

Journal of Police Medicine



ORIGINAL ARTICLE

OPEN 6 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 MHCI and MHCII 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

INTRODUCTION

2

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, and allergenicity of proteins antigenicity, 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

Beyranvand et al.

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. docking and hydrogen Molecular 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 FFTbased 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, AA070695.1, AA070705.1, AA070192.1, 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), AAO69049.1 (UniProt Q93MH4), number AA069399.1 (UniProt accession number P0A1E6), A070162.1 (UniProt accession number Q93IS5), A070695.1 (UniProt accession number Q8XG14), AAO71551 (UniProt accession number P66074), and AAO69743.1 (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 MHCI and MHCII 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	VQQYNRQQDQQASAR	Non-toxic	MVDPGAVVQQY	AA069743.1
Non-toxic	TDLIVAVVSPSGSHD	Non-toxic	VTNLDFDHY	AA070162.1
Non-toxic	IIAFNCQNGTPGDNR	Non-toxic	NRFGPDPKR	AA070695.1
Non-toxic	VVDLNTLKAANIIG	Non-toxic	RRLPKFGFTSR	AA071551.1

Immunoinformatics recombinant construct design and evaluation of physicochemical properties of the recombinant construct: In this study, two recombinant constructs consisting of an epitope domain and an adjuvant domain were successfully designed and evaluated. In the epitope domain, the strongest specific epitopes of MHCI and MHCII molecules of each peptide were linked to each other using a KP inflexible peptide linker, and upstream of this domain, the amino

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).

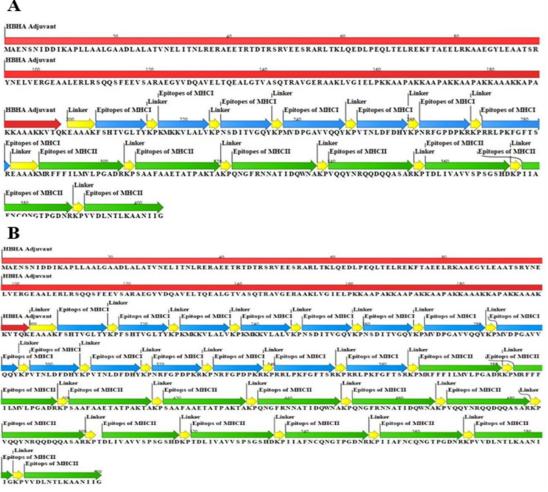


Figure 1) Structure of the designed constructs, consisting of the best-specialized epitopes of MHCI and MHCII molecules identified by two reliable servers IEDB and ProPred. In Figure A, the epitope domain contains one repeat of each epitope, while the epitope domain in Figure B contains two repeats of 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.

Beyranvand et al.

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).

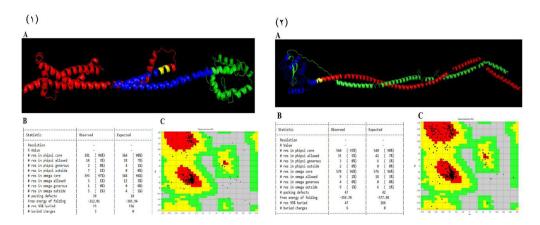


Figure 2) 1 and 2 are related to the tertiary structure investigation of the first and second structures, respectively. A: The predicted model of the tertiary structure, by the I-TASSR server and then refined by the Galaxy Refine2 server. In this model, the red, yellow, blue, and green colors correspond to the molecular adjuvant HBHA, the peptide linker EAAAK, the stimulating epitopes of MHCI molecules, and the stimulating epitopes of MHCII 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 MHCI and MHCII 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

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-x,

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).

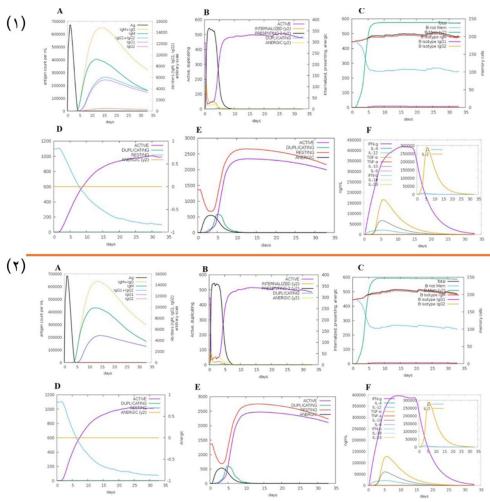


Figure 3) 1 and 2 are the simulation graphs of immune responses by the first and second constructs, respectively. A: Production of different antibodies against the developed vaccine. B: Increase in the population of activated B cells. C: Proliferation of B cells and production of memory cells. D: Increase 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).

Bevranvand et al.

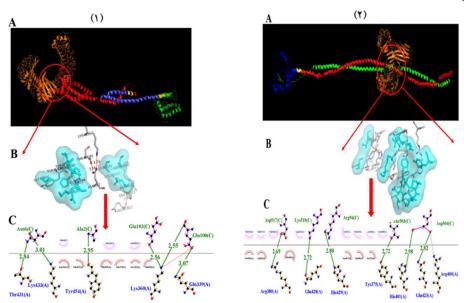


Figure 4) Images 1 and 2 are the results of molecular docking of the first and second recombinant constructs with the TLR4 receptor, respectively. A: In this figure, the orange, red, yellow, blue, and green colors correspond to the TLR4 receptor, the HBHA molecular adjuvant, the EAAAK peptide linker, 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		2.56
Second structure	Lysine 360	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 store store	Aspartic Acid 504	2.98
First structure	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

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 (02-) 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-x 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-y, 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

JOURNAL OF POLICE MEDICINE Vol.13, Issue 1, 2024

Beyranvand et al.

