

Bioinformatic Design and Analysis of Chimeric Immunogen Against Adherence and Toxicity of *Vibrio Cholera*

Mohammad Behrozie¹, Shahram Nazarian^{2*}, Seyed Mojtaba Aghaie³

1. Masters student in Cellular and Molecular Biology, Imam Hossain University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Biology Research Center, Faculty of Science, Imam Hossain University, Tehran, Iran
3. Master of Science, Biology Research Center, Faculty of Science, Imam Hossain University, Tehran, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2017/12/10
Accepted: 2018/01/08
Available online: 2018/11/23

Article Subject:

Microbial bioinformatics

IJMM 2018; 12(4): 269-279

Corresponding author:

Shahram Nazarian

Assistant Professor, Biology
Research Center, Faculty of
Science, Imam Hossain
University, Tehran, Iran

Email:

kpnazari@ihu.ac.ir

Use your device to scan
and read the article online



Abstract

Background and Aims: Diarrhea caused by intestinal bacteria is a major cause of mortality, especially in children under the age of five in developing countries. Vaccines can be considered as an important solution to prevent these diseases. Toxin-coregulated pilus (TcpA), OMPW and cholera toxin are the most important virulence factors of *vibrio cholera* and have immunogenic characteristics. In this study, a recombinant immunogen consisting of TcpA, Outer Membrane Protein OMPW, and cholera toxin B-subunit (CtxB) was designed. This chimeric protein, which contains B-cell epitopes and an adjuvant sequence, can potentially increase the likelihood of developing effective immune responses.

Materials and Methods: To increase the probability expression of the OTC protein, gene codons and various parameters effective in expression were optimized. The thermodynamic analysis of the mRNA structure was performed to verify stability. The third structure of the protein was predicted and the quality of the structures was evaluated. Linear and conformational epitopes were also determined.

Results: Protein with the sequence of OTC showed the highest antigenicity index. Codon Adaption Index of chimer increased to 0/89. The third predicted structure based on the RaptorX server showed good quality. The thermodynamic analysis of the mRNA structure showed that the predicted structure is stable. Conformational and linear epitopes were observed in all three domain of chimeric protein.

Conclusions: The results showed that the protein produced from this structure could act as an immunogen against the binding and toxin function of *Vibrio cholera* bacteria.

Keywords: *Vibrio cholerae*, Cholera toxin, OMPW, TcpA, Bioinformatic design, Chimeric gene

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Nazarian S, Aghaie M. Bioinformatic Design and Analysis of Chimeric Immunogen Against Adherence and Toxicity of *Vibrio Cholera*. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (4):269-279



طراحی بیوانفورماتیکی و آنالیز ایمونوژن کایمر علیه اتصال و سمیت باکتری ویبریولکرا

محمد بهروزی^۱، شهرام نظریان^{۲*}، سیدمجتبی آقایی^۳

۱. دانشجوی کارشناس ارشد زیست‌شناسی گرایش سلولی و مولکولی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۲. استادیار مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۳. کارشناس ارشد سلولی و مولکولی مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: بیماری‌های اسهالی ناشی از باکتری‌های روده‌ای عامل مهم مرگ‌ومیر در کشورهای در حال توسعه به‌ویژه در کودکان زیر پنج سال است. واکسن‌ها می‌توانند راه‌حل مهمی برای پیشگیری از این بیماری باشند. فاکتور کلونیزاسیون پیلی (TcPA)، پروتئین غشای خارجی W و توکسین کلرا مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی ویبریولکرا هستند و ویژگی‌های ایمونوژنیک دارند. در این مطالعه، ایمونوژنی نو ترکیب سه‌گانه متشکل از OMPW، TcPA، CTXB طراحی شد. پروتئین کایمر که دربردارنده اپی‌توپ‌های B-cell و توالی با خاصیت ادجوانتی است، می‌تواند به‌طور بالقوه احتمال بروز پاسخ‌های ایمنی مؤثر را افزایش دهد.

مواد و روش کار: برای افزایش احتمال بیان پروتئین OTC، کدون‌های ژنی و انواع پارامترهای مؤثر در بیان بهینه شد و تجزیه و تحلیل ترمودینامیکی ساختار mRNA با هدف بررسی پایداری انجام گرفت. همچنین ساختار سوم پروتئین پیش‌بینی شد، کیفیت ساختارها ارزیابی، و اپی‌توپ‌های خطی و فضایی نیز تعیین شد.

یافته‌ها: پروتئین با ترتیب توالی OTC بیشترین شاخص آنتی‌ژنی را نشان داد. شاخص سازگاری کدون سازه کایمری به ۰/۸۹ افزایش یافت. ساختار سوم پیش‌بینی شده براساس سرور RaptorX کیفیت مناسبی را نشان داد. آنالیز ترمودینامیکی ساختار mRNA نشان داد ساختار پیش‌بینی شده پایدار است. اپی‌توپ‌های فضایی و خطی در هر سه دومین پروتئین کایمر دیده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد پروتئین حاصل از این ساختار طراحی شده می‌تواند در برابر عملکرد اتصال و توکسین باکتری ویبریولکرا مانند یک ایمونوژن عمل کند.

کلمات کلیدی: ویبریولکرا، کلرا توکسین، OMPW، TcPA طراحی بیوانفورماتیکی، ژن کایمر

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۱۹
پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۸
انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۹/۰۲
موضوع:
 بیوانفورماتیک میکروبی
IJMM1397;12(4):269-279
نویسنده مسئول:

شهرام نظریان

استادیار، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

پست الکترونیک:

kpnazari@ihu.ac.ir

مقدمه

عفونت‌های اسهالی دومین علت اصلی مرگ‌ومیر در کودکان زیر پنج سال، و مسئول کشته‌شدن حدود ۷۶۰۰۰۰ کودک در سال است. کودکانی که دچار سوءتغذیه هستند و یا سیستم ایمنی ضعیفی دارند، بیشتر در معرض این عفونت‌ها هستند (۱). سه شاخصه بیماری‌زایی که میکروارگانیزم‌های ایجادکننده بیماری‌های روده‌ای از طریق آن عمل می‌کنند، عبارت است از: اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده، حمله به سلول‌های اپیتلیال و اپیتلیوم، تولید توکسین‌هایی که ممکن است برای سلول‌ها کشنده باشد و یا به از دست رفتن آب منجر شوند و سیستم عصبی را تحت تأثیر قرار دهند.

