



Study of Structural and Immunological Properties of Glycoprotein S of the East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Hasanshahi Z.¹ MSc,
Dehghani B.¹ PhD,
Hashempour T.^{*1} PhD

How to cite this article

Hasanshahi Z, Dehghani B, Hashempour T. Study of Structural and Immunological Properties of Glycoprotein S of the East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV). Pathobiology Research. 2020;23(1):33-39.

¹Shiraz HIV/AIDS Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

*Correspondence

Address: Shiraz HIV/AIDS Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Lavan Street, Shiraz, Iran.
Postal Code: 7165944753.
Phone: +98 (71) 37386272
Fax: +98 (71) 37386272
thashem@sums.ac.ir

Article History

Received: December 25, 2019
Accepted: June 04, 2020
ePublished: June 22, 2020

ABSTRACT

Aims No definitive treatment or effective vaccine has been suggested against the East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) virus which indicates the growing importance of the study of this virus. Amongst all MERS proteins, glycoprotein S has always been the main candidate for vaccine research against this virus, due to its function and structure. The aim of the present study was to investigate the structural, functional, and immunological properties of S protein using bioinformatics software that paves the way for designing an effective vaccine against this virus.

Materials & Methods 35 glycoprotein S sequences of MERS were obtained from Genbank and amino acid changes were investigated. In addition, sequences were analyzed by various software for post-translational changes. Five types of software were used to evaluate the immunologic and allergenic properties. Finally, different structural aspects of this protein were predicted by SOPMA software.

Findings The highest prevalence substitutions were found in amino acids of 95, 123, and 696 and the results indicate that there are four B-cell epitopes in glycoprotein S, and this protein has been affected by post-translational changes, including glycosylation and phosphorylation. This protein has no allergenic properties and the majority of its structure contains Alpha helix.

Conclusion Glycoprotein S, especially in the RBD region of S1, has a high potential to induce the host immune system and the other features mentioned protein make it appropriate for the production of recombinant protein, including stability in host cells. Therefore, the use of glycoprotein S, especially S1, is recommended as a suitable candidate for vaccine design.

Keywords Glycoprotein S; MERS; RBD

CITATION LINKS

[1] Isolation of a novel coronavirus from a man ... [2] Preliminary epidemiological assessment ... [3] A decade after SARS: Strategies for controlling ... [4] Middle East respiratory ... [5] Unraveling the mysteries of Middle East ... [6] Middle East respiratory syndrome ... [7] Reverse genetics with a full-length infectious ... [8] Evolutionary dynamics of MERS-CoV ... [9] The receptor binding domain of the new Middle East ... [10] The spike protein of SARS-CoV-a target ... [11] Middle East respiratory syndrome ... [12] Receptor recognition mechanisms ... [13] Structure of SARS coronavirus spike ... [14] Structure of MERS-CoV spike ... [15] Cryo-EM structures of MERS-CoV ... [16] Designing of complex multi-epitope ... [17] Functional and structural characterization ... [18] In silico functional and structural ... [19] Immunogenicity, antigenicity and epitope mapping ... [20] Association of mutations in the NS5A-PKRBD ... [21] HIV capsid and protease, new targets ... [22] The possible regions to design Human ... [23] Evaluating drug resistant mutations ... [24] Bioinformatics analysis of domain ... [25] Using immunoinformatics and ... [26] Antibody development to HCV alternate reading ... [27] Interaction of human herpesvirus 8 viral ... [28] Immunogenicity of candidate MERS-CoV ... [29] An optimised method for the production of MERS ... [30] In silico analysis of several signal peptides ... [31] MERS-CoV spike protein: A key ... [32] MERS-CoV Genetic analysis of the SARS-coronavirus ... [33] Receptor usage and cell entry of bat coronavirus ... [34] Computer aided prediction and identification of ... [35] Identification of human neutralizing antibodies ... [36] In silico prediction of a novel ...

بررسی خواص ساختاری و ایمنی‌زایی گلیکوپروتئین S و ویروس نشانگان تنفسی خاورمیانه (مرس)

زهرا حسن‌شاهی MSc

مرکز تحقیقات ایدز شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

بهزاد دهقانی PhD

مرکز تحقیقات ایدز شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

طیبه هاشم‌پور* PhD

مرکز تحقیقات ایدز شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

چکیده

اهداف: هنوز درمان قطعی و یا واکسن موثری علیه ویروس مرس ارایه نشده که این امر نشان‌دهنده اهمیت روزافزون مطالعه این ویروس است. در میان پروتئین‌های این ویروس گلیکوپروتئین S به علت عملکرد و ساختار آن همواره به‌عنوان یک کاندید اصلی برای تحقیقات واکسن علیه آن مطرح بوده است. هدف مطالعه حاضر نیز بررسی ساختار، عملکرد و خواص ایمنی‌زایی پروتئین S با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی است که نتایج آن می‌تواند راه را برای طراحی واکسنی موثر علیه این ویروس هموار سازد.

مواد و روش‌ها: ۳۵ توالی گلیکوپروتئین S ویروس مرس از بانک ژنی دریافت و تغییرات در سطح اسیدآمینینه بررسی شد. علاوه بر این توالی‌ها با نرم‌افزارهای متعددی برای بررسی تغییرات پس ترجمه‌ای مورد آنالیز قرار گرفتند. از نرم‌افزارهای متعددی برای بررسی خواص ایمنی‌زایی و آلرژیک پروتئین استفاده شد و درنهایت ساختار این پروتئین با استفاده از نرم‌افزار SOPMA مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بیشترین تغییرات در اسیدآمینینه‌های ۹۵، ۱۲۳ و ۶۹۶ نشان داده شد و نتایج نشان‌دهنده وجود چهار اپی‌توپ سلول B در گلیکوپروتئین S بود. همچنین تغییرات پس از ترجمه‌ای از جمله گلیکوزیلاسیون و فسفوریلاسیون در مناطق متعددی یافت شد. این پروتئین فاقد خاصیت آلرژیک بود و قسمت اعظم آن از مارپیچ آلفا تشکیل شده است.

