

DOI:10.13350/j.cjpb.230509

• 论著 •

多房棘球绦虫热休克蛋白 90 的生物信息学分析*

常亮亮^{1,2}, 吕咏雪¹, 张翠影¹, 朱亚洲², 赵巍^{1,2,3**}(1. 宁夏医科大学基础医学院, 宁夏银川 750004; 2. 宁夏常见传染病防治重点实验室;
3. 宁夏医科大学科学技术研究中心)

【摘要】 目的 预测多房棘球绦虫热休克蛋白 90(*Echinococcus multilocularis* HSP90, EmHSP90)的生化特性、结构和抗原表位,为泡型包虫病疫苗的研究提供理论基础。 **方法** 登陆 NCBI 数据库检索并下载 EmHSP90 的氨基酸序列,通过 Expasy 在线预测网站预测 EmHSP90 的理化性质;采用 PRABI 数据库中的 SOPMA 预测 EmHSP90 的二级结构;利用 SWISS-MODEL 在线预测网站预测 EmHSP90 的三级结构;通过在线工具 NetAcet-1.0 预测 EmHSP90 的乙酰化位点,Netphos3.1 预测 EmHSP90 的磷酸化位点,NetNGlyc1.0 预测 EmHSP90 的 N-糖基化位点;利用在线数据库 TMHMM 预测 EmHSP90 的跨膜结构域;利用在线数据库 Signal P-5.0 Server 预测 EmHSP90 的信号肽序列;通过在线数据库 Predicting Antigenic Peptides 预测 EmHSP90 的抗原决定簇;利用 IEDB 数据库预测 EmHSP90 的优势 B 细胞表位;利用 SYFPEITHI 在线数据库预测 EmHSP90 的 T 细胞优势表位。 **结果** EmHSP90 由 711 个氨基酸组成,其相对分子质量为 $80.049\ 24 \times 10^3$,不稳定系数 41.09,为不稳定蛋白;亲水性平均系数 -0.276,是亲水性蛋白;其二级结构中 α 螺旋占 50.91%, β 转角占 4.92%,延伸链占 13.92%,无规则卷曲占 30.24%;含有 1 个乙酰化位点,64 个磷酸化位点(40 个丝氨酸(Ser)磷酸化位点,16 个苏氨酸(Thr)磷酸化位点,8 个酪氨酸(Tyr)磷酸化位点)及 4 个 N-糖基化位点;不含信号肽序列和跨膜结构域;EmHSP90 的平均抗原倾向指数为 1.024 4,共有 27 个抗原决定簇区域;该蛋白共有 B 细胞优势表位 10 条,CTL 细胞优势表位 13 条,Th 细胞优势表位 14 条。 **结论** 生物信息学方法预测 EmHSP90 为不稳定亲水性蛋白,含有 B 细胞优势表位和 T 细胞优势表位,可为泡型包虫病疫苗的研制提供参考。

【关键词】 多房棘球绦虫;EmHSP90;疫苗**【中图分类号】** R383.33**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2023)05-0542-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 May;18(5):542-546.]

Bioinformatics analysis of heat shock protein 90 in *Echinococcus multilocularis*CHANG Liangliang^{1,2}, LV Yongxue¹, ZHANG Cuiying¹, ZHU Yazhou², ZHAO Wei^{1,2,3} (1. Basic Medical College of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Ningxia Key Laboratory of Prevention and Treatment of Common Infectious Diseases; 3. Science and Technology Research Center of Ningxia Medical University)***