عوامل بیماری‌زا، عامل بیماری مهلک وبا، از جمله این میکروارگانیزم‌ها است که اغلب کشورهای جهان سوم را درگیر کرده و مرگ‌ومیر زیادی در پی دارد (۲،۳). ویبریولکرا عوامل بیماری‌زای مختلفی مانند آنزیم‌ها و سموم دارد که مهم‌ترین آنها اگزوتوکسین کلرا توکسین است و عامل اصلی بیماری وبا به شمار می‌رود (۴،۵). با توجه به خواص آنتی‌ژنیک قابل توجه کلراتوکسین، مطالعات زیادی با هدف استفاده از این توکسین و زیرواحدهای نو ترکیب آن برای ایجاد مصونیت در برابر این بیماری صورت گرفته است (۶-۸).

علی‌رغم خواص ایمونولوژیکی کلراتوکسین که بسیار مورد توجه محققان است، سمی بودن آن موجب محدود شدن استفاده در واکسیناسیون انسانی شده است. در عوض به علت سمی نبودن زیرواحد B، استفاده از CTXB به‌طور وسیعی به‌عنوان ایمونوژن مخاطی در انسان بررسی شده است. Juthika Kundu و همکاران ایمنی‌زایی پروتئین‌های نوترکیب TcA و CTXB را به‌صورت جداگانه و مخلوط با هم علیه ویبریولکلا بررسی کردند (۶). نتایج نشان داد استفاده از زیرواحد اتصالی سم کلرا به‌عنوان ایمونوژن، مصنوعیت‌بخشی ۷۰/۴۵ درصد و کاربرد آنتی‌ژن TcA به تنهایی مصنوعیت‌بخشی ۴۱/۱ درصد را دربردارد؛ در حالی که استفاده همزمان هر دو آنتی‌ژن، محافظت ۱۰۰ درصدی علیه ویبریولکلا را در مدل حیوانی سبب شد (۶).

امروزه در طراحی ایمونوژن‌ها و واکسن‌های نوترکیب از بیوانفورماتیک استفاده می‌شود که دربردارنده مطالعه ساختارهای پروتئین‌های جدید و طراحی الگوریتم‌هایی برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T و همچنین بررسی پایداری ایمونوژن‌ها است. از این راه زمان و هزینه لازم برای بررسی‌های آزمایشگاهی کاهش می‌یابد. استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی، کمک زیادی به شناسایی ایمونوژن‌های جدید می‌کند (۱۹-۱۷).

ایمونوژن‌ها و پروتئین کایمر دربردارنده زیرواحدهای پروتئینی، لینکرها و توالی‌هایی مانند CTXB هستند که ویژگی ادجوانتی دارند و می‌توانند خاصیت ایمونوژنیستی پروتئین‌های نوترکیب را تقویت کرده و پاسخ‌های ایمنی مناسبی را تحریک کنند (۱۱). با توجه به مزایای استفاده از پروتئین‌های کایمر و با در نظر گرفتن سازوکار بیماری‌زایی ویبریولکلا، هدف این تحقیق طراحی ایمونوژن کایمر نوترکیب علیه فاکتورهای اتصال و توکسین‌باکتری ویبریولکلا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بازیابی توالی، طراحی سازه و بهینه‌سازی کدون

توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی مرتبط با CTXB، TcA و OMPW از پایگاه داده Gene Bank (DNA) با کدهای دسترسی NC_002505.1، E00132.1، NC_002505.1 و پروتئین (Uniprot) با کدهای دسترسی B7U9W2، Q60153، P01556 به دست آمد. توالی آنتی‌ژنی با در کنار هم قرار دادن TcA، OMPW و CTXB و با استفاده از لینکر مناسب طراحی شد. برای اتصال بخش‌های آنتی‌ژنیک به یکدیگر، سازه‌های متفاوتی از آنتی‌ژن‌ها با

زیرواحد اتصالی کلراتوکسین از ۵ قسمت ۱۰۳ اسیدآمینه‌ای یکسان تشکیل شده است که با آرایش حلقه مانند، محل اتصال به گیرنده گانگلوzyd GM1 سلول‌های اپیتلیال روده دارد. زیرواحد B سم کلرا (CTXB) مسئول اتصال سم به گیرنده‌های غشای سیتوپلاسمی سلول میزبان بوده و سمی نیست (۵). امروزه CTXB به‌عنوان ایمونو ادجوانت قوی در ایمنی‌زایی وابسته به مخاط کاربرد دارد (۹،۱۰). نکته دیگری که باید در نظر گرفته شود این است که می‌توان از ادجوانت‌های پروتئینی در طراحی واکسن‌های زیرواحدی استفاده کرد. می‌توان با فیوژ کردن آنتی‌ژن‌های کاندیدای واکسن با ادجوانت‌هایی مثل CTXB، سبب تقویت پاسخ‌های ایمنی شد (۷،۱۱،۱۲).

پروتئین خارج غشائی OMPW، ۲۲ کیلو دالتون وزن دارد و باعث پایداری ویبریولکلا در برابر شوک‌های محیطی مثل تغییرات pH، شوک اسموتیک و مقاومت در مقابل شوینده می‌شود و امکانی برای باکتری فراهم می‌کند تا در داخل روده کلونیزه شود و ایجاد بیماری کند. این پروتئین در مقالات مختلف به‌عنوان یک ایمونوژن معرفی شده است، از آنجا که این پروتئین بین تمام سویه‌های ویبریولکلا توالی ثابت دارد، کاندید واکسن است و ارزش تشخیصی دارد (۱۳،۱۴).

از عوامل مهمی که در اتصال و تجمع باکتری ویبریولکلا در روده نقش اصلی را به عهده دارد، پروتئین TcA (toxin coregulated pillus) است که زیرواحد بزرگ پیلی باکتری به شمار می‌رود. این پروتئین با توجه به محل قرارگیری TcA در سطح باکتری، به راحتی تحت تأثیر سیستم ایمنی قرار می‌گیرد. نحوه قرارگیری آن در معرض آنتی‌بادی‌ها باعث شده کاندید مناسبی برای توسعه ایمنی ضدکلونیزاسیون علیه بیماری و با باشد. پروتئین TcA با وزن حدود ۲۲ کیلودالتون با ژنی کد می‌شود که ۵۹۸ جفت باز دارد (۱۵،۱۶).

امروزه با توجه به مخاطرات واکسن‌های نسل اول، به استفاده از ایمونوژن‌ها و واکسن‌های زیرواحدی نوترکیب جهت مقابله با بیماری‌های میکروبی توجه زیادی می‌شود. ایمونوژن‌ها و واکسن‌های زیرواحدی نوترکیب ایمن‌تر هستند و واکنش‌های غیراختصاصی کمتری در سیستم ایمنی به راه می‌اندازند. از سوی دیگر استفاده از ایمونوژن‌های کایمری و واکسن‌های چندزیرواحدی به جای تک‌زیرواحدی‌ها محافظت بیشتری علیه عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌کند (۱۱).

