

## بررسی ایمونوفورماتیک لیزین‌های کدشده در باکتریوفازهای موثر بر باکتری‌های جنس

### سودوموناس

اشکان عباسی فرد سمنانی<sup>۱</sup>، شمس الضحی ابوالمعالی<sup>۲</sup>، مهدی صادقی<sup>۲</sup> و شکبیا درویش علیپور آستانه<sup>\*۱</sup>

<sup>۱</sup> ایران، سمنان، دانشگاه سمنان، پردیس علوم و فناوری نوین، دانشکده زیست فناوری

<sup>۲</sup> ایران، سمنان، دانشگاه سمنان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۳۰



#### چکیده

گونه‌های باکتری متعلق به جنس سودوموناس از جمله باکتری‌های فرصت‌طلب بیمارزها هستند که بیشترین عامل عفونت‌های بیمارستانی را شامل می‌شود. با توجه به افزایش مقاومت این گروه از باکتری‌ها در برابر اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها، فازدرمانی و یا استفاده از لیزین فاژ یکی از جایگزین‌های درمان است. هدف از این مطالعه، شناسایی خانواده‌ی باکتریوفازهای موثر بر جنس سودوموناس و ارزیابی مقدار ایمنی‌زایی لیزین این نوع فاژها می‌باشد. در این تحقیق، با استفاده از پایگاه‌های داده بیوانفورماتیک و ایمونوفورماتیک، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خانواده‌های مختلف از فاژهای لیتیک موثر بر جنس سودوموناس، ساختار دوم و سوم لیزین‌های فاژ و میزان القای پاسخ ایمنی سلولی و هومورال میزبان، مورد مطالعه قرار گرفته است. در بین خانواده‌های باکتریوفاز موثر بر باکتری‌های از جنس سودوموناس، سه خانواده سیفوویریده، میوویریده، پودوویریده با جمعیت بیش از ۹۰ درصد، بیشترین فراوانی را نشان داد. همچنین توالی آمینواسیدی اندولیزین هر یک از این سه خانواده، تنها در نیمی از کل اسیدآمینها با امتیاز برابر نصف حدآستانه نرم افزار، دارای خاصیت آنتی‌ژنی برای سلول‌های لئوسیت B و تنها در ۱ درصد اسید آمینه‌ها دارای میل اتصال قوی به مولکول‌های حامل MHC برای آرایه به سلول‌های T بودند. هیچ یک از لیزین‌های مورد مطالعه خاصیت آنتی‌ژنی ندارند. با توجه به نتایج بدست آمده از مقدار ایمنی‌زایی پروتئین‌های لیزین فاژ، آنها می‌توانند جایگزین آنتی‌بیوتیک باشند.

واژه‌های کلیدی: باکتریوفاز، لیزین، ایمونوفورماتیک، سودوموناس آئروجنوزا

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳۳۱۵۳۳۱۹۷، پست الکترونیکی: darvishalipour@semnan.ac.ir

#### مقدمه

دهه، فاژ درمانی برپایه استفاده از فاژهای لیتیک بوده است. استفاده از این فاژها برخلاف فاژهای لیزوژن دارای دو مزیت است. نخست اینکه ژن‌های مربوط به مقاومت‌های آنتی‌بیوتیک القا نمی‌شوند. دوم اینکه بیان سریع ژن‌های مرتبط با مرحله لیتیک فاژ سبب می‌شود که آنزیم‌های محدودکننده باکتریایی توالی مورد نظر خود را شناسایی نکنند (۵،۲). در فازدرمانی از فاژها به صورت منفرد و یا به صورت کوکتل (تاثیر بیشتر) استفاده می‌شود و به دلیل

سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، بدلیل به خطر انداختن سلامت جوامع انسانی درصد فراوانی از عامل مرگ و میرهای بیماری عفونی را به خود اختصاص داده است. از جمله این سویه‌های مقاوم، میتوان به سویه‌های سودوموناس اشاره کرد. با توجه به دامنه وسیع مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک در این سویه‌ها، دانشمندان در پی درمان‌های جایگزین هستند. یکی از این روشها، استفاده از باکتریوفازها و لیزین آنها می‌باشد (۳۷،۳۴،۲۲). در چندین

به نام هولین می‌باشند. هولین‌ها با ایجاد حفره در غشای سلولی سبب خروج اندولیزین‌ها از غشا می‌شود، در نهایت اندولیزین‌ها به پپتیدوگلیکان متصل شده و آن را هیدرولیز می‌کنند (۳۹). تخریب سلول میزبان عمدتاً توسط دو دسته پروتئین عملکردی هولین و لیزین انجام می‌گیرد. هولین‌ها در اواخر مراحل عفونت تولید میشوند و پس از رسیدن به غلظت بحرانی، سوراخ‌هایی در غشای سیتوپلاسمی بوسیله الیگومریزاسیون ایجاد می‌شود و به لیزین که در سیتوپلاسم انباشته است، اجازه می‌دهد تا به گهرمایه PG دسترسی پیدا کنند (۲۷).

مطالعات نشان داده است که لیزین فاژها میتواند برای درمان عفونت باکتریایی، جایگزین آنتی‌بیوتیک شود، لیزین از سطح خارجی، به دیواره باکتری گرم مثبت دسترسی می‌یابد. برای دسترسی به پپتیدوگلیکان باکتری گرم منفی، معمولاً یک شوینده یا آنتی‌بیوتیک موثر بر غشا (پلی‌میکسین) استفاده می‌شود. شوینده غشای خارجی باکتری گرم منفی را تخریب و سپس اندولیزین دیواره باکتری گرم منفی را لیز می‌کند (۵) در برخی موارد آندولیزین‌های موثر بر باکتریهای گرم منفی دارای ساختار آلفا هلیکس با بار مثبت است که براحتی میتواند غشای خارجی باکتری گرم منفی را مورد حمله قرار دهد (۱۲). برخی از آندولیزین‌ها قدرت تخریب بیوفیلم و کپسول باکتری را دارند. بطورمثال لیزین SAL-1 در سرم حاوی یون‌های کلسیم و Poloxamer 188 در برابر باکتری‌های کپسول دار و تشکیل بیوفیلم، در شرایط آزمایشگاهی، فعالیت لیتیک قوی را داراست. علاوه بر آن بسیاری از فاژها هیدرولازهای پلی ساکارییدی به نام دپولیمراز رمزگذاری میکنند که میتوانند ساختار اصلی کپسول از جنس پلی ساکارید را تخریب کنند (۲۹).

برخلاف آنتی بیوتیک‌های ساخته شده شیمیایی، یکی از مزیت‌های اصلی لیزین‌های فاژ در این است که برای مقابله با برخی از عفونت‌های باکتریایی انتخابی عمل میکند و بر

