



ORIGINAL ARTICLE

OPEN ACCESS

Comparison of two immunogenic recombinant constructs based on T cell epitopes (extracted from whole proteome screening of *Salmonella typhi* bacteria) against typhoid fever; an immunoinformatic study

Fateme Beyranvand^{1 MSc}, Nemat Shams^{1 * PhD}, Amin Jaydari^{1 PhD}, Narges Nazifi^{2 PhD}, Peyman Khademi^{1 PhD}

¹ Department of Microbiology and food hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Tehran, Iran.

² Department of Basic Veterinary Science, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

ABSTRACT

AIMS: *Salmonella typhi* is a gram-negative pathogen that causes typhoid fever. Since the least expensive way to combat this pathogen is vaccination, access to an effective vaccine is very important.

MATERIALS AND METHODS: For this purpose, the proteome of this bacterium with 4322 proteins was extracted from the NCBI server and screened for antigenicity and allergenicity. Finally, the remaining proteins were used to predict T-cell-specific epitopes, and two immunogenic recombinant constructs consisting of epitopes and molecular adjuvant were designed (the first construct contains one repeat of each epitope and the second construct contains two repeats of each epitope). Physicochemical properties, secondary and tertiary structures, antigenicity, solubility, immune system stimulation ability, and molecular docking of each construct were evaluated by reliable online servers.

FINDINGS: At the end of the evaluation of 4322 proteins, seven proteins remained, and the process of predicting their MHC I and MHC II epitopes was completed, after re-evaluation of the epitopes, the desired structures were designed. Despite the observed expected results in both immunogenic structures, the second structure showed more stability and antigenic (the antigenicity of the first and second structures was 0.6701 and 0.6760, respectively). While both structures were hydrophilic, the distribution of extended sheet and random coil structures in the second structure was higher than in the first structure. Furthermore, the second structure was able to bind to its cell surface receptor with a lower docking energy and shorter average hydrogen bond length. Both structures were able to direct the immune system towards stimulating cellular immunity, i.e. increasing the secretion of T helper and T cytotoxic cells.

CONCLUSION: Based on the presented results, it seems that the second construct, which includes two repeats of each epitope, is a more suitable candidate for the development of an immune vaccine against typhoid fever.

KEYWORDS: Proteome; Epitopes; T cell; Recombinant Vaccine; *Salmonella*; Cellular Immunity; Bioinformatics.

How to cite this article:

Beyranvand F, Shams N, Jaydari A, Nazifi N, Khademi P. Comparison of two immunogenic recombinant constructs based on T cell epitopes (extracted from whole proteome screening of *Salmonella typhi* bacteria) against typhoid fever; an immunoinformatic study. J Police Med. 2024;13:e11.

*Correspondence:

Address: Lorestan University, 5th kilometer of Tehran road, Lorestan Province, Iran, Postal Code: 6815144316
Mail: Shams.n@lu.ac.ir

Article History:

Received: 28/04/2024
Accepted: 13/07/2024
ePublished: 17/07/2024

Comparison of two immunogenic recombinant constructs based on T cell epitopes (extracted from whole proteome screening of *Salmonella typhi* bacteria) against typhoid fever; an immunoinformatic study

INTRODUCTION

In recent decades, the use of various biological agents as weapons of mass destruction has been a very worrying issue. The spread of the smallpox virus by British forces during the war with India and France, the use of the common anthrax bacterium, the outbreak of swine flu virus in Belgium, the outbreak of dengue virus in Cuba, and the use of mustard gas, tabun, and sarin against Iran by the Iraqi Ba'ath regime are examples of the use of dangerous biological agents in the discussion of bioterrorism [1]. Salmonellosis is also one of the infectious diseases common between humans and livestock that is important in terms of economy and health. The causative agent of salmonellosis is a gram-negative, flagellated, motile, and facultatively anaerobic bacillus from the Enterobacteriaceae family called *Salmonella* [2]. This bacterium is excreted through feces and the main route of entry of the bacteria is through ingestion. The bacteria can also enter the host through the upper respiratory tract mucosa [3]. According to the World Health Organization, *Salmonella* causes disease in 16 to 33 million people yearly, resulting in 500,000 to 600,000 deaths [4]. In addition, the use of this bacterium as a biological weapon has also been widely discussed [5].

In recent years, immunization and protection of individuals through vaccination has been the most effective and least expensive way to combat various infectious diseases. According to the World Health Organization, about 80% of communicable diseases are diseases that have led to the death of more than 20 million people in the world. Therefore, vaccines can be considered the best tool to reduce the mortality rate from infectious diseases in the world, because they not only play an important role in the control and prevention of infectious diseases but also are an efficient method to reduce economic and psychological losses to individuals [2, 6]. The oral Ty21a vaccine and injectable capsular polysaccharide Vi vaccine are two common vaccines against typhoid fever. According to reports, the live attenuated Ty21a vaccine has low immunogenicity and requires several booster vaccination courses. Also, injectable capsular polysaccharide Vi vaccine, in addition to its short-term immunity period, has limitations in use in children [7, 8]. Therefore, the need to develop a new generation of vaccines and evaluate them is evident.

Currently, researchers have turned to the production of safe and recombinant vaccines to eliminate such complications or improve the immunogenicity of vaccines; because in the design and manufacture of this type of new vaccine,

also known as subunit vaccines, only parts of the pathogens that stimulate the immune system have been used [9]. Therefore, this study was designed to design, evaluate, and introduce an effective recombinant and subunit construct, through whole proteome scanning and identification of potent and immunogenic epitopes from the bacterium typhoid fever, based on immunoinformatics studies.

MATERIALS & METHODS

In this research study, the NCBI server was used to access the entire proteome of typhoid fever, with accession number AE014613.1. (This bacterium, with 4,791,961 base pairs, has 4,322 protein-coding regions and 327 non-protein-coding regions, and in this study, a set of 4,322 protein sequences was used).

Evaluation of the protectiveness of antigenicity and allergenicity of the proteome: In this study, the Vaxign-ML, Vaxijen, and AllerTop web servers were used to evaluate the protectiveness, antigenicity, and allergenicity of proteins or peptides extracted from the NCBI server, respectively. It should be noted that the settings used by the Vaxign-ML server were the default settings of the software itself, and the threshold set for using the Vaxijen server was 1.5. In the first step, their protectiveness was evaluated by the Vaxign ML server, and proteins or peptides that were not protective were removed. Then, the remaining peptides were evaluated by the Vaxijen server, and peptides whose antigenicity was less than 1.5 were successfully removed. The peptides screened from these two stages were evaluated for allergenicity and non-allergenicity, and allergenic peptides were also removed.

Prediction of MHCI and MHCII cell-stimulating epitopes and assessment of their toxicity: In this study, to access the best epitopes that can be recognized by MHCI and MHCII molecules, two reliable servers with high citation scores, IEDB and Propred, were used. It should be noted that for predicting MHCI cell epitopes, the alleles B-2705, A-0201, and A-0101 were used, and for predicting MHCII cell epitopes, the alleles DRB1-0101 and DRB1-0401 were used. Next, the ToxinPred web server was used to assess the toxicity or not of the obtained epitope sequences.

Engineering and evaluation of epitope-based immunoinformatics constructs: Finally to design a recombinant immunoinformatics construct based on the best screened epitopes, from the previous steps along with a molecular adjuvant (HBHA molecule with accession number P9WIP9) and the most suitable inflexible peptide linkers, CLC

5.5 software was used. It should be noted that in this study, to increase the weight of the construct and comparative immunological studies, two vaccine constructs based on recognizable epitopes were designed by MHCI and MHCII molecules. In construct number one, each of the epitopes was repeated once, and in construct number two, each of the epitopes was repeated twice. The final antigenicity of the designed constructs was evaluated by the Vaxijen server and finally, the secondary and tertiary structures of the aforementioned constructs were evaluated by the SOPMA and I-TASSER web servers, respectively, along with the amino acid sequences of the designed molecular constructs. Then, the best model proposed by the I-TASSAR server was refined using the GalaxyRefine server, and finally, to identify the best model from the refined tertiary structures, a Ramachandran plot was drawn for each of the proposed models by the VADAR server.

Evaluation of physicochemical properties, solubility, and immune system stimulation ability of the recombinant construct: The most important physicochemical properties of the designed molecular constructs (such as molecular weight, isoelectric point, instability index, GRAVY index, and aliphatic index) as well as their solubility were evaluated by the reliable and web-based servers ProtParam and PEPTIDE 2.0, respectively. Next, the immune system stimulation evaluation of the designed recombinant constructs was performed by the C-ImmSim server. To use the mentioned servers, the amino acid sequences of the recombinant constructs were used.

Molecular docking and hydrogen bond determination: In this study, the prediction of binding or non-binding of the HBHA domain bound to the designed recombinant constructs, known as ligand and its receptor, known as TLR4 proteins, was performed by the automated web server ClusPro 2.0. This server uses Piper, an FFT-based hard docking program, which rotates the ligand many times to translate it in the three axes X, Y, and Z relative to the receptor on a grid, and among these, it selects the best ligand placement or translation on the receptor with the lowest energy and eliminates those (structures) that are unstable due to high binding energy. Finally, it clusters the molecular docking process by finding the closest position for the correct ligand-receptor adjacency with an rmsd value of 9 carbon alpha angstroms. Finally, the number and length of hydrogen bonds resulting from these interactions, as well as the amino acids involved in this relationship, were examined and observed using LigPlot+2.2.8 and PyMol 1.3 software.

Ethical Permissions: This article is a

bioinformatics study aimed at designing a new generation of vaccines against the deadly disease typhoid fever. The authors of this article hereby declare that no human or animal was directly or indirectly used in the preparation of this manuscript.

Statistical Analysis: No statistical model was used in the present study.

FINDINGS

Collection of the entire proteome of Salmonella typhi bacteria and evaluation of their protectiveness: antigenicity, and allergenicity:

The sequences of 4322 proteins and peptides present in the entire proteome of Salmonella typhi bacteria were successfully extracted from the NCBI server. At the end of this step, 19 peptides remained, including peptides with accession numbers AA068071.1, AA068335.1, AA069049.1, AA069076.1, AA069118.1, AA069225.1, AA069267.1, AA069385.1, AA069399.1, AA069422.1, AA069489.1, AA069580.1, AA069743.1, AA069748.1, AA070162.1, AA070192.1, AA070695.1, AA070705.1, AA071551.1. The remaining peptides were all sub-aligned by the UniProt server, and between two peptides with sequence similarity above 80%, the peptide with lower antigenicity was removed. It should be noted that peptides that were very short (less than 40 amino acids) were all removed. The remaining proteins included proteins with accession numbers AA068071.1 (UniProt accession number Q8Z4Q7), AA069049.1 (UniProt accession number Q93MH4), AA069399.1 (UniProt accession number P0A1E6), A070162.1 (UniProt accession number Q93IS5), A070695.1 (UniProt accession number Q8XG14), AA071551 (UniProt accession number P66074), and AA069743.1 (UniProt accession number Q8Z8C1).

Prediction of specific epitopes of MHCI and MHCII molecules and evaluation of peptide toxicity:

In the present study, prediction of specific epitopes of MHCI and MHCII molecules from the final screened peptides with protein identification numbers AA068071.1, AA069049.1, AA069399.1, AA070162.1, AA070695.1, AA071551.1 and AA069743.1 from Salmonella typhi bacteria was successfully performed by IEDB and Propred servers. Also in this prediction, alleles A-0201, A-0101, and B-2705 were selected for MHCI molecules, and alleles DRB1-0101 and DRB1-0401 were selected for MHCII molecules. Finally, the highest-scoring epitopes that were presented jointly and overlapped in the results of both servers were selected for use in the design of recombinant constructs (Table 1).

