaxi نشان می دهد (۱۲) که از سال ۲۰۱۲ به بعد تمایل HA برای غشایی شدن با میزان آنتی ژن بودن این پروتئین رابطه مستقیم دارد (محور عمودی سمت راست در شکل ۵).

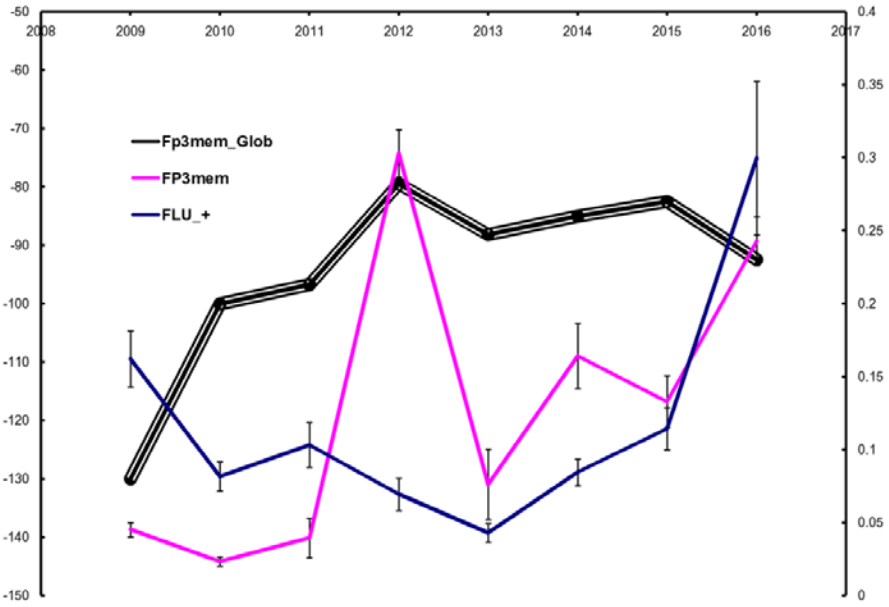


شکل ۴- مقادیر مربوط به پارامتر های کلیدی مرحله نفوذ پروتئین (ddG_Helix) به غشاء و تجمع زیر واحدهای پروتئین غشایی (kProt) هماگلوتینین ویروس آنفولانزای انسانی جدا شده از نمونه های ایرانی به تفکیک شهر و سال به ترتیب در محور عمودی سمت راست و محور عمودی سمت چپ نشان داده شده است.



شکل ۵- مقادیر مربوط به پارامتر کلیدی تمایل پروتئین به غشاء (FP3mem) و میزان آنتی ژنیسیته (Vaxi) هماگلوتینین ویروس آنفولانزای انسانی جدا شده از نمونه های ایرانی به تفکیک شهر و سال به ترتیب در محور عمودی سمت چپ و محور عمودی سمت راست نشان داده شده است. مقادیر بزرگتر پارامتر FP3mem بیانگر پایداری و تمایل بیشتر پروتئین در غشاء و مقادیر بزرگتر پارامتر Vaxi بیانگر آنتی ژنیسیته بیشتر است.

نتایج تا این بخش نشان می دهند که جنبه های ساختاری و کارآیی HA به عنوان یک پروتئین غشایی در سالهای ۲۰۰۹ و ۲۰۱۶ متحمل تغییرات وسیعی شده است. آیا می توان ارتباطی بین ویژگیهای محاسبه شده برای HA و میزان همه گیری این ویروس در بازه زمانی مذکور یافت؟ از آنجا که داده های حامل ویروس بودن بیماران با علائم آنفولانزا به صورت کامل برای همه فصول در نمونه های ایرانی از سال ۲۰۰۹ به بعد در دسترس است بررسی همزمان موارد با علائم حاد تنفسی که بعد از آزمایشات مولکولی حامل ویروس آنفولانزا شناخته شده بودند و تغییرات پارامتر FP3mem پروتئین HA ویروس ایرانی در بازه مذکور نشان می دهد به جز در مورد نمونه های سال ۲۰۱۲ می توان این نتیجه گیری را انجام داد که تمایل بیشتر HA به غشاء در یک سال همگام با شدت همه گیری آنفولانزا در آن سال بوده است. بنا براین می توان این نتیجه را گرفت که میزان غشایی شدن HA به عنوان مولکول کلیدی مراحل انتشار ویروس از سلول به سلول با میزان همه گیری ویروس آنفولانزا همگام است (شکل ۶). در واقع در این سالها مکانیسم غالب ویروس آنفولانزا برای همه گیری شدید می تواند تکامل کارآیی HA برای جایگیری در غشاء و تاخوردگی مؤثر این پروتئین باشد.