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 اصيل

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

فاطمه بیرانوند ٔ ^{MSc}، نعمت شمس ٔ ^{PhD '}، امین جایدری ٔ ^{PhD '}، نرگس نظیفی ٔ ^{PhD '}، پیمان خادمی ٔ PhD فاطمه بیرانوند ٔ MSc

- ٔ گِروه میکروبیولوژی و بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران.
 - ٔ 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 آنتیژنسیتی و آلرژنسیتی غربال شدند. در نهایت، پروتئینهای باقیمانده برای پیشبینی اپیتوپهای اختصاصی سلولهای T بکار گرفته شدند و دو سازه نوترکیب ایمنوژنیک متشکل از اپیتوپها و ادجوانت مولکولی طراحی شد (سازه اول، شامل یک تکرار از هر اپیتوپ است). ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی، ساختار دوم و سوم، آنتیژنیسیتی، حلالیت، قابلیت تحریک سیستم ایمنی و داکینگ مولکولی هر سازه توسط سرورهای معتبر آنلاین ارزیابی شدند.

یافته ها: در انتهای ارزیابی ۴۳۲۲ پروتئین، هفت پروتئین باقی ماند که فرایند پیشبینی اپیتوپهای MHCI و MHCI و آنها با موفقیت انجام و پس از ارزیابی مجدد اپی توپها، سازههای مدنظر طراحی شدند. با وجود مشاهده نتایج مورد انتظار در هردو سازه ایمنوژنیک، سازه دوم خود را پایدارتر و آنتیژنیکتر نشان داد (میزان آنتیژنسیتی سازه اول و دوم نیز بهترتیب ۴۷۰۱، و ۴۷۶۰، بود). درحالی که هر دو سازه آبدوست بودند، ولی توزیع ساختارهای صفحات گسترده و رندم کویل 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.

نتیجه گیری: 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.

كليدواژهها: پروتئوم، اپيتوپ، T Cell، واكسن نوتركيب، سالمونلا، ايمني سلولي، بيوانفورماتيك

نحوه استناد به مقاله:

تاريخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۹ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۲۳ انتشار: ۱۴۰۳/۰۴/۲۷ نویسنده مسئول*:

آدرس: لرستان، خرم آباد، کیلومتر ۵ جاده تهران، دانشگاه لرستان، کد پستی: ۶۸۱۵۱۴۴۳۱۸ پست الکترونیکی: Shams.n@lu.ac.ir. 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.

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

مقدمه

در دههای اخیر، استفاده از عوامل بیولوژیکی مختلف، به عنوان یک سلاح کشتار جمعی، مسئلهٔ بسیار نگران کنندهای به شمار می رود. انتشار ویروس عامل بیماری آبله توسط نیروهای انگلیسی، در خلال جنگ با کشورهای هند و فرانسه، استفاده از باکتری عام بیماری سیاه زخم، شیوع ویروس آنفولانـزای خوکـی در کشـور بلژیـک، شـیوع ویـروس دانگ در کوبا و استفاده از گاز خردل، تابون و سارین علیه ایران توسط رژیم بعث عراق، مثالهایی از استفاده از عوامل خطرناک بیولوژیکی در بحث بیوتروریسم به شمار میرود [۱]. سالمونلوز نیـز، ازجملـه بیماریهای عفونـی و مشـترک بین انسان و دام است که از نظر اقتصادی و سلامت، حایز اهمیت است. عامل بیماری سالمونلوز، یک باسیل گرم منفی، تاژکدار، متحرک و بی هوازی اختیاری، از خانواده آنتروباكترياسـه بـه نـام سـالمونلا اسـت [۲]. ايـن باكتـرى، از طریـق مدفوع دفعشـده و راه ورود اصلـی باکتـری، بلـع باکتـری است. باکتری میتواند از طریق مخاط دستگاه تنفسی فوقانی نیز به بدن میزبان ورود کند [۳]. براساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، باکتری سالمونلا در هر سال، سبب بروز بیماری در بین ۱۶ الی ۳۳ میلیون نفر میشود که در این میان، ۵۰۰ الی ۶۰۰ هـزار مـورد منجـر بـه مـرگ میشـود [۴]. علاوه براین، استفاده از این باکتری به عنوان یک سلاح بیولوژیکی نیز تاکنون بسیار مطرح بوده است [۵].

در سالهای اخیر، ایمنیزایی و محافظت افراد از طریـق واکسیناسـیون، مؤثرتریـن و کمهزینهتریـن راه برای مقابله با انواع بیماریهای عفونی است، چراکه بر اساس گـزارش سـازمان بهداشـت جهانـی، در حـدود ۸۰ درصـد بیماری های عفونی، از جمله بیماری هایی هستند که منجر به مرگ بیش از ۲۰ میلیون انسان در جهان شده است. بنابراین، واکسنها را میتوان به عنوان بهترین ابزار برای کاهـش میـزان مـرگ و میـر ناشـی از بیماریهـای عفونـی در جهان دانست، چراکه نه تنها نقش مهمی در کنتـرل و پیشگیری از بیماریهای عفونی دارد، بلکه یک روش کارآمد برای کاهش زیانهای اقتصادی و روانی برافراد است [۲، ۶]. واکسن خوراکی Ty21a و واکسن تزریقی پلیساکاریدی کپسـولی Vi، دو واکسـن رایـج علیـه باکتـری سـالمونلا تیفـی هستند. بـر اساس گزارشها، واكسن زنـدهٔ ضعيفشـده Ty۲۱a، ایمنیزایی کمی دارد و به چندین دوره واکسیناسیون يادآور نياز دارد. همچنين، واکسن تزریقی یلی ساکاریدی کپسـولی ۷۱، عـلاوه بـر دوره مصونیـت کوتاهمـدت، دارای محدودیت استفاده در اطفال است [۷، ۸]. بنابراین، نیاز به توسعه نسل جدید واکسنها و ارزیابی آنها کاملاً مشهود اسـت.

در حال حاضر، محققین با هدف حذف چنین عوارضی یا بهبود قدرت ایمنیزایی واکست ها، به سمت تولید واکست های ایمن و نوترکیب رفتهاند؛ زیرا در طراحی و ساخت این نوع از واکست های جدید، که به عنوان

واکسنهای زیرواحدی نیز شناخته میشوند، از بخشهایی از پاتوژنها که فقط تحریککننده سیستم ایمنی هستند، استفاده شده است [۹]. بنابرایی، این مطالعه با هدف طراحی، ارزیابی و معرفی یک سازه نوترکیب و زیرواحدی مؤثر، از طریق پویش کل پروتئوم و شناسایی اپیتوپهای قدرتمند و ایمونوژن از باکتری سالمونلا تیفی، بر پایه مطالعات ایمونوانفورماتیک (به صورت درونرایانهای) طراحی شد.