نتیجه‌گیری: گلیکوپروتئین S مخصوصاً در منطقه RBD ناحیه S1 دارای قابلیت بالایی برای تحریک سیستم ایمنی میزبان است و همچنین تمام ویژگی‌ها برای ساخت یک پروتئین نوترکیب از جمله پایداری در سلول‌های میزبان را دارد. استفاده از گلیکوپروتئین S، به‌ویژه ناحیه S1، به‌عنوان کاندید مناسبی برای طراحی واکسن پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: گلیکوپروتئین S، مرس، RBD

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۱۵

*نویسنده مسئول: thashem@sums.ac.ir

مقدمه

سندروم تنفسی خاورمیانه، نوعی بیماری تنفسی ویروسی است که توسط یک عضو از جنس کوروناویروس ایجاد می‌شود و اولین بار در سال ۲۰۱۲ در عربستان سعودی شناسایی شد. بیشتر موارد عفونت‌های این ویروس از عربستان سعودی و کره جنوبی و پس از آن از امارات متحده عربی، اردن و قطر گزارش شده است [1]. همچنین موارد اندکی نیز در عمان، مصر، فرانسه، آلمان، تونس، ایتالیا، الجزایر، ایران، هلند، یونان، کویت، لبنان، مالزی، فیلیپین،

یمن، اتریش، ترکیه، انگلستان و ایالات متحده مشاهده شده است.

این ویروس به‌آسانی از شخصی به شخص دیگر منتقل نمی‌شود، مگر اینکه تماس نزدیکی وجود داشته باشد. برخلاف اکثر کوروناویروس‌های شناخته‌شده دیگر، ویروس مرس (MERS-CoV) باعث التهاب دستگاه تنفسی فوقانی می‌شود و سپس دستگاه تنفسی تحتانی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و در بیشتر موارد منجر به آسیب ریوی کشنده و مرگ می‌شود. متوسط دوره کمون بیماری، حدود ۷-۵ روز (با دامنه ۱۱-۲ روز) است [2]. علایم شایع مرس غیراختصاصی هستند، ولی علامت اصلی و اولیه شامل تب است و در حدود ۵ روز پس از آن، علایم عفونت تنفسی حاد ظاهر می‌شود. هیچ داروی اختصاصی و تاییدشده‌ای برای عفونت کوروناویروس مرس وجود ندارد و رویکرد درمانی، بیشتر حمایتی است [3, 4].

خفاش یکی از مخازن اصلی این ویروس است و از طرفی تماس مستقیم بین انسان و خفاش‌ها محدود است. بنابراین، اغلب یک گونه میزبانی حد واسط نقشی را در انتقال ویروس‌های نوظهور از خفاش‌ها به انسان بازی می‌کند. مسیر انتقال از حیوانات به انسان به‌طور کامل مشخص نیست، اما احتمالاً شتر یک میزبان و مخزن اصلی برای کوروناویروس مرس و یک منبع حیوانی این ویروس است [5].

کوروناویروس مرس، ظاهری کروی دارد و دارای زواید گرممانندی به طول ۲۱ نانومتر است که از سطح ویروئین بیرون زده‌اند. تاکنون، چهار جنس از کوروناویروس‌ها به نام‌های آلفا، بتا، گاما و دلتا شناسایی شده‌اند که کوروناویروس مرس در جنس بتا قرار گرفته است [6].

کوروناویروس مرس دارای ژنوم بزرگی از جنس ریونوکلتوئید و متشکل از ۱۱ قالب خواندن (ORF) است [7]. در انتهای ۵' این ژنوم، دو قالب خواندن همپوشان به نام‌های ORF1a و ORF1b، دو پلی‌پروتئین را کد می‌کنند که حاصل برش این پلی‌پروتئین‌ها، دوازده پروتئین غیرساختمانی است. سکانس ژنوم کاملی که از شتر آلوده و انسان آلوده به این ویروس گرفته شد یکسان بودند. نتایج نشان می‌دهد که ویروسی که از شتر به انسان انتقال می‌یابد بسیار کشنده‌تر و وخیم‌تر از ویروسی است که از انسان به انسان دیگر منتقل می‌شود.

پروتئین ساختمانی شامل چهار پروتئین اسپایک (S)، پوششی (E)، غشا (M) و نوکلئوکپسید (N) و پروتئین‌های فرعی شامل پنج پروتئین ORF3، ORF4a، ORF4b، ORF5، ORF8b است که در پایین‌دست ORF1ab قرار گرفته‌اند [8]. به‌منظور ورود ویروس به داخل سلول میزبان، پروتئین اسپایک به گیرنده سلولی دی‌پتیدیل‌پپتیداز (DPP4) که به نام CD26 نیز شناخته می‌شود متصل می‌شود [9].