شکل ۶- مقادیر مربوط به پارامتر کلیدی تمایل پروتئین به غشاء (FP3mem) هماگلوتینین ویروس آنفولانزای انسانی جدا شده از نمونه های ایرانی و تمایل HA به غشاء ویروس آنفولانزای انسانی جدا شده از نمونه های همه کشور ایران (FP3mem_Glob) در محور عمودی سمت چپ و درصد بیماران ایرانی حامل ویروس آنفولانزا (FLU_+) به تفکیک سال در محور عمودی سمت راست نشان داده شده است. نمودار مشکی پررنگ مربوط به مقادیر FP3mem برای هماگلوتینین های جدا شده از ویروسهای آنفولانزای کشورهای جهان می باشد. دقت اندازه گیری به صورت خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است.

برای مقایسه تغییراتی که در بازه زمانی ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۶ پروتئین HA آنفولانزای ایرانی متحمل شده با گونه های سایر کشورها، مسیر تاخوردگی و تمایل HA به غشاء برای تمام HA های ویروسهای آنفولانزای گزارش شده مربوط به این بازه زمانی در همه کشورها محاسبه و مورد بررسی قرار گرفت. بیش از ۳۶ هزار نوع HA در این بازه زمانی در کشورهای مختلف شناسایی و تعیین توالی شده اند. بررسی این مطالعه نشان می دهد که تمایل غشایی شدن و کارآیی تاخوردگی HA مربوط به سایر کشورها در بازه ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۶ روبه افزایش بوده است (شکل ۶). جالب

آنکه تنها گونه مربوط به سال ۲۰۱۲ ایرانی مقادیر FP3mem مشابه با انواع دیگر HA (FP3mem_Glob) در همان سال دارد و آن نقطه تنها نقطه ای است که رابطه مستقیم میزان شیوع با روند افزایش FP3mem را نمونه ایرانی نقض کرده است. شاید در سال ۲۰۱۲ پروتئینهای دیگر دخیل در مسیر نفوذ ویروس به سلول یا انتشار آن از سلول نقش مهمتری بازی کرده اند، شاید نمونه های گزارش شده حاملین ویروس در آن سال کامل نباشد و امکان این وجود دارد که محاسبات انجام شده در ایران پروتئینهای آن سال را که احتمالاً ویژگیهای خاصی داشته اند به درستی تحلیل ننموده است.

نتیجه گیری

بررسیهای محاسباتی صورت گرفته در این مطالعه نقش مؤثر مسیر متکامل تاخوردگی پروتئین هماگلوتینین در شدت همه گیری گونه ایرانی ویروس آنفولانزا را پیشنهاد می کند. ترکیباتی که بتوانند گام نهایی از گامهای تاخوردگی HA در غشاء را که در این مطالعه بررسی شده است، متأثر کنند می توانند بالقوه مسیر نفوذ ویروس به سلول و خروج ویروس از سلول آلوده را مهار کرده و مانع از شیوع ویروس مرگبار آنفولانزا شوند.

تشکر و قدردانی

نویسنده مقاله از حمایتهای دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه (IASBS) زنجان نهایت تشکر را دارد.

منابع

1- A Ded, Idolo A, Quattrocchi M, Zizza A, Gabutti G, Romano A, Grima P, Donatelli I, Guido M. 2014. Surveillance of human influenza A(H3N2) virus from 1999 to 2009 in southern Italy. Epidemiol Infect 142: 933-939.

2- Alavi SM, Nashibi R, Moradpoor F. 2014. Prevalence and Mortality of Influenza A (H1N1) Virus Among Patients With Acute Respiratory Infection in Southwest Iran. Jundishapur J Microbiol 7: e9263.

3- Andrewes CH. 1953. Epidemiology of influenza. Bulletin of the World Health Organization 8: 595-612.

4- Bao Y, Bolotov P, Dernovoy D, Kiryutin B, Zaslavsky L, Tatusova T, Ostell J, Lipman D. 2008. The influenza virus resource at the National Center for Biotechnology Information. J Virol 82: 596-601.