مواد و روشها

در این مطالعهٔ پژوهشی، با هدف دسترسی به کل پروتئوم مربوط به باکتری سالمونلا تیفی، با شماره دسترسی AE014613.1 استفاده شد. (این باکتری، با دارابودن ۴۷۹۱۹۶۱ جفتباز دارای ۴۳۲۲ ناحیهٔ کدکننده پروتئین و ۳۲۷ ناحیه غیر کدکننده پروتئین است که در این مطالعه، از مجموعه ۴۳۲۲ توالی پروتئینی استفاده شد).

بررســی محافظتــی بــودن آنتیژنســیتی و آلرژنبودن پروتئوم: در این مطالعه، به منظور بررسی میزان محافظتی بودن، میازان آنتی ژن سیتی و آلرژن بودن یا نبودن پروتئینها یا پپتیدهای استخراجشده از سرور NCBI، به ترتيب از سرروهای تحت وب VaxiJen ،Vaxign-ML و AllerTop استفاده شد. لازم به ذکر است، تنظیمات مورد استفاده سرور Vaxign-ML، به صورت پیش فرض خود نرمافزار بود و نیز حد آستانهٔ تعیین شده برای استفاده از سـرور VaxiJen، برابـر ۱/۵ بـود. در گام اول، محافظتیبـودن یا نبودن آنها توسط سرور Vaxigen ML ارزیابی شد و پروتئین ها یا پپتیدهایی که محافظتی نبودند، حذف شدند. سیس، پیتیدهای باقیمانده توسط سرور VaxiJen ارزیابی شدند و پپتیدهایی که میزان آنتیژنسیتی آنها کمتر از ۱/۵ بـود بـا موفقيـت حـذف شـدند. پپتيدهـاى غربالشـده از ایس دو مرحله، مسورد ارزیابی آلرژن بسودن بسا نبسودن قسرار گرفتند و پپتیدهایی که آلرژن بوند نیز حذف شدند.

پیشبینی اپیتوپهای تحریککنندهٔ سلولهای MHCI و ارزیابی سمیت آنها: در این مطالعه، با MHCI و ارزیابی سمیت آنها: در این مطالعه، با هدف دسترسی به بهترین اپیتوپهای قابل شناسایی The MHCI و MHCII از دو سرور معتبر با امتیاز استناد بالا به نام IEDB و Propred استفاده شد. لازم به ذکر است، برای پیشبینی اپیتوپهای سلولهای MHCII، از آللهای 7705-8، 2701، A-0101، از آللهای PRB-2705 و DRB1-0101 استفاده و همچنین، برای پیشبینی اپیتوپهای سلولهای MHCII الکهای DRB1-0401 و DRB1-0401 استفاده شد. در ادامه، برای سنجش سمیبودن یا نبودن توالی ToxinPred و بهای بهدستآمده، از سررو تحت وب ToxinPred استفاده شد.

مهندسی و ارزیابی سازهٔ ایمونوانفورماتیک مبتنی بر اپیتوپ: در نهایت، با هدف طراحی سازه

بیرانوند و همکاران

ایمونوانفورماتیک نوترکیب مبتنی بر بهترین اپیتوپهای غربال شده، 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 ایمنولوژی مقایسهای، دو سازه واکسنی مبتنی بر ایی توپهای قابل شناسایی، توسط مولکولهای MHCI و MHCII طراحی شد. در سازهٔ شمارهٔ یک، هر یک از اپیتوپها یک بار تکرار شدند و در سازهٔ شمارهٔ دو، هـ ریک از اپیتوپها دو بار تکرار شدند. ارزیابی میان 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 طراحی شده، مورد استفاده قرار گرفتند. سپس، بهترین مدل ييشنهادشده توسط سرور I-TASSAR، بـا استفاده از سـرور GalaxyRefine پالایـش شـد و در نهایـت، بـه منظـور شناسایی بهترین مدل از ساختارهای سوم پالایششده، پلات راماچاندران برای هریک از مدلهای پیشنهادشده، توسـط سـرور VADAR رسـم شـد.

ارزیابی ویژگیهای فیزیکوشیمیایی، حلالیت و البلیت تحریک سیستم ایمنی سازهٔ نوترکیب: مهمترین ویژگیهای فیزیکوشیمایی سازه نوترکیب: مهمترین ویژگیهای فیزیکوشیمیایی سازههای مولکولی طراحیشده (مانند وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری، شاخص تالبلات آن، شاخص آلیفاتیک) و همچنین حلالیت آن، به ترتیب توسط سرورهای معتبر و تحت وب ProtParam و و 2.0 به تحریک سیستم ایمنی سازههای نوترکیب طراحیشده، توسط سرورهای سرور انجام شد. برای استفاده از سرورهای خررشده، توالی اسید آمینهای سازههای نوترکیب به کار شدند

داکینگ مولکولی و تعییان پیوندهای هیدروژنی: در ایان مطالعه، پیشبینی اتصال یا عدم اتصال دامنه HBHA متصل شده به سازههای نوترکیاب طراحی شده، به عنوان لیگاند و گیرندهٔ آن که تحت عنوان پروتئینهای TLR4 شاخته می شوند، توسط سرور خودکار و تحت وب TLR4 شاخته می شوند، توسط سرور، از Piper که یک برنامه اتصال سخت مبتنی بر FFT است، استفاده می کند برنامه اتصال سخت مبتنی بر FFT است، استفاده می کند سه محور X، Y و Z نسبت به گیرندهٔ روی یک شبکه (grid) نقال دهد و از ایان بیان، بهتریان جایگیری یا انتقال لیگاند روی گیرنده را با کمتریان میزان انرژی انتخاب می کند و انهایی (ساختارهایی) که به دلیل انرژی اتصال بالا، ناپایدار موقعیات برای مجاورشدن صحیح لیگاند به گیرنده با شعاع موقعیات برای مجاورشدن صحیح لیگاند به گیرنده با شعاع موقعیات برای مجاورشدن صحیح لیگاند به گیرنده با شعاع مولکولی را ۲ rmsd

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

ملاحظات اخلاقی: مقاله حاضریک مطالعه بیوانفورماتیکی با هدف طراحی نسل جدیدی از واکسین علیه بیماری کشنده تب حصبه است. نویسندگان ایس مقاله بدین وسیله اعلام می دارند که در تهیه این دست نوشته از هیچ انسان یا حیوانی به طور مستقیم یا غیرمستقیم است.