گلیکوپروتئین S ویروس مرس یکی از اجزای تعیین‌کننده بیماری‌زایی این ویروس، اتصال ویروس به بافت و تعیین‌کننده

ATG84767.1, ATG84778.1, ATG84789.1
 ATG84800.1, ATG84811.1, ATG84822.1
 ATG84833.1, ATG84844.1, ATG84855.1 است. تمام
 توالی‌ها در سال ۲۰۱۷ در بانک ژنی ثبت شده‌اند که از منطقه
 خاورمیانه هستند. توالی‌ها از بانک ژنی NCBI استخراج شدند و
 سپس برای ویرایش و بررسی وجود موتاسیون‌ها از نرم‌افزار CLC-
 sequence viewer استفاده شد.

مشخصات فیزیکی و شیمیایی و تغییرات پس از ترجمه

نقطه ایزو الکتریک (PI) پروتئین، پایداری آن در برابر حرارت،
 پایداری در لوله آزمایش و پایداری در بدن یک موجود زنده و
 همچنین آبدوستی و آب‌گریزی تمام توالی‌ها با نرم‌افزار
 Protparam ([http://expasy.org/
 tools/protparam.html](http://expasy.org/tools/protparam.html)) پیش‌بینی شدند [22, 23]. همچنین
 جایگاه‌های پیوند دی‌سولفید با استفاده از نرم‌افزار DiANNA
 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>)
 پیش‌بینی شدند. به‌منظور پیش‌بینی جایگاه‌های فسفوریلاسیون از
 سایت‌های DISPHOS و NetPhos و برای پیش‌بینی جایگاه‌های
 N- گلیکوزیلاسیون از سایت‌های NetNGlyc و GlycoEP
 استفاده شد.

بررسی خواص ایمنی‌زایی و آلرژیک

از نرم‌افزارهای Antibody epitope prediction, ABCpred و
 BCE pred برای بررسی اپی‌توپ‌های سلول B و از نرم‌افزار
 algpred برای بررسی خواص آلرژیک استفاده شد. همچنین
 نرم‌افزار Vaxijen برای بررسی خواص آنتی‌ژنیک گلیکوپروتئین S
 به کار گرفته شد [24, 25].

پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین

برای پیش‌بینی ساختار دوم از نرم‌افزار SOPMA
 ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-
 bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html))
 استفاده شد [26, 27].

یافته‌ها

برای توالی اسیدآمینه‌ای توالی‌های مورد بررسی در مقایسه با
 توالی مرجع، جایگزینی‌های متعددی یافت شد که در میان آنها
 بیشترین فراوانی جایگزینی در جایگاه‌های T95 I, A123S,
 R1179S, V1150A, L588 I, G372A, S200Y, M696 I
 و T1216I رخ داده است (جدول ۱).

نتایج آنالیز خواص فیزیکی و شیمیایی پروتئین S نشان داد که
 این پروتئین حاوی ۱۳۵۳ اسیدآمینه با وزن تقریبی
 ۱۴۹۳۶۸ دالتون است. با توجه به اینکه PI این پروتئین حدود
 ۵/۷ بود می‌توان نتیجه گرفت که یک پروتئین اسیدی است.
 همچنین نتایج تخمین نیمه‌عمر نشان داد که این پروتئین در
 پستانداران بیش از ۳۰ ساعت، در مخمر بیش از ۲۰ ساعت و در
 باکتری *E. coli* بیش از ۱۰ ساعت پایدار است. شاخص ناپایداری
 تعیین‌کننده پایداری پروتئین در لوله آزمایش است که این

نوع میزان این ویروس است [10]. این پروتئین به‌صورت تریمر
 روی پوشش ویروس مرس وجود دارد که نقش مهمی در اتصال به
 گیرنده، ادغام غشا و همچنین تشکیل سینسیتیا دارد. علاوه بر
 این آنتی‌بادی اغلب علیه این پروتئین در بدن میزان ساخته
 می‌شود [11-13].

در مطالعات متعددی که بر روی ساختار گلیکوپروتئین S انجام
 شده است، ناحیه‌های مختلف ساختاری و عملکردی متعددی از
 جمله S1 و S2 شناخته شده‌اند. S1 نقش اتصال به سلول هدف
 را بازی می‌کند و S2 بیشتر در ادغام دو غشا نقش دارد. یکی از
 مناطق مهم در ناحیه S1 ناحیه دومین اتصال به گیرنده یا RBD
 است که نقش اصلی را در اتصال به گیرنده بازی می‌کند و
 همچنین تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی عمده‌تاً مربوط
 به این ناحیه است [9, 14, 15].

در سال‌های اخیر مطالعات متعددی روی طراحی واکسنی موثر
 علیه ویروس مرس انجام شده است. هرچند موفقیت‌هایی در
 مدل‌های حیوانی حاصل شده اما هنوز واکسن تاییدشده‌ای علیه
 این ویروس ساخته نشده است. با توجه به اهمیت گلیکوپروتئین
 S در تمام مراحل بیماری‌زایی این ویروس، این پروتئین همواره
 به‌عنوان کاندید اصلی برای طراحی واکسن مطرح بوده است و
 مطالعات گذشته توانایی این پروتئین را برای تحریک سیستم و
 تولید آنتی‌بادی علیه این پروتئین تایید کرده‌اند.

در سال‌های اخیر نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی نقش موثری در
 پیش‌بینی و تحلیل فرآیندهای بیولوژیک ارایه داده‌اند که در حوزه
 ویروس‌شناسی مخصوصاً طراحی واکسن‌های نو ترکیب این نقش
 پررنگ‌تر بوده است [16-21]. با توجه به اهمیت طراحی واکسن علیه
 ویروس مرس، هدف مطالعه حاضر، بررسی خصوصیت‌های فیزیکی
 و شیمیایی، خواص ایمنولوژیک، بررسی‌های تغییرات ژنومی و
 همچنین تعیین ساختار این پروتئین با استفاده از نرم‌افزارهای
 بیوانفورماتیکی است. نتایج این مطالعه می‌تواند در طراحی
 واکسن نقش مهمی داشته باشد و همچنین درک بهتر و
 عمیق‌تری از گلیکوپروتئین S ارایه دهد.