Table 1) Sequences of the final epitopes of MHC I and MHC II molecules

Toxicity	Epitope sequence MHCII	Toxicity	Epitope sequence MHCI	Protein identification number
Non-toxic	MRFFFILMVLPGADR	Non-toxic	FSHTVGLTY	AA068071.1
Non-toxic	SAAFAAETATPAKTA	Non-toxic	KMKKVLALV	AA069049.1
Non-toxic	QNGFRNNATIDQWNA	Non-toxic	NSDITVGQY	AA069399.1
Non-toxic	VQQYNRQDDQASAR	Non-toxic	MVDPGAVVQQY	AA069743.1
Non-toxic	TDLIVAVVSPSGSHD	Non-toxic	VTNLDFDHY	AA070162.1
Non-toxic	IIAFNCQNGTPGDNR	Non-toxic	NRFGDPKR	AA070695.1
Non-toxic	VVDLNTLKAANIIG	Non-toxic	RRLPKFGFTSR	AA071551.1

acid sequence of the HBHA molecular adjuvant was placed by the EAAAK peptide linker. Also, to study the weight gain of the construct and other comparative immunological studies, another construct was designed with two repetitions of each of the epitopes, the KP inflexible linker, and the HBHA molecular adjuvant connected to the epitope domain by the EAAAK peptide linker (Figure 1).

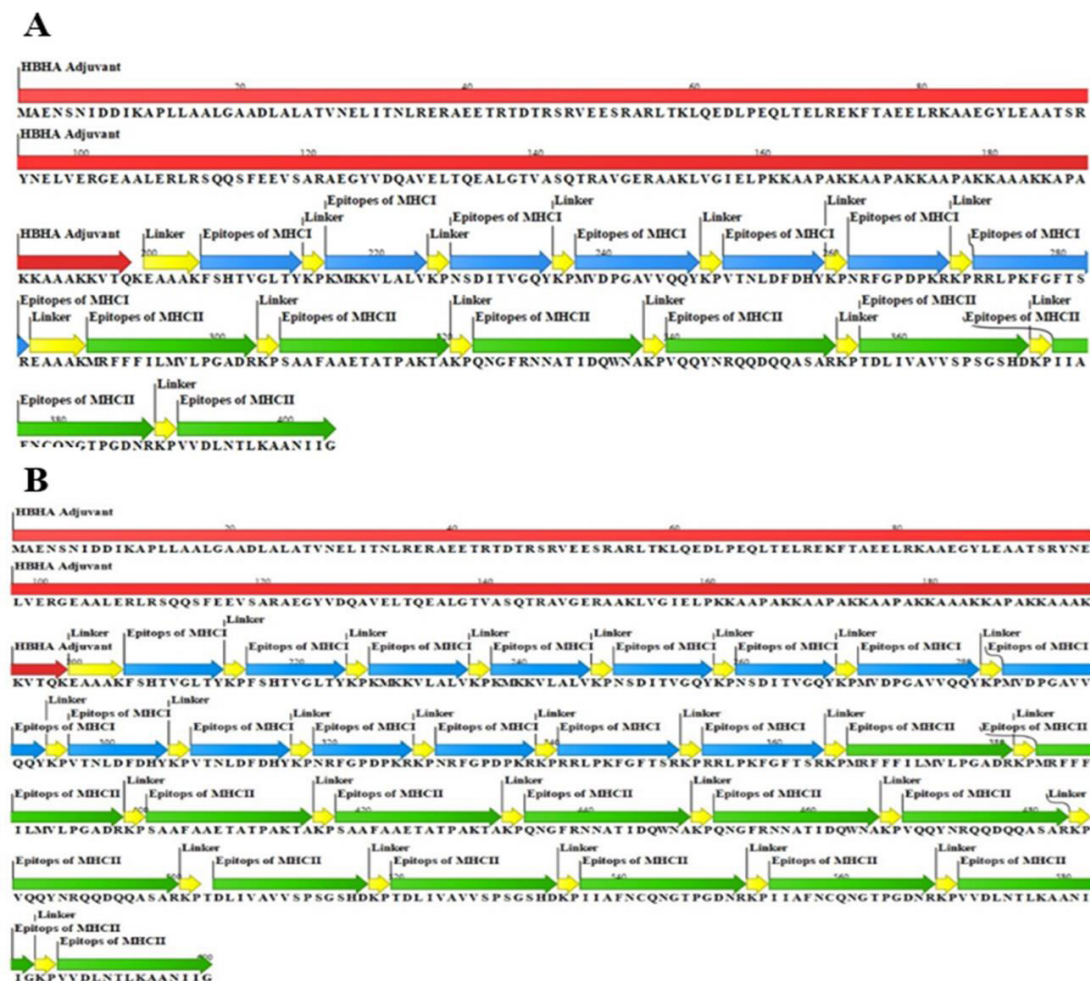


Figure 1) Structure of the designed constructs, consisting of the best-specialized epitopes of MHCI and MHCII molecules identified by two reliable servers IEDB and ProPred. In Figure A, the epitope domain contains one repeat of each epitope, while the epitope domain in Figure B contains two repeats of each epitope. In these figures, the red, blue, yellow, and green colors indicate the sequence of the HBHA molecular adjuvant, the epitopes recognized by MHCI molecules, the rigid peptide linker, and the sequence of epitopes recognized by MHCII molecules, respectively.

The second and third structures of each of the studied structures: Evaluation of different structural states in the second structure of the engineered structures were successfully evaluated by the SOPMA server and based on the results presented, the first structure had 53.47% alpha helix, 18.7% extended sheets and 39.36% random coil, while the distribution of these structures in the second model was as follows: the share of alpha helix was 42.67%, extended sheets was 10.50% and random coil was 46.83%. The third structure of the introduced structures was also successfully predicted by the I-TASSER server

and then evaluated by Ramachandran statistical analysis. Based on the observed results, the predicted structures needed to be refined. In the initial 3D model of the first structure, the number of amino acids in the core region, allowed and disallowed, was 80, 16, and 1%, respectively, which were improved to 94, 3, and 0% after refinement (Figure 2, Part 1). Also, in the case of the initial predicted model, the number of amino acids in the core region, allowed and disallowed, was 84, 13, and 1%, respectively, which were improved to 93, 5, and 0% after refinement (Figure 2, Part 2).

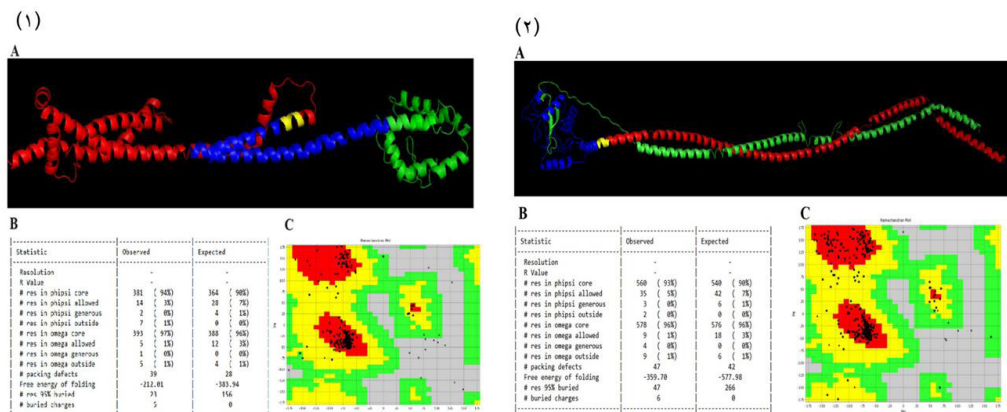


Figure 2) 1 and 2 are related to the tertiary structure investigation of the first and second structures, respectively. A: The predicted model of the tertiary structure, by the I-TASSR server and then refined by the Galaxy Refine2 server. In this model, the red, yellow, blue, and green colors correspond to the molecular adjuvant HBHA, the peptide linker EAAAK, the stimulating epitopes of MHC I molecules, and the stimulating epitopes of MHC II molecules, respectively. B: Ramachandran statistical analysis, corresponding to the best refined 3D model. C: Ramachandran plot, corresponding to the best predicted and refined 3D model. The red, yellow, green, and gray areas correspond to the core, allowed, acceptable, and disallowed regions, respectively.

Physicochemical properties, antigenicity, solubility and immune system stimulation of the designed constructs: The results of the physicochemical properties of the designed constructs showed that the first construct with a length of 404 amino acids had a molecular weight of 44103.42 Daltons, an isoelectric point of 9.08, an aliphatic index of 75.79, a GRAVY index of -0.585, and an instability index of 35.37. While the second construct with a length of 600 amino acids had a molecular weight of 65936.67 Daltons, an isoelectric point of 10.01, an aliphatic index of 48.72, a GRAVY index of -0.609, and an instability index of 48.30. As observed, although both structures were considered thermally stable structures (based on the algorithm defined by the ProtParam server, if the numbers provided for the instability index are greater than 40, the protein is declared unstable), the stability of the second structure was higher than that of the first. Also, the low and negative range of the GRAVY index

indicated the possibility of the proteins being spherical (hydrophilic) rather than membrane-like (hydrophobic). It should be noted that, due to the special importance of the instability index provided, several different configurations of the MHC I and MHC II epitopes, as well as different repeats of the peptide linkers, were considered, and the presented models can be considered the simplest and most acceptable models for study. In addition, based on the results reported by the Vaxijen server, the antigenicity of the first and second constructs was 0.6701 and 0.6760, respectively.

In the investigation of the hydrophobicity parameter of the studied structures by the PEPTIDE 2.0 server, it was found that in the first structure, the share of hydrophobic, acidic, basic, and neutral amino acids was 44.55, 11.63, 17.75, and 26.24%, respectively, while in the second structure, the mentioned ones were reported as 44.5, 9.83, 17.67 and 28%, respectively. According to this

Comparison of two immunogenic recombinant constructs based on T cell epitopes (extracted from whole proteome screening of *Salmonella typhi* bacteria) against typhoid fever; an immunoinformatic study

server, hydrophilic peptides contained more than 25% charged residues, and hydrophobic peptides containing 50 to 75% hydrophobic or hydrophobic residues could be insoluble or only partially soluble in aqueous solutions. As observed, both designed constructs were considered hydrophilic, since less than 50% of the amino acids were hydrophobic and the total percentage of charged amino acids (acidic and basic) present in the construct was less than 25%. Furthermore, the results of the immune response simulation showed that each of the developed vaccine constructs significantly increased the primary and secondary immune responses. It should be noted that based on the results observed in response to stimulation by the developed vaccine constructs, the levels of IFN- γ ,

IL-2, and TGF- β as important markers in cellular immunity increased significantly for a long time. The increase in IgM antibody production was related to the primary response against each of the constructs, while the increase in the levels of IgM, IgG1 + IgG2, and IgG + IgM antibodies along with increased B cell proliferation indicated the secondary response against each of the constructs. In addition, the results showed the generation of memory B cells as well as the induction of both T helper and cytotoxic T cells. Also, based on the reported graphs, a significant increase in the population of activated B cells and activated T helper cells was observed after exposure to the developed vaccines (Figures 3-1 and 3-2).