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

بافتهها

جمع آوری کل پروتئوم باکتری سالمونلا تیفی و ارزیابی محافظتی بودن وآنتی ژنسیتی و آلرژن بودن آنها: توالی مربوط به ۴۳۲۲ پروتئین و پیتید موجود در کل پروتئوم باكترى سالمونلا تيفي، با موفقيت از سرور NCBI استخراج شد. در پایان این مرحله، ۱۹ پپتید باقی ماند که شامل پپتیدهایی با شاماره دسترسی AA068071.1 AA069076.1، AA069049.1، .AA068335.1 AA069267.1 AA069225.1 .AA069118.1 AA069385.1، AA069422.1، .AA069399.1 AA069580.1، AA069489.1 .AA069743.1 AA070162.1، .AA069748.1 .AA070192.1 .AA070695.1 مودند. بودند. پیتیدهای باقیمانده همگی توسط توسط سرور UniProt زیرهمچینی شدند و از بین دو پپتیدی که میزان مشابهت توالی آنها بالای ۸۰ درصد بود، پیتیدی که آنتیژنسیتی کمتری داشت، حذف شد. لازم به ذکر است، پپتیدهایی که خیلی کوتاه بودند (کمتر از ۴۰ اسید آمینه) همگی حذف شـدند. پروتئینهای باقیمانده شامل پروتئینهایی با شـماره دسترسـی AA068071.1 (شـماره دسترسـی Q8Z4Q7 در سـرور UniProt)، AA069049.1 (شـماره دسترسـي Q93MH4 در سـرور UniProt)، AA069399.1 (شـماره دسترسى P0A1E6 در سرور UniProt)، A070162.1 (شماره دسترسى Q93IS5 در سرور UniProt)، A070695.1 (شماره دسترسى Q8XG14 در سرور UniProt)، AAO71551 (شماره دسترســي P66074 در ســرور UniProt) و AAO69743.1 (شـماره دسترسـی Q8Z8C1 در سـررو UniProt) بودنــد.

پیشبینی اپیتوپهای اختصاصی مولکولهای سمیت پیتیدها: در مطالعهٔ حاضر، MHCI و MHCI و ارزیابی سمیت پپتیدها: در مطالعهٔ حاضر، پیشبینی اپیتوپهای اختصاصی مولکولهای MHCI و MHCI از پپتیدهای غربال شدهٔ نهایی با شماره شناسایی پروتئینی AA069399.1 ،AA069049.1 ،AA068071.1 و AA071551.1 و AA070162.1 از باکتری سالمونلا تیفی، توسط سرورهای

·وره ۱۳، شماره ۱، ۱۳۰۳ نـشــریــه علمی پژوهشی طـب انـتـظـامــی

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

IEDB و Propred با موفقیت انجام شد. همچنین در این پیش بینی، آللهای B-2705 و B-2705 برای DRB1 و DRB1 و DRB1 و DRB1 و آللهای 0101 و 0401.

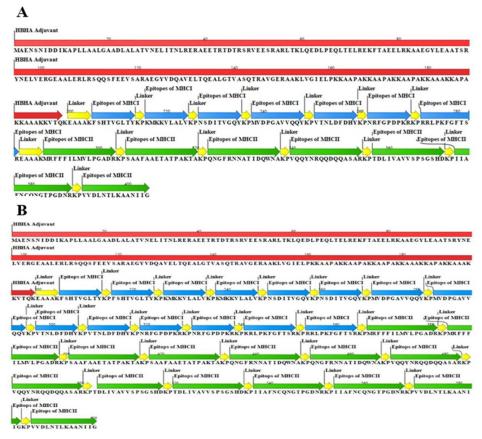
اپیتوپهایی با بالاترین امتیاز که در نتایج هر دو سرور به صورت مشترک ارائه شده بودند و همپوشانی داشتند، برای استفاده در طراحی سازههای نوترکیب انتخاب شدند (جدول ۱).

جدول ۱) توالی اپیتوپهای نهایی مولکولهای MHCI و MHCII و

شماره شناسایی پروتئین	توالی اپیتوپ MHCI	سمیت	توالی اپیتوپ MHCII	سمیت
AA068071.1	FSHTVGLTY	غیر سمی	MRFFFILMVLPGADR	غیر سمی
AA069049.1	KMKKVLALV	غیر سمی	SAAFAAETATPAKTA	غیر سمی
AA069399.1	NSDITVGQY	غیر سمی	QNGFRNNATIDQWNA	غیر سمی
AA069743.1	MVDPGAVVQQY	غیر سمی	VQQYNRQQDQQASAR	غیر سمی
AA070162.1	VTNLDFDHY	غیر سمی	TDLIVAVVSPSGSHD	غیر سمی
AA070695.1	NRFGPDPKR	غیر سمی	IIAFNCQNGTPGDNR	غیر سمی
AA071551.1	RRLPKFGFTSR	غیر سمی	VVDLNTLKAANIIG	غیر سمی

طراحی سازه نوترکیب ایمونوانفورماتیکی و ارزیابی خـواص فیزیکوشـیمیایی سازهٔ نوترکیب: در ایـن مطالعـه، دو سازهٔ نوترکیب متشـکل از یـک دامنـه اپیتوپـی و یـک دامنـه ادجوانتـی بـا موفقیـت طراحـی و ارزیابـی شـد. در دامنـه اپیتوپـی، قویتریـن اپیتوپهـای اختصاصـی مولکولهـای MHCI و MHCII از هـر پپتیـدی اسـتفاده از لینکـر پپتیـدی غیرمنعطـف KP بـه یکدیگـر متصـل شـدند و در بالادسـت ایـن غیرمنعطـف KP بـه یکدیگـر متصـل شـدند و در بالادسـت ایـن

دامنه، توالی اسید آمینهای ادجوانت مولکولی السید آمینهای ادجوانت مولکولی توسط لینکر پپتیدی EAAAK قرار گرفت. همچنین، به منظور مطالعه روی افزایش وزن سازه و سایر مطالعات ایمنولوژی 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).