【Abstract】 Objective To predict the biochemical characteristics, structure and antigenic epitopes of *Echinococcus multilocularis* HSP90 (EmHSP90), and to provide a theoretical basis for the study of peptide vaccine against alveolar Echinococcosis. **Methods** Log in NCBI database to search and download the amino acid sequence of EmHSP90. The physical and chemical properties of EmHSP90 were predicted by Expasy online prediction website. SOPMA in PRABI database was used to predict the secondary structure of EmHSP90. SWISS-MODEL online prediction site was used to predict the tertiary structure of EmHSP90. The online tool NetAcet-1.0 predicted the acetylation site of EmHSP90, Netphos3.1 predicted the phosphorylation site of EmHSP90, and NetNGlyc1.0 predicted the n-glycosylation site of EmHSP90. Prediction of transmembrane domain of EmHSP90 by online database TMHMM. The Signal peptide sequence of EmHSP90 was predicted by Signal P-5.0 Server online database. Predicting Antigenic Peptides from an online database predicts the antigenic determinants of EmHSP90. Prediction of dominant B cell epitopes of EmHSP90 using IEDB database. Prediction of T cell dominance epitopes of EmHSP90 using SYFPEITHI online database. **Results** EmHSP90 was composed of 711 amino acids, its relative molecular weight was $80.049\ 24 \times 10^3$, and its instability coefficient was 41.09. Its average hydrophilic coefficient is -0.276, which is a hydrophilic protein. In the secondary structure, α -helix accounted for 50.91%, β -Angle accounted for 4.92%, extended chain accounted for 13.92%, random curling accounted for 30.24%. It contains 1 acetylation site, 64 phosphorylation sites (40 serine (Ser) phosphorylation sites, 16 threonine

* **【基金项目】** 重点研发计划(重大科技专项)(No. 2019BCG01001)。** **【通讯作者】** 赵巍, E-mail: zw-6915@163.com**【作者简介】** 常亮亮(1995-),女,宁夏人,硕士研究生在读。研究方向:感染与免疫。E-mail: 285073652@qq.com

(Thr) phosphorylation sites, 8 tyrosine (Tyr) phosphorylation sites) and 4 n-glycosylation sites. It does not contain signal peptide sequences and transmembrane domains. The mean antigen propensity index of EmHSP90 was 1.024 4, and there were 27 epitope regions. There were 10 dominant epitopes in B cells, 13 dominant epitopes in CTL cells and 14 dominant epitopes in Th cells. **Conclusion** Bioinformatics predicted that EmHSP90 was an unstable hydrophilic protein containing B-cell and T-cell dominant epitopes, which could provide reference for the development of peptide vaccine against alveolar hydatid disease.

【Key words】 *Echinococcus multilocularis*; EmHSP90; vaccine;

多房棘球蚴病又称泡型包虫病,是由多房棘球绦虫的幼虫感染人或动物引起的一种严重危害人类健康的人畜共患寄生虫病^[1]。该病在我国主要分布于西部畜牧业发达地区,这种严重的、近世界性的疾病至今仍然是一个重要的公共卫生问题^[2]。目前,针对多房棘球蚴病的临床治疗效果不佳,研发具有保护性表位的抗原显得尤为重要^[3-5]。本研究通过预测分析 EmHSP90 的生物信息学特征,为泡型包虫病肽疫苗的研究奠定理论基础。

材料与方法

1 EmHSP90 氨基酸序列

登陆 NCBI 数据库检索并下载 EmHSP90 氨基酸序列,GenBank 登录号为 CDS39694.1。

2 EmHSP90 的生物信息学分析

通过 ExPASy 在线预测网站对 EmHSP90 的理化性质进行预测。利用 PRABI 数据库中的 SOPMA 进行 EmHSP90 二级结构的预测;利用 SWISS-MODEL 在线预测网站对 EmHSP90 的三级结构进行预测。通过在线工具 NetAcet-1.0 预测 EmHSP90 的乙酰化位点;Netphos3.1 预测其磷酸化位点以及 NetNGlyc1.0 预测其 N-糖基化位点。使用在线数据库 TMHMM 分析 EmHSP90 的跨膜结构域;利用在线数据库 Signal P-5.0 Server 预测 EmHSP90 的信号肽序列。通过在线工具 Predicting Antigenic Peptides 对 EmHSP90 抗原决定簇进行预测。使用 IEDB 数据库对 EmHSP90 的优势 B 细胞表位进行预测;利用 SYFPEITHI 在线数据库预测 EmHSP90 的 T 细胞优势表位。