5- Benjamin E, Wang W, McAuliffe JM, Palmer-Hill FJ, Kallewaard NL, Chen Z, Suzich JA, Blair WS, Jin H, Zhu Q. 2014. A broadly neutralizing human monoclonal antibody directed against a novel conserved epitope on the influenza virus H3 hemagglutinin globular head. J Virol 88: 6743-6750.

6- Benton DJ, Martin SR, Wharton SA, McCauley JW. 2015. Biophysical measurement of the balance of influenza a hemagglutinin and neuraminidase activities. J Biol Chem 290: 6516-6521.

7- Chen Q, Guo Y. 2016. Influenza Viral Hemagglutinin Peptide Inhibits Influenza Viral Entry by Shielding the Host Receptor. ACS Infect Dis 2: 187-193.

8- Chi XS, Bolar TV, Zhao P, Tam JS, Rappaport R, Cheng SM. 2005. Molecular evolution of human influenza A/H3N2 virus in Asia and Europe from 2001 to 2003. J Clin Microbiol 43: 6130-6132.

9- Cox DBJaNJ. 2013. Influenza pandemics: History and lessons learned. Pages 3 - 33 in Robert G. Webster ASM, Thomas J. Braciale, Robert A. Lamb, ed. Textbook of Influenza, John Wiley & Sons, Ltd.

10- Cross KJ, Burleigh LM, Steinhauer DA. 2001. Mechanisms of cell entry by influenza virus. Expert Rev Mol Med 3: 1-18.

11- Debiprosad N. SS, Rilwan A., Gwendolyn L. 2013. Structure, disassembly, assembly, and budding of influenza viruses. Pages 37 -171 in Robert G. Webster ASM, Thomas J. Braciale, Robert A. Lamb, ed. Textbook of Influenza, John Wiley & Sons, Ltd.

12- Doytchinova IA, Flower DR. 2007. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens,

tumour antigens and subunit vaccines. BMC Bioinformatics 8: 4.

13- Du X, Wang Z, Wu A, Song L, Cao Y, Hang H, Jiang T. 2008. Networks of genomic co-occurrence capture characteristics of human influenza A (H3N2) evolution. Genome Res 18: 178-187.

14- Eichelberger MC, Hassantoufighi A, Wu M, Li M. 2008. Neuraminidase activity provides a practical read-out for a high throughput influenza antiviral screening assay. Virol J 5: 109.

15- Flahault A, Dias-Ferrao V, Chaberty P, Esteves K, Valleron AJ, Lavanchy D. 1998. FluNet as a tool for global monitoring of influenza on the Web. JAMA 280: 1330-1332.

16- Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ, Stevens DJ, Xiao B, Ha Y, Vasisht N, Steinhauer DA, Daniels RS, Elliot A, Wiley DC, Skehel JJ. 2004. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. Science 303: 1838-1842.

17- Gamblin SJ, Skehel JJ. 2010. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. J Biol Chem 285: 28403-28409.

18- Gouya MM, Nabavi M, Soroush M, Haghdoust AA, Ghalehee S, Hemmati P, Nasr Dadras M, Fallahzadeh MK, Lankarani KB. 2011. Mortality from Pandemic Influenza A (H1N1) in Iran. Iran Red Crescent Med J 13: 698-701.

19- Hadi-Alijanvand H, Rouhani M, Proctor EA, Dokholyan NV, Moosavi-Movahedi AA. 2011. A folding pathway-dependent score to recognize membrane proteins. PLoS One 6: e16778.

20- Hatami H. 2016. History of Influenza: Pandemics in Iran and the World. Int J Infect 3: e36672.

21- Huang JT, Tian J. 2006. Amino acid sequence predicts folding rate for middle-size two-state proteins. Proteins 63: 551-554.

22- Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W. 2006. Influenza report 2006 / www.InfluenzaReport.com ; ed. by Bernd Sebastian Kamps, Christian Hoffmann, Wolfgang Preiser. Paris: Flying Publisher.

23- Kool JL, Pavlin BI, Musto J, Dawainavesi A. 2013. Influenza surveillance in the Pacific Island countries and territories during the 2009 pandemic: an observational study. BMC Infect Dis 13: 6.

24- Kosik I, Yewdell JW. 2017. Influenza A virus hemagglutinin specific antibodies interfere with virion neuraminidase activity via two distinct mechanisms. Virology 500: 178-183.