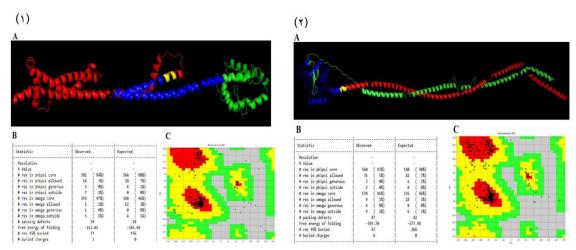


شکل ۱) ساختار سازههای طراحی شده، متشکل از بهترین اپی توپهای تخصصی مولکولهای MHCI و MHCI شناسایی شده توسط دو سرور معتبر IEDB شکل ۱) ساختار سازههای طراحی شده توسط دو سرور معتبر اپی توپ و ProPred. در شکل A، در دامنه اپی توپی، یک تکرار از هر اپی توپ حضور دارد در حالی که دمین اپی توپی در شکل B، شامل دو تکرار از هر اپی توپ است. در این شکلها، رنگهای قرمز، آبی، زرد و سبز به ترتیب نشان دهندهٔ توالی ادجوانت مولکولی اMHCI این توپهای شناسایی شده توسط مولکولهای MHCII است.

بیرانوند و همکاران

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 درصـد آلفـا هليكـس، ۷/۱۸ درصـد صفحـات گسـترده 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 درصـد، صفحـات گسـترده ۱۰/۵۰ درصـد و رندوم کویل ۴۶/۸۳ درصد بود. ساختار سوم سازههای معرفی شده نیـز بـا موفقیـت توسـط سـرور I-TASSER پیشبینـی شـد و سپس توسط آنالیزهای آماری راماچاندران ارزیابی شدند. بر

اساس نتایج مشاهده شده، سازههای پیشبینی شده نیاز ساختار دوم و سوم هریک از سازههای مورد 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، سازهٔ دوم نیـز میـزان اسـید آمینههـای موجـود در ناحیـه هسته، مجاز و غیرمجاز به ترتیب ۸۴، ۱۳ و ۱ درصد بود که بعد از یالایش کردن این مقادیر به ۹۳، ۵ و صفر درصد ارتقا يافتنـد (شـكل ٢، قسـمت ٢).



شکل ۲) ۱ و ۲ بـه ترتیب مربـوط بـه بررسـی سـاختار سـوم سـازه اول و سـازه دوم هسـتند. ۸: مـدل پیش،بینیشـده سـاختار سـوم، توسـط سـرور I-TASSR و سـپس 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 MHCI و اپیتوپهای تحریککننده مولکولهای MHCII هستند. B: آنالیـز آمـاری راماچانـدران، مربـوط بـه بهترین مـدل سـه بعـدی پالایششـده. C: پـلات راماچانـدران، بـه بهتریـن مـدل سـه بعـدی پیـش بینـی و پالایششـده. ناحیـه قرمـز، زرد، سـبز و خاکسـتری بـه ترتیب مربوط به نواحی هسته، مجاز، قابل قبول و غیر مجاز هستند.

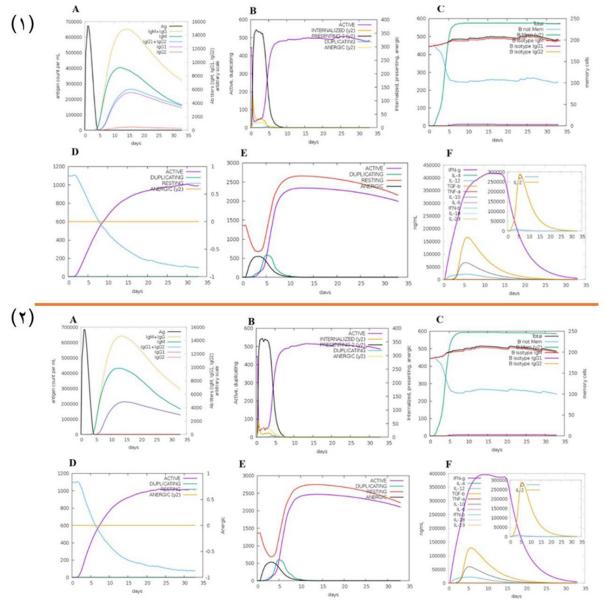
خـواص فیزیکوشـیمیایی، آنتیژنیسـیتی، حلالیـت و میزان تحریک پذیری سیستم ایمنی سازههای طراحی شده: نتایج مربوط به خواص فیزیکوشیمیایی سازههای طراحی شده نشان داد که سازه اول با طول ۴۰۴ اسید آمینه، دارای وزن مولکولی ۴۴۱۰۳/۴۲ دالتون، نقطه ایزوالکتریک ۹/۰۸، شاخص آلیفاتیک ۷۵/۷۹، شاخص GRAVY برابر با ۵/۵۸۵- و شاخص ناپایداری ۳۵/۳۷ بود. درحالی که سازهٔ دوم با طول ۶۰۰ اسید آمینه، دارای وزن مولکولی ۶۵۹۳۶/۶۷ دالتون، نقطه ایزوالکتریک ۱۰/۰۱، شاخص آلیفاتیک ۷۲/۴۸، شاخص GRAVY برابر با ۶۰۹/۰۰ و شاخص ناپایداری ۳۰/۴۸ بود. همان طور که ملاحظه شد، با اینکه هر دو سازه به عنوان یک سازهٔ پایدار حرارتی در نظر گرفته شد (بر اساس الگوریتم تعریفشده توسط سرور ProtParam، اعداد ارائه شده برای شاخص ناپایداری اگر بیشتر از ۴۰ باشند، پروتئین مذکور را ناپایدار اعلام میکند)، ولی میـزان پایـداری سـازه دوم بیشـتر از سـازهٔ اول بـود. همچنیـن محدوده کم و منفی شاخص GRAVY، احتمال کروی بودن (آبدوستی) پروتئین ها را به جای غشایی (آبگریزی)

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 می توان ساده ترین و قابل قبول ترین مدل ها، برای مطالعه در نظر گرفت. علاوه بر این، بر اساس نتایج گزارششــده توســط ســرور VaxiJen، میــزان آنتیژنســیتی سازهٔ اول و دوم به ترتیب ۲۰۷۱، و ۶۷۶۰، بود.

