Research on Medicine

Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

Vol.40; No.1; 2016

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

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۰، شماره ۱، ۱۳۹۵، صفحات ۳۰ تا ۳۵

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 دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۳/۵

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. سنجش 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 می کند. 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 *PDB (Protein Data Bank)*، ساختار دوم آن توسط نرم‌افزار *Phyre2 (Protein Homology/ nalogy Recognition Engine V 2. 0)* و اپی‌توپ‌های خطی آن با نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی *Ellipro* و *IEDB) Immune Epitope Database)* 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 ایمونوانفورماتیکی شناسایی شدند که ابزارهای مناسبی برای تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی شناسایی کننده *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:

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 سنجش دقیق IgG به ابزارهایی تشخیصی که دارای حساسیت و ویژگی بالا بوده و قابلیت شناسایی IgG را به‌طور اختصاصی داشته باشند مانند آنتی بادی‌های منوکلونال نیاز است (۸ و۹). به این منظور تعیین دقیق نقشه اپی‌توپ‌های ایمونوژن مولکول IgG (نواحی از مولکول IgG که به‌طور اختصاصی 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 (۱۳و۱۴). ایمونولوژی کامپیوتری یا ایمونوانفورماتیک، شاخه‌ای از علم ایمونولوژی است که از اطلاعات زیستی موجود در کامپیوتر به‌عنوان 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

نویسنده مسئول: فاطمه حاجی قاسمی
پست الکترونیک: *fatimahajighasemi@gmail.com*

کمک می‌کند(۱۵-۷). این علم فرصت‌های جدیدی برای تحقیق‌های آینده در زمینه ایمونولوژی فراهم کرده است. در واقع هدف ایمونوانفورماتیک، 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 ایمونوانفورماتیک روش مناسبی برای تعیین اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن‌هاست(۱۸)، این مطالعه با هدف استفاده از ایمونوانفورماتیک برای تعیین اپی‌توپ‌های ایمونوژن 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 ایمونوانفورماتیک (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 به 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 1IGT برای ایمونوگلوبولین G وجود داشت که هریک 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) ساختار دوم و سوم ایمونوگلوبولین G انسان برای توالی اسیدآمینه‌ای مرجع با کد دسترسی 1IGT در دسترس است. این ساختارها از طریق بررسی‌های کریستالوگرافیک و آزمایشگاهی تعیین شده و نرم‌افزار Phyre2 Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2. 0 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

۳- ۱ –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/ElliPro/iedb_input 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 1IGT 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 ۱و۲ 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.

جدول ۱- توالی اسیدآمینه‌ای مولکول مرجع IgG انسان

Chain (زنجیره)	Sequence (توالی)
A*	DIVLTQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINVWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTG FTLTISSLQPEDIATYYCQQGQSYPLTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYP KDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSF NRNEC+
B**	EVKLQESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVAYISNGGGSTYYPDTVKGR FTISRDNAKNTLYLQMSRLKSEDTAMYYCARHGGYYAMDYWGQGTTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVC GDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVA HPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDV QISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKG SVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYS KLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSR
C*	DIVLTQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINVWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTG FTLTISSLQPEDIATYYCQQGQSYPLTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYP KDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSF NRNEC
D**	EVKLQESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVAYISNGGGSTYYPDTVKGR FTISRDNAKNTLYLQMSRLKSEDTAMYYCARHGGYYAMDYWGQGTTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVC GDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVA HPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDV QISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKG SVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYS KLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSR

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

شکل ۱- 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 ۲- 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

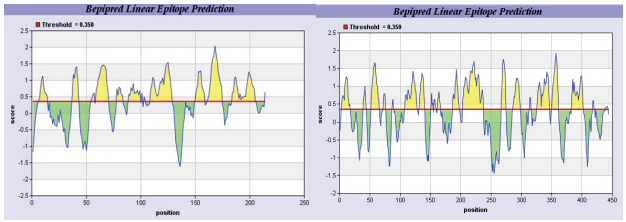
۳-۱- پیش‌گویی اپی‌توپ‌های خطی IgG انسان بر مبنای توالی اسیدامینه‌ها