کیفیت ساختار، همچون PROCHECK، MolProbity، VERIFY3D و مدل RAMPAGE استفاده می‌کند (۲۹). همچنین کیفیت مدل‌های پیشنهادی نرم‌افزارهای تعیین ساختار سه‌بعدی پروتئین با برنامه PROSA نیز تعیین شد (۳۰). بررسی‌های ایمونولوژیکی

برای تخمین میزان آرژی‌زایی پروتئین طراحی شده از AlgPred استفاده شد (۳۱). ABCpred و سرور Ellipro و CBTOP به ترتیب برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی و اپی‌توپ‌های ناپیوسته B-cell سازه کایمری به کار رفت (۳۲،۳۳). در این فرایند، اپی‌توپ‌ها براساس انعطاف‌پذیری و قابلیت در دسترس سطح بودن انتخاب می‌شوند.

یافته‌ها

انتخاب بخش آنتی‌ژنیک و طراحی ساختار کایمری

توالی‌های مرتبط با CTXB، OMPW و TcpA از Genbank به دست آمد. این سه توالی، شامل ۱۰۲ اسیدآمینو از CTXB، ۱۹۶ اسیدآمینو از OMPW و ۱۹۹ اسیدآمینو از TcpA بود. چگونگی قرار گرفتن این سه زیرواحد در سازه پروتئینی ارزیابی شد. بهترین سازه از طریق ارزیابی ساختارهای سوم طراحی شده از پروتئین کایمری و براساس ویژگی آنتی‌ژنیسیته آنها به دست آمد. در جدول ۱ نتایج ترتیب‌های مختلف زیرواحدهای پروتئینی با سرور VaxiJen و نرم‌افزار ANTIGENpro آورده شده است. براساس نتایج جدول ۱، برای پیش‌بینی و ارزیابی ساختار سوم، سازه‌ای با بیشترین شاخص آنتی‌ژنیسیته انتخاب شد. در هر دو بررسی انجام شده با سرور VaxiJen و نرم‌افزار ANTIGENpro بهترین نتایج به سازه آنتی‌ژن مصنوعی با ترتیب OMPW-TcpA-CTXB (OTC) مربوط بود.

لینکر در نظر گرفته شد. براساس بالاترین مقدار آنتی‌ژنیسیته، با استفاده از برنامه‌های نرم‌افزاری VaxiJen و ANTIGENpro (۲۰،۲۱)، سازه OTC انتخاب شد. در سازه OTC، زیرواحدهای پروتئینی با سه بار تکرار از توالی EAAAK و به‌عنوان لینکر سخت به یکدیگر متصل شدند. علاوه بر این، پارامترهای فیزیکی و شیمیایی متفاوت پروتئین کایمر با استفاده از نرم‌افزار ProtParam بررسی شد (۲۲). در نهایت تجزیه و تحلیل ژنی و بهینه‌سازی چندین پارامتر ژن کایمر مصنوعی با استفاده از سرور GenScript و به کار بردن کدون‌های ترجیحی در E. coli انجام شد.

پیش‌بینی پایداری mRNA و ساختار پروتئین

برای پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین، از سرورهای I-TA، SSER، Phyre و RaptorX استفاده شد (۲۵-۲۳). کیفیت مدل‌های سه‌بعدی با سرور ModFOLD4 ارزیابی شد (۲۶). ساختارهای سه‌بعدی کایمر و پروتئین‌های طبیعی با سرور SuperPose مقایسه شد (۲۷). برای مشاهده ساختارهای سه‌بعدی از نرم‌افزار Accelrys Discovery Studio v.1.7 استفاده شد. ساختار mRNA ژن کایمر با نرم‌افزار mfold و روش CentroidFold ارزیابی شد (۲۸). سپس ویژگی‌های فولدینگ و ترمودینامیکی mRNA طبیعی و بهینه‌سازی شده با یکدیگر مقایسه شد.

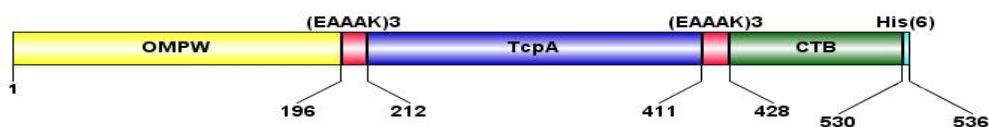
اعتبارسنجی کیفیت ساختار پروتئین کایمر

ارزیابی سریع و تعیین اعتبار کیفیت ساختارهای پروتئینی، با نرم‌افزار اعتبارسنجی ساختار پروتئینی (PSVS) انجام شد. از PSVS بیشتر برای ارزیابی کیفیت ساختار در طراحی‌های زیست‌شناسی ساختاری استفاده می‌شود. این نرم‌افزار برای تجزیه و تحلیل کامل، به‌طور گسترده از ابزارهای متفاوت ارزیابی

جدول ۱. پیش‌بینی شاخص آنتی‌ژنیسیته سازه‌های پروتئینی با استفاده از VaxiJen و SCRATCH

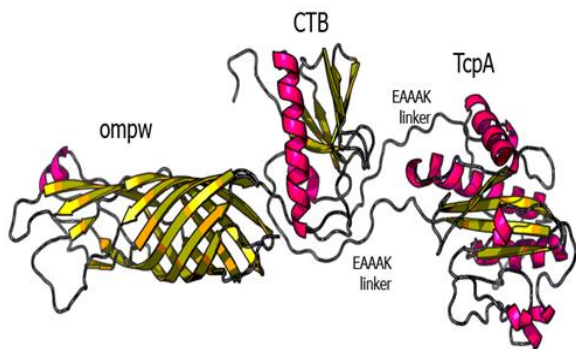
سازه	امتیاز پیش‌بینی شده در VaxiJen	امتیاز پیش‌بینی شده در ANTIGENpro
OTC*	۰/۵۹۹۰	۰/۹۵۱۸
OCT	۰/۵۸۹۲	۰/۹۳۸۸
TOC	۰/۵۹۵۲	۰/۹۴۰۱
TCO	۰/۵۹۷۸	۰/۹۴۴۸
CTO	۰/۵۹۶۱	۰/۹۴۱۲
COT	۰/۵۹۱۷	۰/۹۳۹۶

روش‌های ایمونولوژیکی از جمله وسترن بلات و بهبود فرایند خالص‌سازی پروتئین به روش تمایلی، توالی کدکننده ۶ هیستیدین به انتهای c-terminal قطعه CTXB اضافه شد. همچنین برای پایان دادن ترجمه به‌صورت مؤثرتر، کدون پایانی (TAA) به‌عنوان آخرین کدون به توالی اضافه شد.