در بررسی پارامتر آبگریزی/آبدوستی سازههای مورد مطالعه توسط سرور PEPTIDE 2.0، مشخص شد كه در سازهٔ اول، سهم اسید آمینه های هیدروفوب، اسیدی، بازی و خنثی به ترتیب ۴۴/۵۵، ۱۱/۶۳ و ۲۶/۲۴ درصد بود، درحالی که موارد ذکرشده در سازه دوم، به ترتیب ۴۴/۵، 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 مقایسه دو سازه نوترکیب ایمنوژنیک برپایه اپیتوپهای T cell (مستخرج شده از غربالگری کل پروتئوم باکتری سالمونلا تیفی) علیه بیماری تب حصبه؛ یک مطالعه ایمنوانفورماتیک

شوند. همان طور که ملاحظه شد، هر دو سازهٔ طراحی شده، آب دوست در نظر گرفته شدند، چراکه کمتر از ۵۰ درصد از اسید آمینه ها آبگریز (هیدروفوب) بودند و مجموع درصد اسید آمینه های باردار (اسیدی و بازی) حاضر در سازه کمتر از ۲۵ درصد بود. در ادامه، نتایج شبیه سازی پاسخ ایمنی نشان داد که هریک از سازه های واکسنی توسعه یافته، به طور قابل توجهی پاسخ ایمنی اولیه و ثانویه را افزایش دادند. لازم به ذکر است که بر اساس نتایج ملاحظه شده در پاسخ به تحریک توسط سازه های واکسنی توسعه یافته، مسطح ۳-۱ ۲GF به عنوان مارکرهای مهم در ایمنی سلولی، برای مدت طولانی به طور چشم گیری

افزایی یافت. افزایی تولید آنتیبادی IgM مربوط به پاسخ اولیه، علیه هریک از سازهها بود، درحالی که افزایش سطح آنتیبادیههای IgG + IgM ،IgG1 + IgG2 ،IgM وسطح آنتیبادیهای B، نشاندهندهٔ پاسخ همراه بیا افزایی تکثیر سلولهای B، نشاندهندهٔ پاسخ تانوییه در مقابیل هریک از ساختارها بود. عیلاوه بر ایین، نتاییج، نشاندهندهٔ تولید سلولهای B خاطره و همچنین نتاییج، نشاندهندهٔ تولید سلولهای B خاطره و همچنین برانگیختن هر دو T کمککننده و T سیتوتوکسیک بود. همچنین، بر اساس گرافهای گزارش شده نیز افزایش جمعیت سلول B فعال و سلولهای T کمکی فعال، پس از قرارگرفتن در معرض واکسنهای توسعهیافته، به طرز چشمگیری مشاهده شد (شکل ۱۳۰۳).

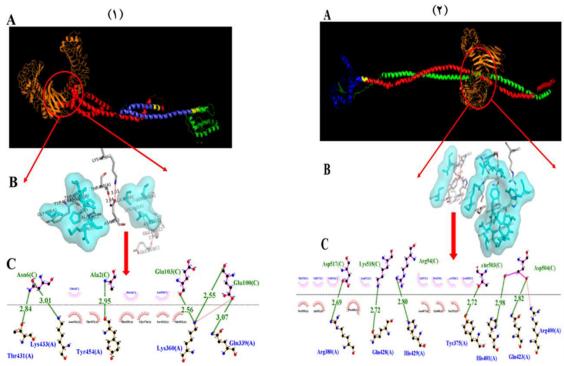


شکل ۳) ۱ و ۲ به ترتیب مربوط به نمودارهای شبیهسازی پاسخهای ایمنی توسط سازه اول و دوم هستند. A: تولید آنتیبادیهای مختلف علیه واکسن توسعهیافته. B: افزایش جمعیت سلول B فعـال. C: تکثیـر سلولهای B و تولیـد سلولهای خاطـره. E: افزایـش جمعیت سلول B فعـال پـس از قـرار گرفتـن در معـرض سازه واکسـنی توسعهیافته. E: افزایـش جمعیت سلولهای T کمکـی فعـال، پـس از قـرار گرفتـن در معـرض سازه واکسـنی توسعهیافته. E: افزایـش جمعیت سلولهای T سلولهای T سلولهای T کمکـی فعـال، پـس از قـرار گرفتـن در معـرض سازه واکسـنی توسعهیافته.

بیرانوند و همکاران

ارزیابی داکینگ مولکولی: احتمال داکینگ مولکولی البین 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 هیدوژنی 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

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 انبرژی اتصال در میدل داکشده ۱۳/۳۰- کیلوکالبری بیر میول و در سازه دوم، ۹۴۲/۸- کیلوکالبری بیر میول محاسبه شد. در جدول ۲ لیست اسیدهای آمینه درگیر در پیوندهای هیدوژنی و طول پیوندها گیزارش شده است.



شکل ۴) تصویر ۱ و ۲ به ترتیب نتیجه داکینگ مولکولی سازه نوترکیب اول و دوم با گیرنده TLR4 هستند. ۸: 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 TLR4 و اپیتوپهای تحریککننده مولکولهای MHCI ادبوانی شده است. 8: ناحیه اتصال مولکولی بین سازههای نوترکیب و گیرنده TLR4، از طریق پیوندها هیدوژنی که توسط نرمافزار PyMol نمایش داده شده است. خطهای قرمز نشان دهنده پیوندهای هیدوژنی بین دو دامنه است. ۵: نمایش اسید آمینههای درگیر از دو دامنه در فرایند داکینگ مولکولی بین سازههای نوترکیب و گیرنده TLR4، در این تصاویر اسید آمینههای مربوط به سازههای نوترکیب به رنگ سبز نشان داده شدهاند. پیوندهای هیدوژنی ایند به صورت خط چین سبز رنگ مشخص شدهاند.