اختصاصی بودن عملکرد فاژ بر روی باکتری‌های پاتوژن، آسیب به میکروفلور روده میزبان کمتر است. استفاده از فاژها به جهت عدم تحریک سیستم ایمنی، غیر سمی بودن و تولید آسان و ارزان، یکی از گزینه‌ها در درمان می‌باشد (۳۰، ۲۴). فاژدرمانی در کشورهای مختلف جهان، از جمله آمریکا و برخی کشورهای اروپایی نظیر لهستان، آلمان و گرجستان به عنوان یک روش جدید در حال انجام است (۱) و از باکتریوفاژهای خانواده سیفویریده، میوویریده، پودوویریده، کورتیکوویریده، پلاسماویریده، لیپوتریکس ویریده، اینوویریده، سیستوویریده و لویویریده برای درمان عفونت‌های سودوموناس آنروجنوزا، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، استرپتوکوکاسه و خانواده انتروباکتریاسه از جمله اشرشیاکلی استفاده می‌شود (۲۵، ۱۹). اندولیزین‌ها که لیزین فاژ نیز نامیده میشوند، هیدرولازهای پپتیدوگلیکان، رمزگذاری شده با فاژ هستند که توسط اکثر باکتریوفاژها تولید می‌شود تا دیواره پپتیدوگلیکان (PG) باکتری میزبان را در انتهای چرخه لیتیک خود تخریب کنند (۲۰). پپتیدوگلیکان‌ها که بخش عمده ساختار دیواره‌ی سلولی باکتری را تشکیل می‌دهند، سلول را در برابر فشار داخل سیتوپلاسمی که حدود ۳ تا ۵ اتمسفر برای باکتری‌های گرم منفی، و ۲۰ تا ۵۰ اتمسفر برای باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد حفظ می‌کند. ایجاد شکاف در پپتیدوگلیکان توسط لیزین‌ها، منجر به خروج مایع سیتوپلاسمی و مرگ سلول می‌شود. در داخل سلول باکتری و زمانی که باکتریوفاژها به سلول حمله می‌کنند، با بیان ژنهای تاخیری باکتریوفاژ یعنی حدود ۸ تا ۱۰ دقیقه پس از شروع عفونت، اندولیزین‌های فاژی تولید می‌شوند و در سلول تجمع پیدا می‌کنند، اما وجود غشای سیتوپلاسمی مانع از دسترسی آنها به پپتیدوگلیکان دیواره سلولی و عملکرد آنزیم می‌شود. زیرا بیشتر اندولیزین‌های فاژی برخلاف اتولیزین‌های باکتریایی فاقد سیگنال پپتیدهای لازم برای عبور از غشای سلولی است و برای عبور از غشای سیتوپلاسمی نیازمند پروتئین فاژی دیگری

مرتبط با جنس *سودوموناس* با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI شناسایی گردید. برای شمارش تعداد گونه‌های فاژ مرتبط از قسمت Taxon در پایگاه NCBI استفاده شد. خانواده، نوع و اندازه مولکول وراثتی هر یک از فاژها به صورت منفرد از NCBI مطالعه شدند.

**بررسی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی لیزین موثر بر جنس *سودوموناس*:** شاخص‌های مختلف فیزیکی-شیمیایی لیزین مانند نقطه ایزوالکتریک، وزن مولکولی، نیمه عمر، شاخص آلفاتیک موثر بر جنس *سودوموناس* با استفاده از ابزار ProtParam در پایگاه EXPASY به نشانی <https://web.expasy.org/protparam/> محاسبه گردید (۱۰).

**بررسی ساختار دوم لیزین های موثر بر جنس *سودوموناس*:** ساختار دوم پروتئین آندولیزین موثر بر جنس *سودوموناس*، شامل ماریچ آلفا (Alpha helix)، صفحات بتا (Beta sheet) و حلقه (Loop) با استفاده از نرم‌افزار Predict protein، ps2، SOPMA نشانی <https://predictprotein.org>، <http://ps2.life.nctu.edu.tw>، <https://npsa-prabi.ibcp.fr> بررسی شدند (۱۱، ۱۵، ۳۱).

**پیشگویی ساختار سوم لیزین موثر بر جنس *سودوموناس*:** تعیین کیفیت و شیمی فضایی ساختار: پیشگویی ساختار سوم پروتئین‌های لیزین موثر بر جنس *سودوموناس* با استفاده از روش مدل‌سازی همولوژی در پایگاه اطلاعاتی Ps2 و Swiss-model به نشانی <http://ps2.life.nctu.edu.tw> و <https://swissmodel.expasy.org> به شکل مقایسه‌ای انجام گرفت، شبیه‌ترین ساختارهای سه بعدی ثبت شده برای توالی آمینواسیدی لیزین‌های انتخاب گردید (۳۵، ۴).

نرم افزار PS2 با استفاده از توالی آمینواسید و ساختار ثانویه پروتئین، ساختار سوم را با روش همولوژی مدلینگ، پیشنهاد می‌دهد و نرم افزار Swiss-model به

فلور طبیعی میزبان تأثیر ندارد (۲۸). با توجه به مزایایی که فاژها در درمان عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک دارند، استفاده از فاژ بعنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک دارای محدودیت‌هایی است. بطورمثال فاژها برای میزبان باکتریایی بسیار اختصاصی هستند و طیف میزبانی محدودی دارند. قبل از استفاده از روش فاژدرمانی باید به نوع سویه باکتریایی که باعث عفونت می‌شوند، توجه کرد. فاژها سیستم ایمنی میزبان را تحریک می‌کنند و ممکن است قبل از اینکه در محل عفونت قرار گیرند، توسط سیستم رتیکولولر آندوتلیال از سیستم گردش خون، حذف شوند. از نگرانی‌های دیگر فاژ درمانی، توانایی بالقوه باکتریوفاژها برای انتقال DNA خود از یک سلول باکتریایی به دیگری است. این ژن می‌تواند مسئول انتقال فاکتورهای بیماریزا به میکروفلور باشد. علاوه بر این، تحت شرایط خاص، فاژهای لیتیک به فاژهای لیزوژنیک تبدیل می‌گردد که این مسئله امکان انتقال عوامل بیماریزا به سایر باکتری‌های میزبان را فراهم می‌آورد. ویژگیهای فارماکوکینتیک فاژها همچون مقدار مطلوب، مسیر تزریق، فراوانی و مدت زمان درمان به خوبی شناخته شده نیست و باید قبل از آزمایشات گسترده بالینی بررسی شود (۵).

در این مطالعه، با توجه به اثر ضد میکروبی باکتریوفاژها و لیزین‌های آنها، ابتدا با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک و ایمونوفورماتیک اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنی سلول‌های B و T پروتئین لیزین شناسایی گردید، در گام بعدی با بررسی ساختار دوم پروتئین لیزین، فراوانی شاخصهای آلفا هلیکس و صفحات بتا برای ارزیابی تجمع پذیری و کانفورماسیون پروتئین مطالعه و در نهایت با پیشگویی ساختار سوم، و میزان مشابهت آن با پروتئین‌های تعیین ساختار شده، مکانیسم عملکرد پروتئین لیزین مطالعه شد.

## مواد و روشها

**شناسایی خانواده‌ی باکتریوفاژهای موثر بر جنس *سودوموناس* از پایگاه اطلاعاتی:** گونه‌های فاژ

دو نرم افزار PROCHCK مندرج در نشانی <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK> مطالعه شد (۴۰).

بررسی ایمنی زایی با مطالعه اپی توپ‌های سطحی ایمنی‌زا برای سلول‌های لنفوسیت B و T: اپی توپ‌های خطی سلول‌های لنفوسیت B از دو پایگاه BCepreds، IEDB به نشانی های [https://webs.iiitd.edu.in/raghava/bcepred/bcepred\\_submission.html](https://webs.iiitd.edu.in/raghava/bcepred/bcepred_submission.html)، <http://tools.iedb.org/bcell/help> مطالعه گردید (۳۲، ۲۱).

برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌ها و قدرت ایمنی‌زایی از پایگاه IEDB از روش Kolaskar و Tongaonkar استفاده شد. در پایگاه BCepreds، هفت ویژگی فیزیکی-شیمیایی شامل آب‌دوستی، انعطاف‌پذیری، تحرک، قابلیت دسترسی، قطبیت، ایمنی‌زایی و سطح در معرض اپی‌توپ‌های خطی سلول B بررسی می‌گردد.

میزان ایمنی‌زایی اپی‌توپ‌ها خطی ارزیابی و برای پیشگویی اپی‌توپ‌های فضایی سلول B در توالی آمینواسیدی، از پایگاه CBTOPE به نشانی <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/cbtope/submit.php> استفاده شد. ورودی این نرم‌افزار، توالی آمینواسید پروتئین و خروجی آن احتمال اپی‌توپ بودن آمینواسیدها در مقیاس عدد ۱-۹ می باشد. این پایگاه توالی اسیدآمینیهایی که امتیاز ۴ به بالا دارند، را به عنوان اپی توپ فضایی در نظر می‌گیرد (۳).