مواد و روش‌ها

تجزیه و تحلیل توالی

در مطالعه حاضر، ۳۵ توالی گلیکوپروتئین S ویروس مرس بررسی
 شده است که شامل ATG84866.1, ATG84877.1,
 ATG84888.1, ATG84899.1, ATG84910.1,
 ATG84921.1, ANF29173.1, ANF29228.1, ANF29195.1,
 ANF29239.1, ANF29206.1, ANF29261.1,
 ANF29217.1, ANF29162.1, ANF29272.1,
 ANF29250.1, ANF29184.1, ATG84690.1,
 ATG84679.1, NC_019843.3, ATG84723.1,
 ATG84712.1, ATG84701.1, ATG84756.1,
 ATG84745.1, ATG84734.1

جدول ۲) جایگاه‌های فسفوریلاسیون در پروتئین S با استفاده از دو سایت NETPHOS و DISPHOS

نوع اسیدآمینه	جایگاه اتصال
سیرین	۱۷، ۲۵، ۵۱، ۱۳۳، ۲۲۴، ۲۲۷، ۲۹۴، ۲۹۹، ۳۰۵، ۳۵۰، ۳۶۲، ۳۶۴
	۳۷۳، ۴۱۹، ۴۲۹، ۴۵۱، ۴۶۵، ۵۰۸، ۵۶۶، ۶۶۰، ۶۸۷، ۶۹۲، ۷۹۵، ۷۹۷، ۸۰۲، ۸۰۳، ۸۰۵، ۸۰۶، ۸۰۷، ۸۰۹، ۸۱۳، ۸۱۴، ۸۸۰، ۸۸۵
	۹۱۹، ۱۰۴۸، ۱۰۵۰، ۱۰۸۹، ۱۱۱۱، ۱۱۱۴، ۱۱۸۵، ۱۱۸۵، ۱۱۹۰، ۱۲۴۵، ۱۲۷۹
	۱۳، ۳۸، ۱۳۹، ۲۸۹، ۵۳۳، ۶۹۳، ۷۰۳، ۷۰۹، ۷۴۶، ۱۰۱۰، ۱۰۱۴، ۱۰۷۶، ۱۰۷۷
تریونین	۱۸، ۸۵، ۲۰۱، ۲۰۷، ۲۱۹، ۲۷۰، ۳۳۲، ۳۶۱، ۳۷۴، ۳۹۹، ۵۴۰، ۶۸۹
تیروزین	۷۰۴، ۸۰۹، ۹۰۵، ۹۰۹، ۹۴۷، ۱۱۸۶، ۱۲۰۴، ۱۲۱۱، ۱۲۸۰، ۱۲۹۸

شاخص برای پروتئین S حدود ۳۶/۶ بود که پایداری مناسب در شرایط آزمایشگاهی را نشان داد. شاخص آلفاتیک معرف پایداری پروتئین‌های مورد بررسی در دماهای بالا است که این شاخص برای پروتئین مورد نظر حدود ۸۲/۷ بود که مبین پایداری آن در برابر حرارت است. با توجه به شاخص آب‌دوستی و آب‌گریزی پروتئین می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین S یک پروتئین آب‌دوست است. بررسی تاثیر موتاسیون‌های یافت‌شده در توالی‌های مورد بررسی نشان داد این موتاسیون‌ها تاثیر چندانی بر شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی این پروتئین ندارند (جدول ۱). در همه توالی‌های بررسی‌شده جایگاه‌های فسفریله‌شدن اسیدآمینه‌های سیرین، تریونین و تیروزین از طریق سایت‌های NETPHOS و DISPHOS شد (جدول ۲).

نتایج نشان‌دهنده تعداد متعددی از جایگاه‌های فسفوریلاسیون بود که قسمت بیشتری از آنها به اسیدآمینه سیرین تعلق داشت. با مقایسه این جایگاه‌ها و نتایج بررسی تغییرات اسیدهای آمینه‌ای نتیجه‌گیری شد که این مناطق جزء مناطق محافظت‌شده هستند و می‌توانند نقش مهمی در ساختار و عملکرد پروتئین داشته باشند. بررسی جایگاه‌های اتصال قند به پروتئین با استفاده از نرم‌افزارهای NETGLYCO و GLYCOEP نشان‌دهنده ۱۸ جایگاه اتصال قند (۶۶، ۱۰۴، ۱۲۵، ۲۲۲، ۲۳۶، ۲۴۴، ۴۱۰، ۴۷۵، ۴۸۹، ۵۹۲، ۶۱۹، ۷۱۹، ۸۷۰، ۱۲۲۵، ۱۱۶۰، ۱۱۷۶، ۱۲۷۷ و ۱۲۸۸) به پروتئین بود که مقایسه این مناطق با موتاسیون‌ها نشان داد که این مناطق کاملاً محافظت‌شده هستند.