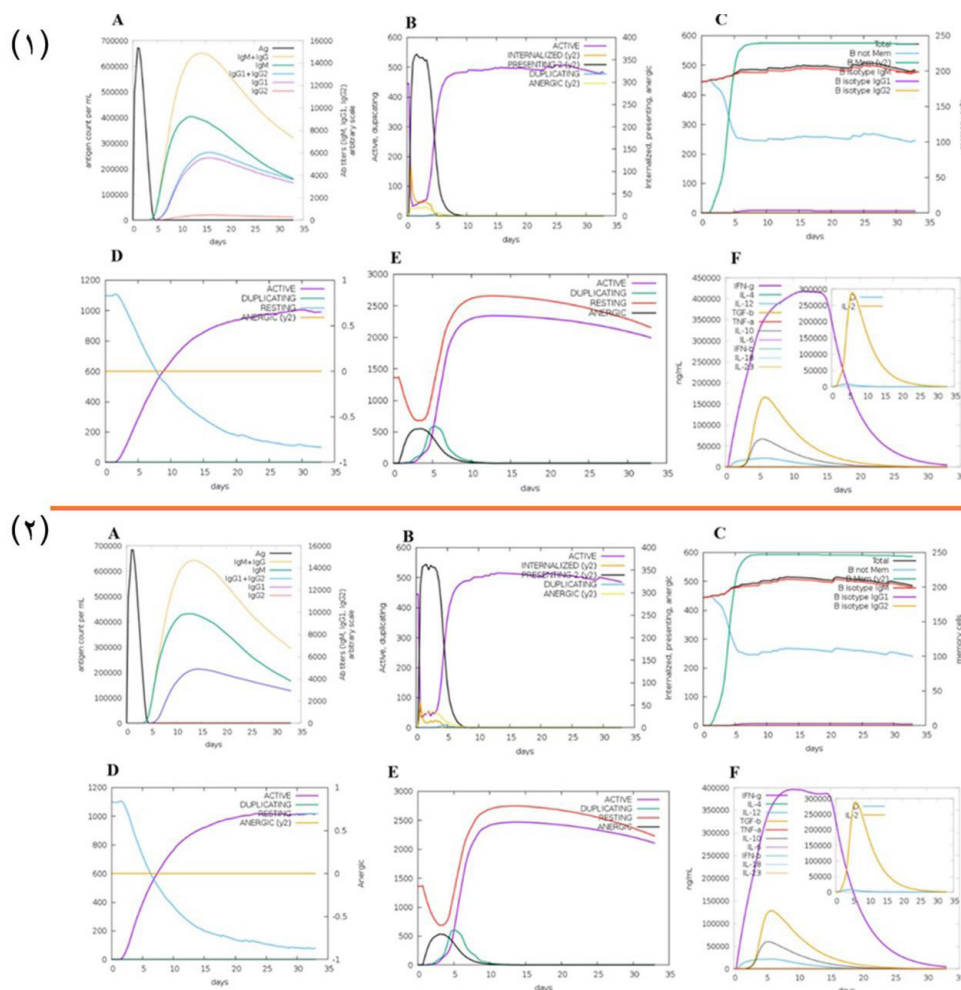


Figure 3) 1 and 2 are the simulation graphs of immune responses by the first and second constructs, respectively. A: Production of different antibodies against the developed vaccine. B: Increase in the population of activated B cells. C: Proliferation of B cells and production of memory cells. D: Increase in the population of activated B cells after exposure to the developed vaccine. E: Growth in the population of activated helper T cells after exposure to the developed vaccine construct. F: Increase in the population of activated cytotoxic T cells.

Molecular docking evaluation: The molecular docking probability between the second adjuvant HBHA (designed in both structures) and its receptor (TLR4) was successfully evaluated by the

ClusPro server. The observed results showed that in each structure, a significant hydrogen bond was formed between the two domains (Figure 4).

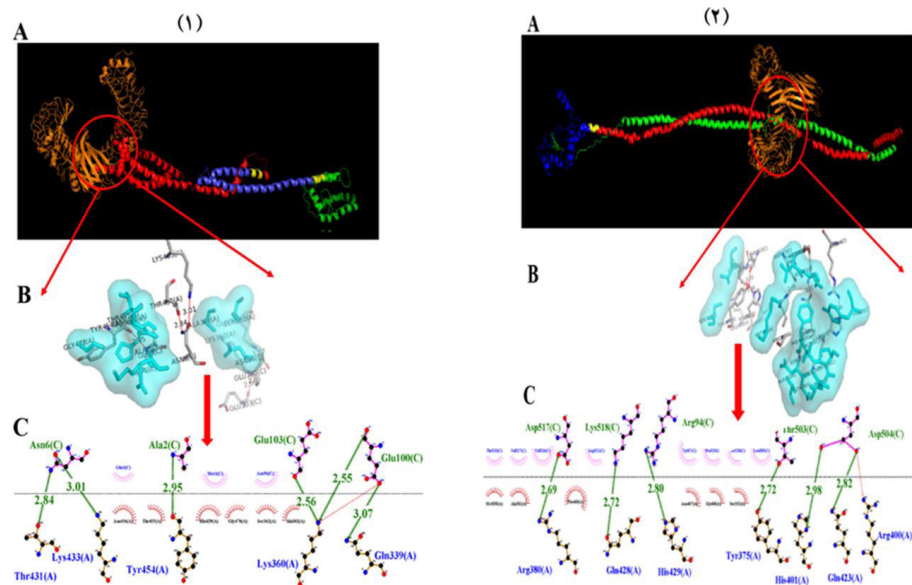


Figure 4) Images 1 and 2 are the results of molecular docking of the first and second recombinant constructs with the TLR4 receptor, respectively. A: In this figure, the orange, red, yellow, blue, and green colors correspond to the TLR4 receptor, the HBHA molecular adjuvant, the EAAAK peptide linker, the MHCI molecule-stimulating epitopes, and the MHCII molecule-stimulating epitopes, respectively, which were visualized by the PyMol software. B: The molecular binding region between the recombinant constructs and the TLR4 receptor, through hydrogen bonds, which was displayed by the PyMol software. The red lines indicate the hydrogen bonds between the two domains. C: Representation of the amino acids involved from the two domains in the molecular docking process between the recombinant constructs and the TLR4 receptor. In these images, the amino acids of the TLR4 receptor are shown in blue and the amino acids of the recombinant constructs are shown in green. Hydrogen bonds are also indicated as green dashed lines.

The molecular docking process was performed in both structures by presenting several different models, out of which, the zero model with the highest number of cluster members in both structures was selected (the first structure had 115 cluster members and the second structure

had 98 cluster members). In the first structure, the lowest binding energy in the docked model was calculated to be -1013.3 kcal/mol, and in the second structure, -942.8 kcal/mol. [Table 2](#) lists the amino acids involved in hydrogen bonds and the bond lengths.

Table 2) List of amino acids involved in hydrogen bonding and bond lengths between HBHA and the TLR4 receptor

Amino acids of the HBHA molecule	Amino acids of the TLR4 molecule	Unit length (Å)
First structure		
Asparagine 6	Threonine 431	2.84
Alanine 2	Lysine 433	3.01
Glutamic acid 103	Tyrosine 454	2.95
Glutamic acid 100	Lysine 360	2.56
Second structure		2.55
Arginine 380	Glutamine 339	3.07
	Glutamine 428	
Histidine 429	Aspartic Acid 517	2.69
Tyrosine 375	Lysine 518	2.72
Histidine 401	Arginine 94	2.80
Amino acids of the HBHA molecule	Threonine 503	2.72
First structure	Aspartic Acid 504	2.98
	Glutamine 423	2.82

DISCUSSION

Important intracellular bacterial species include Salmonella, Listeria, Brucella, Rickettsia, and Legionella. Salmonella typhi invades macrophages for replication and is therefore considered an intracellular pathogen [12]. As expected, the main feature of these pathogens is their survival

through intracellular colonization and replication. This intracellular biology leads to intracellular processing and subsequent presentation of bacterial products by MHC class II molecules to CD4+ T lymphocytes, which, after activation, differentiate into Th1 and Th2 lymphocytes [13]. Th1 lymphocytes, by producing cytokines such as

Comparison of two immunogenic recombinant constructs based on T cell epitopes (extracted from whole proteome screening of *Salmonella typhi* bacteria) against typhoid fever; an immunoinformatic study

interferon-gamma and interleukin-2, play a major role in inducing cell-mediated immune responses (responses mediated by cytotoxic T cells and macrophages) and activating macrophages [14]. Activated macrophages also initiate a strong oxidative burst, mediated by the phagocyte NADPH oxidase (Nox2) to increase the production of oxygen free radicals (O₂⁻) and subsequently the production of H₂O₂, which is associated with the consumption of protons or the reaction with nitric oxide (NO) to form peroxynitrite (ONOO⁻), which leads to bacterial killing and the creation of an alkaline environment [15, 16]. Therefore, the stimulation of cellular immunity and the generation of memory cells are of great importance in terms of a faster response to eliminate intracellular pathogens such as *Salmonella*.

In this study, to design epitope-based vaccine constructs, first MHC I epitopes and then MHC II epitopes belonging to seven immunogenic proteins screened from whole proteome scanning were linked together using a KP hard linker. Then, this epitope domain was linked to HBHA protein, as a molecular adjuvant at the N-terminal of the developed vaccine, using a peptide linker "EAAAK". In general, the HBHA protein from *Mycobacterium tuberculosis* is an important virulence factor that helps this bacterium to attach to its host cells and extracellular matrix [17]. Studies have shown that HBHA protein, as a novel agonist of the TLR4 receptor, can stimulate dendritic cell maturation, IFN- α secretion, and T cell-mediated cellular cytotoxicity without systemic toxicity [8]. As a result, it can be considered a molecular adjuvant. Linkers also play a key role in the biological function of a structure consisting of linked proteins. The EAAAK (which has an alpha-helical structure) and KP peptides have tight linkages that are usually applied in the structure of a protein consisting of multiple domains to maintain its function [19]. The use of recombinant vaccine constructs, consisting of different epitope repeats, is of great interest and attention to researchers, as experimental findings have shown that recombinant chimeric proteins consisting of T helper epitopes, in tandem repeats, are more immunogenic and can significantly increase the stimulation of the immune system [20]. For example, a study by *Nazifi et al.* in 2019 can be cited, which investigated the degree of stimulation of the immune system against *Brucella* bacteria using a construct consisting of multiple tandem repeats of the OMP31 antigen epitope from *Brucella melitensis*. These investigators reported that among the different treatments, the group vaccinated with the multi-epitope construct had the highest IFN- γ , IL-2, and IgG2a secretion rates. Furthermore, after challenging