شکل ۱. ساختار شماتیک سازه پروتئین دربردارنده OMPW.TcpA و CTB که با لینکر مناسب به هم متصل‌شده و شماره‌ها نشانگر شروع و پایان هر قطعه است.

نرم‌افزارهای دیگر، بیشترین شباهت ساختاری را با پروتئین‌های طبیعی دارد. ساختارهای پیش‌بینی‌شده با PHYRE و I-TASSER در رتبه‌های بعدی قرار دارند. نتایج پیش‌بینی ساختار پروتئین کایمر با PHYRE و RaptorX به هم نزدیک است و I-TASSER کمترین امتیاز را دارد. مدل روبانی طراحی ساختار برای پروتئین OTC با سرور RaptorX، سه دومین متمایز دارد؛ به این معنی که دومین‌های پروتئین فیوژن می‌تواند به‌طور مؤثری با لینکرها از هم جدا شوند (شکل ۲).



شکل ۲. ساختار سه‌بعدی مدل OTC پیش‌بینی‌شده با سرور RaptorX

بررسی کیفیت ساختار و پایداری پروتئین

محاسبه حداقل انرژی Swiss-Pdb-Viewer نشان می‌دهد مدل طراحی‌شده با سرور RaptorX برای OTC (۵۹۷/۹۳-) از مدل‌های دیگر پایدارتر است. بررسی نمودار رامچاندان نشان می‌دهد در

قطعات آنتی‌ژنی با لینکرهای سخت (۱۵ اسیدآمینه) به یکدیگر متصل شدند (شکل ۱). برای اتصال دومین‌های مختلف، لینکرهایی با قطعات تکراری EAAAK به کار رفت که یک آلفا هلیکس هیدروفوب منومر را تشکیل می‌دهد. با استفاده از توالی EAAAK، تفکیک مؤثری بین زیرواحدها به دست آمد. علاوه بر این، برای تسهیل شناسایی و تأیید پروتئین کایمر نو ترکیب با

پیش‌بینی ساختار سوم

برای طراحی ساختار سوم پروتئین کایمر، از سه نرم‌افزار مختلف شامل Phyre، I-TASSER و RaptorX استفاده شد. برای ارزیابی کیفیت مدل‌های سه‌بعدی پیش‌بینی‌شده که با این سرورها مدل‌سازی شده بود، سرور ModFOLD4 به کار رفت و ارزیابی براساس نمره کیفیت مدل پیش‌بینی‌شده انجام گرفت. به‌طور استاندارد این نمره بین صفر تا یک در نظر گرفته می‌شود. مقدار P نیز صحت نمره در نظر گرفته‌شده را نشان می‌دهد. مدل طراحی‌شده با RaptorX، با امتیاز کیفیت مدل ۰/۳۹۴۰ و ارزش P قابل قبول (۰/۰۰۸)، بهترین نتیجه را داشت. همچنین نتایج نشان داد Phyre با امتیاز کیفیت مدل ۰/۳۹۱۰ و ارزش P قابل قبول (۰/۰۰۹) با تفاوت بسیار کمی در رتبه دوم پس از RaptorX قرار دارد.

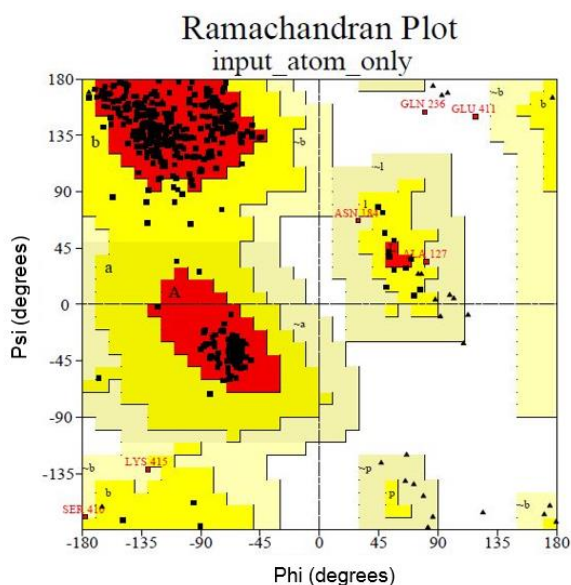
علاوه بر این، کیفیت ساختارهای سه‌بعدی پیش‌بینی‌شده با تطابق دادن روی ساختارهای سه‌بعدی پروتئین کایمر، با ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های زیرواحدهای تشکیل‌دهنده آن ارزیابی شد. بر این اساس ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های طبیعی که از پایگاه داده پروتئین استخراج شده بود با ساختار سه‌بعدی OTC مقایسه شد که با سرورهای مختلف طراحی شده بود. نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است و شامل اندازه‌گیری میانگین فاصله بین اتم‌های ساختار پروتئین است. انحراف معیار ریشه (RMSD) یک سیستم امتیازدهی است که برای پیدا کردن هم‌طرازی بهینه بین دو ساختار پروتئین استفاده می‌شود. براساس این نتایج، مدل پیش‌بینی‌شده با RaptorX، نسبت به مدل‌های طراحی‌شده با

آنالیز ایمونوفورماتیکی پروتئین کایمر OTC

بررسی‌ها نشان داد پروتئین کایمر طراحی شده، پروتئینی غیرآلرژن است. نقشه‌برداری اپی‌توپ IgE و تجزیه و تحلیل خواص ساختاری و فیزیکی و شیمیایی با سرور AlegPred نشان داد توالی پروتئین کایمر حاوی اپی‌توپ IgE تأیید شده نیست. اپی‌توپ‌های B-cell نقش مهمی در انتخاب ایمونوزن‌ها ایفا می‌کنند. اپی‌توپ‌های B-cell، در توالی پروتئین با سرور ABCpred بررسی شد که نتایج آن در جدول ۲ آورده شده است. همانطور که در جدول مشاهده می‌شود اپی‌توپ‌های خطی در طول توالی کایمر پراکنده بوده و به هر دو پروتئین تشکیل‌دهنده سازه متعلق است. نتایج پیش‌بینی اپی‌توپ‌های فضایی در جدول ۳ آمده است. همانطور که در جدول مشاهده می‌شود اپی‌توپ‌های فضایی در طول توالی کایمر پراکنده بوده و به هر دو پروتئین تشکیل‌دهنده سازه متعلق است.

