

Assessment of immunogenic linear epitopes on human Immunoglobulin G by immunoinformatic approach

Fatemeh Hajighasemi, Soheila Rohani, Fatemeh Sefid

Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

(Received: 2015/01/5 Accept: 2016/05/25)

Abstract

Background: Immunoglobulin G (IgG) is the most abundant antibody in serum. The amount of serum IgG is associated to severity of some diseases like immunodeficiencies and infections. Therefore, IgG has high diagnostic value. For precise measurement of IgG, diagnostic tools such as IgG-epitope specific monoclonal antibodies are needed. Immunoinformatic is a branch of immunology helps in more exact diagnosis of diseases using the computational biology. According to the significance of assessment of IgG level in some diseases such as immunodeficiency and infections and also efficacy of immunoinformatic methods for epitope mapping to develop monoclonal antibodies for diagnostic tests, this study was conducted for epitope mapping of human IgG by immunoinformatic.

Methods of study: In this descriptive study, the amino acid sequence and third structure of reference human IgG was found in PDB database. The second IgG structure was determined by Phyre 2 software and the IgG linear epitopes were determined by Ellipro and IEDB immunoinformatic softwares.

Results: Linear epitopes were located in 160-175 and in 350- 360 amino acid sequences of light and heavy chains respectively as was determined by IEDB software. Eleven linear epitopes were located to constant domains of human IgG, one in constant domain 1 (CH1) and others in constant domains 2 and 3 (CH2 and CH3) of IgG heavy chain as were determined by Ellipro. 5 Main epitopes are located in CH3 domain.

Conclusion: In this study a lot of linear epitopes located on human IgG were determined by two immunoinformatic softwares. These epitopes are useful tools for producing specific monoclonal anti-IgG antibodies, epitope mapping of IgG, production of specific diagnostic tools for human IgG and phylogenic studies. It seems that immunoinformatic is a useful tool for mapping of linear epitopes of human IgG. Experimental studies would be valuable for confirming the immunoinformatic results in epitope mapping of human IgG.

Keywords: Human IgG, Immunoinformatic, Linear epitope

* Corresponding authors: Fatemeh Hajighasemi
Email: fatimahajighasemi@gmail.com

بررسی اپیتوپ‌های خطی ایمونوژن ایمونوگلوبولین G انسان به روش ایمونوانفورماتیک

فاطمه حاجی قاسمی، سهیلا روحانی، فاطمه سفید

گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۳/۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۱۵

چکیده

سابقه و هدف: ایمونوگلوبولین G (IgG) فراوان‌ترین آنتی‌بادی سرم است و سطح آن با شدت بیماری‌هایی مانند نقایص ایمنی و عفونت‌ها ارتباط دارد. بنابراین IgG ارزش تشخیصی بالایی دارد. سنجنش دقیق IgG نیازمند ابزارهایی تشخیصی از جمله آنتی‌بادی‌های منوکلونال اختصاصی است. ایمونوانفورماتیک شاخه‌ای از ایمونولوژی است که با استفاده از اطلاعات زیستی در کامپیوتر به تشخیص دقیق‌تر بیماری‌ها کمک می‌کند. با توجه به اهمیت تعیین سطح IgG در بیماری‌هایی مانند نقص ایمنی و برخی عفونت‌ها و نظر به اینکه روش ایمونوانفورماتیک برای تعیین اپی‌توپ‌های ایمونوژن جهت تولید بهینه آنتی‌بادی‌های منوکلونال اختصاصی برای تست‌های تشخیصی گزارش شده است، این پژوهش با هدف تعیین اپی‌توپ‌های خطی ایمونوژن IgG انسان با استفاده از ایمونوانفورماتیک انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه به روش توصیفی انجام شد. توالی و ساختار سوم IgG مرجع انسان در پایگاه داده (Protein Data Bank) PDB، ساختار دوم آن توسط نرم‌افزار (Phyre2) (Protein Homology/ nalogy Recognition Engine V 2. 0) و اپی‌توپ‌های خطی آن با نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک Ellipro و Immune Epitope Database (IEDB) تعیین شدند.

