Brucella-ийн эсрэг IgV_CTLA-4 хэрчим агуулсан олон эпитопт вакцин гарган авах иммуно-информатик загвар

З.Амарбаясгалан[1], Э.Урангоо[1], Т.Мөнгөнзаяа[1], М.Бүрнээ[1], Н.Гиймаа[1], М.Наранхажид[1], А.Гүрбадам[1], Д.Тэмүүлэн[1], С.Чимидцэрэн[2]

[1]АШУҮИС, Био-анагаахын сургууль, Биологийн тэнхим
[2]АШУҮИС, Био-анагаахын сургууль, Дархлаа судлалын тэнхим
Цахим шуудан: Amarbayasgalan@mnums.edu.mn, Утас: 99556520

Түлхүүр үг:

Аминхүчлийн дараалал
Уургийн фосфоржилт
Трансмембраны домэйн

Товч утга:

Үндэслэл: *In vivo* болон *in vitro* туршилтаар иммуно-информатик загвараар бүтээсэн вакцин нь антиген ба дархлаа тогтоох шинж чанартай болохыг баталсан. *Brucella* -ийн эсрэг вакцин гарган авахад Omp2b, Omp31 уургийн аминхүчлийн дарааллыг ашиглан молекул залгах технологитой хослуулан таамаглах нь үр дүнг улам оновчтой болгож, үр дүнгийн нарийвчлалыг сайжруулдаг. Иймээс Omp2b болон Omp31 уургуудыг хослуулан хэрэглэх нь *Brucella* -ийн эсрэг вакцин гарган авахад илүү үр дүнтэй юм. **Зорилго:** *Brucella*-ийн эсрэг CTLA-4 -ийн хувьсамтгай хэрчим агуулсан өндөр авцаал чанар бүхий вакцины боломжит загварыг гарган авах. **Арга, аргачлал:** Omp2b ба Omp31 уургийн аминхүчлийн дарааллыг тогтооход GenBank-аас хайлт хийж, физик химийн үзүүлэлтүүдийг Expasy программ, трансмембран домэйн ба уургийн дохионы пептидийн мэдээллийг TMHMM онлайн серверт боловсруулалт хийж, Т болон В эсийн эпитопийг тодорхойлоход IEDB онлайн сервер ашигласан. Хоёрдогч бүтцийг таамаглахад PRABI онлайн программыг ашиглаж, уураг болон вакцины гурван хэмжээст бүтцийг таамаглахад I-TASSER онлайн программуудыг тус тус ашиглав. **Үр дүн:** Omp2b уураг нь 362 аминхүчлийн үлдэгдлээс тогтох бөгөөд молекул жин нь 38,676.57, молекул бүтэц нь $C_{1734}H_{2578}N_{456}O_{544}S_{5,}$ изоэлектрик цэг нь 4.58, тогтвортой байдлын индекс нь 23.54 гэж тодорхойлогдов. Omp31 уураг нь 240 аминхүчлийн үлдэгдлээс тогтох бөгөөд молекул жин нь 25,323.20, молекул бүтэц нь $C_{1135}H_{1725}N_{297}O_{354}S_4$, изоэлектрик цэг нь 5.22, тогтвортой байдлын индекс нь 8.61 байна. Omp2b-Omp31 уургийн Т-эсийн эпитопийг тодорхойлоход IEDB-MHCII онлайн сервер ашиглан шалгаж, хувийн зэрэглэл хамгийн бага буюу өндөр авцаал чанар бүхий дарааллуудыг тодорхойлов. **Дүгнэлт:** 1. Omp2b, Omp31 болон IgV_CTLA4 уургийн аминхүчлийн дараалал, нийт атомын тоо, молекул бүтэц, молекул жин нь theoretical pI, Instability index (II), Aliphatic index, Grand average hydropathicity (GRAVY), домэйний байршил зэрэг хоёрдогч бүтцийн мэдээллийн үзүүлэлтийг тус тус тодорхойлов. 2. *Brucella* -ийн эсрэг вакцины Т болон В эсийн эпитопийг тодорхойлон вакцины 3-н хэмжээст бүтцийн загварыг таамаглав.

