Echinococcus granulosus-ийн эсрэг EgTeg уургийн вакциныг immuno-informatic загвараар тодорхойлсон дүн

З.Амарбаясгалан[1], Б.Өлзийсайхан[2], Б.Агарзандан[1], Т.Мөнгөнзаяа[1], М.Бүрнээ[1], Н.Гиймаа[1], М.Наранхажид[1], Д.Тэмүүлэн[1], А.Гүрбадам[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:
Нуклеотидийн дараалал
Уургийн фосфоржилт
Трансмембраны домейн

Товч утга:
Үндэслэл: *Echinococcus granulosus*- ийн эсрэгтөрөгчийн эпитопуудыг урьдчилан таамаглах, B ба T эсийн эпитоп агуулсан олон эпитопт вакциныг зохион бүтээхэд иммуно-информатикийн хэрэгсэл, молекул загварчлалын аргыг ашигласан үр дүн цөөнгүй нийтлэгдсээр байна. Иймд *Echinococcus granulosus*–ийн антигений нуклеотидийн дарааллыг ашиглан олон эпитопт вакцины иммуно-информатик загвараар таамаглах, пептид вакцины загвар гарган авах нь цаг хугацаа болон эдийн засгийн хувьд ач холбогдолтой юм. **Зорилго:** *Echinococcus granulosus* -ийн эсрэг олон эпитопт вакцины боломжит загварыг гарган авах. **Арга, аргачлал:** EgTeg уургийн амин хүчлийн дарааллыг тогтооход GenBank-аас хайлт хийж, физик химийн үзүүлэлтүүдийг Expasy программ, трансмембран домэйн ба уургийн дохионы пептидийн мэдээллийг TMHMM онлайн серверт боловсруулалт хийн, EgTeg уургийн фосфоржилтыг Net-Phos3.1 онлайн сервер ашигласан. Sopma болон swiss-model онлайн программыг ашиглан уургийн орон зайн бүтцийг тодорхойлов. **Үр дүн:** EgTeg уураг нь 105 аминхүчлийн дарааллаас тогтох бөгөөд нийт атомын тоо нь 1705, молекул бүтэц нь $C_{547}H_{848}N_{142}O_{165}S_3$, молекул жин нь 12кДа байв. Sopma онлайн программаар EgTeg уургийн хоёрдогч бүтцийг тодорхойлоход нийт амин хүчлийн дараалал дахь alpha helix(Hh) 36.54%, Extended strand (Ee) 23.08%, Beta turn (Tt) 8.65%, Random coil (Cc) 31.73%-иар дээрх утгаар тодорхойлогдов. **Дүгнэлт:** EgTeg уургийн аминхүчлийн дараалал, нийт атомын тоо, молекул бүтэц, молекул жин нь theoretical pI, Instability index (II), Aliphatic index, Grand average hydropathicity (GRAVY), домейны байршил, хоёрдогч бүтцийн мэдээллийг үзүүлэлтийг тус тус тодорхойлов. *Echinococcus granulosus*-ийн эсрэг олон эпитопт вакцины боломжит загварыг EgTeg уургийн B эсийн эпитопийг тодорхойлон таамаглав.

Үндэслэл: Хүний эхинококкоз буюу бэтэг **(**hydatidosis, hydatid disease) нь *Echinococcus* төрлийн туузан хорхойн авгалдайгаар халдварласан тохиолдолд үүсдэг өвчин юм. ДЭМБ-ийн мэдээлснээр *E.granulosis, E.multilocularis*-ын шалтгаант өвчлөл жилд 1-3.5 сая тохиолдол бүртгэгдэж байна.

Echinococcus granulosus-ийн эсрэгтөрөгчийн эпитопуудыг урьдчилан таамаглах, илрүүлэх болон B ба T эсийн эпитоп агуулсан олон эпитопт вакциныг зохион бүтээхэд иммуно-информатикийн хэрэгсэл, молекул загварчлалын аргийг ашигласан судалгааны талаарх үр дүнгүүд нийтлэгдсээр байна. *In vivo* болон *in vitro* туршилтууд нь иммуно-информатик загвараар бүтээсэн вакцин нь антиген ба дархлаа тогтоох шинж чанартай болохыг баталсан. Тухайлбал: Liang нарын (2019) судалгааны үр дүнгээс үзэхэд иммуно-информатик аргийг ашиглан Eg95 уургийн олон эпитопт, пептид вакцин боловсруулах боломжит хэрэглээтэй өндөр антиген шинж чанартай байгааг харуулсан байна. Олон эпитопт вакцин нь хүний биеийг

Echinococcus granulosus-ийн халдвараас хамгаалах, онолын хувьд өвөрмөц эсрэгбие нийлэгжүүлэн, В лимфоцит болон Т-лимфоцитуудыг идэвхжүүлж, бие дэх шимэгчдийг устгах боломжтой. Антигений эпитопийг урьдчилан таамаглах уламжлалт аргууд дээр үндэслэсэн судалгаа нь молекул залгах технологитой хослуулан таамаглах нь үр дүнг улам оновчтой болгож, үр дүнгийн нарийвчлалыг сайжруулдаг. Иймд *Echinococcus granulosus* –ийн антигений нуклеотидийн дарааллыг ашиглан олон эпитопт вакцины иммуно-информатикийн загварыг таамаглах нь вакцин гарган авахад цаг хугацаа болон эдийн засгийн хувьд үр ашигтай юм.