یافته‌ها: نرم‌افزار IEDB، مهم‌ترین اپی‌توپ‌های خطی IgG انسان را در ناحیه اسیدآمینه‌های ۱۶۰ تا ۱۷۵ در زنجیره سبک و ۳۵۰ تا ۳۶۰ در زنجیره سنگین تعیین کرد. نرم‌افزار Ellipro، ۱۱ اپی‌توپ خطی در دومین‌های ثابت IgG انسان یک اپی‌توپ در دومین ثابت یک (CH1) و ۱۰ اپی‌توپ در دومین‌های ثابت دو و سه زنجیره سنگین CH2 و CH3 با توزیع مساوی معرفی کرد. پنج اپی‌توپ شاخص‌تر در دومین CH3 واقع شده‌اند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه تعداد قابل توجهی از اپی‌توپ‌های خطی IgG انسان با دو نرم‌افزار ایمونوانفورماتیک شناسایی شدند که ابزارهای مناسبی برای تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال اختصاصی شناسایی‌کننده IgG، تعیین نقشه اپی‌توپ‌های IgG، تولید کیت‌های تشخیص اختصاصی IgG انسان و مطالعه‌های فیلوژنیک هستند. به نظر می‌رسد روش ایمونوانفورماتیک، ابزاری مفید برای تشخیص اپی‌توپ‌های خطی IgG انسان است. انجام مطالعه‌های آزمایشگاهی برای تأیید روش ایمونوانفورماتیک در تعیین اپی‌توپ‌های خطی IgG انسان مفید است.

واژگان کلیدی: IgG انسان، ایمونوانفورماتیک، اپی‌توپ خطی

مقدمه:

از طریق سیستم ایمنی شناسایی شده و موجب ایجاد پاسخ ایمنی اختصاصی علیه این مولکول می‌شوند) برای بهینه‌سازی تکنیک‌های تشخیصی مولکول IgG اهمیت بسزایی دارد (۱۰-۱۲). در این زمینه علم «ایمونولوژی کامپیوتری» (Computational Immunology) یا ایمونوانفورماتیک که یک شاخه علمی به نسبت جدید، کارآمد، ارزان، مقرون به صرفه، به راحتی قابل اجرا و بسیار سودمند است (۱۳ و ۱۴). ایمونولوژی کامپیوتری یا ایمونوانفورماتیک، شاخه‌ای از علم ایمونولوژی است که از اطلاعات زیستی موجود در کامپیوتر به عنوان یک ابزار برای حل مسائل ایمونولوژیک استفاده می‌کند. همچنین به فهم بهتر پاسخ‌های ایمنی و نقش آن‌ها در سلامت و بیماری و تشخیص سریع‌تر و دقیق‌تر بیماری‌ها

ایمونوگلوبولین G (IgG) (فراوان‌ترین آنتی‌بادی سرم و مایعات خارج سلولی بوده و نقش مهمی در دفاع علیه پاتوژن‌ها به عهده دارد (۱)). بین سطح IgG سرم و شدت برخی بیماری‌ها از قبیل نقایص ایمنی، بیماری‌های عفونی و بیماری‌های خود ایمنی ارتباط وجود دارد (۲-۵). بنابراین اندازه‌گیری سطح IgG از ارزش تشخیصی بالایی برخوردار است (۶، ۷). برای سنجنش دقیق IgG به ابزارهایی تشخیصی که دارای حساسیت و ویژگی بالا بوده و قابلیت شناسایی IgG را به‌طور اختصاصی داشته باشند مانند آنتی‌بادی‌های منوکلونال نیاز است (۸ و ۹). به این منظور تعیین دقیق نقشه اپی‌توپ‌های ایمونوژن مولکول IgG (نواحی از مولکول IgG که به‌طور اختصاصی

نویسنده مسئول: فاطمه حاجی قاسمی

پست الکترونیک: fatimahajighasemi@gmail.com

ساختار دوم و سوم ایمونوگلوبولین G انسان برای توالی اسیدآمینه‌ای مرجع با کد دسترسی IGT در دسترس است. این ساختارها از طریق بررسی‌های کریستالوگرافیک و آزمایشگاهی تعیین شده و نرم‌افزار Phyre2 Protein Homology/analogY Recognition Engine V2.0 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre>) که در وب‌گاه (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre>) در دسترس است نیز در تعیین ساختار دوم پروتئین‌ها استفاده شد.

۳- پیش‌گویی اپی‌توپ‌های خطی IgG انسان
۱-۳- پیش‌گویی اپی‌توپ‌های خطی IgG انسان بر مبنای توالی اسیدآمینه‌ای پیش‌گویی اپی‌توپ‌های خطی در مولکول پروتئینی ایمونوگلوبولین G انسان با استفاده از نرم‌افزار Bepipred موجود در پایگاه IEDB (Immune Epitope Database) با آدرس اینترنتی (www.immuneepitope.org) انجام شد.

۳-۲- پیش‌گویی اپی‌توپ‌های خطی ایمونوگلوبولین G انسان بر مبنای ساختار سه بعدی مولکول به کمک نرم‌افزار ElliPro که نرم‌افزاری بر پایه ساختار سه بعدی پروتئین است و توانایی پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی یا پیوسته را به ما می‌دهد، اپی‌توپ‌های خطی ایمونوگلوبولین G انسان براساس ساختار سه بعدی آن نیز تعیین شد. نرم‌افزار ElliPro با آدرس اینترنتی <http://tools.immuneepitope.org/tools/> در دسترس است.