the vaccinated treatments with an acute strain of *Brucella melitensis*, the microbial load of the treatment that received the candidate vaccine construct consisting of consecutive repeats of a single epitope was significantly lower [21]. Since glomerular permeability in the kidney is affected by the weight and size of the molecule, low molecular weight proteins (mw < 40 kDa) are essentially freely filtered, whereas high molecular weight proteins (mw > 100 kDa) are almost completely restricted [22, 23]. In this study, two constructs with approximate weights of 44 and 65 kDa were designed. This was while, in a study conducted by *Forouharmehr* in 2024 with extensive proteome scanning on the bacterium *Coxiella burnetii*, he designed a construct consisting of an epitope and adjuvant with a molecular weight of 22.59 kDa [24]. Also, in a study conducted by *Shams et al.* in 2020 by predicting the epitopes of important antigens of the bacterium *Salmonella typhi*, they introduced a vaccine construct with a weight of 41 kDa [25]. In another study conducted by *Rashidian* and his colleagues in 2020, by predicting the epitopes of the most important antigens of the bacterium *Coxiella burnetii*, they reported a vaccine construct with a weight of 41.50 kDa [26]. As can be seen, the weight of the recombinant constructs designed in previous studies is relatively high, as in the present study, and they are not removed during passage through the renal filtration system due to their high weight. The instability index obtained in this study is 35.37 and 30.48 for the first and second constructs, respectively, and according to the proprietary algorithm of the ProtParam server, proteins that present an instability index below 40 are thermally stable. *Forouharmehr* in 2024 [24], *Shams et al.* in 2020 [25], and *Rashidian et al.* in 2020 [26] have designed and investigated epitope-based immunoinformatics constructs and reported that each of the aforementioned recombinant constructs is stable with instability indices of 31.9, 7.04, and 32.39, respectively. In addition, both structures designed in this study were able to bind to their TLR4 receptor by forming 6 hydrogen bonds. In a study, the number of hydrogen bonds observed during the docking of the designed structure was reported to be 15 [24]. Therefore, these reports have shown that the binding of the epitope domain to the HBHA molecule does not prevent the binding of this protein to the TLR4 receptor on the cell surface. Nowadays, the use of the prepared platform in the in silico space has received much attention to obtain valuable molecular compounds in various fields of biology. One of the most widely used tools available in the in silico space, which has high accuracy and reliability, are specialized servers

for predicting the immunogenic parts of proteins (peptides known as epitopes) and specialized servers for examining various physicochemical properties and different structures present in them. By identifying and using this class of biomolecules in the design of recombinant vaccine structures, it is possible to reduce the repetition of various experiments in the in vitro environment by saving time and money, and by using the most powerful and most cited algorithms, the second generation of vaccines can be developed and the complications of using the first generation of vaccines can be eliminated [27, 28]. Today, in the field of giving importance to the public health of societies, the use of recombinant vaccines has received great attention from researchers. So far, many studies have been conducted in silico as well as in vitro, and researchers have shown that successful vaccine structures can be designed, evaluated, and presented against a variety of pathogens such as Salmonella, Bacillus anthracis, Coxiella, Leptospirosis, etc. [9, 25, 29 and 30].

CONCLUSION

In this study, two different recombinant constructs, consisting of specific stimulatory epitopes of MHCI and MHCII molecules, derived from the best antigens present in the entire proteome of Salmonella typhi bacteria, have been designed, evaluated, and introduced. As can be seen, the second construct, which had tandem repeats of T cell-specific epitopes, showed both a higher molecular weight and a lower instability index. Also, this construct, in addition to a higher partial antigenicity, had a higher total percentage of flat-sheet and random coil structures than the first construct. Finally, it was observed that the construct with tandem repeats of epitopes had lower docking energy and average hydrogen bond length than the construct without repeats. Therefore, it could be a promising candidate construct for use as a superior vaccine against typhoid fever.

Clinical & Practical Tips in POLICE MEDICINE:

Since the storage conditions of recombinant vaccines are easier compared to live or attenuated vaccines (these types of vaccines use the whole pathogen). Therefore, in strategic and sensitive situations where time and equipment are of great importance, the use of recombinant vaccines is more reasonable. In addition, unlike live or attenuated vaccines, the use of recombinant vaccines does not lead to the occurrence of disease or the occurrence of side effects such as headaches, body aches, nausea, and miscarriage. Therefore, the use of recombinant vaccines is more popular

in the event of a pandemic in the community.

Authors' Contribution: *Fatemeh Beiranvand:* Data collection and analysis; *Nemat Shams:* Conception and study design; *Amin Jaydari:* Data collection; *Narges Nazifi:* Conception and study design; *Peyman Khademi:* Data collection. All authors participated in the initial writing and revision of the article, and all accept responsibility for the accuracy and completeness of the information contained in it with the final approval of the present article.

Conflict of interest: The authors stated that there is no conflict of interest in the present study.

Financial Sources: There was no financial support in this article.



نشریه طب انتظامی



دسترسی آزاد

مقاله اصیل

مقایسه دو سازه نوترکیب ایمونوژنیک برپایه اپی‌توپ‌های T cell (مستخرج شده از غربالگری کل پروتئوم باکتری سالمونلا تیفی) علیه بیماری تب حصبه؛ یک مطالعه ایمونوفورماتیک

فاطمه بیرانوند¹ MSc، نعمت شمس^{1*} PhD، امین جایداری¹ PhD، نرگس نظیفی² PhD، پیمان خادمی¹ PhD

¹ گروه میکروبیولوژی و بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران.
² گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران.

چکیده

اهداف: سالمونلا تیفی، یک پاتوژن گرم منفی و عامل بیماری حصبه است. از آنجا که کم‌هزینه‌ترین راه برای مقابله با این پاتوژن واکسیناسیون است، دسترسی به یک واکسن کارآمد بسیار حائز اهمیت است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، پروتئوم باکتری سالمونلا تیفی با ۴۳۲۲ پروتئین از سرور NCBI استخراج و از نظر آنتی‌ژن‌سیستی و آلرژن‌سیستی غربال شدند. در نهایت، پروتئین‌های باقی‌مانده برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های اختصاصی سلول‌های T بکار گرفته شدند و دو سازه نوترکیب ایمونوژنیک متشکل از اپی‌توپ‌ها و ادجوانت مولکولی طراحی شد (سازه اول، شامل یک تکرار از هر اپی‌توپ و سازه دوم، شامل دو تکرار از هر اپی‌توپ است). ارزیابی خواص فیزیوشیمیایی، ساختار دوم و سوم، آنتی‌ژن‌سیستی، حلالیت، قابلیت تحریک سیستم ایمنی و داکینگ مولکولی هر سازه توسط سرورهای معتبر آنلاین ارزیابی شدند.

یافته‌ها: در انتهای ارزیابی ۴۳۲۲ پروتئین، هفت پروتئین باقی ماند که فرایند پیش‌بینی اپی‌توپ‌های MHC I و MHC II آن‌ها با موفقیت انجام و پس از ارزیابی مجدد اپی‌توپ‌ها، سازه‌های مدنظر طراحی شدند. با وجود مشاهده نتایج مورد انتظار در هردو سازه ایمونوژنیک، سازه دوم خود را پایدارتر و آنتی‌ژنیک‌تر نشان داد (میزان آنتی‌ژن‌سیستی سازه اول و دوم نیز به ترتیب ۶۷۰۱٪ و ۶۷۶۰٪ بود). درحالی‌که هر دو سازه آبدوست بودند، ولی توزیع ساختارهای صفحات گسترده و رندم‌کوئل در سازه دوم، دارای درصد بالاتری نسبت به سازه اول بود. در ادامه، سازه دوم نیز با انرژی داکینگ و نیز میانگین طول پیوندهای هیدروژنی کمتر، توانست به گیرنده سطح سلولی خود متصل شود. از طرفی، هر دو سازه توانستند سیستم ایمنی را به سمت تحریک ایمنی سلولی، یعنی افزایش ترشح میزان T کمک‌کننده و T سایتوتوکسیک، هدایت کنند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج ارائه شده به نظر می‌رسد که سازه شماره دو که شامل دو تکرار از هر اپی‌توپ است کاندید مناسب‌تری برای ساخت واکسن ایمنی علیه تب حصبه است.

کلیدواژه‌ها: پروتئوم، اپی‌توپ، T Cell، واکسن نوترکیب، سالمونلا، ایمنی سلولی، بیوانفورماتیک

نحوه استناد به مقاله:	نویسنده مسئول*:	تاریخچه مقاله:
Beyranvand F, Shams N, Jaydari A, Nazifi N, Khademi P. Comparison of two immunogenic recombinant constructs based on T cell epitopes (extracted from whole proteome screening of <i>Salmonella typhi</i> bacteria) against typhoid fever; an immunoinformatic study. J Police Med. 2024;13:e11.	آدرس: لرستان، خرم آباد، کیلومتر ۵ جاده تهران، دانشگاه لرستان، کد پستی: ۶۸۱۵۱۴۴۳۱۶ پست الکترونیکی: Shams.n@lu.ac.ir	دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۹ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۲۳ انتشار: ۱۴۰۳/۰۴/۲۷

خوشه‌بندی می‌کند. در نهایت، تعداد و طول پیوندهای هیدروژنی حاصل از این برهم‌کنش‌ها و همچنین اسید آمینه‌های درگیر در این ارتباط، توسط نرم‌افزار LigPlot+ 2.2.8 و نرم‌افزار PyMol 1.3 بررسی و مشاهده شدند.

ملاحظات اخلاقی: مقاله حاضر یک مطالعه بیوانفورماتیکی با هدف طراحی نسل جدیدی از واکسن علیه بیماری کشنده تب حصبه است. نویسندگان این مقاله بدین وسیله اعلام می‌دارند که در تهیه این دست نوشته از هیچ انسان یا حیوانی به طور مستقیم یا غیرمستقیم استفاده نشده است.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: در پژوهش حاضر هیچ گونه مدل آماری استفاده نشده است.

یافته‌ها

جمع‌آوری کل پروتئوم باکتری سالمونلا تیفی و ارزیابی محافظتی‌بودن و آنتی‌ژن‌سیتی و آلرژن‌بودن آنها: توالی مربوط به ۴۳۲۲ پروتئین و پپتید موجود در کل پروتئوم باکتری سالمونلا تیفی، با موفقیت از سرور NCBI استخراج شد. در پایان این مرحله، ۱۹ پپتید باقی ماند که شامل پپتیدهایی با شماره دسترسی AA068071.1، AA069076.1، AA069049.1، AA069118.1، AA069225.1، AA069267.1، AA069385.1، AA069399.1، AA069422.1، AA069489.1، AA069580.1، AA069743.1، AA069748.1، AA070162.1، AA070192.1، AA070695.1، AA070705.1، AA071551.1 بودند. پپتیدهای باقی‌مانده همگی توسط سرور UniProt زیرهم‌چینی شدند و از بین دو پپتیدی که میزان مشابهت توالی آنها بالای ۸۰ درصد بود، پپتیدی که آنتی‌ژن‌سیتی کمتری داشت، حذف شد. لازم به ذکر است، پپتیدهایی که خیلی کوتاه بودند (کمتر از ۴۰ اسید آمینه) همگی حذف شدند. پروتئین‌های باقی‌مانده شامل پروتئین‌هایی با شماره دسترسی AA068071.1 (شماره دسترسی Q8Z4Q7 در سرور UniProt)، AA069049.1 (شماره دسترسی Q93MH4 در سرور UniProt)، AA069399.1 (شماره دسترسی P0A1E6 در سرور UniProt)، AA070162.1 (شماره دسترسی Q93IS5 در سرور UniProt)، AA070695.1 (شماره دسترسی Q8XG14 در سرور UniProt)، AA071551.1 (شماره دسترسی P66074 در سرور UniProt) و AA069743.1 (شماره دسترسی Q8Z8C1 در سرور UniProt) بودند.