نتایج سایت‌های SCRATCH و DiANNA نشان‌دهنده ۱۵ پیوند دی‌سولفید در ساختار پروتئین S شامل ۳-۵۸۵-۷۳۶، ۸۱۷-۸۰۶-۹۲۵، ۹۱۲-۹۱۱۷، ۱۱۰۶-۱۱۱۷، ۱۱۵۶-۱۱۶۴، ۱۳۱۳-۱۳۱۹، ۱۳۳۶-۱۳۰۳، ۱۳۳-۳۴۹، ۱۳۳۷-۱۳۳۷، ۱۳۲۰-۲۱۴، ۱۳۳۷-۱۳۳۷، ۳۳۹ و ۳۸۳-۴۰۷ بود که می‌تواند اهمیت این اتصال در ساختار این پروتئین را نشان دهد. همچنین هیچ جهشی در جایگاه‌های ایجادکننده پیوندهای دی‌سولفید وجود نداشت که نشان داد این مناطق، مناطق محافظت‌شده با اهمیت زیاد در ساختار و عملکرد ویروس هستند.

نتایج نرم‌افزار SOPMA نشان داد که به‌صورت کلی گلیکوپروتئین S شامل ساختار مارپیچ آلفا (۶۲/۳۵٪)، پیچ تصادفی یا Random coil (۳۴/۸۹٪)، رشته ممتد یا Extended strand (۲۱/۳۶٪) و صفحات بتا (۸/۱۳٪) بود.

با استفاده از سه نرم‌افزار معرفی‌شده توالی‌ها از نظر وجود اپی‌توپ‌ها بررسی شدند و نتایج نهایی که حاصل جمع‌بندی نتایج هر کدام از نرم‌افزارها بود نشان‌دهنده چهار ناحیه اپی‌تویی (۲۲۵-۲۱۲، ۳۷۵-۳۶۵، ۵۸۵-۵۷۴ و ۷۰۴-۶۶۰) در پروتئین S بود.

نتایج بررسی خواص آلرژنی پروتئین S با استفاده از تمام روش‌های معرفی‌شده توسط نرم‌افزار AlgPred نشان داد که این پروتئین فاقد خواص آلرژنی است. همچنین نتایج بررسی خواص

جدول ۱) موتاسیون‌های مشاهده‌شده در سطح اسیدآمینه‌های توالی‌های بررسی‌شده به همراه فراوانی آنها

فراوانی	جایگاه‌های اسیدآمینه
۱	I 529 T
۳	L 588 I
۴	M 696 I
۱	P 710 H
۱	Q 733 R
۱	Q 792 H
۱	Q 914 H
۱	Q 1031 H
۳	V 1150 A
۱	A 1159 V
۳	R 1179 S
۱	R 1179 M
۳	T 1216 I
۱	G 1250 S
۱	L 1267 S
۱	I 1317 T
۹	T 95 I
۱	P 97 S
۴	A 123 S
۱	R 163 L
۳	S 200 Y
۱	T 206 I
۱	T 212 I
۱	F 228 L
۱	I 300 T
۱	I 303 F
۳	G 372 A
۱	E 379 D
۱	T 424 I
۱	S 426 R
۲	F 473 S
۱	D 509 G
۱	D 509 H

آنتی‌ژنی با استفاده از نرم‌افزار Vaxijen نشان داد که این پروتئین می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌ژن قوی مطرح شود.

بحث و نتیجه‌گیری

تهدید دایمی سندروم تنفسی در خاورمیانه اهمیت توسعه درمان‌های ضدویروسی موثر را برای جلوگیری و درمان عفونت MERS-CoV نشان می‌دهد. پروتئین S به‌عنوان یک پروتئین سطحی با اتصال به گیرنده سلولی DPP4 باعث اتصال به سلول میزبان و در نهایت ادغام دو غشا می‌شود. این پروتئین همواره به‌عنوان کاندیدای ساخت واکسن و همچنین هدفی برای داروهایی ضدویروسی مورد توجه محققین در سراسر دنیا بوده است. مطالعات متعددی نشان‌دهنده اهمیت دو ناحیه از این پروتئین به‌عنوان هدف‌های درمانی شامل ناحیه متصل‌شونده به گیرنده (RBD) و ناحیه تکراری هفت‌تایی ۱ (HR1) بوده اند. هرچند هنوز هیچ راهکار درمانی تاییدشده‌ای برای این ویروس وجود ندارد، آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده و همچنین پپتیدهای ضدویروسی متعددی علیه این پروتئین معرفی شده‌اند که قابلیت توسعه و تبدیل شدن به روشی برای مهار این ویروس را دارند. نتایج بررسی مشخصات فیزیکی و شیمیایی پروتئین S ویروس مرس نشان داد که این پروتئین دارای خاصیت اسیدی است. لامری و همکاران و گریهان و همکاران توانستند این پروتئین را در سلول‌های میزبان بیان کنند و پایداری این پروتئین را در شرایط آزمایشگاهی نشان دهند که نتایج این مطالعه نیز حاکی از پایداری این پروتئین در شرایط آزمایشگاهی (در سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی) بود [28, 29]. در میان میزبان‌های مورد بررسی هر سه میزبان (سلول پستانداران، مخمر و باکتری *E. coli*) نیمه‌عمر بسیار مناسبی را نشان دادند که تاییدکننده قابلیت هر سه میزبان در بیان این پروتئین است. هرچند با توجه به اینکه پروتئین S یک گلیکوپروتئین است و فرآیندهای پس از ترجمه‌ای تاثیر چشم‌گیری بر ویژگی‌های ساختاری و عملکردی آن دارند، سلول‌های پستانداران و مخمر می‌توانند میزبان‌های بهتری برای بیان این پروتئین باشند [30].