Үндэслэл: Бруцеллёз нь грамм сөрөг бактериар халдварладаг дэлхийн хүн амын эрүүл мэндэд ноцтой аюул учруулж буй зоонозын халдварт өвчин юм. Жил бүр дэлхий дахинд бруцеллёзын 500,000 гаруй шинэ тохиолдол илэрдэг.[1] Монгол улсад жил бүр 400-500 гаруй шинэ тохиолдол бүртгэгдэж байгаа буюу 10000 хүн ам тутамд 1-2 хүн шинээр халдвар авч байгаа тохиолдол бүртгэгдэж байна.[2] Бруцеллёзын эсрэг хүнийг дархлаажуулахад гол төлөв 19-BA болон 104M вакцинуудыг хэрэглэдэг. Харин гэрийн тэжээвэр амьтдыг бруцеллёзын SL9, Rev.1, RB5I, S2 болон M5 вакцинд хамруулдаг.[3] Бруцеллёзын вакцинууд нь

бруцеллёзын голомтыг зогсоох гол үүрэг гүйцэтгэдэг ч богино хугацаанд хамгаалах болон дархлаа тогтоц үүсэж буй нь серологийн шинжилгээгээр илрэхгүй байгаа нь дутагдалтай талтай.[4]

Өмнөх судалгаануудын үр дүнд гарган авсан нэг уургийн вакцинууд нь дархлааны хариу урвалыг сул өдөөдөг тул олон эпитопт уургийг ашиглах нь дархлааны хариу урвалыг илүү нэмэгдүүлдэг.[5] Иймд вакцин гарган авахад Био-информатик, молекул залгах аргийг ашигласнаар үр дүнг урьдчилан таамаглаж, үр дүнгийн нарийвчлалыг илүү тодорхой болгож, биомолекулын бүтцийн загварчлан, харилцан үйлчлэлийг тогтооход тусалдаг. Түүнчлэн *In vitro* орчинд вакцин гарган авахад онолын суурь болох бөгөөд вакцины судалгаанд цаг хугацаа болон эдийн засгийг хэмнэж үр дүнг богино хугацаанд тодорхой гарган авах олон давуу талуудтай.

Иммуно-информатик загвараар бүтээсэн вакцин нь антиген шинжтэй ба дархлаа тогтоох чадвартай болохыг *in vivo* болон *in vitro* туршилтуудаар баталсан. *Brucella*-ийн эсрэг вакцин гарган авахад Omp2b, Omp31 гадаргуугийн уургийн аминхүчлийн дарааллыг ашиглан молекул залгах технологитой хослуулан таамаглах нь үр дүнг улам оновчтой болгож нарийвчлалыг сайжруулдаг. Omp2b, Omp31 болон IgV_CTLA-4 уургуудыг хослуулан хэрэглэх нь *Brucella*-ийн эсрэг вакцин гарган авахад илүү үр дүнтэй юм.[6-7]

Зорилго: *Brucella*-ийн эсрэг CTLA-4 -ийн хувьсамтгай хэрчим агуулсан олон эпитопт вакцины боломжит загварыг гарган авах.

Зорилт:

1. Omp2b, Omp31 болон IgV_CTLA-4 уургийн физик-химийн үзүүлэлт, домэйний байршил, хоёрдогч бүтцийн мэдээллийг тооцоолох.
2. Omp2b, Omp31 болон IgV_CTLA-4 уургийн Т болон В-эсийн эпитопийг таамаглан, вакцины 3-н хэмжээст бүтцийн загварыг гарган авах.

Арга, аргачлал: Энэхүү судалгааг био-информатикт суурилсан *In silico* орчинд туршилт судалгааны загвараар хийж гүйцэтгэв. Omp2b, Omp31 болон IgV_CTLA-4 уургийн аминхүчлийн дарааллыг тогтооход GenBank-аас хайлт хийж, физик химийн үзүүлэлтүүдийг Expasy программ, трансмембран домэйн ба уургийн дохионы пептидийн мэдээллийг TMHMM онлайн серверт боловсруулалт хийж, Omp2b болон Omp31 уургийн хоёрдогч бүтцийг тодорхойлоход PRABI онлайн сервер ашигласан. Уургийн Т болон В эсийн эпитопийг IEDB, I-TASSER онлайн программыг ашиглаж вакцины 3-н хэмжээст бүтцийг боловсруулав.