یافته‌ها:

۱- توالی اسیدآمینه‌ای چهار زنجیره IgG انسان
توالی اسیدآمینه‌ای چهار زنجیره ایمونوگلوبولین G انسان که شامل دو زنجیره سبک A و C و دو زنجیره سنگین B و D است در بانک اطلاعاتی با نام اختصاری IGT تعیین و در جدول ۱ نشان داده شده است. اسیدآمینه‌های هر زنجیره با نماد اختصاری تک حرفی نشان داده شده‌اند.

۲- ساختار دوم و سوم IgG انسان
شکل‌های (۱ و ۲) ساختار دوم IgG انسان را نشان می‌دهند که از طریق نرم‌افزار phyre2 به دست آمده است. شکل ۱ مربوط به زنجیره سبک (C) و شکل ۲ مربوط به زنجیره سنگین (B) است.

کمک می‌کند (۷-۱۵). این علم فرصت‌های جدیدی برای تحقیق‌های آینده در زمینه ایمونولوژی فراهم کرده است. در واقع هدف ایمونوآنفورماتیک، آنالیز حجم وسیع اطلاعات آزمایشگاهی جمع‌آوری شده در کامپیوتر است و در تمام جنبه‌های فرآیندهای سیستم ایمنی و بیماری‌ها گسترش پیدا کرده است. در این علم، از کامپیوتر به‌عنوان آزمایشگاه استفاده می‌شود و اطلاعات حاصل از تحقیق‌های تجربی گردآوری شده در کامپیوتر، دسته‌بندی و با برنامه‌های کامپیوتری داده‌کاوی می‌شود. با توجه به اینکه ایمونوآنفورماتیک روش مناسبی برای تعیین اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن‌هاست (۱۸)، این مطالعه با هدف استفاده از ایمونوآنفورماتیک برای تعیین اپی‌توپ‌های ایمونوزن خطی مولکول IgG انسان برای بهینه‌سازی تکنیک‌های تشخیصی اختصاصی آنتی‌بادی IgG از جمله کیت‌های تشخیص IgG انسان انجام شد.

روش‌ها:

این مطالعه به روش توصیفی با استفاده از نرم‌افزارهای ایمونوآنفورماتیک (۱۹) به شرح زیر انجام شد.

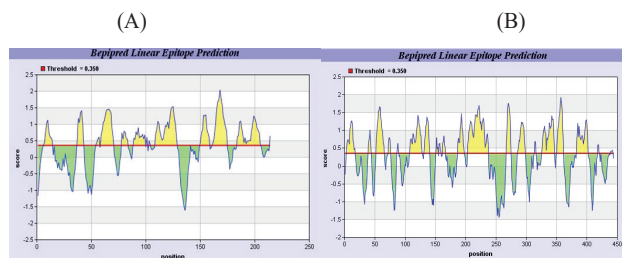
۱- تعیین توالی اسیدآمینه‌ای تایید شده برای IgG انسان با استفاده از بانک اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) و PDB (Protein Data Bank)

برای جست‌وجو و یافتن توالی اسیدآمینه‌ای تایید شده برای ایمونوگلوبولین G انسان از بانک اطلاعاتی NCBI با آدرس اینترنتی (www.ncbi.nlm.nih.gov) و از پایگاه داده PDB (Protein Data Bank) در وب‌گاه (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) استفاده کردیم. در بانک‌های اطلاعاتی مذکور چهار توالی مرجع با کد شناسایی IGT برای ایمونوگلوبولین G وجود داشت که هر یک مربوط به یک زنجیره از ساختار چهار زنجیره‌ای آن هستند. این توالی‌ها از طریق روش‌های آزمایشگاهی و به کمک روش کریستالوگرافی تعیین شده‌اند.

۲- تعیین ساختار دوم و سوم IgG انسان
در پایگاه داده PDB در آدرس اینترنتی (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

جدول ۱- توالی اسیدآمینه‌ای مولکول مرجع IgG انسان	
Chain (زنجیره)	Sequence (توالی)
A*	DIVLTQSPSSLSASLGDTITITCHASQININWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDIAITYYCQQGQSYPLTFGGGKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC+
B**	EVKLQESGGGLVQPGGSLKLSGTSSTGTFSDYYMYWVRQTPEKRLWVAYISNGGGSTYYPDVTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSRLKSEDTAMYYCARHGGYYAMDYWGQGTITVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWSNGLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNVEVHTAQTQTHREDYNTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCLMTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSR
C*	DIVLTQSPSSLSASLGDTITITCHASQININWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDIAITYYCQQGQSYPLTFGGGKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
D**	EVKLQESGGGLVQPGGSLKLSGTSSTGTFSDYYMYWVRQTPEKRLWVAYISNGGGSTYYPDVTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSRLKSEDTAMYYCARHGGYYAMDYWGQGTITVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWSNGLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNVEVHTAQTQTHREDYNTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCLMTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSR