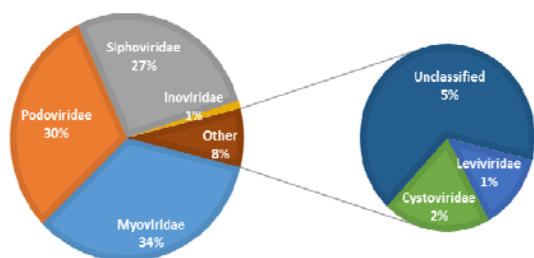
مولکول‌های MHC در عرضه آنتی‌ژن به لنفوسیت T نقش دارند، در شناسایی اپی‌توپ‌ها توسط لنفوسیت T، میل اتصال پتیده‌های متصل شونده به مولکول‌های MHCI و MHCII، از پایگاه IEDB به نشانی <http://tools.iedb.org/mhci> و <http://tools.iedb.org/mhcii> بررسی گردید.

آل‌هایی که توسط Esmaeili و همکارانش در سال ۲۰۱۷ با بیشترین فراوانی در بین آل‌های MHC در جمعیت کشور ایران معرفی شده بودند برای مطالعه انتخاب

مدل‌سازی براساس همولوژی پروتئین با توجه به میزان شباهت توالی‌ها و درصد حفاظت‌شدگی اختصاص دارد. در واقع پیشگویی براساس امتیاز GMQE انجام می شود. این امتیاز در بازه عدد ۰ تا ۱ قرار می‌گیرد. امتیاز هرچه به عدد ۱ نزدیکتر باشد، کیفیت مدل بهتر است. این امتیاز بیانگر دقت مورد انتظار مدل پیشنهاد شده است که با توالی هدف ترازبندی می شود.

کیفیت ساختار سه بعدی پروتئین از پایگاه PROSA به نشانی <https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php> بررسی گردید (۳۹). نرم افزار PROSA با داشتن قابلیت امتیاز دهی به ساختار سوم پروتئین پیشگویی شده کیفیت آن را مورد ارزیابی قرار می‌دهد. این امتیاز که با Z-score تعریف می شود. نشان دهنده کیفیت کلی پروتئین است. اگر این امتیاز خارج از دامنه باشد. احتمالاً ساختار پیشگویی شده صحیح نیست. مقدار این شاخص در نموداری که در بردارنده‌ی همه‌ی پروتئین‌های تعیین ساختار شده در شرایط آزمایشگاه است، نمایش داده می شود. در یک نمودار Z-score ساختارهای مشخص شده با روش‌های متفاوت X-ray و NMR با طیف رنگ‌های متفاوت (ساختارهای کریستالوگرافی شده با اشعه x به رنگ آبی روشن و ساختار تعیین شده با NMR با آبی تیره) از هم متمایز می‌شوند. هر چه Z-score ساختار ورودی برنامه به محدوده Z-score پروتئین‌های کریستالوگرافی شده و یا تعیین ساختار شده به روش NMR نزدیک تر باشد، مدل بهتر و کیفیت بالاتر است. نمودار سبز رنگ کیفیت مدل ورودی را با رسم انرژی برای موقعیت آمینواسیدها نمایش می‌دهد. به طور کلی امتیازهای مثبت، مرتبط با قسمتی از ساختار است که کیفیت پایینی دارند. نمودار رسم شده از ساختار پیشگویی شده، برای هر اسیدآمینیه دارای نوسان است، بنابراین برای کاهش این نوسانات میانگین کیفیت را برای خطوط ضخیم و نازک محاسبه و به صورت نمودار ارائه می‌دهند. شیمی فضایی ساختار سوم پیشگویی شده، با کمک نقشه رامانچاندرا از

پایگاه آنالین NCBI، از بین ۵۲۶ گونه و ۱۶۴۳ اطلاعات ژن ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی، فراوانی خانواده فازهای مرتبط با جنس *سودوموناس* عبارتند از: میوویریده ۳۴٪، پودوویریده ۳۰٪، سیفوویریده ۲۷٪، اینوویریده ۱٪، لویوویریده کمتر از ۱٪، سیستوویریده ۵/۱٪ و فازهای طبقه بندی نشده ۵٪ (شکل ۱).



شکل ۱- فراوانی هر یک از خانواده‌های فاز، موثر بر باکتری جنس *سودوموناس*

خانواده‌های فاز میوویریده، پودوویریده، سیفوویریده، اینوویریده دارای محتوای ژن DNA، سه خانواده میوویریده، پودوویریده، سیفوویریده دارای DNA دو رشته و اینوویریده دارای DNA تک رشته و خانواده سیستوویریده و لویوویریده دارای محتوای ژن RNA میباشند، باکتریوفازهای RNA دارها موثر *سودوموناس آئروجنوزا*، شامل ۲ درصد کل گونه‌های ثبت شده است.

برای بررسی چرخه زندگی فازها ۱۰۰ گونه فاز انتخاب شد که تقریباً از این تعداد ۷۸٪ دارای چرخه لیتیک و ۲۲٪ چرخه معتدل است.

لیزین‌های سه خانواده فاز که دارای بیش از ۹۰٪ فراوانی در گونه‌های فاز موثر بر جنس *سودوموناس* بودند، برای مطالعه بیوانفورماتیک انتخاب گردیدند. لیزین از خانواده میوویریده گونه POR-1 با نام لیزین A، لیزین خانواده پودوویریده گونه gh-1 با نام لیزین B و لیزین خانواده سیفوویریده گونه phi-297 با نام لیزین C نامگذاری شد.

بررسی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی لیزین A، B و C موثر بر باکتری جنس *سودوموناس*: مطالعه ویژگی‌های

گردیدند. آلل‌های HLA-A\*02 - B\*35 از مولکول MHC I و آلل‌های DRB1\*15 و DRB1\*13 از مولکول MHC II به ترتیب با ۲۰ و ۴/۱۶ درصد از مولکول MHC I و فراوانی ۲۰ و ۴/۱۶ درصد از مولکول MHC II دارای بیشترین فراوانی در جمعیت ایران از بین سایر آلل‌ها بودند.

بررسی پپتیدهای متصل شونده لیزین‌های A، B، C به آلل‌های مولکول‌های MHC دارای اهمیت زیادی است. برای بررسی پپتیدهای متصل شونده به مولکول‌های MHC I پیشگویی در پایگاه IEDB به روش ANN4.0 و پپتیدهای متصل شونده به مولکول‌های MHC II در پایگاه IEDB باروش SMM-align انجام گرفت. برای بررسی نواحی پپتیدی متصل شونده به مولکول‌های MHC آلل HLA-A\*02 از مولکول MHC I و آلل DRB1\*15 از مولکول MHC II به دلیل داشتن درصد فراوانی بالاتر انتخاب شدند. سرور IEDB پپتیدهای دارای IC50 کوچکتر از ۵۰ نانومولار دارای میل اتصال قوی به مولکول‌های MHC I و MHC II، و کوچکتر از ۵۰۰ نانومولار میل اتصال متوسط و زیر ۵۰۰۰ نانومولار دارای میل اتصال ضعیف دارا میباشند (۳۸).

پیشگویی توانایی آنتی ژنیسیته لیزین موثر بر جنس *سودوموناس*: برای تعیین درصد آنتی ژنیسیته پروتئین لیزین از نسخه ۲ نرم افزار Vaxijen به آدرس [http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen\\_citation.html](http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen_citation.html) استفاده گردید (۸). از آنجا که در این نرم افزار در مدل‌های ویروسی و باکتریایی در حد آستانه ۵/۰ دارای بیشترین دقت میباشند، لذا حد آستانه ۵/۰ برای بدست آوردن درصد آنتی ژنیسیته انتخاب گردید (۸).