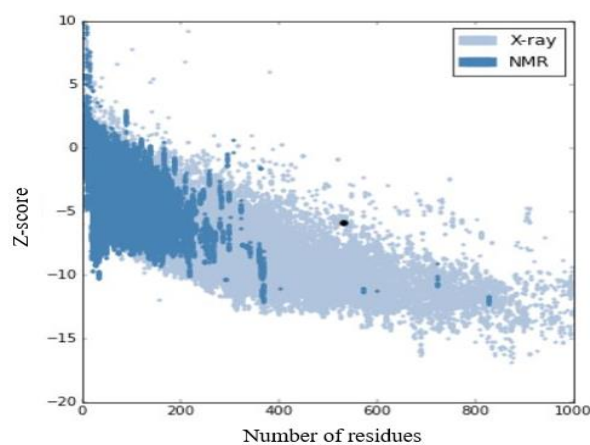
مدل طراحی شده با سرور RaptorX، ۹۲/۵ درصد از اسیدهای آمینه در منطقه بسیار مطلوب است که بسیار بیشتر از مدل‌های سه بعدی دیگر است. پس از آن، مدل PHYERE با ۷۶/۸ درصد و I-TA SSER با ۷۴/۹ از اسیدهای آمینه قرار گرفته، در منطقه بسیار مطلوب قرار دارند. فقط ۰/۶ درصد از اسیدهای آمینه مدل RaptorX در ناحیه غیرمجاز هستند. تعداد اسیدهای آمینه قرار گرفته در ناحیه غیرمجاز برای مدل‌های PHYERE و I-TA SSER به ترتیب ۳/۱ و ۳/۷ درصد بود.

بررسی نمودار رامچاندان در مدل پیش‌بینی شده با سرور RaptorX، نشان داد بیش از ۹۹/۴ درصد از اسیدهای آمینه درون مناطق مطلوب و مجاز و ۰/۶ درصد از اسید آمینه‌ها در ناحیه غیرمطلوب قرار دارند (شکل ۳). کیفیت ساختار پیش‌بینی شده با نرم‌افزار PROSA بررسی شد. بر این اساس کیفیت ساختار پروتئین در محدوده پروتئین‌های کریستالوگرافی شده و یا تعیین ساختار شده به روش NMR بود (شکل ۳).



Overall model quality

Z-score: -5.87



شکل ۳. نمودار رامچاندان و بررسی کیفیت ساختار پیش‌بینی شده با سرور PROSA

جدول ۲. نتایج پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی. توالی‌هایی با امتیاز بیش از ۰/۴ اپی‌توپ به شمار می‌رود.

توالی اپی‌توپ	موقعیت شروع	امتیاز	توالی اپی‌توپ	موقعیت شروع	امتیاز
VSAGVVTLAQRAID	۲۲۷	۰/۹	WGAAANVGFDFYMLN	۱۳۷	۰/۸
LGDIGETKHLPTF	۷۵	۰/۸	STSGGELGSLGDIG	۶۶	۰/۷۹
KTPQNITDLCAEYH	۴۲۵	۰/۸	AETGVGVKSIAPA	۳۶۸	۰/۷۹
FAISVDGLTQAQCK	۳۱۹	۰/۸	TNMNIFSFRNAAA	۳۰۲	۰/۷۹
VALTQTYRGLGNYP	۲۵۶	۰/۸	VSLGKISSDEAKNP	۲۸۵	۰/۷۹
VGAGLNYTTFFDES	۱۰۵	۰/۸	SWFLNAYVWYANIE	۱۵۲	۰/۷۹
TQIHTLNDKIFSyt	۴۴۰	۰/۸	AGGAVALADLGDfE	۳۴۹	۰/۷۹

TLAQRADSQIMTK	۲۳۳	۰/۸	IIVLGIMGVVSAGV	۲۱۸	۰/۷۸
امتیاز	موقعیت شروع	امتیاز	توالی اپی توپ	موقعیت شروع	امتیاز
PRNAAANKAFAISV	۳۱۰	۰/۸	DVEINPWVFIAGG	۱۸۰	۰/۷۸
GFDYMLNDSWFLNA	۱۴۴	۰/۸	TNNALSCLKLDDSW	۱۲۴	۰/۷۸
GDFIVRAGIASVVP	۴	۰/۸	EVLARTPFSSHKIST	۵۴	۰/۷۸
KNLDLTNITHVEKL	۳۸۳	۰/۸	DLCAEYHNTQIHITL	۴۳۲	۰/۷۶
DLGDFENSAAAAET	۳۵۷	۰/۸	QYYFGEANSTNRPY	۹۱	۰/۷۵
ASKLTSGLVSLGKI	۲۷۷	۰/۸	VIKSIAPASKNLDL	۳۷۴	۰/۷۵
WYANIETTATYKAG	۱۶۰	۰/۸	DMFPYIAIKAGGAV	۳۴۰	۰/۷۴

جدول ۳. نتایج پیش‌بینی اپی توپ‌های ساختاری. توالی‌هایی با امتیاز ۴ و بیش از آن به‌عنوان اپی توپ در نظر گرفته می‌شوند.

اسید آمینه	موقعیت	امتیاز	اسید آمینه	موقعیت	امتیاز
HQE	۱-۳	۴	AGADAKS	۱۷۱-۱۷۷	۴
SVVPNDS	۱۳-۲۰	۴	KF	۱۹۵-۱۹۷	۴
ISTS	۶۴-۶۷	۴	QVALT	۲۵۴-۲۵۸	۴
LPP	۸۳-۸۵	۴	GKISSDEAKN	۲۸۸-۲۹۷	۴
EANSTNRPYVGAGL	۹۶-۱۰۹	۴	EN	۳۶۰-۳۶۲	۴
TFFDEFNSTGTNN	۱۲۲-۱۲۶	۴	PQNITDLCAEY	۴۲۷-۴۳۷	۴
LSDLKLLDDSWG	۱۲۸-۱۴۸	۴	TFKNGATFQVEVPGSQ HIDSQ	۴۶۶-۴۸۶	۴
LNAYVWYA	۱۵۵-۱۶۲	۴	KLCV	۵۱۰-۵۱۳	۴