* زنجیره سبک ** زنجیره سنگین + هر حرف بیانگر رمز تک حرفی یک اسیدآمینه است



شکل ۳- تصاویر فوق نتیجه آنالیز توالی اسیدآمینه‌ای مرجع برای زنجیره‌های سبک و سنگین IgG انسان با نرم‌افزار Bepipred. از مجموعه نرم‌افزارهای پایگاه IEDB است. تصاویر A و B به ترتیب اپی‌توپ‌های موجود در زنجیره سبک و سنگین را نشان می‌دهد. در این نمودارها هر چه امتیاز اسیدآمینه‌های موجود برای قرارگیری به عنوان اپی‌توپ احتمالی در بخشی از توالی بالاتر باشد، این بخش از توالی با احتمال بیشتری اپی‌توپ خواهد بود.

۲-۳- پیش‌گویی اپی‌توپ‌های خطی IgG انسان بر مبنای ساختار مولکول Ellipro نرم‌افزاری بر پایه ساختار پروتئین است که توانایی پیش‌گویی اپی‌توپ‌های خطی و فضایی را به صورت توأم دارد است. این نرم‌افزار به هریک از اپی‌توپ‌های پیش‌گویی شده نمره‌ای را اختصاص می‌دهد که این نمره به عنوان متوسط مقدار (Protrusion index) PI در طول آمینو اسیدهای موجود در اپی‌توپ پیش‌گویی شده است. منظور از PI هر اسیدآمینه میزان پیش‌آمدگی یا جلوفتادگی آن اسیدآمینه در ساختار پروتئین است. اسیدآمینه‌هایی که در سطح پروتئین واقع شده‌اند و نسبت به سایر اسیدآمینه‌ها بیشتر در دسترس هستند، PI بالاتری را به خود اختصاص می‌دهند، بنابراین نسبت به سایر اپی‌توپ‌ها نمره بالاتری را به دست می‌آورند. جدول ۳ بیانگر نتایج آنالیز اپی‌توپ‌های ایمونوگلوبولین G انسان با نرم‌افزار Ellipro است. هرچه امتیاز اختصاص یافته به یک اپی‌توپ بالاتر باشد، آن اپی‌توپ از صحت بیشتر و درجه اطمینان بالاتری برخوردار است.

بحث و نتیجه‌گیری:

این تحقیق نشان داد که روش ایمونوآنفورماتیک قادر به شناسایی تعداد قابل توجهی از اپی‌توپ‌های خطی ایمونوزن IgG انسان است.

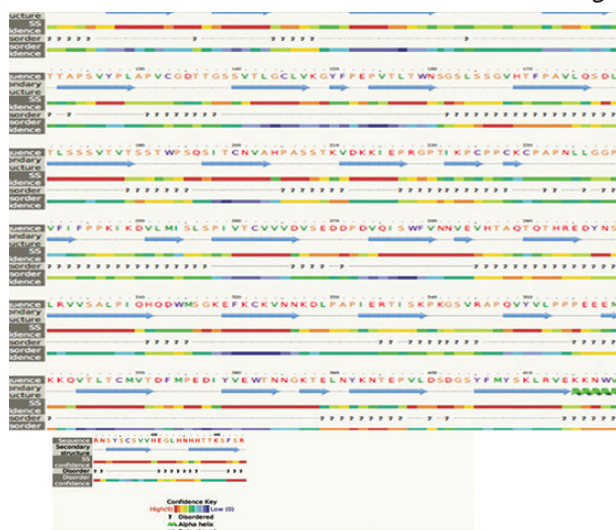
۱- پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی IgG انسان بر پایه توالی اسیدهای آمینه این روش بر پایه این نظریه که توالی پروتئین ساختار آن را تعیین می‌کند و ساختارهای مشابه به عملکردهای یکسان منجر می‌شوند، بنا نهاده شده است (۱۷).

طبق نتایج نرم‌افزار IEDB، مهم‌ترین اپی‌توپ پیش‌گویی شده در زنجیره سبک IgG انسان در محدوده اسیدآمینه‌های شماره ۱۶۰ تا ۱۷۵ است و در حد فاصل اسیدآمینه‌های شماره ۱۱۰ تا ۱۳۰ و ۱۸۰ تا ۲۰۸ نیز اپی‌توپ‌های شاخصی تعیین شده است. مهم‌ترین اپی‌توپ پیش‌گویی شده در زنجیره سنگین، در محدوده اسیدآمینه‌های شماره ۳۵۰ تا ۳۶۰ است و در حد فاصل اسیدآمینه‌های شماره‌های ۲۶۵ تا ۲۷۰ و ۲۰۰ تا ۲۴۰ نیز اپی‌توپ‌های شاخص بعدی قرار دارند. براساس نتایج این نرم‌افزار ۶۳ درصد اپی‌توپ‌ها در ناحیه Fab و ۳۷ درصد اپی‌توپ‌ها در ناحیه Fc مولکول IgG قرار دارند. همچنین در ناحیه Fc، ۷۵ درصد اپی‌توپ‌ها در دومین CH2 و ۲۵ درصد آن‌ها در دومین CH3 واقع شده‌اند. ۴۵ درصد اپی‌توپ‌ها در زنجیره سبک و ۵۵ درصد اپی‌توپ‌ها در زنجیره سنگین قرار گرفته‌اند.