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های اختصاصی مولکول‌های MHCII و MHCI و ارزیابی سمیت پپتیدها: در مطالعه حاضر، پیش‌بینی اپی‌توپ‌های اختصاصی مولکول‌های MHCI و MHCII از پپتیدهای غربال‌شده نهایی با شماره شناسایی پروتئینی AA068071.1، AA069049.1، AA069399.1، AA070162.1، AA070695.1، AA071551.1 و AA069743.1 از باکتری سالمونلا تیفی، توسط سرورهای

ایمونوآفورماتیک نوترکیب مبتنی بر بهترین اپی‌توپ‌های غربال‌شده، از مراحل قبلی به همراه یک ادجوانت مولکولی (مولکول HBHA با شماره دسترسی P9WIP9) و مناسب‌ترین لینکرهای پپتیدی غیرمنعطف، از نرم‌افزار CLC Mainworkbench 5.5 استفاده شد. لازم به ذکر است که در این مطالعه، به منظور افزایش وزن سازه و مطالعات ایمونولوژی مقایسه‌ای، دو سازه واکسنی مبتنی بر اپی‌توپ‌های قابل شناسایی، توسط مولکول‌های MHCI و MHCII طراحی شد. در سازه شماره یک، هر یک از اپی‌توپ‌ها یک بار تکرار شدند و در سازه شماره دو، هر یک از اپی‌توپ‌ها دو بار تکرار شدند. ارزیابی میزان آنتی‌ژن‌سیتی نهایی سازه‌های طراحی‌شده، توسط سرور Vaxijen و در نهایت نیز ساختار دوم و سوم سازه‌های مذکور، به ترتیب توسط سرورهای تحت وب SOPMA و I-TASSER، به همراه توالی اسید آمینه‌ای سازه‌ها مولکولی طراحی‌شده، مورد استفاده قرار گرفتند. سپس، بهترین مدل پیشنهادشده توسط سرور I-TASSER، با استفاده از سرور GalaxyRefine پالایش شد و در نهایت، به منظور شناسایی بهترین مدل از ساختارهای سوم پالایش‌شده، پلات رامچاندرا برای هریک از مدل‌های پیشنهادشده، توسط سرور VADAR رسم شد.

ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، حلالیت و قابلیت تحریک سیستم ایمنی سازه نوترکیب: مهم‌ترین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی سازه‌های مولکولی طراحی‌شده (مانند وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری، شاخص GRAVY و شاخص آلیفاتیک) و همچنین حلالیت آن، به ترتیب توسط سرورهای معتبر و تحت وب ProtParam و PEPTIDE 2.0 بررسی شد. در ادامه، ارزیابی تحریک سیستم ایمنی سازه‌های نوترکیب طراحی‌شده، توسط سرور C-ImmSim انجام شد. برای استفاده از سرورهای ذکرشده، توالی اسید آمینه‌ای سازه‌های نوترکیب به کار گرفته شدند.

داکینگ مولکولی و تعیین پیوندهای هیدروژنی: در این مطالعه، پیش‌بینی اتصال یا عدم اتصال دامنه HBHA متصل‌شده به سازه‌های نوترکیب طراحی‌شده، به عنوان لیگاند و گیرنده آن که تحت عنوان پروتئین‌های TLR4 شناخته می‌شوند، توسط سرور خودکار و تحت وب ClusPro 2.0 انجام شد. این سرور، از Piper که یک برنامه اتصال سخت مبتنی بر FFT است، استفاده می‌کند که لیگاند را در دفعات بسیار زیادی می‌چرخاند تا آن را در سه محور X، Y و Z نسبت به گیرنده روی یک شبکه (grid) انتقال دهد و از این بین، بهترین جایگیری یا انتقال لیگاند روی گیرنده را با کمترین میزان انرژی انتخاب می‌کند و آنهایی (ساختارهایی) که به دلیل انرژی اتصال بالا، ناپایدار هستند را حذف می‌کند. در انتها، با یافتن نزدیک‌ترین موقعیت برای مجاورشدن صحیح لیگاند به گیرنده با شعاع rmsd ۹ آنگستروم کربن آلفا، فرآیند داکینگ مولکولی را

مقایسه دو سازه نوترکیب ایمونوزنیک برپایه اپی‌توپ‌های T cell (مستخرج شده از غربالگری کل پروتئوم باکتری سالمونلا تیفی) علیه بیماری تب حصبه؛ یک مطالعه ایمونوفورماتیک

۱۳

نشریه تخصصی طب نظامی
۱۴۰۳، ۱۰، فصل ۱۱، ۶۵

اپی‌توپ‌هایی با بالاترین امتیاز که در نتایج هر دو سرور به صورت مشترک ارائه شده بودند و همپوشانی داشتند، برای استفاده در طراحی سازه‌های نوترکیب انتخاب شدند (جدول ۱).

Propred و IEDB با موفقیت انجام شد. همچنین در این پیش‌بینی، آل‌های A-0201، A-0101 و B-2705 برای مولکول‌های MHCI و آل‌های DRB1-0101 و DRB1-0401 برای مولکول‌های MHCII انتخاب شدند و در نهایت،

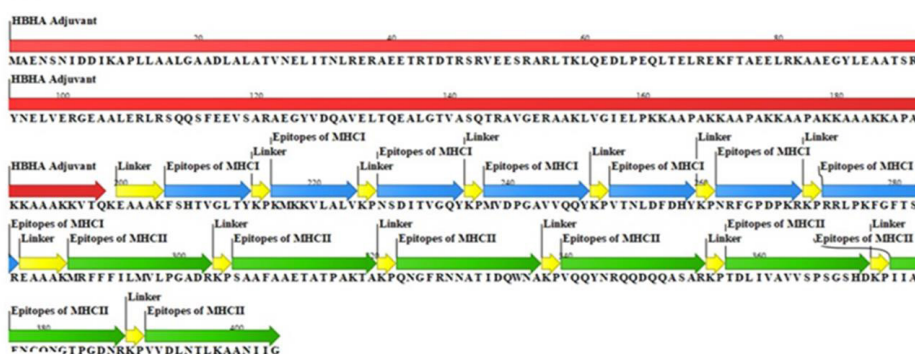
جدول ۱) توالی اپی‌توپ‌های نهایی مولکول‌های MHCI و MHCII

سمیت	توالی اپی‌توپ MHCII	سمیت	توالی اپی‌توپ MHCI	شماره شناسایی پروتئین
غیر سمی	MRFFFILMVLPGADR	غیر سمی	FSHTVGLTY	AAO68071.1
غیر سمی	SAFAAEATATPAKTA	غیر سمی	KMKKVLALV	AAO69049.1
غیر سمی	QNGFRNNATIDQWNA	غیر سمی	NSDITVGQY	AAO69399.1
غیر سمی	VQYQNRQQDQASAR	غیر سمی	MVDPGAVVQY	AAO69743.1
غیر سمی	TDLIVAVVSPSGSHD	غیر سمی	VTNLDLFDHY	AAO70162.1
غیر سمی	IIAFNCQNGTPGDNR	غیر سمی	NRFGDPKR	AAO70695.1
غیر سمی	VVDLNTLKAANIIG	غیر سمی	RRLPKFGFTSR	AAO71551.1

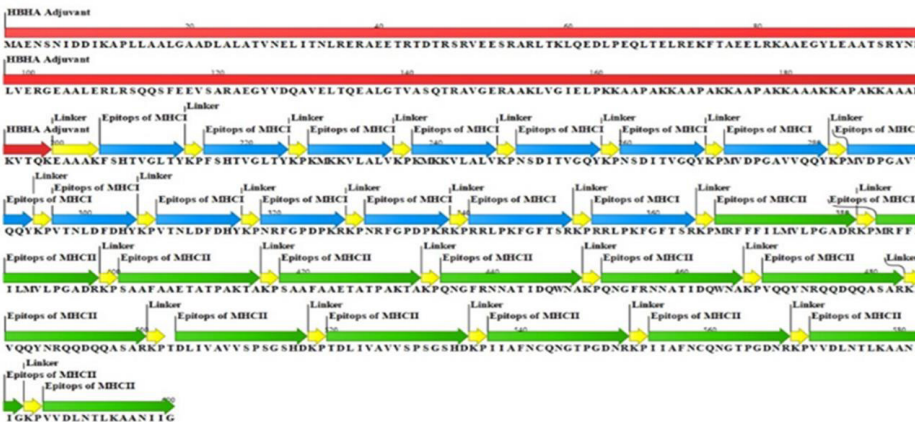
دامنه، توالی اسید آمینه‌ای ادجوانت مولکولی HBHA توسط لینکر پپتیدی EAAAK قرار گرفت. همچنین، به منظور مطالعه روی افزایش وزن سازه و سایر مطالعات ایمونولوژی مقایسه‌ای، یک سازه دیگر نیز با دو بار تکرار از هر یک از اپی‌توپ‌ها، لینکر غیر منعطف KP، و ادجوانت مولکولی HBHA که توسط لینکر پپتیدی EAAAK به دامنه اپی‌توپ‌ی وصل می‌شود، طراحی شد (شکل ۱).

طراحی سازه نوترکیب ایمونوفورماتیکی و ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی سازه نوترکیب: در این مطالعه، دو سازه نوترکیب متشکل از یک دامنه اپی‌توپ‌ی و یک دامنه ادجوانتی با موفقیت طراحی و ارزیابی شد. در دامنه اپی‌توپ‌ی، قوی‌ترین اپی‌توپ‌های اختصاصی مولکول‌های MHCI و MHCII از هر پپتید، با استفاده از لینکر پپتیدی غیرمنعطف KP به یکدیگر متصل شدند و در بالادست این

A

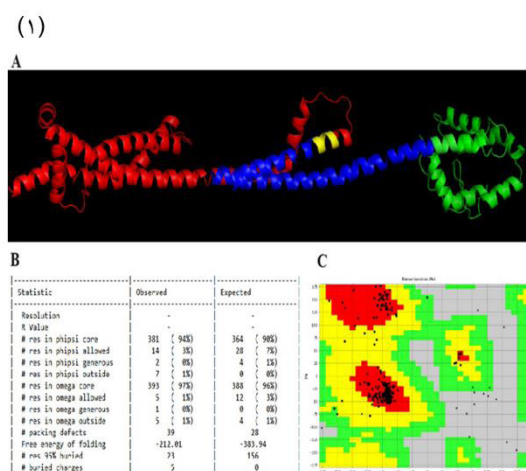


B

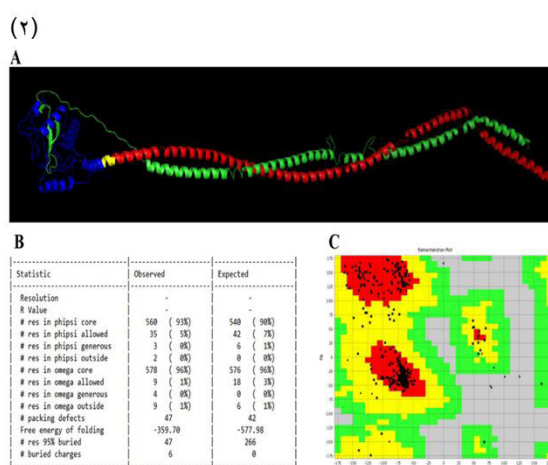


شکل ۱) ساختار سازه‌های طراحی‌شده، متشکل از بهترین اپی‌توپ‌های تخصصی مولکول‌های MHCI و MHCII شناسایی‌شده توسط دو سرور معتبر IEDB و ProPred. در شکل A، در دامنه اپی‌توپ‌ی، یک تکرار از هر اپی‌توپ حضور دارد در حالی که دمین اپی‌توپ‌ی در شکل B، شامل دو تکرار از هر اپی‌توپ است. در این شکل‌ها، رنگ‌های قرمز، آبی، زرد و سبز به ترتیب نشان‌دهنده توالی ادجوانت مولکولی HBHA، اپی‌توپ‌های شناسایی‌شده توسط مولکول‌های MHCI، لینکر پپتیدی سخت و توالی اپی‌توپ‌های قابل شناسایی توسط مولکول‌های MHCII است.