Үр дүн:

Уургийн аминхүчлийн дараалал: GenBank-аас хайлт хийхэд Omp2b уургийн оролт (accession) AMM72579, хувилбар AMM72579.1, уургийн аминхүчлийн дараалал

1 MNIKSLLLGS AAALVAASGA QAADAIVAPE PEAVEYVRVC DAYGAGYFYI
51 PGTETCLRVH GYVRYDVKGG DDVYSGTDRN GWDKGARFAL RVSTGSETEL
101 GTLKTFTELR FNYAANNSGV DGKYGNETSS GTVMEFAYIQ LGGLRVGIDE
151 SEFHTFTGYL GDVINDDVIS AGSYRTGKIA YTFTGGNGFS AVIALEQGGD
201 NDGGYTGTTN YHIDGYMPDV VGGLKYAGGW GSIAGVVAYD SVIEEWAAKV
251 RGDVNITDQF SVWLQGAYSS AATPDQNYGQ WGGDWAVWGG LKYQATQKAA
301 FNLQAAHDDW GKTAVTANVA YELVPGFTVT PEVSYTKFGG EWKNTVAEDN
351 AWGGIVRFQR SF байв.

Omp31 уургийн оролт (accession) AAS84567, хувилбар AAS84567.1, уургийн аминхүчлийн дараалал

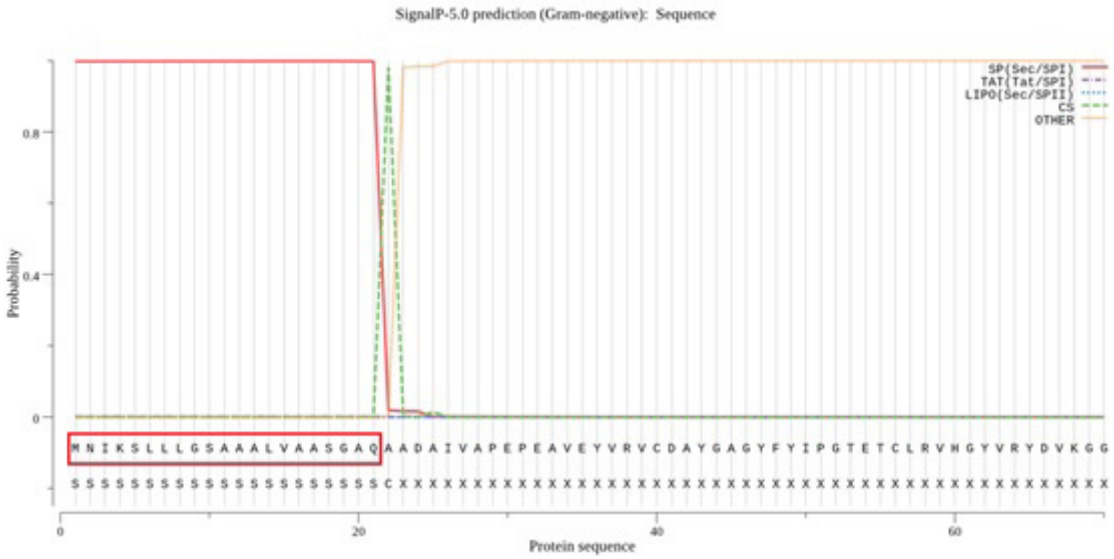
1 MKSVILASIA AMFATSAMAA DVVVSEPSAP TAAPVDTFSW TGGYIGINAG
51 YAGGKFKHPF SSFDKEDNEQ VSGSLDVTAG GFVGGVQAGY NWQLDNGVVL
101 GAETDFQGSS VTGSISAGAS GLEGKAETKV EWFGTVRARL GYTATERLMV
151 YGTGGLAYGK VKSAFNLGDD ASALHTWSDK TKAGWTLGAG AEYAINNNWT
201 LKSEYLYTDL GKRNLVDVDN SFLESKVNFH TVRVGLNYKF байв.

Уургийн физик химийн үзүүлэлтийн таамаглал: Omp2b уураг нь 362 аминхүчлийн үлдэгдлээс тогтох бөгөөд молекул жин нь 38,676.57, молекул бүтэц нь $C_{1734}H_{2578}N_{456}O_{544}S_5$ байв. Онолын изоэлектрик цэг (theoretical pI) 4.58, тогтвортой байдлын индекс (instability index) 23.54, (II<40 үед уураг тогтвортой гэж үзнэ) байна. Их дундаж гидропатик утга (GRAVY) -0.200, (GRAVY үзүүлэлт нь -2; +2, сөрөг утга нь гидрофил уургийг илэрхийлнэ) гэж тодорхойлогдов.

Omp31уураг нь 240 аминхүчлийн үлдэгдлээс тогтох бөгөөд молекул жин нь 25,323.20, молекул бүтэц нь $C_{1135}H_{1725}N_{297}O_{354}S_4$ байв. Онолын изоэлектрик цэг (theoretical pI) 5.22, тогтвортой байдлын индекс (instability index) 8.61, (II<40 үед уураг тогтвортой гэж үзнэ) байна. Их дундаж гидропатик утга (GRAVY) -0.091, (GRAVY үзүүлэлт нь -2; +2, сөрөг утга нь гидрофил уургийг илэрхийлнэ) гэж тодорхойлогдов.