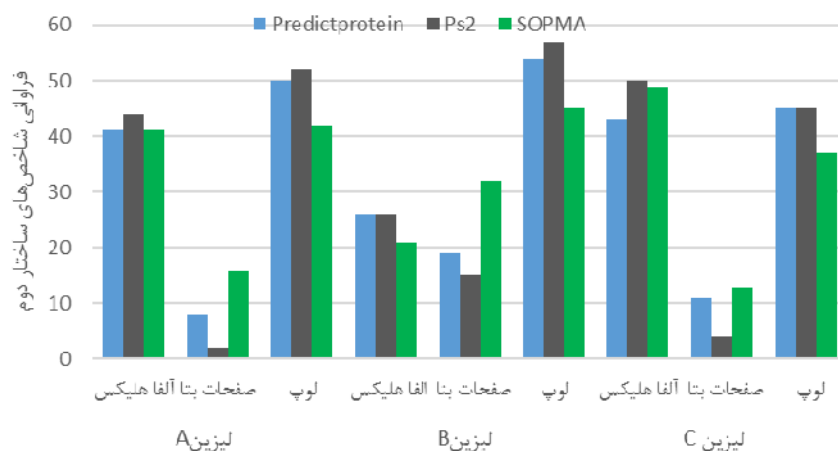
## نتایج

بررسی خانواده و گونه‌های باکتریوفاز موثر بر جنس *سودوموناس*: براساس جستجو در قسمت تاکسونومی در

است که به ترتیب فراوانی ۱۸، ۱۹ و ۱۹ عدد از کل آمینواسیدها را دارد. شاخص آلفاتیک آن معادل ۸۸/۸۷ که با آستانه شاخص ناپایداری ۰/۲۳، این پروتئین نیز پایدار است.

هر سه انزیم با شاخص هیدروپاتی (hydropathicity) منفی به عنوان یک پروتئین غیرقطبی شناخته می‌شود. نیمه عمر هر سه انزیم در میزبان‌های مختلف متفاوت است. به طوریکه در میزبان باکتریایی، مخمر و سلول‌های پستانداران به ترتیب نیمه عمر ۱۰، ۲۰، ۳۰ ساعت دارد.

**بررسی ساختارهای دوم لیزین A، B و C موثر بر جنس سودوموناس:** ساختار دوم لیزین‌های A، B و C موثر بر جنس سودوموناس نشان داد، که بیشترین فراوانی مربوط به ساختار لوپ و آلفا هلیکس است، لازم به ذکر است، نتایج نرم افزارهای predict protein، ps2 در پیشگویی شاخص‌های ساختار دوم (آلفا - هلیکس، صفحات بتا، لوپ) مشابه این نتایج است (شکل ۲).



شکل ۲- پیش بینی شاخص‌های ساختار دوم در لیزین‌های A، B، C

و شباهت ساختار ۴۳ درصد، مدل پیشنهادی لیزین B، هیدرولاز لامبدا /شرشیاکلی، با همترازی ۹۵ درصد، شباهت ساختار ۵۲ درصد، و مدل پیشنهادی لیزین C، گلیکوزیدار لامبدا از /شرشیاکلی با همترازی ۱۰۰ درصد است.

فیزیکوشیمیایی پروتئین به شناخت نوع عملکرد بیولوژی آن کمک میکند، لیزین نوع A دارای وزن مولکولی ۶۹/۱۸۳۹۱ دالتون، فرمول مولکولی  $C_{814}H_{1277}N_{225}O_{253}S_4$  و  $pI=9/8$  است. بیشترین فراوانی آمینواسید در توالی پروتئین، گلايسين و آلانين به ترتیب ۲۱ و ۱۶ عدد از کل آمینواسیدها را تشکیل میدهد. شاخص آلفاتیک آن معادل ۳۶/۷۰ و با آستانه شاخص ناپایداری ۸۴/۲۴، این پروتئین پایدار است.

لیزین B با وزن مولکولی ۱۶۲۵۸/۶۱ دالتون، فرمول مولکولی  $C_{725}H_{1136}N_{21}O_{203}S_5$  و  $pI=4/9$ ، دارای بیشترین فراوانی در اسید آمینه گلايسين و آلانين است که به ترتیب ۱۳ و ۱۲ عدد از کل آمینواسیدها را تشکیل میدهد. شاخص آلفاتیک ۴۹/۸۳، با توجه به آستانه ناپایداری ۹۴/۳۲، بنابراین پروتئین پایدار است.

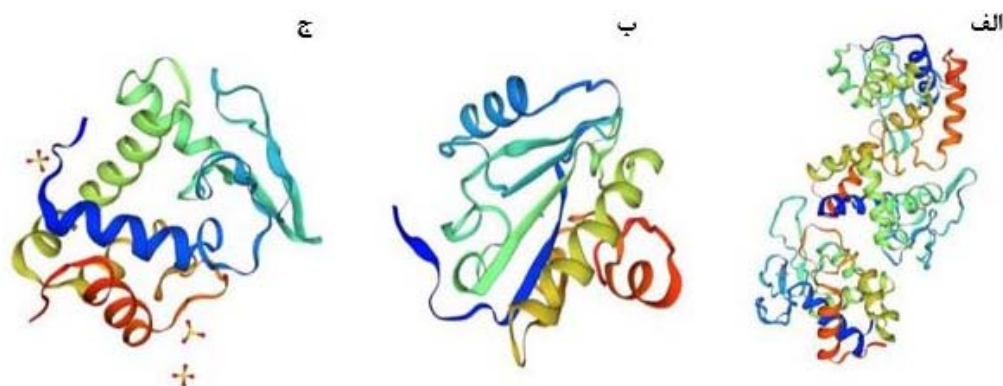
لیزین C دارای وزن مولکولی ۵۸/۱۷۳۷۴ دالتون، فرمول مولکولی  $C_{772}H_{1205}N_{221}O_{231}S_3$  و  $pI=0/9$  بیشترین فراوانی در تعداد اسید آمینه، گلايسين، لوسين و آلانين

پیشگویی ساختار سوم بر اساس روش‌های همولوژی مدلینگ

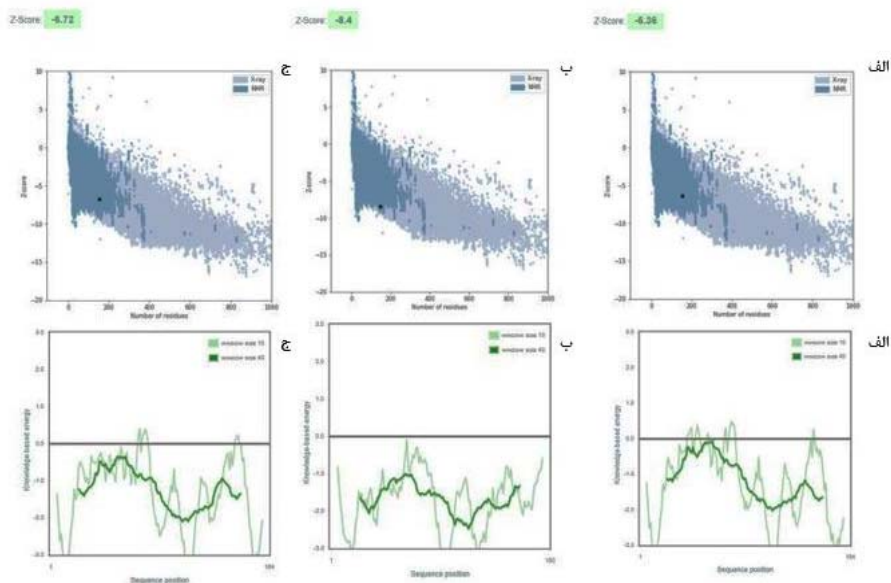
مدل پیشنهادی لیزین A، در نرم افزار PS2: انزیم گلیکوزیدار از فاز لامبدا /شرشیاکلی با همترازی ۹۸ درصد

در ادامه در لیزین A مدل lam7A با داشتن ۴۴ درصد شباهت ساختاری، لیزین B مدل HbaA با داشتن ۵۷ درصد شباهت ساختاری در هر دو نرم افزار swiss-ps2، model و لیزین C مدل Id9uA با داشتن ۵۹ درصد شباهت ساختاری به عنوان بهترین مدل در نرم افزار swiss-model معرفی گردید (شکل ۳).