۲- پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی IgG انسان بر پایه ساختار پروتئین با توجه به نتایج ارائه شده از طریق نرم‌افزار Ellipro که پیش‌گویی اپی‌توپ‌های خطی را بر پایه ساختار سه بعدی پروتئین انجام می‌دهد، ۱۱ اپی‌توپ خطی در ناحیه ثابت IgG انسان پیش‌گویی شد که ۱۰ اپی‌توپ در زنجیره سنگین و یک اپی‌توپ در زنجیره سبک قرار گرفته است. یکی از اپی‌توپ‌های فوق در ناحیه Fab و ۱۰ اپی‌توپ دیگر در بخش Fc واقع شده است. پنج اپی‌توپ که دارای بالاترین امتیاز صحت پیش‌گویی بودند همگی در دومین CH3 از ناحیه Fc مولکول IgG واقع شده‌اند. نرم‌افزار Ellipro اپی‌توپ‌ها را براساس دسترسی و بیرون‌زدگی سطحی اسیدآمینه‌ها معین می‌کند، بنابراین به احتمالاً مناطق دارای اپی‌توپ‌های نام برده در مولکول IgG دارای بیشترین دسترسی هستند. براساس نتایج حاصل از



شکل ۴- ساختار دوم زنجیره سبک ایمونوگلوبولین G انسان که با نرم‌افزار phyre 2 تعیین شده است. در شکل صفحات بتا با پیکان آبی رنگ و مارپیچ‌های آلفا با رنگ سبز نشان داده شده است.



شکل ۵- ساختار دوم زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین G انسان که با نرم‌افزار phyre 2 تعیین شده است. در شکل صفحات بتا با پیکان آبی رنگ و مارپیچ‌های آلفا با رنگ سبز نشان داده شده است.

۳- پیش‌گویی اپی‌توپ‌های خطی IgG انسان

۱-۳- پیش‌گویی اپی‌توپ‌های خطی IgG انسان بر مبنای توالی اسیدآمینه‌ها طبق نتایج نرم‌افزار Bepipred از مجموعه نرم‌افزار IEDB که در جدول شماره ۲ و شکل شماره ۳ نشان داده شده است، در زنجیره سبک ناحیه بین اسیدآمینه‌های شماره ۱۵۰ تا ۱۷۵، ۱۸۰ تا ۲۰۵ و ۱۱۰ تا ۱۳۰ (دومین CH1 ناحیه Fab) مناسب‌ترین نواحی قرارگیری اپی‌توپ‌های خطی در این زنجیره هستند. در زنجیره سنگین طبق نمودار ناحیه بین اسیدآمینه‌های شماره ۱۱۰ تا ۱۴۰، ۲۰۰ تا ۲۴۰ (دومین CH1 در ناحیه Fab)، ۲۶۵ تا ۲۷۰ تا ۲۹۰، ۳۰۰ تا ۳۲۰، ۳۶۰ تا ۳۸۰ (دومین CH2 در ناحیه Fc) و ۳۸۰ تا ۴۰۰ (در دومین CH3 از ناحیه Fc) جایگاه قرارگیری اپی‌توپ‌های خطی هستند.

جدول ۲- اپی‌توپ‌های خطی IgG انسان پیش‌گویی شده با نرم‌افزار Bepipred موجود در پایگاه IEDB

زنجیره سنگین	زنجیره سبک	
۱۱۰ تا ۱۴۰	۱۱۰ تا ۱۳۰	موقعیت اسیدهای آمینه
۲۴۰ تا ۲۶۵	۱۶۰ تا ۱۸۰	
۲۷۰ تا ۲۹۰	۱۷۵ تا ۱۹۰	
۳۰۰ تا ۳۲۰	۱۸۰ تا ۱۹۵	
۳۶۰ تا ۳۸۰		
۴۰۰ تا ۴۲۰		