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

J., J			
طول پيوند (Å)	اسید آمینههای مولکول TLR4	اسید آمینههای مولکول HBHA	
	سازه اول		
ترئونين ۴۳۱		آ اھ. ع	
٣/٠١	ليزين ۴۳۳	آسپارژین ۶	
۲/۹۵	تيروزين ۴۵۴	آلانین ۲	
۲/۵۶	NIC I	گلوتامیک اسید ۱۰۳	
۲/۵۵	—		
٣/٥٧	گلوتامین ۳۳۹	گلوتامیک اسید ۱۰۰	
	سازه دوم		
Y/89	اسید آسپارتیک ۵۱۷	آرژنین ۳۸۰	
۲/۷۲	لايزين ۵۱۸	گلوتامین ۴۲۸	
۲/۸۰	آرژنین ۹۴	هیستیدین ۴۲۹	
۲/۷۲	ترئونین ۵۰۳	تيروزين ۳۷۵	
۲/۹۸	اسید آسپارتیک ۵۰۴	*	
Y/AY	گلوتامین ۴۲۳	هیستیدین ۴۰۱	

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

بحث

از جمله گونههای مهم باکتریهای درون سلولی، میتوان بـ منسهای سالمونلا، لیستریا، بروسلا، ریکتزیا و لژیونلا اشاره داشت. باکتری سالمونلا تیفی، برای تکثیر به ماکروفاژها حمله میکند و بنابراین جنزء پاتوژنهای درون سلولی محسوب میشود [۱۲]. همانطور که انتظار میرود، ویژگی اصلی این پاتوژنها، زندهمانی از طریق ساكن شدن و تكثير درون سلولي آنها است. اين زيست 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 پـس از فعالشـدن بـه لنفوسـيتهاى Th1 و Th2 تمايـز مىيابند [۱۳]. لنفوسيتهاى Th1، با توليد سايتوكاينهايي نظیر اینتروفرون 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 نيز فعاليت انفجاري اكسيداتيو قوي، توسط فاگوسیت اکسیداز (NADPH (Nox2را برای افزایش تولید راديكال آزاد اكسيژن(-O2) و متعاقباً توليد H2O2، كه با مصرف پروتون ها یا واکنش با اکسید نیتریک (NO) برای ایجاد پروکسی نیتریت (-ONOO)مرتبط است، آغاز میکنند که منجر به کشتن باکتریها و ایجاد یک محیط قلیایی میشود [۱۵, ۱۵]. بنابراین، تحریک ایمنی سلولی و ایجاد سلولهای خاطره، در رابطه با مقابلهٔ سریعتر برای حـذف پاتوژنهـای درون سـلولی ماننـد سـالمونلا، بسـیار حائـز

در این مطالعه، برای طراحی سازههای واکسنی مبتنی بر اییتوپ، ابتدا اییتوپهای MHC I و سیس، 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 اپیتوپی با استفاده از لینکر پپتیدی "EAAAK" به پروتئین HBHA، به عنوان ادجوانت مولکولی در N ترمینال واکسن توسعهیافته متصل شد. به طور کلی، پروتئین HBHA از باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یک عامل حدت مهم است کے بے این باکتری کمک میکند تا بے سلولھا و ماتریکس خارج سلولی میزبان خود متصل شود [۱۷]. مطالعات نشان داهاند که پروتئین HBHA، به عنوان آگونیست جدید گیرنده TLR4، بدون سمیت سیستمیک، مىتوانىد بلوغ سلولهاى دندريتيك، ترشح ٧-IFN و سایتوتوکسیسیتی سلولی با واسطه سلولهای T را تحریک کنید [۸]. در نتیجیه، می تبوان آن را بیه عنبوان پیک ادجوانیت 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 عملكرد آن اعمال مىشوند [۱۹]. استفاده از سازههاى نوترکیب واکسنی، متشکل از تکرارهای متفاوت اپیتوپی، بسیار مورد علاقه و توجه محققین است، چراکه یافتههای تجربی نشان دادہانہ کے پروتئین های کایمریک 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، می توان به مطالعه نظیفی و همکاران در سال ۲۰۱۹ اشاره داشت که به بررسی میان تحریک سیستم ایمنی علیه باکتری بروسلا با بکارگیری یک سازه متشکل از چند تکرار پشت سر هم از اپیتوپ آنتیژن OMP31 از باكترى بروسلا مليتنسيس يرداختهاند. اين محققین گزارش کردهاند که در بین تیمارهای متفاوت، گروه واکسینه شده با سازه چند اپی توپی بیشترین نرخ ترشے IL-2 ،IFN-γ و IgG2a را دارنـد. عـلاوہ بـر ایـن، بعـد از چلینـجدادن تیمارهـای واکسینهشـده بـا سـویه حـاد باکتری بروسلا ملیتنسیس، مینزان بار میکروبی تیماری که دریافتکننده سازه کاندید واکسنی متشکل از تکرارهای متوالی از یک اپیتوپ بود، به طور معنی داری پایین گـزارش شـد [۲۱]. از آنجاکـه نفوذپذیـری گلومرولـی در کلیه، متأثر از وزن و سایز مولکول است، پروتئینهای با وزن مولکولی یایین (۴۰>mw کیلو دالتون)، اساساً آزادانه فیلتر می شوند، درحالی که فیلتر پروتئینهایی با وزن مولکولی بالا (mw ١٠٠ كيلو دالتون)، تقريباً به طور كامل محدود مى شوند [٢٢, ۲۳]. در این مطالعه، دو سازه با وزنهای تقریبی ۴۴ و ۶۵ کیلو دالتون طراحی شد. این درحالی بود که در مطالعهای کے 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 واکسنی با وزن ۴۱ کیلودالتون معرفی کردند [۲۵]. در مطالعـهای دیگـر کـه رشـیدیان و همکارانـش درسـال ۲۰۲۰، بـه واسطه پیشبینی اپیتوپ مهمترین آنتیژنهای باکتری کوکسیلا بورنتی انجام دادهاند، سازهٔ واکسنی با وزن ۴۱/۵۰ کیلودالتون را گزارش کردهاند [۲۶]. همانطور که ملاحضه میشود وزن سازههای نوترکیب طراحیشده در مطالعات گذشته، همانند مطالعه حاضر نسبتاً بالا است و در زمان عبور از سیستم فیلتراسیون کلیوی به دلیل وزن بالا حذف نمىشـوند.