اساس نتایج مشاهده شده، سازه‌های پیش‌بینی شده نیاز به پالایش کردن داشتند. در مدل سه‌بعدی اولیه سازه اول، میزان اسید آمینه‌های موجود در ناحیه هسته، مجاز و غیر مجاز به ترتیب ۸۰، ۱۶ و ۱ درصد بود که بعد از پالایش کردن این مقادیر به ۹۴، ۳ و صفر درصد ارتقا یافتند (شکل ۲، قسمت ۱). همچنین در مورد مدل اولیه پیش‌بینی شده، سازه دوم نیز میزان اسید آمینه‌های موجود در ناحیه هسته، مجاز و غیرمجاز به ترتیب ۸۴، ۱۳ و ۱ درصد بود که بعد از پالایش کردن این مقادیر به ۹۳، ۵ و صفر درصد ارتقا یافتند (شکل ۲، قسمت ۲).



ساختار دوم و سوم هریک از سازه‌های مورد مطالعه: ارزیابی حالات ساختاری مختلف در ساختار دوم سازه‌های مهندسی شده، توسط سرور SOPMA با موفقیت ارزیابی شدند و بر اساس نتایج ارائه شده، سازه اول دارای ۵۳/۴۷ درصد آلفا هلیکس، ۷/۱۸ درصد صفحات گسترده و ۳۹/۳۶ درصد رندوم کویل بود، در حالی که توزیع این ساختارها در مدل دوم به این صورت بود که سهم آلفا هلیکس ۴۲/۶۷ درصد، صفحات گسترده ۱۰/۵۰ درصد و رندوم کویل ۴۶/۸۳ درصد بود. ساختار سوم سازه‌های معرفی شده نیز با موفقیت توسط سرور I-TASSER پیش‌بینی شد و سپس توسط آنالیزهای آماری رامچاندرا ارزیابی شدند. بر



شکل ۲) ۱ و ۲ به ترتیب مربوط به بررسی ساختار سوم سازه اول و سازه دوم هستند. A: مدل پیش‌بینی شده ساختار سوم، توسط سرور I-TASSER و سپس پالایش شده توسط سرور Galaxy Refine 2 است. در این مدل رنگ‌های قرمز، زرد، آبی و سبز به ترتیب مربوط به ادجوانت مولکولی HBHA، لینکر پپتیدی EAAAK، اپی‌توپ‌های تحریک‌کننده مولکول‌های MHCII و اپی‌توپ‌های تحریک‌کننده مولکول‌های MHCII هستند. B: آنالیز آماری رامچاندرا، مربوط به بهترین مدل سه بعدی پالایش شده. C: پلات رامچاندرا، به بهترین مدل سه بعدی پیش‌بینی و پالایش شده. ناحیه قرمز، زرد، سبز و خاکستری به ترتیب مربوط به نواحی هسته، مجاز، قابل قبول و غیر مجاز هستند.

نشان داد. لازم به ذکر است، به دلیل اهمیت ویژه شاخص ناپایداری ارائه شده، چند حالت مختلف از چینش و ترتیب اپی‌توپ‌های MHCII و MHCII و همچنین، تکرارهای متفاوت از لینکرهای پپتیدی، در نظر گرفته شد و مدل‌های ارائه شده را می‌توان ساده‌ترین و قابل قبول‌ترین مدل‌ها، برای مطالعه در نظر گرفت. علاوه بر این، بر اساس نتایج گزارش شده توسط سرور Vaxijen، میزان آنتی‌ژن‌سیتی سازه اول و دوم به ترتیب ۶۷۰۱٪ و ۶۷۶۰٪ بود.

در بررسی پارامتر آب‌گریزی/آب‌دوستی سازه‌های مورد مطالعه توسط سرور PEPTIDE 2.0، مشخص شد که در سازه اول، سهم اسید آمینه‌های هیدروفوب، اسیدی، بازی و خنثی به ترتیب ۴۴/۵۵، ۱۱/۶۳، ۱۷/۷۵ و ۲۶/۲۴ درصد بود، درحالی‌که موارد ذکر شده در سازه دوم، به ترتیب ۴۴/۵، ۹/۸۳، ۱۷/۶۷ و ۲۸ درصد گزارش شد. طبق گزارش این سرور، پپتیدهای آب‌دوست، حاوی بیش از ۲۵ درصد باقیمانده‌های باردار بودند و پپتیدهای آب‌گریز حاوی ۵۰ تا ۷۵ درصد باقیمانده‌های آب‌گریز یا هیدروفوب، ممکن بود نامحلول یا فقط تا حدی در محلول‌های آبی حل

خواص فیزیکوشیمیایی، آنتی‌ژنیسیته، حلالیت و میزان تحریک پذیری سیستم ایمنی سازه‌های طراحی شده: نتایج مربوط به خواص فیزیکوشیمیایی سازه‌های طراحی شده نشان داد که سازه اول با طول ۴۰۴ اسید آمینه، دارای وزن مولکولی ۴۴۱۰۳/۴۲ دالتون، نقطه ایزوالکتریک ۹/۰۸، شاخص آلیفاتیک ۷۵/۷۹، شاخص GRAVY برابر با ۰/۵۸۵ و شاخص ناپایداری ۳۵/۳۷ بود. درحالی‌که سازه دوم با طول ۶۰۰ اسید آمینه، دارای وزن مولکولی ۶۵۹۳۶/۶۷ دالتون، نقطه ایزوالکتریک ۱۰/۰۱، شاخص آلیفاتیک ۷۲/۴۸، شاخص GRAVY برابر با ۰/۶۰۹ و شاخص ناپایداری ۳۰/۴۸ بود. همان‌طور که ملاحظه شد، با اینکه هر دو سازه به عنوان یک سازه پایدار حرارتی در نظر گرفته شد (بر اساس الگوریتم تعریف شده توسط سرور ProtParam، اعداد ارائه شده برای شاخص ناپایداری اگر بیشتر از ۴۰ باشند، پروتئین مذکور را ناپایدار اعلام می‌کند)، ولی میزان پایداری سازه دوم بیشتر از سازه اول بود. همچنین محدوده کم و منفی شاخص GRAVY، احتمال کروی بودن (آب‌دوستی) پروتئین‌ها را به جای غشایی (آب‌گریزی)

شوند. همان‌طور که ملاحظه شد، هر دو سازه طراحی‌شده، آب‌دوست در نظر گرفته شدند، چراکه کمتر از ۵۰ درصد از اسید آمینه‌ها آبگریز (هیدروفوب) بودند و مجموع درصد اسید آمینه‌های باردار (اسیدی و بازی) حاضر در سازه کمتر از ۲۵ درصد بود. در ادامه، نتایج شبیه‌سازی پاسخ ایمنی نشان داد که هریک از سازه‌های واکسنی توسعه‌یافته، به‌طور قابل توجهی پاسخ ایمنی اولیه و ثانویه را افزایش دادند. لازم به ذکر است که بر اساس نتایج ملاحظه‌شده در پاسخ به تحریک توسط سازه‌های واکسنی توسعه‌یافته، سطح IL-2 ، $\text{IFN-}\gamma$ و $\text{TGF-}\beta$ به عنوان مارکرهای مهم در ایمنی سلولی، برای مدت طولانی به‌طور چشم‌گیری

A

antigen count per mL

days

Ag
Igh4+Igc2
Igc1+Igc2
Igc1
Igc2

abs. (Igh4, Igc1, Igc2)
arbitrary scale

B

Active, duplicating

days

ACTIVE
INTERNALIZED (v2)
PREFORMING (v2)
ANERGIC (v2)

C

Internalized, present, anergic

days

total
B not mem
B mem (v2)
B isotype Igh4
B isotype Igc1
B isotype Igc2

D

ACTIVE
DUPICATING
PREFORMING
ANERGIC (v2)

days

E

ACTIVE
DUPICATING
PREFORMING
ANERGIC

days

F

ng/mL

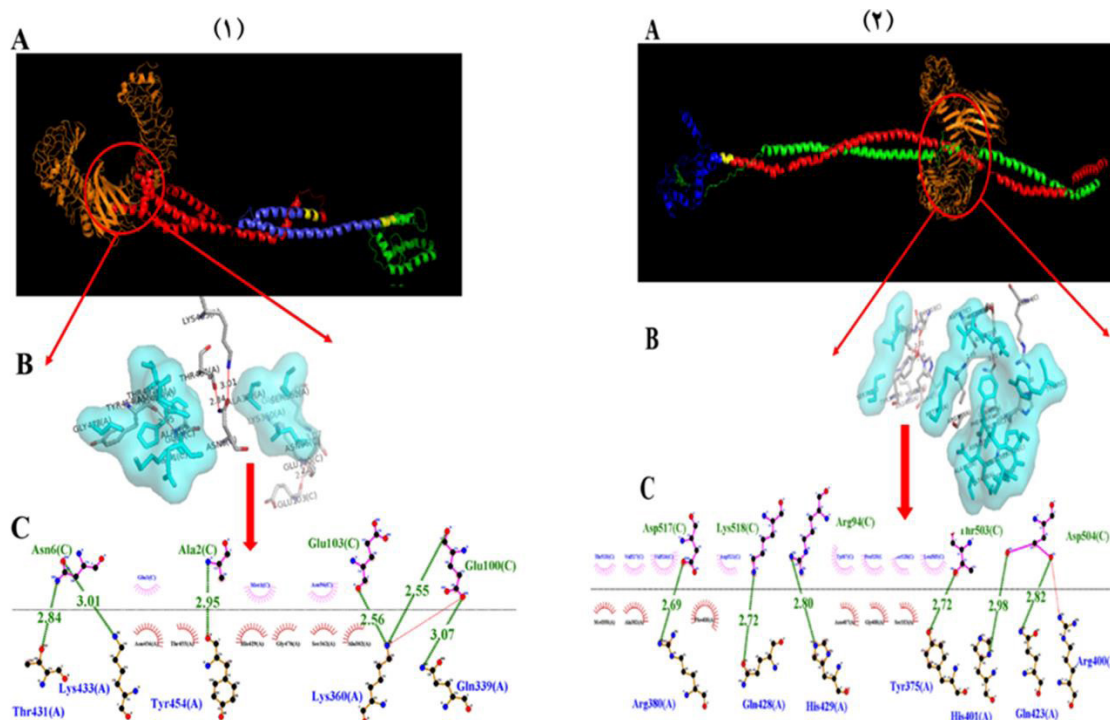
days

IFN- γ
IL-4
IL-12
TGF- β
TNF- α
IL-17
IL-6
IL-1
IL-23

DOI: 10.30505/13.1.11]

این بین، مدل صفر با بالاترین تعداد عضو خوشه در هر دو سازه انتخاب شد (سازه اول ۱۱۵ عضو خوشه و سازه دوم ۹۸ عضو خوشه). در سازه اول، کمترین انرژی اتصال در مدل داک شده ۱۰۱۳/۳- کیلوکالری بر مول و در سازه دوم، ۹۴۲/۸- کیلوکالری بر مول محاسبه شد. در جدول ۲ لیست اسیدهای آمینه درگیر در پیوندهای هیدروژنی و طول پیوندها گزارش شده است.