结 果

1 EmHSP90 的理化性质

EmHSP90 由 711 个氨基酸组成,分子式为 $C_{3495}H_{5562}N_{964}O_{1091}S_{47}$,相对分子质量为 $80.049\ 24 \times 10^3$;理论等电点 pI 为 5.00,是弱酸性蛋白;当蛋白的 N 端残基为 Met 时,该蛋白在哺乳动物网状红细胞中半衰期为 30 h,在酵母菌内半衰期为 20 h,在大肠埃希菌内半衰期为 10 h;不稳定系数 41.09,为不稳定蛋白;脂肪族氨基酸指数 84.46;亲水性平均系数 -

0.276,是亲水性蛋白。

2 EmHSP90 的空间结构

2.1 二级结构 预测 EmHSP90 的二级结构以 α 螺旋(Alpha helix)为主,占 50.91%; β 转角(Beta turn)占 4.92%,延伸链(Bend region)占 13.92%,无规则卷曲(Random coil)占 30.24%(图 1)。



图 1 SOPMA 预测的 EmHSP90 二级结构
Fig.1 The secondary structure of EmHSP90 predicted by SOPMA

2.2 三级结构 通过 SWISS-MODEL 在线软件预测 EmHSP90 的三级结构,选择相似度、覆盖度最高的模板 预测得到 EmHSP90 的三级结构(图 2A)。EmHSP90 的预测结构与模板覆盖率为 95%。该模型 GMQE 评分为 0.68,QMEAN 评分为 -2.85,结果显示波形图稳定,模型可靠(图 2B-C)。