25- Krammer F, Palese P. 2013. Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines. Curr Opin Virol 3: 521-530.

26- Luksza M, Lassig M. 2014. A predictive fitness model for influenza. Nature 507: 57-61.

27- Mackenzie KR. 2006. Folding and stability of alpha-helical integral membrane proteins. Chem Rev 106: 1931-1977.

28- Nayak DP, Hui EK, Barman S. 2004. Assembly and budding of influenza virus. Virus Res 106: 147-165.

29- Newman LP, Bhat N, Fleming JA, Neuzil KM. 2018. Global influenza seasonality to inform country-level vaccine programs: An analysis of WHO FluNet influenza surveillance data between 2011 and 2016. PLoS One 13: e0193263.

30- Nishikawa K, Ooi T. 1980. Prediction of the surface-interior diagram of globular proteins by an empirical method. Int J Pept Protein Res 16: 19-32.

31- Otzen D. 2014. Membrane protein folding and stability. Arch Biochem Biophys 564: 262-264.

32- Ouyang Z, Liang J. 2008. Predicting protein folding rates from geometric contact and amino acid sequence. Protein Science : A Publication of the Protein Society 17: 1256-1263.

33- Pace CN, Scholtz JM. 1998. A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. Biophysical Journal 75: 422-427.

34- Pilpel Y, Ben-Tal N, Lancet D. 1999. kPROT: a knowledge-based scale for the propensity of residue orientation in transmembrane segments. Application to membrane protein structure prediction. J Mol Biol 294: 921-935.

35- Schleiff E, Soll J. 2005. Membrane protein insertion: mixing eukaryotic and prokaryotic concepts. EMBO Rep 6: 1023-1027.

36- Su B, Wurtzer S, Rameix-Welti MA, Dwyer D, van der Werf S, Naffakh N, Clavel F, Labrosse B. 2009. Enhancement of the influenza A hemagglutinin (HA)-mediated cell-cell fusion and virus entry by the viral neuraminidase (NA). PLoS One 4: e8495.

37- Wharton SA, Weis W, Skehel JJ, Wiley DC. 1989. Structure, Function, and Antigenicity of the Hemagglutinin of Influenza Virus. Pages 153-173 in Krug RM, ed. The Influenza Viruses. Boston, MA: Springer US.

38- Wimley WC. 2012. Protein folding in membranes. Biochim Biophys Acta 1818: 925-926.

39- Xiong X, McCauley JW, Steinhauer DA. 2014. Receptor binding properties of the influenza virus hemagglutinin as a determinant of host range. Curr Top Microbiol Immunol 385: 63-91.

40- Xu R, McBride R, Nycholat CM, Paulson JC, Wilson IA. 2012. Structural characterization of the hemagglutinin receptor specificity from the 2009 H1N1 influenza pandemic. J Virol 86: 982-990.

41- Yao Y, Li X, Liao B, Huang L, He P, Wang F, Yang J, Sun H, Zhao Y. 2017. Predicting influenza antigenicity from Hemagglutintin sequence data based on a joint random forest method. Sci Rep 7: 1545.

From Folding Pathway of Hemagglutinin to Influenza Prevalence in Iran, A Computational Approach

Hadi-Alijanvand H.

Dept. of Biological Sciences, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan, I.R. of Iran.

Abstract

Influenza virus is one of the most deleterious viruses that threaten human being for years. High deleterious effects of Flu virus root in its proficient epidemic mechanisms. Proficient mechanisms that Influenza virus has utilized are interesting for biologists with various research interests. Hemagglutinin (HA) is introduced as one of important Influenza virus proteins for viral infection cycle and virus pandemic potency. In current study, some structural and physicochemical parameters that describe the folding pathway of HA are studied by computational biophysics approaches for the first time. Presented computations are performed to analyze HA protein from worldwide Flu-positive cases between 2005 and 2016. The noted computations are performed to find possible relation between Flu epidemic in Iran and molecular characteristics of HA. The results of current study suggest that there is a direct relation between the proficiency of HA folding pathway and HA antigenicity and virus epidemic in Iran territory. The results suggest that there is a relation between the changes in HA stability in membrane and its antigenicity. The results of current study may help researchers to develop models for prediction of incoming Flu pandemic and design molecules for targeting influenza pandemic.

Key words: Influenza Virus, Protein Folding, Membrane Protein, Hemagglutinin.