ارزیابی داکینگ مولکولی: احتمال داکینگ مولکولی بین دومین ادجوانت HBHA (در هر دوسازه طراحی شده) و گیرنده آن (TLR4)، توسط سرور ClusPro با موفقیت بررسی شد. نتایج مشاهده شده نشان داد که در هر سازه، پیوند هیدروژنی قابل توجهی بین دو دامنه ایجاد شده است (شکل ۴). فرآیند داکینگ مولکولی در هر دو سازه، با ارائه چندین مدل مختلف انجام شد که از



شکل ۴) تصویر ۱ و ۲ به ترتیب نتیجه داکینگ مولکولی سازه نوترکیب اول و دوم با گیرنده TLR4 هستند. A: در این شکل، رنگ‌های نارنجی، قرمز، زرد، آبی و سبز به ترتیب مربوط به گیرنده TLR4، ادجوانت مولکولی HBHA، لینکر پپتیدی EAAAK، اپی‌توپ‌های تحریک‌کننده مولکول‌های MHCII و اپی‌توپ‌های تحریک‌کننده مولکول‌های MHCI هستند. B: ناحیه اتصال مولکولی بین سازه‌های نوترکیب و گیرنده TLR4، از طریق پیوندهای هیدروژنی که توسط نرم‌افزار PyMol رویت‌سازی شده است. C: نمایش داده شده است. خط‌های قرمز نشان‌دهنده پیوندهای هیدروژنی بین دو دامنه است. C: نمایش اسید آمینه‌های درگیر از دو دامنه در فرآیند داکینگ مولکولی بین سازه‌های نوترکیب و گیرنده TLR4. در این تصاویر اسید آمینه‌های مربوط به گیرنده TLR4 به رنگ آبی و اسید آمینه‌های مربوط به سازه‌های نوترکیب به رنگ سبز نشان داده شده‌اند. پیوندهای هیدروژنی نیز به صورت خط چین سبز رنگ مشخص شده‌اند.

جدول ۲) لیست اسید آمینه‌های درگیر در ایجاد پیوند هیدروژنی و طول پیوندهای بین HBHA و گیرنده TLR4

اسید آمینه‌های مولکول HBHA	اسید آمینه‌های مولکول TLR4	طول پیوند (Å)
سازه اول		
آسپارژین ۶	ترئونین ۴۳۱	۲/۸۴
	لیزین ۴۳۳	۳/۰۱
آلانین ۲	تیروزین ۴۵۴	۲/۹۵
گلوتامیک اسید ۱۰۳	لیزین ۳۶۰	۲/۵۶
گلوتامیک اسید ۱۰۰	گلوتامین ۳۳۹	۳/۰۷
سازه دوم		
آرژنین ۳۸۰	اسید آسپارتیک ۵۱۷	۲/۶۹
گلوتامین ۴۲۸	لایزین ۵۱۸	۲/۷۲
هیستیدین ۴۲۹	آرژنین ۹۴	۲/۸۰
تیروزین ۳۷۵	ترئونین ۵۰۳	۲/۷۲
هیستیدین ۴۰۱	اسید آسپارتیک ۵۰۴	۲/۹۸
	گلوتامین ۴۲۳	۲/۸۲

مقایسه دو سازه نوترکیب ایمونوژنیک برپایه اپی‌توپ‌های T cell (مستخرج شده از غربالگری کل پروتئوم باکتری سالمونلا تیفی) علیه بیماری تب حصبه: یک مطالعه ایمونوفرماتیک

۱۷

بحث

از جمله گونه‌های مهم باکتری‌های درون سلولی، می‌توان به جنس‌های سالمونلا، لیستریا، بروسلا، ریکتزیا و لژیونلا اشاره داشت. باکتری سالمونلا تیفی، برای تکثیر به ماکروفاژها حمله می‌کند و بنابراین جزء پاتوژن‌های درون سلولی محسوب می‌شود [۱۲]. همانطور که انتظار می‌رود، ویژگی اصلی این پاتوژن‌ها، زنده‌مانی از طریق ساکن شدن و تکثیر درون سلولی آن‌ها است. این زیست درون سلولی، سبب پردازش درون سلولی و متعاقباً، ارائه محصولات باکتریایی توسط مولکول‌های MHC کلاس دو، به لنفوسیت‌های T با مارکر CD4+ می‌شود که این سلول‌ها پس از فعال شدن به لنفوسیت‌های Th1 و Th2 تمایز می‌یابند [۱۳]. لنفوسیت‌های Th1، با تولید سایتوکاین‌هایی نظیر اینترفرون گاما و اینترلوکین-۲، نقش اصلی را در تحریک پاسخ‌های ایمنی، به واسطه سلول (پاسخ‌هایی که به واسطه سلول‌های T سیتوتوکسیک و ماکروفاژها هستند) و فعال‌سازی ماکروفاژها دارد [۱۴]. ماکروفاژهای فعال شده نیز فعالیت انفجاری اکسیداتیو قوی، توسط فاکتور اکسیداز NADPH (Nox2) را برای افزایش تولید رادیکال آزاد اکسیژن (O_2^-) و متعاقباً تولید H_2O_2 ، که با مصرف پروتون‌ها یا واکنش با اکسید نیتریک (NO) برای ایجاد پروکسی نیتريت ($ONOO^-$) مرتبط است، آغاز می‌کنند که منجر به کشتن باکتری‌ها و ایجاد یک محیط قلیایی می‌شود [۱۵، ۱۶]. بنابراین، تحریک ایمنی سلولی و ایجاد سلول‌های خاطره، در رابطه با مقابله سریع‌تر برای حذف پاتوژن‌های درون سلولی مانند سالمونلا، بسیار حائز اهمیت است.

در این مطالعه، برای طراحی سازه‌های واکنشی مبتنی بر اپی‌توپ، ابتدا اپی‌توپ‌های MHC I و سپس، اپی‌توپ‌های MHC II متعلق به هفت پروتئین ایمنی‌زای غربال شده از پویش کل پروتئوم، با استفاده از لینکر سخت KP به یکدیگر متصل شدند. سپس، این دامنه اپی‌تویی با استفاده از لینکر پپتیدی "EAAAK" به پروتئین HBHA، به عنوان ادجوانت مولکولی در N ترمینال واکنش توسعه یافته متصل شد. به طور کلی، پروتئین HBHA از باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یک عامل حدت مهم است که به این باکتری کمک می‌کند تا به سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی میزبان خود متصل شود [۱۷]. مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین HBHA، به عنوان آگونیست جدید گیرنده TLR4، بدون سمیت سیستمیک، می‌تواند بلوغ سلول‌های دندریتیک، ترشح IFN- γ و سایتوتوکسیسیتی سلولی با واسطه سلول‌های T را تحریک کند [۸]. در نتیجه، می‌توان آن را به عنوان یک ادجوانت مولکولی در نظر گرفت.

لینکرها نیز نقش کلیدی در عملکرد بیولوژیکی یک ساختار متشکل از پروتئین‌های متصل شده به هم دارند. پپتیدهای EAAAK (که یک ساختار آلفا-مارپیچ دارد)

و KP دارای پیوندهای سفت و سختی هستند که معمولاً در ساختار یک پروتئین متشکل از چند دامنه برای حفظ عملکرد آن اعمال می‌شوند [۱۹]. استفاده از سازه‌های نوترکیب واکنشی، متشکل از تکرارهای متفاوت اپی‌تویی، بسیار مورد علاقه و توجه محققین است، چراکه یافته‌های تجربی نشان داده‌اند که پروتئین‌های کایمیریک نوترکیب تشکیل شده از اپی‌توپ‌های T کمکی، به صورت تکرارهای پشت سر هم ایمنی‌زاتر هستند و می‌توانند به صورت معنی‌داری، تحریک پذیری سیستم ایمنی را افزایش دهند [۲۰]. به عنوان مثال، می‌توان به مطالعه نظیفی و همکاران در سال ۲۰۱۹ اشاره داشت که به بررسی میزان تحریک سیستم ایمنی علیه باکتری بروسلا با بکارگیری یک سازه متشکل از چند تکرار پشت سر هم از اپی‌توپ آنتی‌ژن OMP31 از باکتری بروسلا ملیتسنسیس پرداخته‌اند. این محققین گزارش کرده‌اند که در بین تیمارهای متفاوت، گروه واکنشیده شده با سازه چند اپی‌تویی بیشترین نرخ ترشح IFN- γ ، IL-2 و IgG2a را دارند. علاوه بر این، بعد از چلینج دادن تیمارهای واکنشیده شده با سوبه حاد باکتری بروسلا ملیتسنسیس، میزان بار میکروبی تیماری که دریافت کننده سازه کاندید واکنشی متشکل از تکرارهای متوالی از یک اپی‌توپ بود، به طور معنی داری پایین گزارش شد [۲۱]. از آنجا که نفوذپذیری گلوبولی در کلیه، متأثر از وزن و سایز مولکول است، پروتئین‌های با وزن مولکولی پایین (<40 کیلو دالتون)، اساساً آزادانه فیلتر می‌شوند، در حالی که فیلتر پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بالا (>40 کیلو دالتون)، تقریباً به طور کامل محدود می‌شوند [۲۲]. در این مطالعه، دو سازه با وزن‌های تقریبی ۴۴ و ۶۵ کیلو دالتون طراحی شد. این در حالی بود که در مطالعه‌ای که فروهرمهر در سال ۲۰۲۴ با پویش گسترده پروتئوم روی باکتری کوکسیلا بورنتی انجام داده است، یک سازه متشکل از اپی‌توپ و ادجوانت مولکولی با وزن ۵۹/۲۲ کیلو دالتون طراحی کرده است [۲۴]. همچنین در مطالعه‌ای که شمس و همکاران در سال ۲۰۲۰ با پیش‌بینی اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن‌های مهم باکتری سالمونلا تیفی انجام داده‌اند، سازه واکنشی با وزن ۴۱ کیلو دالتون معرفی کردند [۲۵]. در مطالعه‌ای دیگر که رشیدیان و همکارانش در سال ۲۰۲۰، به واسطه پیش‌بینی اپی‌توپ مهم‌ترین آنتی‌ژن‌های باکتری کوکسیلا بورنتی انجام داده‌اند، سازه واکنشی با وزن ۴۱/۵۰ کیلو دالتون را گزارش کرده‌اند [۲۶]. همانطور که ملاحظه می‌شود وزن سازه‌های نوترکیب طراحی شده در مطالعات گذشته، همانند مطالعه حاضر نسبتاً بالا است و در زمان عبور از سیستم فیلتراسیون کلیوی به دلیل وزن بالا حذف نمی‌شوند.

میزان شاخص ناپایداری به دست آمده در این مطالعه، برای سازه اول و دوم به ترتیب ۳۵/۳۷ و ۳۰/۴۸ است و بر اساس الگوریتم اختصاصی سرور ProtParam، پروتئین‌هایی که شاخص ناپایداری زیر ۴۰ را ارائه می‌دهند،

اپی‌توپ‌های اختصاصی تحریک‌کننده مولکول‌های MHCII و MHCII، حاصل از بهترین آنتی‌ژن‌های موجود در کل پروتئوم باکتری سالمونلا تیفی، طراحی، ارزیابی و معرفی شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود، سازه دوم که دارای تکرارهای پشت سر هم از اپی‌توپ‌های اختصاصی T cell بود، هم وزن مولکولی بالاتر و هم شاخص ناپایداری کمتری را نشان می‌دهد. همچنین این سازه، در کنار میزان جزئی آنتی‌ژن‌سپت بالتر، مجموع درصد ساختارهای صفحات گسترده و رندم کوئل بیشتری نسبت به سازه اول دارد. در آخر نیز مشاهده می‌شود که سازه دارای تکرارهای پشت سر هم از اپی‌توپ‌ها، انرژی داکینگ و نیز میانگین طول پیوندهای هیدروژنی کمتر از سازه بدون تکرار دارد. بنابراین، می‌تواند برای استفاده به عنوان یک سازه کاندید، واکسنی برتر علیه بیماری تب حصبه امید بخش باشد.