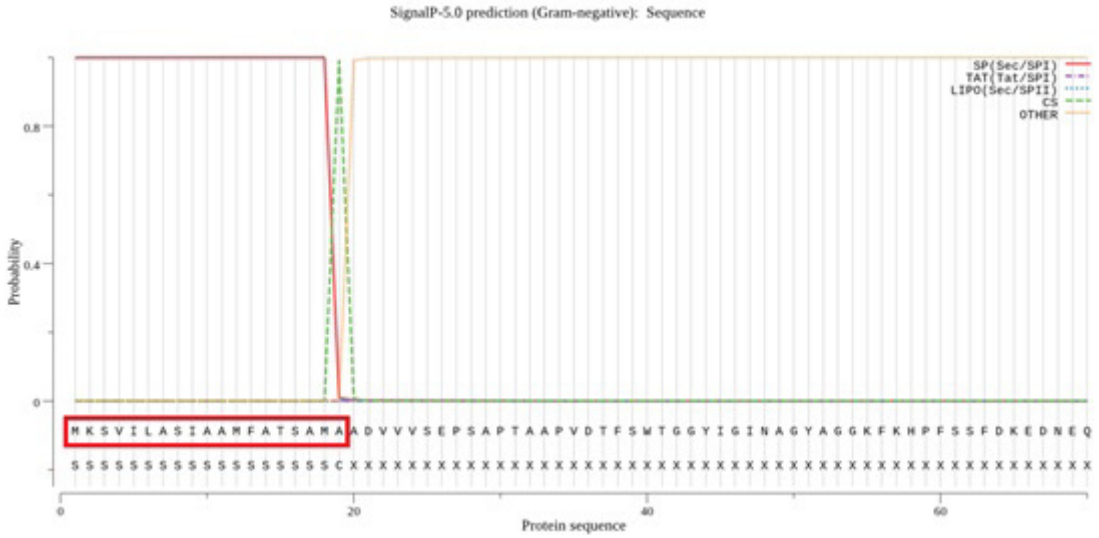
Дохионы пептидийг таамаглал: Уургийн дохионы пептидийн дарааллыг тогтоохдоо сигналП-5.0 онлайн серверийг ашигласан бөгөөд Omp2b уургийн дохионы пептидийн дараалал нь MNIKSLLLGS AAALVAASGA QA, Omp31 уургийн дохионы пептидийн дараалал нь MKSVILASIA AMFATSAMA байв.

Omp2b уургийн дохионы пептидийг сигналП-5.0 ашиглан тогтооход аминхүчлийн дараалал дахь 1-21 хоорондох хэсэг нь дохионы пептидийн дараалал болох нь тодорхойлогдов. (Зураг 1)



Зураг 1. Omp2b уургийн дохионы пептид

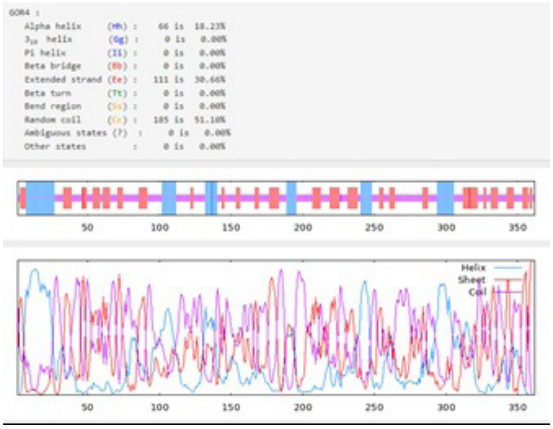
Omp31 уургийн дохионы пептидийг сигналП-5.0 ашиглан тогтооход аминхүчлийн дараалал дахь 1-19 хоорондох хэсэг нь дохионы пептидийн дараалал болох нь тодорхойлогдов. (Зураг 2)