جدول ۳- پی شگویی اپیتوپهای خطی IgG انسان با نرم‌افزار Ellipro

امتیاز	تعداد اسید آمینه	نام اسید آمینه‌ها	شماره اسید آمینه پایانی	شماره اسید آمینه آغازی	نام زنجیره	شماره اپی‌توپ
۰/۷۹۶	۴۰	YFMYSKLRVEKKNWVERNSY+SCSVVHEGLHNHHTTKSFSR	۴۷۴	۴۳۵	D*	۱
۰/۷۶۷	۳۱	VRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFM	۳۹۶	۳۶۴	D	۲
۰/۷۴۵	۵۲	TEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERN SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSR	۴۷۴	۴۲۲	B*	۳
۰/۷۴۱	۲۰	DIYVEWTNNGKTELNYKNT	۴۲۳	۳۹۹	D	۴
۰/۷۱۵	۵۴	KPKGSVRAPQVYVLPPEEEM TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE WTNNGKTELNY	۴۱۹	۳۵۸	B	۵
۰/۶۶۰	۱۳	KIKDVLMSLSPI	۲۷۱	۲۵۹	D	۶
۰/۵۸۸	۱۲	VEVHTAQTQTHR	۳۱۰	۲۹۹	D	۷
۰/۵۷۹	۱۰	IQHQDWMSGK	۳۳۶	۳۲۷	B	۸
۰/۵۷۴	۱۲	KIKDVLMSLSP	۲۷۰	۲۵۹	B	۹
۰/۵۶۲	۱۲	ALPIQHQDWMSG	۳۳۵	۳۲۴	D	۱۰
۰/۵۰۳	۶	HKTSTS	۲۰۳	۱۹۸	C**	۱۱

* B و D زنجیره‌های سنگین، ** C زنجیره سبک، + نام تک حرفی اسید آمینه‌ها

شد که ۱۰ اپی‌توپ اختصاصی ناحیه Fc (۹۱ درصد) و یکی از آن‌ها (۹ درصد) اختصاصی ناحیه Fab مولکول IgG بوده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در مطالعه حاضر اکثر اپی‌توپ‌های شناخته شده مربوط به ناحیه Fc مولکول IgG و نه ناحیه Fab بوده‌اند که مشابه مطالعه‌های حاجی قاسمی و همکاران است (۲۴، ۲۳، ۲۰). همان‌طور که در بخش نتایج قابل مشاهده است، تعداد اپی‌توپ‌های بخش Fc نسبت به تعداد اپی‌توپ‌های بخش Fab، در نرم‌افزار Ellipro نسبت به نرم‌افزار Bepipred بیشتر است. دلیل اختلاف نتایج بین این دو نرم‌افزار می‌تواند به علت اختلاف در اساس کار آن‌ها باشد. نرم‌افزار Bepipred اپی‌توپ‌ها را براساس توالی اسید آمینه‌ها تعیین می‌کند درحالی‌که نرم‌افزار Ellipro اپی‌توپ‌ها را بر پایه ساختار سه بعدی پروتئین پیش‌گویی می‌کند که جدیدتر از روش‌های پیش‌گویی اپی‌توپ بر پایه توالی پروتئین است. پیش‌گویی اپی‌توپ‌ها بر پایه ساختار چندین مزیت نسبت به پیش‌گویی اپی‌توپ بر پایه توالی پروتئین دارد. مجموعه داده‌های کوچک‌تری برای استفاده از روش‌های بر پایه ساختار در مقایسه با روش‌های بر پایه توالی مورد نیاز است. بسیاری از پپتیدهای شناسایی شده با روش‌های بر پایه ساختار، به کمک روش‌های بر پایه توالی اسید آمینه‌ای قابل شناسایی و بررسی نبوده‌اند و با روش‌های آزمایشگاهی نیز مطالعه نشده‌اند. تعیین اپی‌توپ‌ها بر پایه توالی نیز برای ارائه کردن نتایج قابل اعتماد و استناد نیازمند هماهنگ کردن و تطبیق دادن نتایج خود با نتایج به دست آمده از روش‌های مبتنی بر ساختار پروتئین هستند. از محدودیت‌های روش‌های بر پایه ساختار پیچیده بودن و در دسترس نبودن ساختار سوم اکثر پروتئین‌هاست. این ساختارها به روش‌های آزمایشگاهی و کریستالوگرافی اشعه X تعیین می‌شوند. همچنین دشواری تفسیر نتایج در مولکول‌های بزرگ و هزینه‌های بالای برخی از نرم‌افزارها و دسترسی نداشتن به آن‌ها از محدودیت‌های دیگر این روش‌هاست (۱۷).

نرم‌افزار Ellipro11 اپی‌توپ در دومین‌های ثابت مولکول IgG شناسایی شدند که فقط یکی از آن‌ها مربوط به ناحیه Fab واقع در دومین ثابت زنجیره C (CL) بوده و بقیه (۱۰ اپی‌توپ) مربوط به دومین‌های ثابت زنجیره‌های سنگین (CH2 و CH3) هستند. به عبارت دیگر با توجه به نتایج نرم‌افزار Ellipro، ۹ درصد اپی‌توپ‌های IgG انسان مربوط به ناحیه Fab و ۹۱ درصد آن‌ها مربوط به ناحیه Fc است و از اپی‌توپ‌های مربوط به ناحیه Fc، ۵۰ درصد آن‌ها در دومین CH2 و ۵۰ درصد در دومین CH3 واقع هستند. از ۱۱ اپی‌توپ شناسایی شده در مناطق ثابت مولکول IgG شاخص‌ترین اپی‌توپ‌ها (۵ عدد) در زنجیره سنگین، ناحیه Fc (دومین CH3) قرار داشت.