نرم افزار **SWISS-MODEL**: لیزین A مدل lam7A (هیدرولاز لامبدا فاز آلوده باکتری /شرشیاکلی)، شباهت ساختاری ۴۷ درصد و امتیاز GMQE: ۷۸/۰، لیزین B مدل HbaA (هیدرولاز لامبدا فاز آلوده کننده باکتری /شرشیاکلی) با شباهت ساختار ۵۳ درصد و امتیاز GMQE: ۷۸/۰ و در لیزین C مدل Id9uA (هیدرولاز لامبدا فاز آلوده کننده باکتری /شرشیاکلی) با شباهت ساختار ۵۹ درصد و امتیاز GMQE: ۷۹/۰ معرفی شد.



شکل ۳- الف، ب، ج) بهترین ساختارهای سه بعدی انتخاب شده برای لیزین A، B، C از بین هر دو نرم افزار ps2، swiss-model

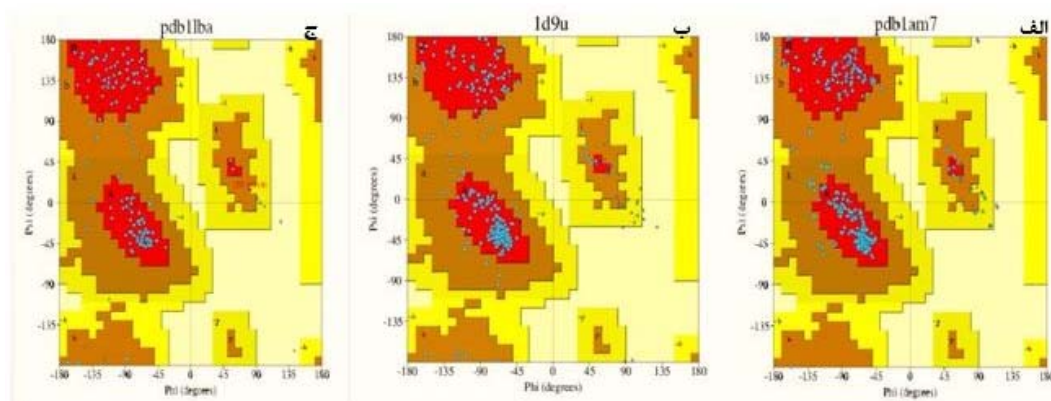


شکل ۴- ارزیابی کیفیت ساختار سوم پیشگویی شده برای لیزین های A، B، C موثر بر باکتریهای از جنس سودوموناس توسط نرم افزار PROSA در محدوده پروتئین‌های کریستالوگرافی شده و تعیین توالی شده با روش رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (NMR)

هرسه نمودار دارای کمترین درصد خطا در کیفیت ساختار تعیین شده است (شکل ۴).

تعیین کیفیت توسط نرم افزار PROCHECK: پایداری مدل‌های پیشگویی شده با نقشه رامچاندمان در پایگاه PROCHECK بررسی شد و درصد اسیدآمینها در نواحی مطلوبترین (Most favoured regions)، مجاز فرعی (Additional allowed region)، مجاز سخاوتمدانه (Generously allowed regions) و غیرمجاز (Disallowed regions) برای الگوی پیشنهادی 1am7A از لیزین A با استفاده از سرور PROCHECK به ترتیب ۲/۹۱، ۸/۸، ۰، ۰ درصد، الگوی 1lbaA از لیزین B به ترتیب ۷/۸۶، ۵/۱۲، ۸/۰، ۰ درصد و برای الگوی پیشنهادی 1d9uA از لیزین C به ترتیب ۱/۸۷، ۹/۱۲، ۰، ۰ درصد پیشگویی گردید (شکل ۵).

تعیین کیفیت ساختارهای سوم پیشگویی شده توسط نرم افزار PROSA: بهترین الگوهای ساختاری در پایگاه PROSA برای لیزین A الگوی 1am7A به عنوان مدل انتخابی با  $Z\text{-score} = -6/36$ ، لیزین B الگوی 1lbaA به عنوان بهترین مدل، با کیفیت  $Z\text{-score} = -8/4$  و الگوی 1d9uA بهترین مدل انتخابی لیزین C، با کیفیت  $Z\text{-score} = -6/72$  مشخص گردید (شکل ۳). ساختار سوم پیشگویی شده لیزین‌های A، B و C در محدوده پروتئین‌های کریستالوگرافی و تعیین توالی شده با کمک رزونانس مغناطیسی هسته ای (NMR) بود و همچنین با توجه به اینکه منفی تر بودن این شاخص نشان از کیفیت بیشتر ساختار سوم است. الگوی لیزین B از کیفیت بالاتری بر اساس امتیاز بندی نرم افزار برخوردار است. پس از آن به ترتیب لیزین C و A بر اساس معیار امتیازدهی کیفیت نرم افزار قرار دارند. داشتن بیشترین تراکم در محدوده منفی در



شکل ۵- نقشه رامچاندردان نرم افزار PROCHECK هر نقطه آبی رنگ نشان دهنده‌ی یک اسید آمینه در نواحی قرمز (مطلوب)، نارنجی (مجاز فرعی)، زرد (مجاز سخاوتمدانه)، کرم (غیرمجاز) است. الف) شیمی فضایی اسیدآمین‌های ساختار سه بعدی لیزین A، ب) شیمی فضایی اسیدآمین‌های ساختار سه بعدی لیزین C، ج) شیمی فضایی اسیدآمین‌های ساختار سه بعدی لیزین B

امتیاز ۸/۱ مشخص شد. در لیزین A تنها ۷ درصد از آمینواسیدها، در لیزین B، ۶ درصد از آمینواسیدها و در لیزین C، ۸ درصد از آمینواسیدها به عنوان نواحی اپی‌توپ معرفی گردید (جدول ۱).

بررسی اپی‌توپ‌های ایمنی‌زا برای لئوسیت B: اپی-توپ خطی و اپی-توپ‌های فضایی به شرح زیر است: در پایگاه Bcepred نواحی از توالی آمینواسیدی که دارای امتیاز بالاتر از حدآستانه نرم افزار بودند، به عنوان نواحی اپی‌توپ معرفی گردید. در این نرم افزار حدآستانه نرم افزار