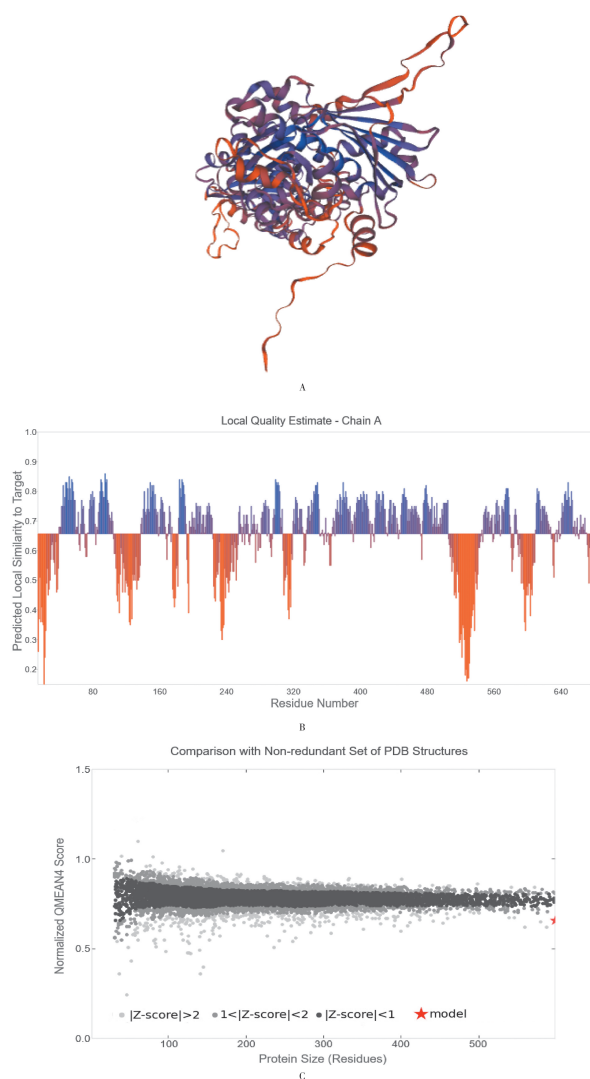


图 2 EmHSP90 的三级结构预测
Fig. 2 Tertiary structure prediction of EmHSP90

3 EmHSP90 的乙酰化位点、磷酸化位点及 N-糖基化位点

通过 NetAcet-1.0 预测 EmHSP90 共有 1 个乙酰化位点(图 3A);Netphos3.1 预测 EmHSP90 共有 64 个磷酸化位点,40 个丝氨酸磷酸化位点,16 个苏氨酸磷酸化位点,8 个酪氨酸磷酸化位点(图 3B);NetNGlyc1.0 预测 EmHSP90 共有 4 个 N-糖基化位点(图 3C)。

4 跨膜结构域及信号肽预测

通过在线数据库 TMHMM 分析 EmHSP90 的跨膜结构域,Signal P-5.0 Server 分析 EmHSP90 的信号肽序列,结果显示该蛋白无跨膜区域(图 4A),是一种非跨膜蛋白;也未发现信号肽序列(图 4B)。

5 EmHSP90 抗原决定簇分析

通过在线工具 Predicting Antigenic Peptides 对 EmHSP90 抗原决定簇进行预测,结果如图 5。EmHSP90 的平均抗原倾向指数为 1.0244,共含有 27

个抗原决定簇区域,表明 EmHSP90 含有较多的优势抗原表位结构,抗原倾向指数高。

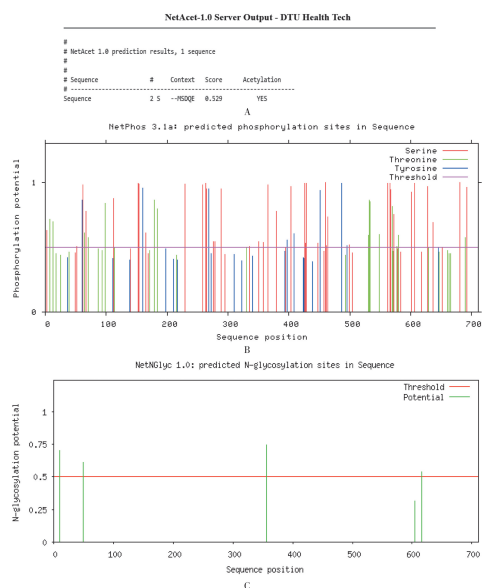


图 3 EmHSP90 乙酰化位点、磷酸化位点及 N-糖基化位点预测
Fig. 3 Acetylation site and Phosphorylation sites and the N-glycosylation sites of EmHSP90

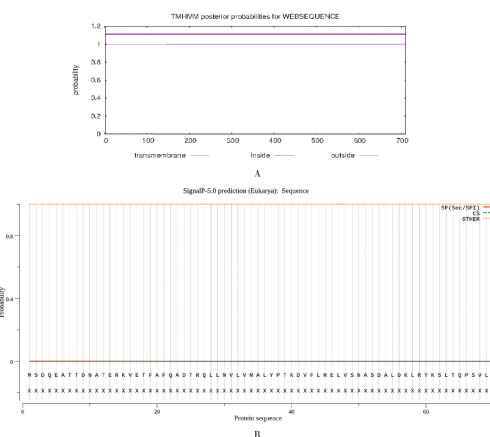


图 4 EmHSP90 的跨膜结构及信号肽预测
Fig. 4 Transmembrane structure and the signal peptides of EmHSP90