به‌صورت کلی آنتی‌بادی‌هایی که به ناحیه RBD متصل می‌شوند قابلیت بالاتری برای مهار ویروس نسبت به آنتی‌بادی‌هایی که به دیگر مناطق متصل می‌شوند دارند. جهش‌هایی که باعث فرار ویروس از سیستم ایمنی می‌شود و از طرفی محدودیت‌های آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده، لزوم شناسایی دیگر مناطق ویروس با قابلیت تحریک سیستم ایمنی برای تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده را نشان می‌دهد که مهندسی آنها برای افزایش کارایی واکسن و کاهش هزینه‌ها ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه بررسی جهش‌ها با مقایسه با سکانس مرجع (NC_019843.3) نشان داد که اغلب جهش‌ها در دومین S1 اتفاق افتاده‌اند و همچنین فراوانی جهش‌های موجود در این منطقه بیشتر از فراوانی آنها در دومین S2 است. در دومین S1 هفت موتاسیون از

بین کل موتاسیون‌ها در ناحیه RBD اتفاق افتاده‌اند. وانگ و همکاران جایگاه‌های مهم برای پیوند دی‌سولفید (۳۸۳، ۴۳۷، ۴۷۸، ۴۲۵، ۴۰۷ و ۵۸۵ را تعیین کردند که در تشکیل ساختار ساب دومین RBD بسیار ضروری هستند [14].

دو و همکاران نیز ۶ جایگاه مهم برای پیوندهای دی‌سولفید (۳۷۷، ۳۷۹، ۵۸۵، ۵۸۸ و ۵۸۶) را در ساختار پروتئین S مشخص کردند و نشان دادند که وجود این جایگاه‌ها و ایجاد پیوند دی‌سولفید بین آنها نقش بسیار مهمی در تشکیل ساختار سوم و عملکرد این پروتئین دارد [31]. در مطالعه حاضر نیز مناطق متعددی برای تشکیل پیوند دی‌سولفید یافت شد که در دو ناحیه S1 و S2 به‌صورت یکنواخت وجود دارند و اهمیت این نوع پیوند را در تشکیل ساختار سوم و نهایی این پروتئین نشان می‌دهد.

مطالعات متعددی تاثیر گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های پوششی را بر قدرت ویروس‌ها برای فرار از سیستم ایمنی میزبان تایید کرده‌اند. در مطالعه‌ای که توسط یان و همکاران با استفاده از روش cryo-EM صورت گرفت نشان داده شد که این پروتئین دارای ۱۰ جایگاه برای اتصال N-link است، هرچند به‌صورت تئوری این پروتئین ۲۵ جایگاه اتصال به قندها دارد [15]. نتایج مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعه یان و همکاران نشان‌دهنده وجود ۱۸ جایگاه مشترک است که به نظر می‌رسد تحت تاثیر فرآیند گلیکوزیلاسیون قرار داشته باشند که از این میان ۱۵ جایگاه در دومین S1 قرار دارند و تاییدکننده این امر هستند که این ناحیه بیشتر تحت تاثیر این فرآیند پس از ترجمه‌ای قرار می‌گیرد و در نتیجه در فرآیند فرار از سیستم ایمنی نقش موثرتری دارد.

بتیت و همکاران در مطالعه‌ای بررسی تاثیر فسفوزیلاسیون گلیکوپروتئین S را نشان دادند که این فرآیند در بیان این پروتئین در سطح سلولی و همچنین فرآیند اتصال دو غشا در طول بیماری‌زایی نقش موثری ندارد ولی می‌تواند نقش مهمی در پایداری غشای این ویروس ایفا کند [32]. نتایج مطالعه حاضر نیز در تایید مطالعات گذشته نشان‌دهنده جایگاه‌های متعددی برای فرآیند فسفوزیلاسیون پروتئین S است که قسمت اعظم آن در ناحیه S1 قرار دارد و همچنین منطقه RBD در این ناحیه نیز دارای تعداد زیادی سرین، ترونین و تیروزین است که پتانسیل بالایی برای اتصال گروه‌های فسفات دارند.

یانگ و همکاران با روش وسترن‌بلاتینگ ناحیه‌ای را در ساختار پروتئین S مشخص کردند که محل اصلی اتصال آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده بود [33]. در مطالعه‌ای دیگر، با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی ۱۲ اپی‌توپ سلول B تعیین شدند که در مقایسه با مطالعه حاضر چندین منطقه مشابه یافت شدند [34]. وانگ و همکاران نشان دادند که در میان سه منطقه ۳۵۸-۳۵۱، ۳۴۹-۳۴۹ و ۳۴۹-۳۴۹ در پروتئین S ویروس مرس، منطقه ۳۴۹-۳۴۹ توانایی اتصال بالاتری به آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده دارد که این منطقه دقیقاً منطقه‌ی RBD پروتئین S است که مشابه با نتایج مطالعه حاضر، نشان می‌دهد که منطقه RBD یکی از مناطقی است که

روش‌شناسی/پژوهشگر کمکی (۳۰٪)؛ طیبه هاشم‌پور (نویسنده سوم)، تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۰٪)
منابع مالی: مطالعه حاضر با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شیراز (طرح مصوب به شماره ۱۳۹۶-۰۱-۲۱-۱۵۲۳۸) انجام شد.