بحث و نتیجه‌گیری

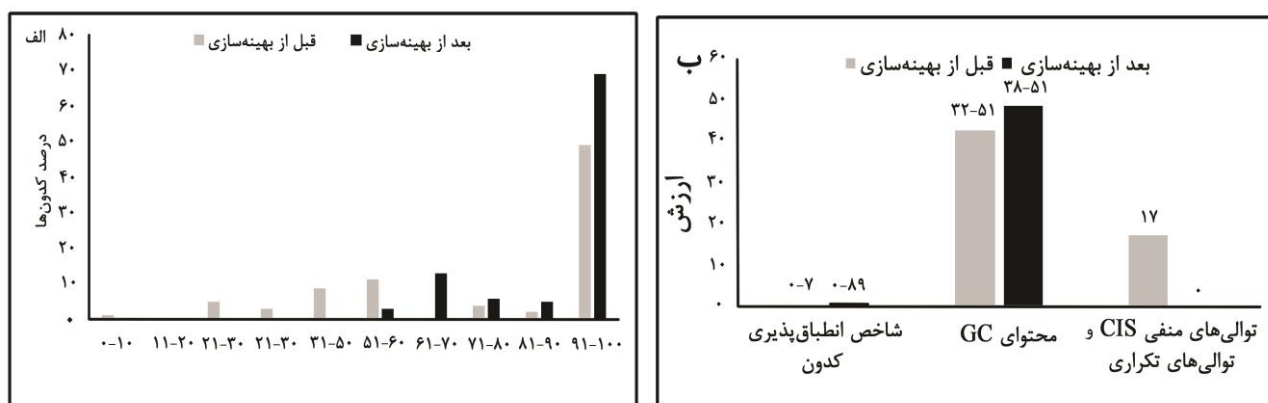
با توجه به آمارهای جهانی مشخص می‌شود اسهال دومین عامل اصلی مرگ‌ومیر کودکان در جهان است و در سال ۲۰۱۲ موجب مرگ ۱۶۰۰ کودک در هر روز یا بیش از ۵۸۰ هزار کودک در سال شده است. باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای از جمله ویبریوکلا/ عوامل رایج اسهال هستند و یک برنامه واکسیناسیون کنترل این باکتری، می‌تواند به کاهش مرگ‌ومیر بیماری کمک کند (۱،۵).

پروتئین TcpA به‌عنوان زیرواحد بزرگ پیلی و با توجه به محل قرارگیری آن در سطح باکتری، کاندیدای مناسبی برای توسعه ایمنی ضدکلونیزاسیون باکتری است. از سوی دیگر پروتئین ساختاری هموپنتامریک و غیرسمی دارد که روی کروموزوم بزرگ باکتری ویبریوکلا قرار گرفته است. پروتئین CTXB علاوه بر تولید آنتی‌بادی و ایجاد محافظت علیه توکسین کلرا، ادجوانت زیستی مهمی است که می‌تواند سبب برانگیختن پاسخ‌های ایمنی از جمله ایمنی مخاطی شود. تحقیقات انجام‌شده بر دخالت فاکتور OMPW در ایجاد بیماری ویا دلالت دارد.

بهینه‌سازی کدون برای ساخت ژن کایمر

توالی کدکننده ژن کایمر OTC با تغییر فاکتورهای مختلفی بهینه شد که بر تنظیم بیان ژن تأثیر می‌گذارد و آن را تنظیم می‌کند. تجزیه و تحلیل ژن دستکاری‌نشده و بهینه‌سازی‌شده در شکل ۴ نشان داده شده است.

افزایش شاخص CAI (شاخص انطباق‌پذیری کدونی) به ۱۰۰٪ نشان‌دهنده میزان انعطاف‌پذیری و افزایش کدون‌های استفاده‌شده برای بیان ژن در باکتری/شریشیالکی است. شاخص انطباق‌پذیری کدونی از ۰/۷ به ۰/۸۹ تغییر کرد. انتخاب و تغییر کدون مناسب به‌نحوی بود که محتوای سیتوزین و گوانین از ۳۲/۵۱ درصد به ۳۸/۵۱ درصد افزایش یافت. تعداد کدون‌هایی که کیفیت مناسبی برای افزایش بیان پروتئین دارند، از ۴۹ درصد به ۶۹ درصد تغییر کرد. تعداد عناصر بی‌ثبات‌کننده و توالی‌های تکراری که ممکن است بر میزان بیان تأثیر منفی داشته باشد، از ۱۷ به صفر رسید. برای پیش‌بینی ساختار mRNA از سرور centroidFold استفاده شد. میزان حداقل انرژی برای ساختار، قبل از بهینه‌سازی ۴۹۱/۳۰ - کیلو کالری و بعد از بهینه‌سازی به ۵۲۵/۸۰- رسید.



شکل ۴. بررسی توزیع فراوانی کدون‌ها بر اساس میزان تأثیر بر بیان پروتئین (الف) شاخص سازگاری کدون، درصد GC و توالی‌های منفی و تکراری مؤثر در بیان پروتئین (ب). در نمودار الف، محور عمودی نشان دهنده درصد کدون‌های پروتئین می باشد و محور افقی نشانگر دسته‌بندی و ارزش گذاری کدون‌ها بر اساس میزان تأثیر بر بیان پروتئین، و ارزش زیر ۳۰ به معنی تأثیر منفی بر بیان پروتئین است. در نمودار ب، بهبود شاخص‌های مؤثر بر بیان پروتئین ارائه شده است. همانطور که در نمودار ب دیده می شود شاخص انطباق پذیری کدون به ۸۹٪ ارتقاء یافته و توالی‌های منفی و تکراری مؤثر بر بیان پروتئین نیز حذف گردیده است.

ترادف به علت داشتن پل نمکی مربوط به اسید گلوتامیک و لیزین، می‌تواند با ایجاد ساختار هلیکس پایدار، مانع از به هم نزدیک شدن دومین‌های پروتئینی شود (۱۱). در مطالعات انجام‌شده، از ۱ تا ۵ تکرار این لینکر استفاده شده است. نتایج تحقیقات نشان داد ۴ و یا ۵ تکرار از توالی لینکر EAAAK می‌تواند سبب پروتئین‌های کایمریک فولدینگ مناسب داشته باشد (۱۱، ۳۶). Khaloiee و همکاران برای طراحی پروتئین کایمر علیه سه بیماری‌زای روده‌ای، از چهار تکرار این لینکر با هدف فاصله‌اندازی زیرواحدهای پروتئینی استفاده کردند (۳۷). در تحقیق Nazarian و همکاران، برای ایجاد فاصله بین زیرواحدهای پروتئین کایمر از تکرار چهارتایی لینکر استفاده شد (۱۱). در تحقیق Amani و همکاران، به‌کارگیری لینکر ۴ (EAAAK) در پروتئین کایمر سبب شد پروتئین‌های EspA، اینتیمین و Tir ساختار جداگانه داشته باشند (۳۶). در تحقیق حاضر، استفاده از ۳ تکرار لینکر نیز توانست سبب جدا ماندن اجزای پروتئینی کایمر از یکدیگر شود.