Зураг 2. Omp31 уургийн дохионы пептид

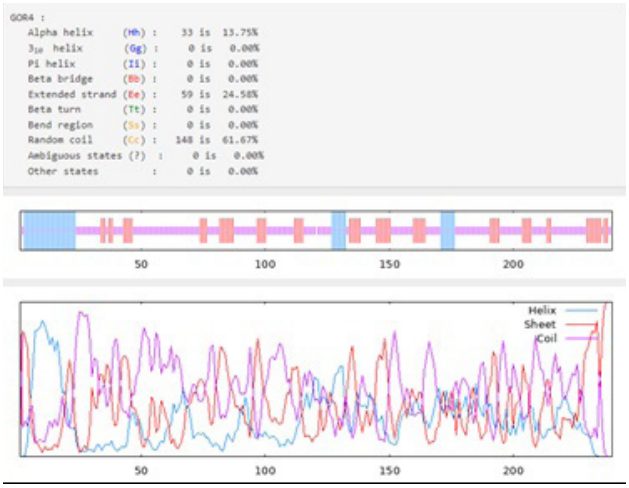
Трансмембраны домэйнийг таамаглал: Omp2b болон Omp31 уургийг TMHMM онлайн серверт шалгахад трансмембраны домэйн агуулаагүй байв.

Уургийн хоёрдогч бүтцийг таамаглал: PRABI онлайн программаар Omp2b уургийн хоёрдогч бүтцийг тодорхойлоход нийт аминхүчлийн дараалал дахь альфа мушгиа (Hh alpha helix) 18.23%, сунгасан хэлхээ (Ee extended strand) 30.66%, бета эргэлт (Tt beta turn) 0.00%, ороомог (Cc random coil) 51.1% байгааг тус тус тодорхойлов. (Зураг 3)



Зураг 3. Omp2b уургийн хоёрдогч бүтэц

PRABI онлайн программаар Omp31 уургийн хоёрдогч бүтцийг тодорхойлоход нийт аминхүчлийн дараалал дахь альфа мушгиа (Hh alpha helix) 13.75%, сунгасан хэлхээ (Ee extended strand) 24.58%, бета эргэлт (Tt beta turn) 0.00%, ороомог (Cc random coil) 61.67% байгааг тодорхойлов. (Зураг 4.)



Зураг 4. Omp31 уургийн хоёрдогч бүтэц

Т эсийн эпитопийг таамагласан үр дүн: Т эсийн эпитопийг урьдчилан таамаглахад IC_{50}nM нэгжээр бодсон учраас хамгийн бага утгатай нь хамгийн өндөр авцаал чанартайг илтгэнэ. IC_{50} утгаас <50нМ утгатай пептидүүд нь хамгийн өндөр авцаал чанартай, <500нМ утгатай пептидүүд нь дунд зэргийн авцаал чанартай, <5000нМ утгатай пептидүүд нь хамгийн бага авцаал чанартай гэж үздэг.

Omp2b уургийн Т эсийн эпитопийг HLA-DRB1-07 локуст шалгав. Omp2b уургийн Т эсийн эпитопийг таамаглаж хувийн зэрэглэл хамгийн бага 10-н дарааллыг сонгов. (Хүснэгт 1) Omp31 уургийн Т эсийн эпитопийг HLA-DRB1-07 локуст шалгаж, хувийн зэрэглэл хамгийн 9-н дарааллыг сонгов.

Хүснэгт 1. Omp2b уургийн Т эсийн эпитопийг таамагласан үр дүн

Аллель	Байрлал	Дараалал	Хувийн зэрэглэл
HLA-DRB1*07:01	199	GDNDGGYTGTTNYHI	0.42
HLA-DRB1*07:01	200	DNDGGYTGTTNYHID	0.06
HLA-DRB1*07:01	202	DGGYTGTTNYHIDGY	0.03
HLA-DRB1*07:01	203	GGYTGTTNYHIDGYM	0.13
HLA-DRB1*07:01	201	NDGGYTGTTNYHIDG	0.04
HLA-DRB1*07:01	316	TANVAYELVPGFTVT	0.79
HLA-DRB1*07:01	315	VTANVAYELVPGFTV	2.90
HLA-DRB1*07:01	317	ANVAYELVPGFTVTP	0.19
HLA-DRB1*07:01	318	NVAYELVPGFTVTPE	0.12
HLA-DRB1*07:01	319	VAYELVPGFTVTPEV	0.96

В эсийн эпитопийг таамагласан үр дүн: В эсийн эпитопийг IEDB онлайн програм ашиглан тодорхойлов. Omp2b болон Omp31 уургийн В эсийн эпитопийг таамаглаж тав болон түүнээс дээш урттай эпитопуудыг сонгов. Omp31 уургийн В эсийн эпитопийг (Хүснэгт 2)-т харуулав.