منابع

- 1- Zaki AM, Van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *New Engl J Med*. 2012;367(19):1814-20.
- 2- Cowling BJ, Park M, Fang VJ, Wu P, Leung GM, Wu JT. Preliminary epidemiological assessment of MERS-CoV outbreak in South Korea, May to June 2015. *Eurosurveillance*. 2015;20(25):21163.
- 3- Graham RL, Donaldson EF, Baric RS. A decade after SARS: Strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(12):836-48.
- 4- Zumla A, Hui DS, Perlman S. Middle East respiratory syndrome. *Lancet*. 2015;386(9997):995-1007.
- 5- Watson JT, Hall AJ, Erdman DD, Swerdlow DL, Gerber SI. Unraveling the mysteries of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(6):1054-6.
- 6- Mohd HA, Al-Tawfiq JA, Memish ZA. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) origin and animal reservoir. *Virol J*. 2016;13(1):87.
- 7- Scobey T, Yount BL, Sims AC, Donaldson EF, Agnihothram SS, Menachery VD, et al. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(40):16157-62.
- 8- Zhang Z, Shen L, Gu X. Evolutionary dynamics of MERS-CoV: potential recombination, positive selection and transmission. *Sci Rep*. 2016;6(1):25049.
- 9- Mou H, Raj VS, Van Kuppeveld FJ, Rottier PJ, Haagmans BL, Bosch BJ. The receptor binding domain of the new Middle East respiratory syndrome coronavirus maps to a 231-residue region in the spike protein that efficiently elicits neutralizing antibodies. *J Virol*. 2013;87(16):9379-83.
- 10- Du L, He Y, Zhou Y, Liu Sh, Zheng BJ, Jiang S. The spike protein of SARS-CoV-a target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(3):226-36.
- 11- Xia Sh, Liu Q, Wang Q, Sun Z, Su Sh, Du L, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) entry inhibitors targeting spike protein. *Virus Res*. 2014;194:200-10.
- 12- Li F. Receptor recognition mechanisms of coronaviruses: A decade of structural studies. *J Virol*. 2015;89(4):1954-64.
- 13- Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science*. 2005;309(5742):1864-8.
- 14- Wang N, Shi X, Jiang L, Zhang S, Wang D, Tong P, et al. Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Res*. 2013;23(8):986-93.
- 15- Yuan Y, Cao D, Zhang Y, Ma J, Qi J, Wang Q, et al. Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. *Nat Commun*. 2017;8(1):15092.
- 16- Farhadi T, Nezafat N, Ghasemi Y, Karimi Z, Hemmati Sh, Erfani N. Designing of complex multi-epitope peptide

دارای اپی‌توپ‌های سلول B است [35].

بدوی و همکاران با استفاده از روش آنالیز بیوانفورماتیک توانستند دو ناحیه مهم برای اپی‌توپ‌های سلول B تعیین کنند که این دو ناحیه از اسیدآمین ۳۹۱ تا ۳۹۷ و همچنین از اسیدآمین ۷۴۵ تا ۷۵۴ هستند [36]. مناطق مطرح‌شده در این مطالعه با مناطق تعیین‌شده در مطالعه حاضر تفاوت دارند که می‌تواند به علت تفاوت سکانس‌های مورد استفاده در دو مطالعه باشد.

با توجه به نتایج حاصل از بررسی اپی‌توپ‌های سلول B، تمام مناطق در ناحیه S1 قرار دارند و همچنین دو اپی‌توپ از چهار اپی‌توپ یافت‌شده در منطقه RBD قرار دارند. این یافته‌ها موید اهمیت این ناحیه در اتصال آنتی‌بادی‌های مهارکننده و همچنین اهمیت آن برای تحقیقات آتی در جهت طراحی واکسن علیه این ویروس است.

بررسی خواص آلرژیک این پروتئین نشان داد که فاقد پتانسیل ایجاد واکنش‌های آلرژیک در بدن است و از این نظر می‌تواند گزینه مناسبی برای تولید واکسن و استفاده از آن در بدن انسان باشد. همچنین نتایج VaxiJen که نرم‌افزاری برای تعیین خاصیت آنتی‌ژنیک پروتئین‌ها است و امتیاز بالای هر پروتئین در این نرم‌افزار نشان‌دهنده قابلیت آن برای استفاده در واکسن‌های نو ترکیب است، نشان داد که این پروتئین دارای قابلیت آنتی‌ژنیک و مورد مناسبی برای مطالعات تهیه واکسن است.

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که پروتئین S ویروس مرس از چند نظر می‌تواند یک کاندید مناسب برای طراحی واکسن باشد. از جمله این موارد در نظر گرفتن وجود اپی‌توپ‌های سلول B است که تعداد قابل توجهی اپی‌توپ با قابلیت بالا برای تحریک سیستم ایمنی را دارد که در ساخت واکسن‌های نو ترکیب از اهمیت بالایی برخوردار است. به‌علاوه این پروتئین دارای پایداری مناسب در تمام میزبان‌های مطرح در زمینه تولید پروتئین‌های نو ترکیب است. علی‌رغم وجود موتاسیون‌ها در ساختار این پروتئین، این موتاسیون‌ها تاثیر چندانی بر خواص ایمنی‌زایی و همچنین فرآیندهای پس از ترجمه‌ای ندارند بنابراین متغیر بودن سکانس این ژن که جزء ذات این ویروس است مانعی برای ایمنی‌زایی و در نظر گرفتن در ترکیب واکسن نیست. در مجموع اهمیت ناحیه RBD چه از نظر ایمنی‌زایی و چه از نظر فرآیندهای پس از ترجمه‌ای غیر قابل انکار است که می‌تواند به‌تنهایی کاندید مناسبی برای یک واکسن نو ترکیب در تحقیقات آتی مدنظر باشد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از مسئولین محترم دانشگاه علوم پزشکی شیراز به‌ویژه معاونت پژوهشی کمال تشکر را دارند.