برای طراحی ساختار سوم کایمر OTC، از سه روش مرتبط استفاده شد. ارزیابی ساختارهای سه‌بعدی طراحی‌شده با سرور ModFOLD نشان داد روش RaptorX و PHYERE با تفاوت‌های زیادی نسبت به I-TASSER، قابلیت مناسبی برای پیش‌بینی مدل سه‌بعدی دارد و نتایج رامچاندردان و ارزیابی کیفیت PROSA نیز این تفاوت را نشان می‌دهد. این تفاوت احتمالا از اینجا ناشی

در تحقیقات واکسن‌های زیرواحدهای و نوترکیب، رویکرد جدید استفاده از آنتی‌ژن چندجزئی می‌تواند با ایمنی بیشتر، پاسخ ویژه و همچنین واکنش نامطلوب کمتری در طراحی کاندید واکسن استفاده شود. در تجزیه و تحلیل کایمر چندظرفیتی، تجزیه و تحلیل داده‌های بیوانفورماتیکی، ابزارهای ارزشمند و استراتژی‌های جدید، می‌توانند ویژگی‌های ساختاری و ایمنی‌زایی ترکیبی متفاوت را با اپی‌توپ‌ها فراهم کند و در فرایند طراحی به صرفه جویی در هزینه و زمان منجر می‌شود (۳۴، ۳۵). در این تحقیق، به دلیل خاصیت ایمنی‌زایی پروتئین TcpA و OMPW و خاصیت آنتی‌ژنی و ادجوانتی پروتئین، طراحی پروتئین کایمر در بردارنده هر سه زیرواحد، مدنظر قرار گرفت. بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد این پروتئین توانایی تحریک سیستم ایمنی را خواهد داشت.

برای رسیدن به بهترین مدل با بالاترین شاخص آنتی‌ژنی، سه آنتی‌ژن با هر ترتیب ممکن کنار یکدیگر قرار گرفتند. شاخص آنتی‌ژن این ساختارهای کایمر با دو روش بررسی شد و در نهایت ترتیب OTC بهترین نمره آنتی‌ژنی را نشان داد.

در طراحی پروتئین‌های کایمر از لینکرها استفاده می‌شود. استفاده از لینکر مناسب سبب می‌شود سیستم ایمنی بتواند علیه اپی‌توپ‌های خطی و به‌ویژه اپی‌توپ‌های ساختاری هر زیرواحد تشکیل‌دهنده پروتئین، پاسخ داده و آنتی‌بادی تولید کند. در این مطالعه از لینکر سخت شامل اسیدآمینه‌های EAAAK و بردارنده اسیدآمینه گلوتامیک، آلانین و لیزین استفاده شد. این

افزایش یافت که نشانگر انتخاب کدون‌هایی است که tRNA بیشتری برای آن وجود داشته و باعث افزایش بیان در میزبان *E. coli* شده است. طراحی ساختار mRNA نشان داد mRNA به اندازه کافی برای ترجمه کارآمد در میزبان پایدار است و موقعیت کدون شروع و RBS در ساختارهای ثانویه نامطلوب قرار ندارند.

می‌توان نتیجه گرفت روش‌های بیوانفورماتیک تأثیر بسزایی بر تجزیه و تحلیل طراحی ایمونوژن‌ها دارد. ارزیابی *in silico* طراحی شده نشان می‌دهد این سازه ژنی به‌طور مؤثر در *E. coli* بیان می‌شود و پاسخ‌های ایمنی را علیه فاکتورهای اتصالی و توکسین باکتری القا می‌کند.

سپاسگزاری

به این وسیله از مدیریت محترم مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) برای همکاری در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

می‌شود که برخلاف RaptorX و PHYERE، سرور I-TASSER سه دومین مجزا را تشخیص نداده است.

تعیین و نقشه‌برداری اپی‌توپ‌ها، مرحله‌ای ضروری در طراحی واکسن است که برای اجتناب از روش‌های وقت‌گیر و پرهزینه تجربی، شناسایی اپی‌توپ‌های احتمالی از توالی‌های آنتی‌ژنی با روش‌های محاسباتی انجام می‌شود.

پیش‌بینی اپی‌توپ‌ها براساس پارامترهای مختلف مانند آب‌دوستی، انعطاف‌پذیری، دسترسی و در معرض سطح بودن مبتنی بر روش‌های توالی و ساختار انجام شد. نتیجه نشان داد اپی‌توپ‌های B-cell توزیع شده، در طول هر سه بخش سازه کایمری پراکنده بود و احتمالاً می‌تواند پاسخ ایمنی محافظتی تولید کند. مطالعات انجام شده نشان داد سازه کایمری، آلرژی‌زا نیست و یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های کاندیدای ایمنی‌زا برای واکسن است.

از آنجا که توالی ژن‌های *ompW* و *ctxB, tcpA* کدون نادری دارد، تمام توالی‌های نوکلئوتیدی تولیدکننده پروتئین کایمر با نرم‌افزار آنلاین و با هدف بیان بالا در میزبان *E. coli* بهینه‌سازی شد. CAI کایمر قبل از بهینه‌سازی ۰/۷ و پس از بهینه‌سازی به ۰/۸۹

<https://doi.org/10.1007/s00018-008-7496-5>
PMID:18278577

References

1. Troeger C, Forouzanfar M, Rao PC, Khalil I, Brown A, Reiner JRC, et al. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(9): 909-48. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30276-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30276-1) PMID:28579426 PMID:PMC5589208
2. Nazarian S, Arefpour M, Bagheripour M, Olad G. Bioinformatical Study and Evaluation of Expression of Cholera Toxin Subunit B Optimized Gene as a Vaccine Candidate. *J Isfahan Med Sch.* 2014;32(279):378-87.
3. Silva AJ, Benitez JA. *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(2):e0004330. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330> PMID:26845681 PMID:PMC4741415
4. Odumosu O, Nicholas D, Yano H, Langridge W. AB toxins: a paradigm switch from deadly to desirable. *Toxins.* 2010; 2(7): 1612-45. <https://doi.org/10.3390/toxins2071612> PMID:22069653 PMID:PMC3153263
5. Sanchez J, Holmgren J. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(9):1347-60.
6. Kundu J, Mazumder R, Srivastava R, Srivastava BS. Intranasal immunization with recombinant toxin-coregulated pilus and cholera toxin B subunit protects rabbits against *Vibrio cholerae* O1 challenge. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;56(2):179-84. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00563.x> PMID:19453752
7. Price GA, Holmes RK. Evaluation of TcpF-A2-CTB chimera and evidence of additive protective efficacy of immunizing with TcpF and CTB in the suckling mouse model of cholera. *PLoS One.* 2012;7(8):e42434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042434> PMID:22879984 PMID:PMC3413659
8. Price GA, Holmes RK. Immunizing adult female mice with a TcpA-A2-CTB chimera provides a high level of protection for their pups in the infant mouse model of cholera. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(12):e3356. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003356> PMID:25474636 PMID:PMC4256283
9. Holmgren J, Adamsson J, Anjuère F, Clemens J, Czerkinsky C, Eriksson K, et al. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunol Lett.* 2005;97(2):181-8.