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 CH_1 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، ۲۹۰ تا ۳۰۰، ۳۲۰ تا ۳۶۰ (در دومین CH2 در ناحیه Fc) و ۳۸۰ تا ۴۰۰ (در دومین CH3 ازناحیه 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
۲۰۰ تا ۲۴۰	۱۵۰ تا ۱۶۰	
۲۶۵ تا ۲۷۰	۱۶۰ تا ۱۷۵	
۲۹۰ تا ۳۰۰	۱۸۰ تا ۱۹۰	
۳۲۰ تا ۳۶۰	۱۹۵ تا ۲۰۵	
۳۸۰ تا ۴۰۰		

(A) (B)



شکل۳- 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 به‌عنوان اپی‌توپ احتمالی در بخشی از توالی بالاتر باشد، این بخش از توالی با احتمال بیشتری اپی‌توپ خواهد بود.

۳-۲- 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 توام دار است. این نرم‌افزار به هریک از اپی‌توپ‌های پیش‌گویی شده نمره‌ای را اختصاص می‌دهد که این نمره به‌عنوان متوسط مقدار PI (Protrusion index) در طول آمینو اسیدهای موجود در اپی‌توپ پیش‌گویی شده است. منظور از PI هر اسیدآمینه میزان پیش‌آمدگی یا جلوافتادگی آن اسیدآمینه در ساختار پروتئین است. اسیدآمینه‌هایی که در سطح پروتئین واقع شده‌اند و نسبت به سایر اسیدهای آمینه بیشتر در دسترس هستند ، PI بالاتری را به خود اختصاص می‌دهند، بنابراین نسبت به سایر اپی‌توپ‌ها نمره بالاتری را به دست می‌آورند. جدول۳ 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 ایمونوانفورماتیک قادر به شناسایی تعداد قابل توجهی از اپی‌توپ‌های خطی ایمونوژن 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 احتمالا مناطق دارای اپی‌توپ‌های نام برده در مولکول IgG دارای بیشترین دسترسی هستند. براساس نتایج حاصل از

جدول ۳- پی شگویی اپ یتوپهای خطی IgG انسان با نرم‌افزار Ellipro

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

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

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، ۹درصد اپی‌توپ‌های IgG انسان مربوط به ناحیه Fab و ۹۱درصد 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 اپی توپ 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 ایدیوتیپ‌ها، 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 زیرکلاس‌های IgG1,2,3 که دو اپی‌توپ آن‌ها خطی بوده‌اند (۲۶) ، چهار اپی‌توپ اختصاصی همه زیرکلاس‌های IgG که سه اپی‌توپ آن‌ها خطی بوده‌اند(۲۵) معرفی شده‌اند. در مطالعه‌های ذکر شده بالا(۲۲، 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 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 (۲۰، ۲۳، ۲۴). 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 اسیدآمینه‌ها 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 برپایه 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 اسیدآمینه‌ای 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).

در مجموع در این مطالعه تعداد زیادی اپی‌توپ خطی واقع بر مولکول IgG انسان با نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی Bepipred، Ellipro و IEDB شناسایی و معرفی شدند. با توجه به اینکه ایمونوانفورماتیک روش مناسبی برای تعیین اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن‌هاست (۱۸)، اپی‌توپ‌های خطی واقع بر مولکول IgG انسان که در این مطالعه به روش‌ایمونوانفورماتیک تعیین شدند، ابزارهای مفیدی برای تولید آنتی‌بادی‌های 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 ایمونوانفورماتیک 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, Sharifipour 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 unconcerated CSF by agarose isoelectric focusing,transfer to cellulose nitrate and immunoperoxidase staining. Journal of Neuroimmunology. 1983;4 (2): 141-148.

9. Olsson T, Kostulas 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 of 42 monoclonal antibodies to human IgG epitopes using a flurescent 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, Shafferman A. Protective immunity against lethal F. tularensis holarctica 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 N1, 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.