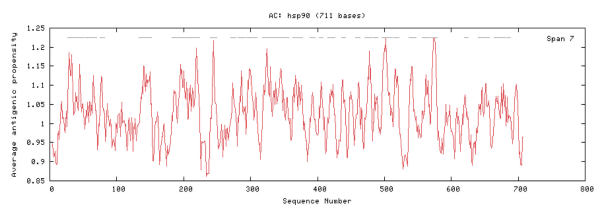


图 5 EmHSP90 的抗原决定簇预测
Fig. 5 Prediction of antigenic determinant of EmHSP90

6 EmHSP90 的抗原表位

6.1 B 细胞表位 通过 IEDB 预测出 B 细胞表位 25 条(图 6),去除长度过长及过短的表位,共选出 10 条优势表位,结果见表 1。

表 1 B 细胞表位预测
Table 1 B-cell epitope prediction

序号 Order	位置 Location	序列 Sequence
1	5-18	EATTDNATERKVVET
2	59-72	RYKSLQPSVLETN
3	118-131	MGALKDGAADMVMA
4	167-182	GESFTIRAWNEETLKR
5	189-202	HMKRQQCVEYLEPH
6	306-318	PPAAYFARNGRPH
7	353-385	LPLNLSRDAIRES
8	380-392	IELMQEMAEDAQA
9	628-635	STEGMPNK
10	653-661	GFVLEEPKT

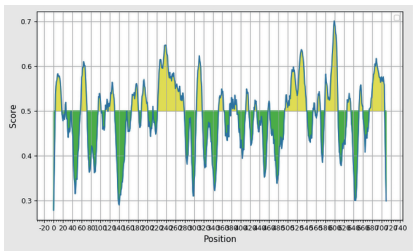


图 6 B 细胞优势表位预测
Fig. 6 The advantage epitope of B cell

6.2 T 细胞表位 通过 SYFPEITHI 在线工具,选择等位基因 HLA-A * 0201 预测 CTL 细胞抗原表位,选用长度为 9 个氨基酸进行分析(阈值设定为 24)。以 HLA-DRB1 * 0401 预测 Th 细胞抗原表位,选用长度为 15 个氨基酸(设定阈值为 26);采用 VaxiJen2.0 评估其抗原性,根据分数确定出 13 个 CTL 细胞优势表位(表 2)和 14 个 Th 细胞优势表位(表 3)。

表 2 HLA- A0201 限制性 CTL 表位
Table 2 HLA-A0201 restricted CTL table bits

序号 Order	起始点 Initial point	序列 Sequence	分数 Score
1	28	LLNVLVNAL	30
2	555	ILGERVESV	30
3	495	YLGKSLVCV	28
4	336	LIPDYLNFL	27
5	340	YLNFLIGVV	27
6	142	FLVADRVEV	25
7	648	ALLDSGFVL	25
8	668	ALIRMFLEI	25
9	321	RLYVKRVLV	24
10	453	RLYVKRVLV	24
11	457	SMASVSDSV	24
12	469	GLKKRDVEV	24
13	619	IIIGLKKML	24

讨 论

泡型包虫病俗称“虫癌”,危害严重。该病的发生不易察觉,并且潜伏期长,通常情况下患者初次感染 10 年以上才能出现明显的临床症状,而且被发现时已

经处于疾病的中晚期,此时大多数患者已有大量的肝浸润及肺、脑转移,失去了治疗的最佳时机。目前手术治疗该病仍是唯一比较有效的方法^[6],但是极易复发,除了阿苯达唑外^[7]还没有一个比较有效的治疗药物。关于多房棘球蚴致病的发生机制仍尚不明确,所以泡型包虫病的诊断及其免疫预防是十分重要的。

表 3 HLA- DRB1 * 0401 限制性 Th 表位
Table 3 Restricted th epitopes of HLA-DRB1 * 0401

序号 Order	起始点 Initial point	序列 Sequence	分数 Score
1	18	TFAFQADTRQLLNVL	28
2	57	KLRYKSLTQPSVLET	28
3	139	YSAFLVADRVEVVS	28
4	394	SAFVGNFQRSIKLGV	28
5	41	DVFLRELVSNASDAL	26
6	287	HFSVEGELSFRALLF	26
7	342	NFLIGVVDSEDLPLN	26
8	383	MQEMAEDAQAISAFY	26
9	415	RQKLANLLRYYSSKS	26
10	485	DEYVNVAMTEYLGKS	26
11	497	GKSLVCVSRLDLQLP	26
12	638	RDMLEILYNTALLDS	26
13	663	TNTIHALIRMFLEIP	26
14	679	CESVKDAEQVTADSD	26