Хүснэгт 2. Omp31 уургийн В эсийн эпитопийг таамагласан үр дүн

Эхлэл	Төгсгөл	Дараалал	Урт
4	20	VVSEPSAPTAAPVDTFS	17
32	61	YAGGKFKHPFSSFDKEDNEQVSGSLDVTAG	30
71	77	YNWQLDN	7
87	109	FQGSSVTGSISAGASGLEGKAET	23
141	163	KVKSAFNLGDDASALHTWSDKTK	23
185	211	EYLYTDLGKRNLVDVDNSFLESKVNFH	27

Omp2b-Omp31 уургуудыг холбогч уургаар холбон, Т эсийн эпитопийг таамаглахад, Omp2b уургийн Т эсийн эпитоптой адилхан байв. (Хүснэгт 3)

Хүснэгт 3. Omp2b-Omp31 уургийн холбон Т-эсийн эпитопуудыг таамагласан үр дүн

Omp2b			Omp2b-Omp31		
Байрлал	Дараалал	Хувийн зэрэглэл	Байрлал	Дараалал	Хувийн зэрэглэл
199	GDNDGGYTGTTNYHI	0.42	199	GDNDGGYTGTTNYHI	0.42
200	DNDGGYTGTTNYHID	0.06	200	DNDGGYTGTTNYHID	0.06
316	TANVAYELVPGFTVT	0.79	316	TANVAYELVPGFTVT	0.79

Omp2b-Omp31 уургуудыг холбогч уургаар холбон, Т эсийн эпитопийг таамаглахад, Omp2b болон Omp31 уургуудын Т эсийн эпитоптой адилхан байв. (Хүснэгт 4)

Хүснэгт 4. Omp31 болон Omp2b-Omp31 уургуудын хооронд Т эсийн эпитопийг харьцуулсан байдал

Omp31			Omp2b-Omp31		
Байрлал	Дараалал	Хувийн зэрэглэл	Байрлал	Дараалал	Хувийн зэрэглэл
136	VRARLGYTATERLMV	0.41	513	VRARLGYTATERLMV	0.41
138	ARLGYTATERLMVYG	3.50	515	ARLGYTATERLMVYG	3.50
128	TKVEWFGTVRARLGY	14	505	TKVEWFGTVRARLGY	14

Omp2b-Omp31 уургуудыг хооронд нь холбогч уургаар холбон В эсийн эпитопийг таамаглахад Omp2b уургийн В эсийн эпитоптой таарч байгаа боловч Omp31 уургийн В эсийн эпитоптой бага зэрэг зөрж байна. (Хүснэгт 5)

Хүснэгт 5. Omp31 болон Omp2b-Omp31 уургуудын хооронд В эсийн эпитопийг харьцуулсан байдал

Omp31			Omp2b-Omp31		
Байрлал	Дараалал	Урт	Байрлал	Дараалал	Урт
4	VVSEPSAPTAAPVDTFS	17	356	ADVVVSEPSAPTAAPVDTFS	20
32	YAGGKFKHPFSSFDKEDN EQVSGSLDVTAG	30	388	AGGKFKHPFSSFDKEDNEQ VSGSLDVTAG	29
141	KVKSAFNLGDDASALH TWSDKTK	23	489	KSAFNLGDDASALHTWSDKTK	21

Хэлцэмж: Бруцеллёз нь *brucella*-ийн төрөл зүйлийн халдвараар үүсдэг зоонозын халдварт өвчин юм. *Brucella*-гийн халдвар нь мал амьтанд болон хүнд ноцтой аюул учруулсан хэвээр байна.[1] Бруцеллёзоос урьдчилан сэргийлэх хамгийн эхний сонголт нь вакцин учраас бруцеллёзын эсрэг үр дүнтэй вакциныг боловсруулах нь чухал ач холбогдолтой байна. Өмнөх судалгаануудын үр дүнгээс үзэхэд Omp2b болон Omp31 уургууд нь бруцеллёзын эсрэг вакцин гарган авахад антиген шинж чанартай болохыг тодорхойлсон.[5] Тиймээс энэхүү судалгаанд бид *B. Melitensis* -ийн гадаргуугийн Omp2b, Omp31 болон IgV_CTLA4 уургуудыг сонгож В болон Т эсийн эпитопийг таамаглан олон эпитопт вакцины боломжит загварыг боловсруулав.