حاجی قاسمی و همکاران در چندین مطالعه، اپی‌توپ‌های اختصاصی ایدئوتیپ‌ها، ایزوآلوتیپ‌ها یا زیرکلاس‌های IgG انسان را معرفی کردند (۲۰-۲۶). در مطالعه حاجی قاسمی و همکاران دو اپی‌توپ خطی اختصاصی زیر کلاس IgG3 (۲۲)، چهار اپی‌توپ اختصاصی زیر کلاس‌های IgG1,2,3 که یکی از آن‌ها خطی بوده، سه اپی‌توپ اختصاصی زیر کلاس‌های IgG1,2,3 که دو اپی‌توپ آن‌ها خطی بوده‌اند (۲۶)، چهار اپی‌توپ اختصاصی همه زیر کلاس‌های IgG که سه اپی‌توپ آن‌ها خطی بوده‌اند (۲۵) معرفی شده‌اند. در مطالعات ذکر شده بالا (۲۴، ۲۵، ۲۶) ۱۳ اپی‌توپ اختصاصی IgG یا زیر کلاس‌های آن شناخته شده‌اند که همگی در بخش Fc مولکول IgG واقع شده و ۸ اپی‌توپ آن‌ها (۶۲ درصد) خطی بوده‌اند. نتایج مطالعه‌های حاجی قاسمی و همکاران تاییدی بر نتایج مطالعه حاضر است. در مطالعه ما ۱۱ اپی‌توپ خطی واقع بر مولکول IgG انسان با نرم‌افزار IEDB (Bepipred) شناسایی شد که ۶۳ درصد آن‌ها اختصاصی ناحیه Fab و ۳۷ درصد آن‌ها اختصاصی ناحیه Fc مولکول بودند. همچنین در مطالعه حاضر، ۱۱ اپی‌توپ خطی واقع بر بخش ثابت مولکول IgG انسان با نرم‌افزار Ellipro شناسایی

منوکلونال اختصاصی IgG انسان برای تولید کیت‌های تشخیصی IgG انسان و بهینه‌سازی کیت‌های تشخیصی موجود هستند. همچنین این اپی‌توپ‌ها می‌توانند برای تعیین نقشه اپی‌توپ‌های IgG انسان و مطالعه‌های فیلوژنتیکی استفاده شوند. انجام مطالعه‌های آزمایشگاهی برای تایید روش ایمونوفورماتیک در تعیین اپی‌توپ‌های خطی IgG انسان مفید خواهد بود.

منابع:

1. Abbas AK, Litchman AH, Pilla S. Cellular and Molecular immunology, 6nd edn. 2007. W B Sanders.
2. Wong LP, AbuBakar S, Chinna K. Community knowledge, health beliefs, practices and experiences related to dengue Fever and its association with IgG seropositivity. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2014;8 (5): e2789.
3. Taheraghdam A, Pourkhanjar P, Talebi M, Bonyadi M, Pashapour A, Sharifpour E, Rikhtegar R. Correlations between cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, anti-ganglioside antibodies, electrodiagnostic findings and functional status in Guillain-Barré syndrome. Iranian Journal of Neurology. 2014 ;13 (1): 7-12.
4. E Silva de Azevedo CD, Bruña-Romero O, Marques SG, do Nascimento FR, Pinto MC, Silva LA, et al. Association of IgG immunoglobulin and subclasses level with the severity of chromoblastomycosis due to Fonsecaea pedrosoi and therapeutic response to itraconazole. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2014. [Epub ahead of print]
5. Marco H, Smith RM, Jones RB, Guerry MJ, Catapano F, Burns S, et al. The effect of rituximab therapy on immunoglobulin levels in patients with multisystem autoimmune disease. BMC Musculoskeletal Disorders. 2014;15 (1): 178. [Epub ahead of print]
6. Bai J, Li H, Shi J, Xu J, Li X, Cao W, et al. Biochemical index and immunological function in the peripheral blood of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. Biomedical Reports. 2013;1 (3): 405-409.
7. Negrão-Corrêa D, Fittipaldi JF, Lambertucci JR, Teixeira MM, Antunes CM, Carneiro M. Association of Schistosoma mansoni-specific IgG and IgE antibody production and clinical schistosomiasis status in a rural area of Minas Gerais, Brazil. PLoS One. 2014;9 (2): e88042.
8. Walker RWH, Keir G, Johnson MH, Thompson EJ. A rapid method for detecting oligoclonal IgG in unconcentrated CSF by agarose isoelectric focusing, transfer to cellulose nitrate and immunoperoxidase staining. Journal of Neuroimmunology. 1983;4 (2): 141-148.
9. Olsson T, Košťals V, Link H. Improved detection of oligoclonal IgG in cerebrospinal fluid by isoelectric focusing in agarose, double-antibody peroxidase labeling and avidin-biotin amplification. Clinical Chemistry. 1984;30 (7): 1246-1249.
10. Wayne GS, Doerthe AL, Ludmilla B, Hugh AS. IgE and IgG4 epitope mapping by microarray immunoassay reveals the discovery of immune response to the peanut allergen, Ara h 2. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2009 ;116 (4): 893-89
11. Yoshinori M, Jie WZ. Identification and fine mapping of IgG and IgE epitopes in Ovomucoid. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2002; 292 (4): 1070-1074.
12. Donald JP, Thomas WW, Charles BR. Estimation of association constant