HSP90 是一种高度保守且普遍存在的分子伴侣,在细胞生物学的几乎所有方面都发挥重要的功能作用,包括细胞周期控制、细胞存活、激素和其它信号通路等许多细胞过程^[8-11]。HSP90 以同二聚体形式存在^[12],其中单个单体包括 3 个结构域:N 端结构域、中间结构域和 C 端结构域。近年来 HSP90 已成为癌症的主要治疗靶点^[13],使用 HSP90 抑制剂作为化学生物探针在揭示伴侣在免疫功能的多个方面的重要作用方面具有重要价值。HSP90 作为神经退行性疾病的治疗靶点以及抗病毒药物和抗原虫感染的开发也越来越受到重视。本研究利用在线软件对 EmHSP90 进行了预测分析,从 NCBI 数据库获得 EmHSP90 的氨基酸序列,并对其理化性质及其空间结构进行了分析。一般认为,翻译合成后的蛋白质经过特定类型的翻译后修饰才能获得相应的活性、结构及功能^[14]。棘球绦虫是多细胞寄生虫,在宿主体内发育的过程中涉及十分复杂的信号转导途径与信号分子,相关分子的乙酰化、磷酸化及糖基化可启动相应基因的转录并翻译蛋白质,以适应寄生生活的需要。因此本研究采用生物信息学方法预测分析了 EmHSP90 的修饰位点,发现其具有 1 个乙酰化位点,64 个磷酸化位点(40 个丝氨酸(Ser)磷酸化位点,16 个苏氨酸(Thr)磷酸化位点,8 个酪氨酸(Tyr)磷酸化位点)和 4 个 N-糖基化位点,提示该蛋白在细胞信号转导过程中的乙酰化、磷酸化和糖基化可能与寄生虫逃避宿主免疫应答密切相关。通

过在线数据库 TMHMM 分析 EmHSP90 的跨膜结构域,Signal P-5.0 Server 分析 EmHSP90 的信号肽序列,结果表明该蛋白是一个非跨膜蛋白并且无信号肽序列。通过 Predicting Antigenic Peptides 对 EmHSP90 抗原决定簇进行预测,其平均抗原倾向指数为 1.0244,共含有 27 个抗原决定簇区域,表明 EmHSP90 含有较多的优势抗原表位结构,抗原倾向指数较高。表位是指抗原分子中决定抗原特异性的特殊化学基团,包括 B 细胞表位和 T 细胞表位^[15]。棘球绦虫为多细胞寄生虫,在不同生活阶段的抗原成分,其诱导不同的特异性免疫应答,涉及体液免疫与细胞免疫^[16]。在筛选的蛋白分子中,既是 B 细胞表位又是 T 细胞表位的肽段(称为交叉反应性表位肽)不仅可以诱导体液免疫,还可诱导细胞免疫^[17-18],对棘球绦病疫苗的设计有十分重要的意义。本研究通过 IEDB、SYFPEITHI 分别预测了 EmHSP90 的 B 细胞表位与 T 细胞表位,经过筛选,分别得到优势 B 细胞表位 10 条,CTL 细胞优势表位 13 条,Th 细胞优势表位 14 条。因此证明 EmHSP90 可以作为泡型包虫病疫苗的一个候选分子。

目前,对于 HSP90 的研究备受关注,但是对于 HSP90 在棘球绦病方面的研究鲜有报道。基于 HSP90 在抗原呈递、免疫效应细胞应答和炎症过程调节中的细胞内和细胞外作用,本研究利用生物信息学的方法预测 EmHSP90 含有丰富的优势 T、B 细胞表位,为泡型包虫病疫苗的研发奠定了理论基础。