Зорилго: *Echinococcus granulosus*-ийн эсрэг олон эпитопт вакцины боломжит загварыг гарган авах

Зорилт:

1. EgTeg уургийн аминхүчлийн дарааллаас дараах мэдээллүүд болох физик-хими үзүүлэлт, домейны байршил, хоёрдогч бүтцийн мэдээллийг тооцоолох
2. EgTeg уургийн В-эсийн эпитопийг таамаглаж өндөр антиген шинж бүхий уургийг загварыг таамаглах

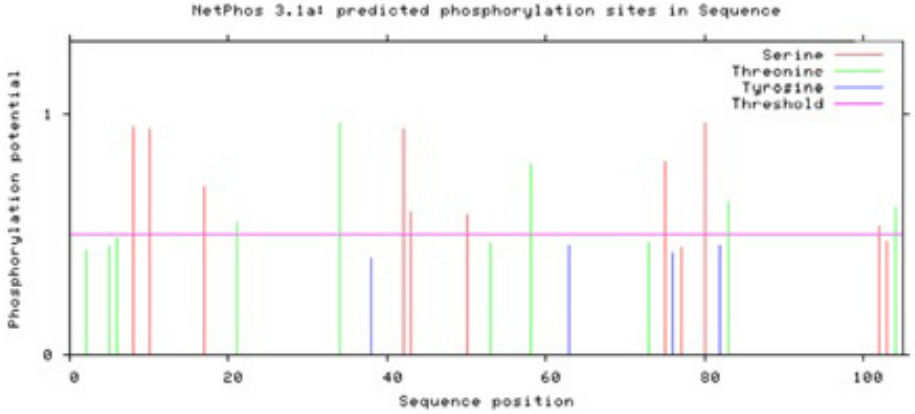
Арга, аргачлал: Энэхүү судалгааг био-информатикт суурилсан *In silico* орчинд туршилт судалгааны загвараар хийж гүйцэтгэв. EgTeg уургийн амин хүчлийн дарааллыг тогтооход GenBank-аас хайлт хийж, физик химийн үзүүлэлтүүдийг Expasy программ, трансмембран домэйн ба уургийн дохионы пептидийн мэдээллийг TMHMM онлайн серверт боловсруулалт хийх, EgTeg уургийн фосфоржилтыг NetPhos3.1 онлайн сервер ашигласан. Sopma болон swiss-model онлайн программаар уургийн орон зайн бүтцийг тодорхойлж, В эсийн эпитопыг IEDB, I-TASSER онлайн программыг ашиглаж вакцины 3-н хэмжээст бүтцийг боловсруулав.

Үр дүн: Уургийн аминхүчлийн дараалал**:** GenBank аас хайлт хийхэд EgTeg уургийн accession AY874524, version AY874524.1 байсан бол уургийн аминхүчлийн дараллал ATDPTTMSRSEVEVLKSDMPTEM-KNFIIDQVDDTLREYNADSSRPIKLES LVTQL-GRTLKQRYEGVWQVVILTGSYSAFSAYTPRLFHFK-FGRFVVLVWQSSTY байв.

Уургийн физик химийн үзүүлэлтийн таамаглал: EgTeg уураг нь 105 аминхүчлийн үлдэгдлээс тогтох бөгөөд нийт атомын тоо нь 1705, молекул бүтэц нь $C_{547}H_{848}N_{142}O_{165}S_3$, молекул жин нь 12кДа байв. Theoretical pI 5.80, нийт 13 сөрөг цэнэгтэй аминхүчлийн үлдэгдэл (Asp + Glu), эерэг цэнэгтэй аминхүчлийн үлдэгдэл 12 (Arg + Lys) агуулж байв. Instability index (II) 33.96 (II<40 үед уураг тогтвортой гэж үзнэ). Aliphatic index 79.71, Grand average hydropathicity (GRAVY) -0.309 (GRAVY үзүүлэлт нь -2; +2, сөрөг утга нь гидрофил уургийг илэрхийлнэ) тодорхойлогдов.