نکات بالینی کاربردی برای پلیس: از آنجا که شرایط نگهداری واکسن‌های نوترکیب در مقایسه با واکسن‌های زنده یا تخفیف حدت‌یافته (در ساخت این نوع واکسن‌ها از پیکره کل پاتوژن استفاده می‌شود) راحت‌تر است. بنابراین، در شرایط استراتژیک و حساس که زمان و تجهیزات بسیار اهمیت پیدا می‌کنند، بکارگیری واکسن‌های نوترکیب معقول‌تر است. علاوه‌براین، استفاده از واکسن‌های نوترکیب برخلاف واکسن‌های زنده یا تخفیف حدت‌یافته، منجر به بروز بیماری و یا بروز عوارض جانبی مانند سر درد، بدن درد، تهوع و سقط نمی‌شود. بنابراین، در شرایط بروز یک پاندمی در جامعه استفاده از واکسن‌های نوترکیب محبوب‌تر است.

سهم نویسندگان. فاطمه بیرانوند: جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل داده‌ها؛ نعمت شمس: ارائه ایده و طراحی مطالعه؛ امین جایدی: جمع‌آوری داده‌ها؛ نرگس نظیفی: ارائه ایده و طراحی مطالعه؛ پیمان خادمی: جمع‌آوری داده‌ها. همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله و بازنگری آن سهیم بودند و همه با تأیید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند. تعارض منافع. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تعارض منفعی در قبال مطالعه حاضر وجود ندارد. حامی مالی. در این مقاله هیچ‌گونه حامی مالی وجود نداشت.

Reference

1. Ahmadi MH, Ahmadi A. An overview of bioterrorism and its association with the emerging coronavirus. *New Cellular and Molecular Biotechnol J*. 2022; 12 (46): 9-24. <https://ncmbjpiu.ir/article-1-1451-en.html>
2. Su L, Chiu C. Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J*. 2007; 30(3):210. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17760271/>

از نظر حرارتی پایدار هستند. فروهر مهر در سال ۲۰۲۴ [۲۴]، شمس و همکارانش در سال ۲۰۲۰ [۲۵] و رشیدیان و همکاران نیز در سال ۲۰۲۰ [۲۶]، سازه‌های ایمونوآنتی‌جینی مبتنی بر اپی‌توپی طراحی و بررسی کرده‌اند و گزارش کرده‌اند که هریک از سازه‌های نوترکیب مذکور با شاخص‌های ناپایداری به ترتیب ۳۱/۹، ۷/۰۴ و ۳۲/۳۹، پایدار است. علاوه براین، هر دو سازه طراحی‌شده در این مطالعه، توانست با ایجاد ۶ پیوند هیدروژنی به گیرنده TLR4 خود متصل شود. این در حالی است که در مطالعه‌ای، تعداد پیوندهای هیدروژنی مشاهده‌شده در هنگام داکینگ سازه طراحی‌شده، ۱۵ عدد گزارش شده است [۲۴]. بنابراین، این گزارش‌ها نشان داده‌اند که اتصال دامنه اپی‌توپی به مولکول HBHA، مانع اتصال این پروتئین به گیرنده TLR4 سطح سلول نمی‌شود.

امروزه، بکارگیری بستر مهیاشده در فضای *in silico*، برای دستیابی به ترکیبات مولکولی ارزشمند در حوزه‌های مختلف بیولوژی، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. یکی از پرکاربردترین ابزارهای موجود در فضای *in silico* که دقت و اعتبار بالایی دارد، سرورهای تخصصی پیش‌بینی‌کننده بخش‌های ایمونوژن پروتئین‌ها (پپتیدهایی که تحت عنوان اپی‌توپ شناخته می‌شوند) و سرورهای تخصصی بررسی انواع خواص فیزیکوشیمیایی و ساختارهای مختلف موجود در آن‌ها هستند. با شناسایی و بکارگیری این دسته از مولکول‌های زیستی در طراحی ساختارهای واکسنی نوترکیب، می‌توان با صرفه‌جویی در زمان و هزینه، تکرار آزمایشات مختلف در فضای *in vitro* را کاهش داد و با بکارگیری قوی‌ترین و پر استنادترین الگوریتم‌ها، نسل دوم واکسن‌ها را توسعه داد و عوارض استفاده از نسل اول از واکسن‌ها را کاملاً حذف کرد [۲۷]. امروزه در بخش اهمیت دادن به سلامت عمومی جوامع، بکارگیری واکسن‌های نوترکیب بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است. تاکنون مطالعات زیادی به صورت *in silico* و همچنین *in vitro* انجام شده و محققین نشان داده‌اند که می‌توان سازه‌های واکسنی موفق را علیه انواع پاتوژن‌هایی مانند سالمونلا، باسیلوس آنتراسیس، کوکسیلا، لپتوسپیروز و غیره طراحی، ارزیابی و ارائه کنند [۲۵، ۲۹ و ۳۰].

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، دو سازه نوترکیب متفاوت، متشکل از

3. Fox J, Galus C. Salmonella-associated conjunctivitis in a cat. *J Vet Med Educ*. 1977;171(9):845-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/336590/>
4. Nosrat S, Sabokbar A, Dezfoolian M, Tabarraie B, Fallah F. Prevalence of Salmonella enteritidis, typhi and typhimurium from food products

- in Mofid hospital. Res Med. 2012;36(1):43-8. https://pejouhesh.sbmu.ac.ir/browse.php?a_id=1009&sid=1&slc_lang=en4
5. Das S, Kataria VK. Bioterrorism: A public health perspective. Med J Armed Forces India. 2010;66(3):255-60. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377123710800516>
 6. Plotkin S. History of vaccination. Proc Natl Acad Sci. 2014;111(34):12283-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25136134/>
 7. Wong K, Feeley JC. Isolation of Vi antigen and a simple method for its measurement. Appl Microbiol. 1972;24(4):628-33. <https://doi.org/10.1128/am.24.4.628-633.1972>
 8. Syed KA, Saluja T, Cho H, Hsiao A, Shaikh H, Wartel TA, et al. Review on the recent advances on typhoid vaccine development and challenges ahead. Clin Infect Dis. 2020;71(Supplement_2):S141-S50. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa504>
 9. jaydari A, Nazifi N, Forouharmehr A. Computational design of a novel multi-epitope vaccine against Coxiella burnetii. Hum Immunol. 2020 1;81(10-11):596-605. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/enamp/mdl-32718721>
 10. Li Y, Liu X, Zhu Y, Zhou X, Cao C, Hu X, et al. Bioinformatic prediction of epitopes in the Emy162 antigen of Echinococcus multilocularis. Exp ther med. 2013; 1;6(2):335-40. <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2013.1142?text=fulltext#>
 11. Enany S. Structural and functional analysis of hypothetical and conserved proteins of Clostridium tetani. J infec public health. 2014;7(4):296-307. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24802661>
 12. Mak TW, Saunders ME. Immunity to pathogens. The Immune Response. 2006:641. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7150295/>
 13. Raupach B, Kaufmann SH. Immune responses to intracellular bacteria. Curr Opin Immunol. 2001;13(4):417-28. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11498297/>
 14. Gutiérrez-Martínez E, Planès R, Anselmi G, Reynolds M, Menezes S, Adiko AC, et al. Cross-presentation of cell-associated antigens by MHC class I in dendritic cell subsets. Front immunol. 2015;6:363. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4505393/>
 15. Canton J, Khezri R, Glogauer M, Grinstein S. Contrasting phagosome pH regulation and maturation in human M1 and M2 macrophages. Mol Biol Cell. 2014;25(21):3330-41. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25165138/>
 16. El Chemaly A, Nunes P, Jimaja W, Castelbou C, Demareux N. Hv1 proton channels differentially regulate the pH of neutrophil and macrophage phagosomes by sustaining the production of phagosomal ROS that inhibit the delivery of vacuolar ATPases. J Leukoc Biol. 2014;95(5):827-39. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24415791/>
 17. Menozzi FD, Reddy VM, Cayet D, Raze D, Debie A-S, Dehouck M-P, et al. Mycobacterium tuberculosis heparin-binding haemagglutinin adhesin (HBHA) triggers receptor-mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions. Microbes infec. 2006;8(1):1-9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15914062/>
 18. Lei Y, Shao J, Ma F, Lei C, Chang H, Zhang Y. Enhanced efficacy of a multi-epitope vaccine for type A and O foot-and-mouth disease virus by fusing multiple epitopes with Mycobacterium tuberculosis heparin-binding hemagglutinin (HBHA), a novel TLR4 agonist. Mol immunol. 2020;121:118-26. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32199211/>
 19. Chen X, Zaro JL, Shen W-C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. Adv Drug Deliv Rev. 2013;65(10):1357-69. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23026637/>
 20. Kjerrulf M, Löwenadler B, Svanholm C, Lycke N. Tandem repeats of T helper epitopes enhance immunogenicity of fusion proteins by promoting processing and presentation. Mol immunol. 1997;34(8-9):599-608. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0161589097000783>
 21. Nazifi N, Tahmoorespur M, Sekhavati MH, Haghparast A, Behroozikhah AM. In vivo immunogenicity assessment and vaccine efficacy evaluation of a chimeric tandem repeat of epitopic region of OMP31 antigen fused to interleukin 2 (IL-2) against Brucella melitensis in BALB/c mice. BMC vet. Res. 2019;15:1-11. <https://link.springer.com/article/10.1186/s12917-019-2074-7>
 22. Tojo A, Endou H. Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. Am J Physiol Renal Physiol. 1992;263(4):F601-F6. <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajprenal.1992.263.4.F601>
 23. Blouch K, Deen WM, Fauvel J-P, Bialek J, Derby G, Myers BD. Molecular configuration and glomerular size selectivity in healthy and nephrotic humans. Am J Physiol Renal Physiol. 1997;273(3):F430-F7. <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajprenal.1997.273.3.F430>
 24. Forouharmehr A. Whole proteome screening to develop a potent epitope-based vaccine against Coxiella burnetii: a reverse vaccinology approach. J Biomol Struct Dyn. 2024; 2:1-13. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07391102.2024.2326198>
 25. Shams N, Shakarami Gandabeh Z, Nazifi N, Forouharmehr A, Jaydari A, Rashidian E. Computational design of different epitope-based vaccines against Salmonella typhi. Int J Peptide Res Ther. 2020;26:1527-39. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10989-019-09959-4>
 26. Rashidian E, Gandabeh ZS, Forouharmehr A, Nazifi N, Shams N, Jaydari A. Immunoinformatics approach to engineer a potent poly-epitope fusion protein vaccine against Coxiella burnetii. Int J Pept Res Ther. 2020;26:2191-201. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10989-019-10013-6>

27. Tomar N, De RK. Immunoinformatics: an integrated scenario. *Immunol.* 2010;131(2):153-68. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20722763/>
28. Korber B, LaBute M, Yusim K. Immunoinformatics comes of age. *PLoS Comput Biol.* 2006;2(6):e71. <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.0020071>
29. Nazifi N, Mousavi SM, Moradi S, Jaydari A, Jahandar MH, Forouharmehr A. In Silico B Cell and T Cell epitopes evaluation of lipL32 and OmpL1 proteins for designing a recombinant multi-epitope vaccine against leptospirosis. *Int J Infec.* 2018;5(2). <https://brieflands.com/articles/iji-63255>
30. Tahmoorespur M, Nazifi N, Pirkhezranian Z. In silico prediction of B-cell and T-cell epitopes of protective antigen of Bacillus anthracis in development of vaccines against anthrax. *Iran J Appl Anim Sci.* 2017;7(3):429-36. <https://sanad.iau.ir/Journal/ijas/Article/102381>