【参考文献】

- [1] Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas CA, et al. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis[J]. Adv Parasitol, 2017(95): 315-493.
- [2] Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis: Advances in the 21st century[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2): e00075-18.
- [3] Li K, Lowey C, Sandstrom P, et al. CAVES: A novel tool for comparative analysis of variant epitope sequences[J]. Viruses, 2022, 14(6): 1152.
- [4] Albekairi TH, Alshammari A, Alharbi M, et al. *E. hormaechei* designing of a novel multi-antigenic epitope-based vaccine against: An intergraded reverse vaccinology and immunoinformatics approach[J]. Vaccines (Basel), 2022(10): undefined.
- [5] Arora N, Keshri AK, Kaur R, et al. Immunoinformatic approaches for vaccine designing for pathogens with unclear pathogenesis[J]. Methods Mol Biol, 2022(2412): 425-437.
- [6] Strohaecker J, Sulyok M, Koenigsrainer A, et al. Alveolar echinococcosis-A challenging task for the hepatobiliary surgeon[J]. Pathogens, 2021(11): undefined.
- [7] Weingartner M, Stucheli S, Jebbawi F, et al. Albendazole reduces hepatic inflammation and endoplasmic reticulum-stress in a mouse model of chronic *Echinococcus multilocularis* infection[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2022(16): e0009192.
- [8] Lang BJ, Prince TL, Okusha Y, et al. Heat shock proteins in cell signaling and cancer[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2022(1869): 119187.
- [9] Prodromou C. The 'active life' of Hsp90 complexes[J]. Biochim Biophys Acta, 2012(1823): 614-23.
- [10] Lorenz OR, Freiburger L, Rutz DA, et al. Modulation of the Hsp90 chaperone cycle by a stringent client protein[J]. Mol Cell, 2014(53): 941-53.
- [11] Dixit A, Verkhivker GM. Probing molecular mechanisms of the Hsp90 chaperone: biophysical modeling identifies key regulators of functional dynamics[J]. PLoS One, 2012(7): e37605.
- [12] Pearl LH, Prodromou C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery[J]. Annu Rev Biochem, 2006(75): 271-294.
- [13] Miyata Y, Nakamoto H, Neckers L. The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks[J]. Curr Pharm Des, 2013(19): 347-365.
- [14] Czuba LC, Hillgren KM, Swaan PW. Post-translational modifications of transporters[J]. Pharmacol Ther, 2018(192): 88-99.
- [15] Ramana J, Mehla K. Immunoinformatics and epitope prediction[J]. Methods Mol Biol. 2020(2131): 155-171.
- [16] Wang L, Gao J, Lan Xi, et al. *Echinococcus granulosus* identification of combined T-cell and B-cell reactive 95 antigens for the potential development of a multi-epitope vaccine[J]. Ann Transl Med, 2019(7): 652.
- [17] Lindesmith LC, Brewer-Jensen PD, Mallory ML, et al. Antigenic site immunodominance redirection following repeat variant exposure[J]. Viruses, 2022(14): undefined.
- [18] Bayindala X, Huang H, Gao S, et al. *Echinococcus multilocularis* induces surface high expression of inhibitory killer immunoglobulin-like receptor on natural killer cells[J]. Allergol Immunopathol (Madr), 2021(49): 78-86.

【收稿日期】 2022-12-30 【修回日期】 2023-03-15

(上接 541 页)

- [14] Prisic S, Dankwa S, Schwartz D, et al. Extensive phosphorylation with overlapping specificity by *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinases[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(16): 7521-7526.
- [15] Deol P, Vohra R, Saini A K, et al. Role of *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr kinase PknF: implications in glucose transport and cell division[J]. J Bacteriol, 2005, 187(10): 3415-3420.
- [16] Madan R, Pandit K, Bhati L, et al. Mining the *Mycobacterium tuberculosis* proteome for identification of potential T-cell epitope based vaccine candidates[J]. Microb Pathog, 2021(157): 104996.

【收稿日期】 2022-12-16 【修回日期】 2023-02-25