Pejman (2023) нарын судалгааны үр дүнгээс үзэхэд *B. Melitensis* ийн гадаргуугийн Omp31, Omp25, Omp28 уургуудын сонгож В болон Т эсийн эпитопийг таамагласан байна.[13] Уг судалгаа нь эсийн эпитопийг таамаглахад RANKPEP болон MHCpred бүхий 2 онлайн програм ашиглан үр дүнг харьцуулж гаргасан байна. Тухайлбал Omp31 уургийн Т эсийн эпитопийг таамаглахад RANKPEP серверт 111, 110, 58, 61 MHCpred серверт 71, 44, 199, 186 байрлал дэх дарааллууд илүү өвөрмөц антиген шинж чанартай байсан бол бидний судалгаанд IEDB серверт HLA-DRB1*07:01 локуст шалгахад 136, 138, 128, 127, 129 зэрэг дарааллууд илүү өвөрмөц антиген шижтэй байв.

B. Melitensis-ийн эсрэг олон эпитопт вакцин гарган авахад (Pejman 2023) Omp31, Omp25, Omp28 уургууд нь үр дүнтэй болохыг харуулж байна.[13] Бид судалгаанд Omp2b, Omp31, Omp2b-Omp31, IgV_CTLA4-Omp2b-Omp31 уургуудыг тус бүрд нь дархлаа төрүүлэх шинжийг үнэлэхэд дээрх судалгааны үр дүнтэй дүйж байв.

W.H. Guo (2023) нарын судалгаанд нь хувьсамтгай CTLA-4-ийг Omp2b-Omp31 уурагтай холбох, өвөрмөц дархлааны хариу урвалыг илүү өдөөж байгааг баталсан.[5] Иймд бид Omp2b-Omp31 антигенийг хувьсамтгай CTLA-4-тэй холбож үр дүнг үнэлэв. IgV_CTLA4 уургийг Omp2b-Omp31 холбож үр дүнг үнэлэхэд, Omp2b-Omp31уургаас илүү нөлөөтэй байгааг харуулж байна.

Иммуно-информатик үр дүнгээс үзэхэд олон эпитопт антигенүүд нь дархлаа тогтоох болон вакцин гарган авах бүрэн боломжтойг харуулж байна. Энэ арга цаг хугацаа болон эдийн засаг хэмнэх зорилготой бөгөөд иммуно-информатик аргад суурилсан үр дүн нь өдөр антиген шинж чанартай, тохиромжтой бүтэцтэй, тогтвортой, уусамтгай, харшил төрүүлдэггүй зэрэг давуу талтай**.** Иймээс цаашид судалгааны үр дүнг баталгаажуулахад дархлаа тогтцын үнэлэн *In vivo* болон *In vitro* шинжилгээг хийх нь илүү чухал байна.

Дүгнэлт:

1. Omp2b (362 аминхүчил), Omp31 (240 аминхүчил) болон IgV_CTLA4 (223 аминхүчил) уургийн аминхүчлийн дараалал, нийт атомын тоо, молекул бүтэц (Omp2b-$C_{1734}H_{2578}N_{456}O_{544}S_5$, Omp31-$C_{1135}H_{1725}N_{297}O_{354}S_4$), молекул жин нь (Omp2b-38,676.57, Omp31-25,323.20), theoretical pI (Omp2b-4.58, Omp31-5.22), Instability index (II) (Omp2b-23.54, Omp31-8.61), Grand average hydropathicity (GRAVY) Omp2b-(-0.200), Omp31-(-0.091), домэйний байршил зэрэг хоёрдогч бүтцийн мэдээллийн үзүүлэлтийг тус тус тодорхойлов.
2. Omp2b-Omp31, IgV_CTLA4 уургийн Т болон В эсийн эпитопийг тодорхойлон вакцины 3-н хэмжээст бүтцийн загварыг таамаглав.

Ном зүй:

1. *Tabynov K, Ryskeldinova S, Sansyzbay A. An influenza viral vector Brucella abortus vaccine induces good cross-protection against Brucella melitensis infection in pregnant heifers. Vaccine 2015; 33: 3619–3623, doi: 10.1016/j.vaccine.2015. 06.045*
2. *Зоонозын өвчин судлалын үндэсний төв. 2017.*