جدول ۱- بررسی اپی‌توپ‌های خطی لیزین‌های A, B و C با استفاده از پایگاه Bcepred

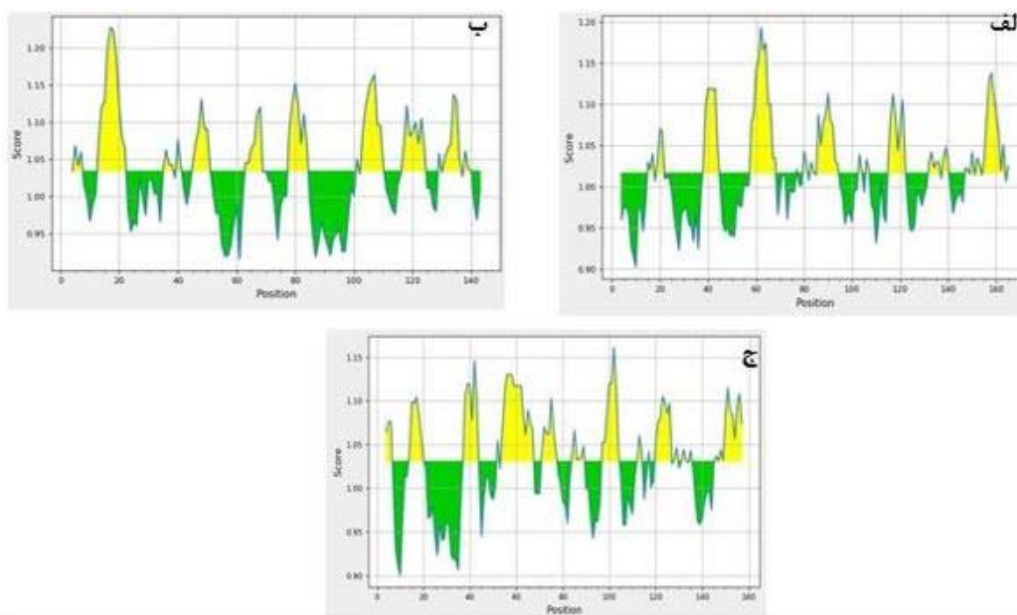
نوع لیزین	توالی اپی‌توپ خطی منتخب	مکان آمینواسیدی	پایگاه
لیزین A	DVIVS .PGVLVQVR ,T	۴۳-۳۹, ۶۶-۵۹, ۹۰	Bcepred
لیزین B	IV .YHFV .GS ,L ,H ,F	۱۶-۱۵, ۵۰-۴۷, ۶۸-۶۷, ۱۰۶, ۱۲۳, ۱۳۵	Bcepred
لیزین C	NVV .GG .LKVYLPRY ,L ,C	۴۰-۳۸, ۴۳-۴۲, ۶۲-۵۵, ۷۵, ۱۲۶	Bcepred

قدرت ایمنی‌زایی را دارد. در لیزین C از بین ۷ اپی‌توپ شناسایی شده، پپتید ۷ آمینواسیدی از توالی شماره ۳۷ تا ۴۳ با امتیاز ۱۱۹/۱ و توالی ۸ آمینواسیدی (۹۷-۱۰۴) دارای امتیاز ۲/۱ به عنوان بهترین اپی‌توپ در این لیزین معرفی می‌شود (شکل ۶).

بر اساس نتایج بدست آمده از پایگاه CBTOPE در لیزین A تنها ۱ درصد، لیزین B، ۶ درصد و لیزین C، ۱۱ درصد از آمینواسیدها به عنوان اپی‌توپ فضایی معرفی گردید (جدول ۲).

در پایگاه IEDB شناسایی اپی‌توپ بر اساس روش Tongaonkar و Kolaskar بررسی گردید. حد آستانه این روش برابر شاخص عددی ۰.۱۷/۱ است. ۵ پپتید دارای شاخص بالاتر از حد آستانه نرم افزار، به عنوان نواحی اپی-توپ لیزین A، هستند که پپتید دارای توالی ۸ آمینواسیدی (۶۷-۵۹) دارای بالاترین قدرت ایمنی‌زایی و امتیاز ۱۷۰/۱ است.

در لیزین B، ۷ پپتید دارای شاخص بالاتر از حد آستانه نرم-افزار است، پپتید ۱۳ آمینواسید (آمینواسیدی ۱۱-۲۳) با بالاترین امتیاز ۱۷۲/۱ بین پپتیدهای این مجموعه بالاترین



شکل ۶- پیش بینی مناطق دارای اپی‌توپ در لیزین‌های فاژی A, B, C

جدول ۲- بررسی اپی‌توپ‌های فضایی لیزین‌های A, B و C با استفاده از پایگاه CBTOPE

نوع لیزین	پپتید اپی‌توپ فضایی منتخب	مکان آمینواسیدی	پایگاه
لیزین A	LP ,G	۱۳۸-۱۳۷, ۱۶۳	CBTOPE
لیزین B	VRE .YH .FV .N .QIVG	۳۲-۲۹, ۴۸-۴۷, ۷۰-۶۹, ۹۵, ۱۲۲-۱۱۹	CBTOPE
لیزین C	VS ,LA .STI ,P ,KV ,SLALKGGF ,QDL	۵-۴, ۱۶-۱۴, ۳۱-۲۸, ۵۳, ۵۷-۵۶, ۹۲-۸۵, ۹۹-۹۷	CBTOPE

کافی انتخاب گردید. هریک از لیزین‌ها دارای توانایی آنتی‌ژن‌سیسته کمی می‌باشند و تنها ۱/۰ و ۰۱/۰ با حد آستانه نرم افزار اختلاف دارند. همچنین مقدار آنتی‌ژن‌سیسته لیزین C کمتر از لیزین A و B می‌باشند.

### بحث

با گسترش ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، روش‌های جایگزین از جمله فازدرمانی علیه عفونت جنس سودوموناس مورد توجه است (۲۱)، نتایج مطالعات بیوانفورماتیک از ساختار لیزین‌فازهای موثر بر جنس سودوموناس، نشان داد که بیشتر از ۹۰٪ گونه‌های فاز در سه گروه میوویریده، سیفوویریده، پودوویریده قرار گرفتند. در سال ۲۰۱۵ P.Pires و همکاران گزارش کردند که ۱۳۷ فاز بر علیه جنس سودوموناس در پایگاه‌های داده NCBI وجود دارد که حدود ۲/۹۴ درصد متعلق به راسته کادوویروس‌ها، شامل سه خانواده میوویریده، سیفوویریده، پودوویریده هستند، ۱٪ متعلق به خانواده اینوویریده، ۱٪ متعلق به خانواده لویوویریده و ۲٪ متعلق به خانواده سیستوویریده است که ۸ مورد در آن زمان تعیین توالی نشد (۲۳). شاخص آلفاتیک با درصد بالای اسید آمینه‌های آلفاتیک (آلانین، گلايسين، لوسين) ارتباط دارد که احتمالاً سبب پایداری پروتئین در بازه دمایی وسیع می‌شود (۱۴). بنابراین لیزین C نسبت به لیزین A و B پایداری بیشتری دارد. دومین فاکتور در بررسی ویژگی بیوشیمیایی، شاخص متوسط هیدروپاتی برای شناسایی میزان قطبیت مولکول است، بطوریکه دارا بودن امتیاز منفی، یک پروتئین غیرقطبی را معرفی می‌کند. بنابراین لیزین A خاصیت غیرقطبی بیشتری دارد (۱۵). در ساختار دوم پروتئین‌های لیزین A، B، C نسبت هلیکس از صفحات بتا بیشتر است که سبب تاخوردگی و پایداری بهتر پروتئین می‌گردد (۳۶). همچنین در تحقیقی که در سال ۲۰۱۹ توسط Santos و همکاران گزارش شد، لیزین PlyPI23 موثر بر باکتری جنس پانی باسیلوس دارای ساختار هلیکس بیشتری نسبت

پیش‌گویی اپی توپ‌های لنفوسیت T: در بررسی پپتیدهای متصل شونده به مولکول MHC I در لیزین A، آلل HLA-A\*02 از ۱۵۹ پپتید دارای توالی ۱۰ آمینواسید، ۱ پپتید از شماره توالی آمینواسید ۱۵۱-۱۶۰ دارای میل اتصال قوی و بقیه پپتیدها دارای اتصال ضعیف به مولکول MHC I برای عرضه به سلول‌های T بودند. در لیزین B از ۱۳۷ پپتید دارای توالی ۱۰ آمینواسید، ۱ پپتید از شماره توالی آمینواسید ۵۱-۴۲ دارای میل اتصال قوی و ۱ پپتید دارای اتصال متوسط و بقیه پپتیدها دارای اتصال ضعیف به مولکول MHC I برای عرضه به سلول‌های T بودند. در لیزین C از ۱۵۱ پپتید دارای توالی ۱۰ آمینواسید، ۱ پپتید از شماره توالی آمینواسید ۱۴۴-۱۵۳ دارای میل اتصال قوی و ۴ پپتید دارای اتصال متوسط و بقیه پپتیدها دارای اتصال ضعیف به مولکول MHC I برای عرضه به سلول‌های T بودند.