در مجموع در این مطالعه تعداد زیادی اپی‌توپ خطی واقع بر مولکول IgG انسان با نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی Ellipro، Bepipred و IEDB شناسایی و معرفی شدند. با توجه به اینکه ایمونوفورماتیک روش مناسبی برای تعیین اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن‌هاست (۱۸)، اپی‌توپ‌های خطی واقع بر مولکول IgG انسان که در این مطالعه به روش ایمونوفورماتیک تعیین شدند، ابزارهای مفیدی برای تولید آنتی‌بادی‌های

- of 42 monoclonal antibodies to human IgG epitopes using a fluorescent sequential-saturation assay. Immunology Letters. 1988;17 (2): 159-168.
13. Tong JC, Ren EC. Immunoinformatics: Current trends and future directions. 04. 01 Drug Discovery. 2009; 14 (13-14): 684-9
14. Korber B, LaBute M, Yusim K. Immunoinformatics comes of age. PLOS Computational Biology. 2006; 2 (6): e71.
15. Zhang S, Desrosiers J, Aponte-Pieras JR, Dasilva K, Fast LD, Terry F, et al. Human Immune Responses to H. pylori HLA Class II Epitopes Identified by Immunoinformatic Methods. PLoS One. 2014;9 (4): e94974.
16. Rotem S, Cohen O, Bar-Haim E, Bar-On L, Ehrlich S, Shaffer A. Protective immunity against lethal F. tularensis holartica LVS provided by vaccination with selected novel CD8+ T cell epitopes. PLoS One. 2014;9 (1): e85215.
17. Blythe MJ, Flower DR. Benchmarking B cell epitope prediction: underperformance of existing methods. Protein Science. 2009; 14: 246-248.
18. Backert L, Kohlbacher O. Immunoinformatics and epitope prediction in the age of genomic medicine. Genome Medicine. 2015;7: 119.
19. Tomar NI, De RK. Immunoinformatics: a brief review. Methods Mol Biol. 2014;1184: 23-55.
20. Hajighasemi F, Saboor-Yaraghi AA, Shokri F. Measurement of affinity constant of anti-human IgG monoclonal antibodies by an Elisa-based method. Iranian Journal of Immunology. 2004; 1 (3): 154-161.
21. Hadji-Ghasemi F, Gharagozlou S, Ghods R, Roohi A, Khoshnoodi J, Shokri F. Generation and characterization of a mouse monoclonal antibody with specificity similar to staphylococcal protein A (SPA). Hybridoma and Hybridomics. 2003; 22 (1): 33-39.
22. Hajighasemi F, Shokri F. Generation and characterization of mouse hybridomas secreting monoclonal antibodies specific for human IgG3. Avicenna Journal of Medical Biotechnology. 2009; 1 (1): 19-26.
23. Hajighasemi F, Gharagozlou S, Ghods R. Private idiotypes located on light and heavy chains of human myeloma proteins characterized by monoclonal antibodies. Hybridoma (Larchmt). 2006; 25 (6): 329-335.
24. Hajighasemi F, Khoshnoodi J, Shokri F. Development of two murine monoclonal antibodies recognizing human nG1m (a)-like isoallotypic markers. Hybridoma (Larchmt). 2008; 27 (6): 473-479.
25. Hajighasemi F1, Khoshnoodi J, Shokri F. Production and Characterization of Mouse Monoclonal Antibodies Recognizing Human Pan-IgG Specific Conformational or Linear Epitopes. Avicenna Journal of Medical Biotechnology. 2012 ;4 (4): 170-7.
26. Hajighasemi F1, Shokri F. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies recognizing multiple subclasses of human IgG. Avicenna Journal of Medical Biotechnology. 2010; 2 (1): 37-45.