3. Jing ZJ, Yan JR, Fan WX. Research progress on brucellosis vaccine [in Chinese]. Chin J Zoonozool 2016; 32: 188–199
4. Yao L, Wu CX, Zheng K, Xu XJ, Zhang H, Chen CF, et al. Immunogenic response to a recombinant pseudorabies virus carrying bp26 gene of Brucella melitensis in mice. Res Vet Sci 2015; 100: 61–67, doi: 10.1016/j.rvsc.2015.03. 030.
5. Guo WH, Zhu YJ, Haimiti G, et al. Bioinformatics-based design of a fusion vaccine with CTLA-4 variable region to combat Brucella. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas. 2023;56:e12938.
6. Vizcaíno N, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Dubray G. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the Brucella melitensis Omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. Infect Immun 1996; 64: 3744– 3751, doi: 10.1128/iai.64.9.3744-3751.1996.
7. Paquet JY, Diaz MA, Genevrois S, Grayon M, Verger JM, de Bolle X, et al. Molecular, antigenic, and functional analyses of Omp2b porin size variants of Brucella spp. J Bacteriol 2001; 183: 4839–4847, doi: 10.1128/JB.183.16.4839-4847. 2001
8. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. Veterinary microbiology. 2010;140(3-4):392-398.
9. Group DoHfNIBSotNIRZ. "Diagnosis Management of Acute Brucellosis in Primary Care". 2007.
10. Głowacka P, Żakowska D, Naylor K, Niemcewicz M, Bielawska-Drózd A. Brucella - Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment. Polish journal of microbiology. 2018;67(2):151-161.
11. Lalsiamthara J, Lee JH. Development and trial of vaccines against Brucella. Journal of veterinary science. 2017;18(S1):281-290.
12. Sakran W, Chazan B, Koren A. [Brucellosis: clinical presentation, diagnosis, complications and therapeutic options]. Harefuah. 2006;145(11):836-840, 860.
13. Hashemzadeh P, Nezhad SA, Khoshkhabar H. Immunoinformatics analysis of Brucella melitensis to approach a suitable vaccine against brucellosis. J Genet Eng Biotechnol. 2023 Nov 29;21(1):152. doi: 10.1186/s43141-023-00614-6. PMID: 38019359; PMCID: PMC10686926.

Utilizing immuno-informatics for *brucella* vaccine development with multi-epitope IgV_CTLA-4 domain fusion

Amarbayasgalan Z[1], Urangoo[1], Mungunzaya T[1], Burnee M[1], Giimaa N[1], Narankhajid M[1], Gurbadam A[1], Temuulen B[1], Chimidtseren S[2]

[1]Department of Biology, School of Biomedicine, MNUMS
[2]Department of Immunology, School of Biomedicine, MNUMS
E-mail: amarbayasgalan@mnums.edu.mn, Tel: +976-99556520

Background*: In vivo* and *in vitro* experiments confirmed the antigenic and immunogenic properties of the immuno-informatics-developed vaccine for *Brucella*. Predicting the *Brucella* vaccine using Omp2b and Omp31 protein nucleotide sequences, combined with molecular docking technology, enhances accuracy. The Omp2b and Omp31 protein combination proves more effective in *Brucella* vaccine development.
Aim: Development of a potential high-affinity vaccine design containing a variable fragment of CTLA-4 against *Brucella*.
Materials and Methods: The amino acid sequences of Omp2b, Omp31 and IgV_ CTLA4 were retrieved from GenBank. Physicochemical parameters were calculated using Expasy software, while transmembrane domain and protein signal peptide data were analyzed using the TMHMM online server. T and B cell epitopes were identified using the IEDB online server. Secondary structure prediction was performed using the PRABI online program. Furthermore, three-dimensional structures of proteins and vaccines were predicted using the I-TASSER online programs.
Results: The Omp2b protein consists of 362 amino acid residues with a molecular weight of 38,676.57. Its molecular structure is represented by $C_{1734}H_{2578}N_{456}O_{544}S_5$, and its theoretical pI value is 4.58. The instability index (II) of Omp2b is 23.54. The Omp31 protein consists of 240 amino acid residues with a molecular weight of 25,323.20. Its molecular structure is represented by $C_{1135}H_{1725}N_{297}O_{354}S_4$, and its theoretical pI value is 5.22. The instability index (II) of Omp31 is 8.61. The T-cell epitope potential sequences of Omp2b and Omp31 proteins were examined using the IEDB-MHCII online server, and the three potential T-cell sequences with the lowest adjusted rank and highest affinity were selected.
Conclusions:
1. Determined the amino acid sequences, molecular structures, atomic compositions, weights, theoretical isoelectric points, instability index, aliphatic index, grand averages of hydropathicity (GRAVY), and pinpointed their domain locations for the Omp2b, Omp31, and IgV_CTLA4 proteins.
2. Predicted T and B cell epitopes of Omp2b-Omp31 and IgV_CTLA4 proteins and developed a three-dimensional structural model of the vaccine.

Keywords: The amino acid sequence, Protein phosphorylation, Transmembrane domain