در بررسی پپتیدهای متصل شونده به مولکول MHC II در لیزین A از ۱۵۴ پپتید دارای توالی ۱۵ آمینواسید، ۱۷ پپتید دارای میل اتصال متوسط و بقیه پپتیدها دارای اتصال ضعیف به مولکول MHC II برای عرضه به سلول‌های T بودند. در لیزین B از ۱۳۲ پپتید دارای توالی ۱۵ آمینواسید، ۳۰ پپتید دارای میل اتصال متوسط و بقیه پپتیدها دارای اتصال ضعیف به مولکول MHC II برای عرضه به سلول‌های T بودند. در لیزین C از ۱۴۶ پپتید دارای توالی ۱۵ آمینواسید، ۲۴ پپتید دارای میل اتصال متوسط و بقیه پپتیدها دارای اتصال ضعیف به مولکول MHC II برای عرضه به سلول‌های T بودند.

پیش‌گویی توانایی آنتی‌ژن‌سیسته لیزین موثر بر جنس سودوموناس: بر اساس نتایج به دست آمده از نرم افزار، توانایی آنتی‌ژن‌سیسته برای لیزین A عدد ۰/۶، برای لیزین B عدد ۰/۶ و برای لیزین C عدد ۵۱/۰ می‌باشد. با توجه به اینکه حد آستانه نرم افزار ۵/۰ تا ۱ می‌باشد. و در این مطالعه حد آستانه ۵/۰ به عنوان حد آستانه بهینه با دقت

به صفحات بتا است. این مطالعه هم می‌تواند خاصیت تجمعی بودن پروتئین‌های لیزین را نقص کند (۳۳).

مدل‌های پیشگویی ساختار سوم برای لیزین‌های A و C مدل 1am7A و 1d9uA به ترتیب متعلق به پروتئین گلیکوزید هیدرولازها و مدل پیشگویی شده 1lbaA از لیزین B متعلق به آمیلازها، دارای ۷۰٪ حفاظت شدگی به همراه دومین‌های پروتئین‌های این خانواده (گلیکوزید هیدرولازها، آمیلازها) است (۱۸، ۹، ۶). در ارزیابی کیفیت مدل مورد نظر از نقشه رامچاندرا استفاده شد. زوایای چرخش phi و psi برای تمامی آمینواسیدهای ساختاری در محور Y و X قابل مشاهده است. زاویه phi چرخش را حول باندها N-C alpha اسید آمینه نشان می‌دهد. در حالیکه زاویه psi چرخش را حول باندها C-C alpha مشخص می‌کند. با توجه به تاخوردگی (folding) پلی‌پپتیدها، زوایای phi و psi وابسته به نوع زنجیره جانبی اسید آمینه در محدوده چرخش ۱۸۰- تا ۱۸۰+ درجه قرار می‌گیرند. ترکیباتی که اتم‌ها فاصله نزدیکتری از مجموع شعاع واندروالسی را دارند، نواحی غیرمجاز را می‌سازند، قرارگیری در این نواحی برای همه‌ی اسید آمینه‌ها به غیر از گلايسين از نظر برخورد فضایی ممکن نیست. گلايسين به علت نداشتن زنجیره جانبی محدودیت سایر اسید آمینه‌ها را ندارد و در تمامی نقاط نقشه به ویژه نواحی مخصوص دور، در ساختار دوم که برای سایرین ممنوع است، می‌تواند قرار بگیرد. مکان اسید آمینه‌ها در نقشه حاصل از پایگاه PROCHECK با علامت مثلث و مربع قابل تشخیص است. درصد باقیمانده در ناحیه مطلوب راهنمای خوبی جهت ارزیابی کیفیت استرئوشیمیایی ساختار است و با توجه به قرارگیری درصد بالای ۸۵٪ اسید آمینه‌ها، در ناحیه مطلوب مدل‌های انتخابی برای لیزین‌های A، B، C از کیفیت بالایی برخوردار می‌باشند. بنابراین داروهای پروتئینی، سبب القای پاسخ ایمنی میزبان نسبت به این داروها می‌شود. مطالعه بالینی Rashed و همکاران در سال ۲۰۰۷ مشخص نمود که بعد از تزریق، پروتئین

لیزین سبب تولید آنتی بادی و پاسخ ایمنی در بدن میزبان می‌شود. ولی هیچ گونه مهارتی در عملکرد لیزین ایجاد نمی‌کند و سبب هیچ گونه علائم حساسیت زا در بدن حیوان نمی‌شود (۲۶). در طراحی هر دارو با توجه به ماهیت عملکرد آن شناخت نواحی اپی‌توپ و میزان تحریک سیستم ایمنی توسط این نواحی و همچنین مهندسی نواحی اپی‌تویی به منظور رسیدن به سطح ایمنی‌زایی کمتر حائز اهمیت است (۷). توانایی شناسایی اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن توسط سلول‌های ایمنی و القای پاسخ ایمنی برای طراحی دارو می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. روش‌های ایمونوفورماتیکی علاوه بر روش‌های *in vitro* و *in vivo* در شناسایی نواحی اپی‌توپ آنتی ژن سلول‌های B و سلول‌های T موثر است (۱۳، ۱۶).

روش koslar و Tangaonkar در سال ۱۹۹۰، مقیاسی از ترکیب هیدروفوبیسیت، انعطاف پذیری و دسترسی سطحی ارائه می‌نماید. این مقیاس به نام تمایل ذاتی ایمنی‌زایی، نامگذاری و بعنوان استاندارد طلایی در پیشگویی اپی‌توپ معرفی شد که دقت آن ۷۵ درصد می‌باشد (۱۷). اپی‌توپ‌های شناسایی شده برای سلول‌های B، شامل ۱۲/۵ درصد از کل توالی آمینواسیدهای لیزین در این خانواده است. در تمام پایگاه‌های بررسی شده (BCepreds، IEDB) اپی‌توپ‌های پیشنهاد شده برای سلول‌های B دارای امتیاز کمتر از نصف میانگین بودند. عبارت دیگر خاصیت ایمنی‌زایی این پروتئین ضعیف است. از مجموع اپی‌توپ‌های پیشنهاد شده برای اتصال به مولکول MHCII از ۱۵۰ اپی‌توپ رایج شده برای نرم افزار تنها ۳ اپی‌توپ برای لیزین‌های A، B، C دارای میل اتصال متوسط و بالا به مولکول‌های MHCII و سایر اپی‌توپ‌های رایج شده دارای میل اتصال کم بودند. با توجه به اتصال ضعیف بیش از ۹۸ درصد از اپی‌توپ‌های ارائه شده به گیرنده MHCII، امکان انتخاب لیزین، برای استفاده به عنوان دارو افزایش می‌یابد.