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

بیرانوند و همکاران

از نظر حرارتی پایدار هستند. فروهرمهر در سال ۲۰۲۴ [۲۹]، شمس و همکارانش در سال ۲۰۲۰ [۲۵] و رشیدیان و همکاران نیز در سال ۲۰۲۰ [۲۵]، سازههای ایمونوانفورماتیکی مبتنی بر اپیتوپی طراحی و بررسی کردهاند و گزارش کردهاند نیایداری به ترتیب ۱۳۷۸ و ۱۳۷۸، پایداراست. علاوه ناپایداری به ترتیب ۳۱/۹، ۳۱/۹ و ۳۲/۳۹، پایداراست. علاوه براین، هر دو سازه طراحیشده در این مطالعه، توانست با ایجاد ۶ پیوند هیدوژنی به گیرنده TLR4 خود متصل شود. این در حالی است که در مطالعهای، تعداد پیوندهای شود. این در حالی است که در مطالعهای، تعداد پیوندهای هیدروژنی مشاهده شده در هنگام داکینک سازه طراحی شده، اشان دادهاند که اتصال دامنه اپیتوپی به مولکول نشان دادهاند که اتصال این پروتئین به گیرنده TLR4 سطح ساول نمی شود.

امروزه، بکارگیری بستر مهیاشده در فضای in silico، بـرای دسـتیابی بـه ترکیبات مولکولـی ارزشـمند در حوزههای مختلف بیولوژی، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. یکی از پرکاربردترین ابزارهای موجود در فضای in silico کـه دقـت و اعتبار بالایـی دارد، سـرورهای تخصصـی پیشبینی کننـده بخشهای ایمونـوژن پروتئینها (پپتیدهایی که تحت عنوان اپیتیدهایی که تحت عنوان 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 واکسینی نوترکییب، میتوان بیا صرفهجوییی در زمان و هزینه، تکرار آزمایشات مختلف در فضای in vitro را کاهـش داد و با بکارگیـری قویتریـن و پـر اسـتنادترین الگوریتمها، نسل دوم واکسنها را توسعه داد و عوارض استفاده از نسل اول از واكسنها را كاملاً حذف كرد [۲۷، ۲۸]. 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 دادهانید که می توان سازههای واکسنی موفقی را علیه انواع پاتوژنهایی مانند سالمونلا، باسیلوس آنتراسیس، کوکسیلا، لپتوسیپیروز و غیره طراحی، ارزیابی و ارائه کنند [٩، ۵٢، ٩٢ و ٣٠].

نتيجهگيري

در این مطالعه، دو سازه نوترکیب متفاوت، متشکل از

gov/17760271/

- 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/
- Nosrat S, Sabokbar A, Dezfoolian M, Tabarraie B, Fallah F. Prevalence of Salmonella enteritidis, typhi and typhimurium from food products

اپیتوپهای اختصاصی تحریک کنندهٔ مولکولهای MHCI و MHCII، حاصل از بهتریان آنتیژنهای موجود در کل MHCII 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 Cell بود، هم وزن مولکولی بالاتر و هم شاخص ناپایداری کمتری را نشان میدهد. همچنیان ایان سازه، در کنار میزان جزئی آنتیژنسیته بالاتر، مجموع درصد ساختارهای صفحات گسترده و رندم کویل بیشتری نسبت به سازه اول دارد. در آخر نیز مشاهده میشود که سازهٔ دارای تکرارهای پشت سر هم از اپیتوپها، انرژی داکینگ و نیز میانگیان طول پیوندهای هیدروژنی کمتر از سازه بدون تکرار دارد. بنابرایان، میتواند برای استفاده به عنوان یک سازه کاندید، بالبرایان برتر علیه بیماری تب حصبه امید بخش باشد.

نکات بالینی کاربردی برای پلیس: از آنجا که شرایط نگهداری واکسینهای نوترکیب در مقایسه با واکسینهای زنده یا تخفیف حدتیافته (در ساخت این نوع واکسینها از پیکره کل پاتووژن استفاده میشود) راحتتر است. بنابرایی، در شرایط استراتژیک و حساس که زمان و تجهیزات بسیار اهمیت پیدا میکنند، بکارگیری واکسینهای نوترکیب معقول تر است. علاوهبرایی، استفاده از واکسینهای نوترکیب نوترکیب برخلاف واکسینهای زنده یا تخفیف حدتیافته، منجر به بروز بیماری و یا بروز عوارض جانبی مانند سر درد، بدن درد، تهوع و سقط نمیشود. بنابرایی، در شرایط بروز یک پاندمی در جامعه استفاده از واکسینهای نوترکیب بروز یک پاندمی در جامعه استفاده از واکسینهای نوترکیب محبوبت راست.

سهم نویسندگان. فاطمه بیرانوند: جمعآوری و تجزیه و تحلیل دادهها؛ نعمت شمس: ارائه ایده و طراحی مطالعه؛ امین جایدری: جمع آوری دادهها ؛ نرگس نظیفی: ارائه ایده و طراحی مطالعه؛ پیمان خادمی: جمع اوری 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 منافعی در قبال مطالعه حاضر وجود ندارد.

حامــی مالــی. در ایــن مقالــه هیچگونــه حامــی مالــی وجــود نداشــت.

Reference

- 1. Ahmadi MH, Ahmadi A. An overview of bioterrorism and its association with the emerging coronavirus. New Cellularand Molecular Biotechnol J. 2022; 12 (46): 9-24. https://ncmbjpiau.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.

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

- 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
- 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
- Plotkin S. History of vaccination. Proc Natl Acad Sci. 2014;111(34):12283-7. https://pubmed.ncbi.nlm. nih.gov/25136134/
- 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
- 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
- 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/
- 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/
- 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, Demaurex 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 AT-Pases. J Leukoc Biol. 2014;95(5):827-39. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24415791/
- 17. Menozzi FD, Reddy VM, Cayet D, Raze D, Debrie 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/
- 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/
- 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/10.1080/07391102.202 4.2326198
- 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
- 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

بیرانوند و همکاران