تأییدیه اخلاقی: مطالعه حاضر با کد اخلاق ۱۵۲۳۷ در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز تصویب شده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زهرا حسن‌شاهی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۴۰٪)؛ بهزاد دهقانی (نویسنده دوم)،

- 27- Dehghani B, Hashempour T, Hasanshahi Z. Interaction of human herpesvirus 8 viral interleukin-6 with human interleukin-6 receptor using in silico approach: The potential role in HHV-8 pathogenesis. *Curr Proteom.* 2020;17(2):107-16.
- 28- Al-Amri SS, Abbas AT, Siddiq LA, Alghamdi A, Sanki MA, Al-Muhanna MK, et al. Immunogenicity of candidate MERS-CoV DNA vaccines based on the spike protein. *Sci Rep.* 2017;7:44875.
- 29- Grehan K, Ferrara F, Temperton N. An optimised method for the production of MERS-CoV spike expressing viral pseudotypes. *MethodsX.* 2015;2:379-84.
- 30- Mousavi P, Mostafavi-Pour Z, Morowvat MH, Nezafat N, Zamani M, Berenjian A, et al. In silico analysis of several signal peptides for the excretory production of reteleplase in *Escherichia coli*. *Curr Proteom.* 2017;14(4):326-35.
- 31- Du L, Yang Y, Zhou Y, Lu L, Li F, Jiang S. MERS-CoV spike protein: A key target for antivirals. *Expert Opin Ther Targets.* 2017;21(2):131-43.
- 32- Petit CM, Melancon JM, Chouljenko VN, Colgrove R, Farzan M, Knipe DM, et al. Genetic analysis of the SARS-coronavirus spike glycoprotein functional domains involved in cell-surface expression and cell-to-cell fusion. *Virology.* 2005;341(2):215-30.
- 33- Yang Y, Du L, Liu Ch, Wang L, Ma C, Tang J, et al. Receptor usage and cell entry of bat coronavirus HKU4 provide insight into bat-to-human transmission of MERS coronavirus. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(34):12516-21.
- 34- Morshed MM, Gazi MA, Musa MA, Kibria MG, Uddin MJ, Khan MA, et al. Computer aided prediction and identification of potential epitopes in the receptor binding domain (RBD) of spike (S) glycoprotein of MERS-CoV. *Bioinformatics.* 2014;10(8):533-8.
- 35- Tang XC, Agnihothram SS, Jiao Y, Stanhope J, Graham RL, Peterson EC, et al. Identification of human neutralizing antibodies against MERS-CoV and their role in virus adaptive evolution. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(19):E2018-26.
- 36- Badawi MM, SalahEldin MA, Suliman MM, AbduRahim SA, Mohammed AE, SidAhmed SA, et al. In silico prediction of a novel universal multi-epitope peptide vaccine in the whole spike glycoprotein of MERS CoV. *Am J Microbiol Res.* 2016;4(4):101-21.
- vaccine based on omps of *Klebsiella pneumoniae*: An in silico approach. *Int J Pept Res Ther.* 2015;21(3):325-41.
- 17- Dehghani B, Ghasabi F, Hashempour T, Joulaei H, Hasanshahi Z, Halaji M, et al. Functional and structural characterization of Ebola virus glycoprotein (1976-2015)-An in silico study. *Int J Biomath.* 2017;10(08):1750108.
- 18- Moattari A, Dehghani B, Khodadad N, Tavakoli F. In silico functional and structural characterization of H1N1 influenza A viruses hemagglutinin, 2010-2013, Shiraz, Iran. *Acta Biotheor.* 2015;63(2):183-202.
- 19- Dehghania B, Hashempoura T, Hasanshahia Z, Rasoolib I. Immunogenicity, antigenicity and epitope mapping of *Salmonella InvH* protein: An in silico study. *J Curr Biomed Rep.* 2020;1(1):1-9.
- 20- Hashempoura T, Dehghania B, Mousavi Z, Akbari T, Hasanshahi Z, Moayedi J, et al. Association of mutations in the NS5A-PKRBD region and IFNL4 genotypes with hepatitis C interferon responsiveness and its functional and structural analysis. *Curr Proteom.* 2020;17.
- 21- Dehghani B, Hasanshahi Z, Hashempour T. HIV capsid and protease, new targets of melittin. *Int J Pept Res Ther.* 2020.
- 22- Dehghani B, Hasanshahi Z, Hashempour T, Motamedifar M. The possible regions to design Human Papilloma Viruses vaccine in Iranian L1 protein. *Biologia.* 2020;75(5):749-59.
- 23- Hashempour T, Dehghani B, Mousavi Z, Yahaghi M, Hasanshahi Z, Moayedi J, Akbari T, Davarpanah MA. Evaluating drug resistant mutations to HCV NS3 protease inhibitors in Iranian Naïve patients. *Int J Pept Res Ther.* 2019.
- 24- Dehghani B, Hashempour T, Hasanshahi Z, Moayedi J. Bioinformatics analysis of domain 1 of HCV-core protein: Iran. *Int J Pept Res Ther.* 2020;26(1):303-20.
- 25- Dehghani B, Hashempour T, Hasanshahi Z. Using immunoinformatics and structural approaches to design a novel HHV8 vaccine. *Int J Pept Res Ther.* 2020;26(1):321-31.
- 26- Musavi Z, Hashempour T, Moayedi J, Dehghani B, Ghassabi F, Hallaji M, et al. Antibody development to HCV alternate reading frame protein in liver transplant candidate and its computational analysis. *Curr Proteom.* 2020;17(2):154-70.