## منابع

- 1- Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., & Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1(2), 66-85.
- 2- Altamirano, F. L. G., & Barr, J. J. (2019). Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical microbiology reviews*, 32(2).
- 3- Ansari, H. R., & Raghava, G. P. (2010). Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immunome research*, 6(1), 1-9.
- 4- Chen, C. C., Hwang, J. K., & Yang, J. M. (2006). 2: protein structure prediction server. *Nucleic acids research*, 34(suppl\_2), W152-W157.
- 5- Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L., & Yuan, Z. (2014). Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry?. *Frontiers in microbiology*, 5, 217.
- 6- Cheng, X., Zhang, X., Pflugrath, J. W., & Studier, F. W. (1994). The structure of bacteriophage T7 lysozyme, a zinc amidase and an inhibitor of T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(9), 4034-4038.
- 7- Dingman, R., & Balu-Iyer, S. V. (2019). Immunogenicity of protein pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical sciences*, 108(5), 1637-1654.
- 8- Doytchinova, I. A., & Flower, D. R. (2008). Bioinformatic approach for identifying parasite and fungal candidate subunit vaccines. *Open Vaccine J*, 1(1), 4.
- 9- Evrard, C., Fastrez, J., & Declercq, J. P. (1998). Crystal structure of the lysozyme from bacteriophage lambda and its relationship with V and C-type lysozymes. *Journal of molecular biology*, 276(1), 151-164.
- 10- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids research*, 31(13), 3784-3788.
- 11- Geourjon, C., & Deleage, G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Bioinformatics*, 1(6), 681-684.
- 12- Ghose, C., & Euler, C. W. (2020). Gram-negative bacterial lysins. *Antibiotics*, 9(2), 74.
- 13- Heffernan, R., Paliwal, K., Lyons, J., Dehzangi, A., Sharma, A., Wang, J., ... & Zhou, Y. (2015). Improving prediction of secondary structure, local backbone angles and solvent accessible surface area of proteins by iterative deep learning. *Scientific reports*, 5(1), 1-11.
- 14- Jalili-Manesh, M., Haddad-Mashadrizheh, A., Makhdoumi, Ali., Housaindokht, M.R. (2019). Assessment of structural and functional properties of Xpt complex protein to develop molecular approach in design of novel generation of pesticide. *Molecular and Cellular Researches*, 32(2), 216-224.
- 15- Jawa, V., Cousens, L. P., Awwad, M., Wakshull, E., Kropshofer, H., & De Groot, A. S. (2013). T-cell dependent immunogenicity of protein therapeutics: preclinical assessment and mitigation. *Clinical immunology*, 149(3), 534-555.
- 16- Khalili S., Jahangiri A., Amani J. & Salmanian A.H. (2014). Bioinformatics application in studying of immunology. *Molecular and Cellular Researches*, 27(2), 192-210.
- 17- Kolaskar, A. S., & Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS letters*, 276(1-2), 172-174.
- 18- Leung, A. K. W., Duetzel, H. S., Honek, J. F., & Berghuis, A. M. (2001). Crystal structure of the lytic transglycosylase from bacteriophage lambda in complex with hexa-N-acetylchitohexaose. *Biochemistry*, 40(19), 5665-5673.
- 19- Lin, D. M., Koskella, B., & Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*, 8(3), 162.
- 20- Matamp, N., & Bhat, S. G. (2019). Phage endolysins as potential antimicrobials against multidrug resistant *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*: current status of research and challenges ahead. *Microorganisms*, 7(3), 84.
- 21- Melo, L. D., Oliveira, H., Pires, D. P., Dabrowska, K., & Azeredo, J. (2020). Phage therapy efficacy: a review of the last 10 years of preclinical studies. *Critical reviews in microbiology*, 46(1), 78-99.
- 22- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in

- Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology advances*, 37(1), 177-192.
- 23- Pires, D. P., Boas, D. V., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2015). Phage therapy: a step forward in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Journal of virology*, 89(15), 7449-7456.
- 24- Principi, N., Silvestri, E., & Esposito, S. (2019). Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections. *Frontiers in pharmacology*, 10, 513.
- 25- Qadir, Muhammad Imran. "Phage Therapy: a modern tool to control bacterial infections." *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* 28.1 (2015).
- 26- Rashed, M., Uchiyama, J., Ujihara, T., Uehara, Y., Kuramoto, S., Sugihara, S., ... & Matsuzaki, S. (2007). Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage  $\phi$ MR11. *The Journal of infectious diseases*, 196(8), 1237-1247.
- 27- Reuter, M., & Kruger, D. H. (2020). Approaches to optimize therapeutic bacteriophage and bacteriophage-derived products to combat bacterial infections. *Virus genes*, 56(2), 136-149.
- 28- Rios, A. C., Moutinho, C. G., Pinto, F. C., Del Fiol, F. S., Jozala, A., Chaud, M. V., ... & Balcão, V. M. (2016). Alternatives to overcoming bacterial resistances: state-of-the-art. *Microbiological Research*, 191, 51-80.
- 29- Roach, D. R., & Donovan, D. M. (2015). Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage*, 5(3), e1062590.
- 30- Romero-Calle, D., Guimarães Benevides, R., Góes-Neto, A., & Billington, C. (2019). Bacteriophages as alternatives to antibiotics in clinical care. *Antibiotics*, 8(3), 138.
- 31- Rost, B., Yachdav, G., & Liu, J. (2004). The Predict Protein server *Nucleic Acids Res. The Predict Protein server Nucleic Acids Res.*, 32.
- 32- Saha, S., & Raghava, G. P. S. (2004, September). BcePred: prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. In *International Conference on Artificial Immune Systems* (pp. 197-204). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 33- Santos, S. B., Oliveira, A., Melo, L. D., & Azeredo, J. (2019). Identification of the first endolysin Cell Binding Domain (CBD) targeting *Paenibacillus larvae*. *Scientific reports*, 9(1), 1-9.
- 34- Schmelcher, M., Donovan, D. M., & Loessner, M. J. (2012). Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future microbiology*, 7(10), 1147-1171.
- 35- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic acids research*, 31(13), 3381-3385.
- 36- Shivu, B., Seshadri, S., Li, J., Oberg, K. A., Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2013). Distinct  $\beta$ -sheet structure in protein aggregates determined by ATR-FTIR spectroscopy. *Biochemistry*, 52(31), 5176-5183.
- 37- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and therapeutics*, 40(4), 277.
- 38- Vita, R., Overton, J. A., Greenbaum, J. A., Ponomarenko, J., Clark, J. D., Cantrell, J. R., ... & Peters, B. (2015). The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic acids research*, 43(D1), D405-D412.
- 39- Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic acids research*, 35(suppl\_2), W407-W410.
- 40- Wlodawer, A. (2017). Stereochemistry and validation of macromolecular structures. *Protein Crystallography*, 595-610.
- 41- Young, R. Y., Wang, N., & Roof, W. D. (2000). Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends in microbiology*, 8(3), 120-128.

## Immunoinformatics study of encoded lysines in bacteriophages effective on *Pseudomonas* genus bacteria

AbbasifardSemnani A.,<sup>1</sup> Abolmaali Sh.,<sup>2</sup> Sadeghi M.<sup>2</sup> and DarvishAlipourAstaneh Sh.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. for Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Semnan University, Semnan, I.R. of Iran.

<sup>2</sup>Dept. for Biology, Faculty of Basic Science, Semnan University, Semnan, I.R. of Iran.

### Abstract

The genus *Pseudomonas* are considered as one of the most opportunistic and pathogenic microbes. Due to its high resistance to antibiotics, this bacterium has also encouraged the researchers to introduce alternative therapies, including phage therapy. Identification of the anti-Pseudomonadaceae phages and the evaluation of the lysine immunogenicity are considered here.

The physio-chemical features of the family of phages affecting the genus *Pseudomonas* was investigated using bioinformatic and immunoinformatic databases. The secondary and tertiary structures of the lysines and the capacity of antigenicity in the host cells were determined. The results showed that the three bacteriophage families; Siphoviridae, Myoviridae, and Podoviridae, with more than 90% abundance had the highest frequency among the bacteriophage families affecting the genus *Pseudomonas*. The lysine sequences showed immunity in only half of the total amino acids with a numerical value of half of the threshold for B cells. 1% of amino acids had a strong affinity for MHC molecules those subjected to T cells. Due to the low induction of the immune response by phage lysine, they can be a candidate as alternative therapies for antibiotic resistance.

**Key words:** Bacteriophage, lysine, immunoinformatics, *Pseudomonas* infections