- <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.11.009>
PMID:15752556
10. Stratmann T. Cholera toxin subunit B as adjuvant—An accelerator in protective immunity and a break in autoimmunity. *Vaccines*. 2015;3(3):579-96. <https://doi.org/10.3390/vaccines3030579> PMID:26350596 PMCID:PMC4586468
11. Nazarian S, Mousavi Gargari SL, Rasooli I, Amani J, Bagheri S, Alerasool M. An in silico chimeric multi subunit vaccine targeting virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) with its bacterial inbuilt adjuvant. *J Microbiol Methods*. 2012;90(1):36-45. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.04.001> PMID:22525194
12. Qiu S, Ren X, Ben Y, Ren Y, Wang J, Zhang X, et al. Fusion-expressed CTB improves both systemic and mucosal T-cell responses elicited by an intranasal DNA priming/intramuscular recombinant vaccinia boosting regimen. *J Immunol Res*. 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/308732>
13. Nandi B, Nandy RK, Sarkar A, Ghose AC. Structural features, properties and regulation of the outer-membrane protein W (OmpW) of *Vibrio cholerae*. *Microbiology*. 2005;151(9):2975-86. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27995-0> PMID:16151208
14. Alizadeh J, Ranjbar R, Kamali M, Farhadi N, Davari A, Sadeghifard N. Cloning of *Vibrio cholerae* outer membrane protein W in *Pichia pastoris*. *Iran J Microbiol*. 2013;5(3):252. PMID:24475332
15. Kiaie S, Abtahi H, Mosayebi G, Alikhani M, Pakzad I. Recombinant toxin-coregulated pilus A (TcpA) as a candidate subunit cholera vaccine. *Iran J Microbiol*. 2014;6(2):68-73. PMID:25705354
16. Molaee N, Mosayebi G, Amozande-Nobaveh A, Soleyman MR, Abtahi H. Evolution of the Immune Response against Recombinant Proteins (TcpA, TcpB, and FlaA) as a Candidate Subunit Cholera Vaccine. *J Immunol Res*. 2017;2017.
17. María RAR, Arturo CVJ, Alicia JA, Paulina MLG, Gerardo AO. The Impact of Bioinformatics on Vaccine Design and Development. *Vaccines: InTech*; 2017.
18. Oyarzun P, Ellis JJ, Gonzalez-Galarza FF, Jones AR, Middleton D, Boden M, et al. A bioinformatics tool for epitope-based vaccine design that accounts for human ethnic diversity: application to emerging infectious diseases. *Vaccine*. 2015;33(10):1267-73. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.040> PMID:25629524
19. Soria-Guerra RE, Nieto-Gomez R, Govea-Alonso DO, Rosales-Mendoza S. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development. *J Biomed Inform*. 2015;53:405-14. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2014.11.003> PMID:25464113
20. Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*. 2007;8(1):4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4> PMID:17207271 PMCID:PMC1780059
21. Magnan CN, Zeller M, Kayala MA, Vigil A, Randall A, Felgner PL, et al. High-throughput prediction of protein antigenicity using protein microarray data. *Bioinformatics*. 2010;26(23):2936-43. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq551> PMID:20934990 PMCID:PMC2982151
22. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud Se, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. New York: Springer; 2005. PMCID:PMC1347523
23. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*. 2015;10(6):845-58. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053> PMID:25950237
24. Xu J, Li M, Kim D, Xu Y. RAPTOR: optimal protein threading by linear programming. *J Bioinform Comput Biol*. 2003; 1(01): 95-117. <https://doi.org/10.1142/S0219720003000186> PMID:15290783
25. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat methods*. 2015;12(1):7-8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213> PMID:25549265 PMCID:PMC4428668
26. McGuffin LJ, Buenavista MT, Roche DB. The ModFOLD4 server for the quality assessment of 3D protein models. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(W1):W368-72. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt294> PMID:23620298
27. Maiti R, Van Domselaar GH, Zhang H, Wishart DS. SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(S2):W590-4. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh477> PMID:15215457 PMCID: PMC441615
28. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3406-15. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595> PMID:12824337
29. Bhattacharya A, Tejero R, Montelione GT. Evaluating protein structures determined by structural genomics consortia. *Proteins*. 2007; 66(4): 778-95. <https://doi.org/10.1002/prot.21165> PMID:17186527
30. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res*.

- 2007;35(S2):W407-10.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm290> PMID:17517781
31. Saha S, Raghava G. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(S2): W202-9.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl343> PMID:16844994
32. Ansari HR, Raghava GP. Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immunome Res.* 2010;6(1):6.
<https://doi.org/10.1186/1745-7580-6-6> PMID:20961417
PMCID:PMC2974664
33. Saha S, Raghava G. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins.* 2006; 65(1): 40-8.
<https://doi.org/10.1002/prot.21078> PMID:16894596
34. Nuccitelli A, Cozzi R, Gourlay LJ, Donnarumma D, Necchi F, Norais N, et al. Structure-based approach to rationally design a chimeric protein for an effective vaccine against Group B Streptococcus infections. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(25):10278-83.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1106590108>
PMID:21593422 PMCID:PMC3121859
35. Rostami A, Goshadrou F, Langroudi RP, Bathaie SZ, Riazi A, Amani J, et al. Design and expression of a chimeric vaccine candidate for avian necrotic enteritis. *Protein Eng Des Sel.* 2016;30(1):39-45.
<https://doi.org/10.1093/protein/gzw060>
PMID:27887025
36. Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae and tir genes of *Escherichia coli* O157: H7. *Vaccine.* 2010;28(42):6923-9.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.061>
PMID:20709010
37. Khaloiee F, Pourfarzam P, Rasooli I, Amani J, Nazarian S, Mousavi SL. In silico analysis of chimeric recombinant immunogen against three diarrhea causing bacteria. *J Cell Mol Res.* 2013;5(2):65-74.