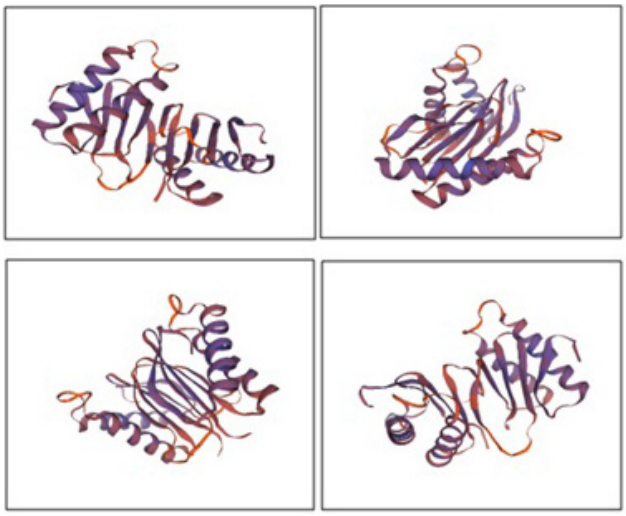
Уургийн дохионы пептид болон трансмембраны домейныг таамаглах: EgTeg уургийг TMHMM онлайн серверт шалгахад аминхүчлийн дараалал дахь 65–87 хоорондох хэсэг нь трансмембраны домейн болох нь тодорхойлогдов.

Уургийн фосфоржилтыг таамаглах: EgTeg уургийг фосфоржих сайтийн дарааллыг дараах байдлаар NetPhos3.1 онлайн программ ашиглан тодорхойлов. (Зураг 1.)



Зураг 1. EgTeg уургийг фосфоржих сайтийн дараалал

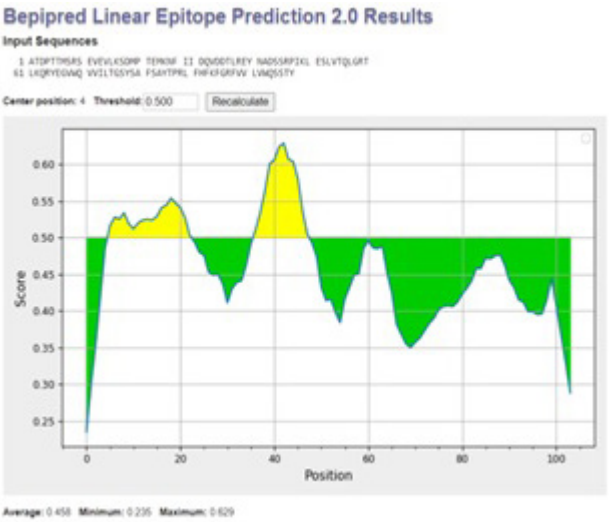
Sopma онлайн программаар EgTeg уургийн хоёрдогч бүтцийг тодорхойлоход нийт амин хүчлийн дараалал дахь alpha helix(Hh) 36.54%, Extended strand (Ee) 23.08%, Beta turn (Tt) 8.65%, Random coil (Cc) 31.73%-иар дээрх утгаар тодорхойлогдов. (Зураг 1.)



Зураг 2. EgTeg уургийн орон зайн гурван хэмжээст бүтэц

EgTeg уургийн орон зайн гурван хэмжээст бүтцийг SWISS-MODEL програмыг ашиглан боловсруулав. (Зураг 2.)

B эсийн эпитопийг таамаглах:



Зураг 3. EgTeg уургийн B эсийн эпитоп таамаглал

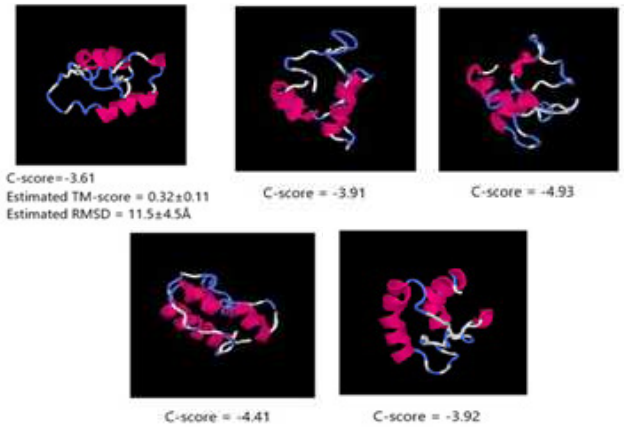
EgTeg уургийн B эсийн эпитопийг IEDB онлайн программ ашиглан хамгийн боломжит 2 пептидийн дарааллыг боловсруулав. (Зураг 3.)

Predicted peptides:

No.	Start	End	Peptide	Length
1	6	23	TMSRSEVEVLKSDMPTEM	18
2	37	48	EYNADSSRPIKL	12

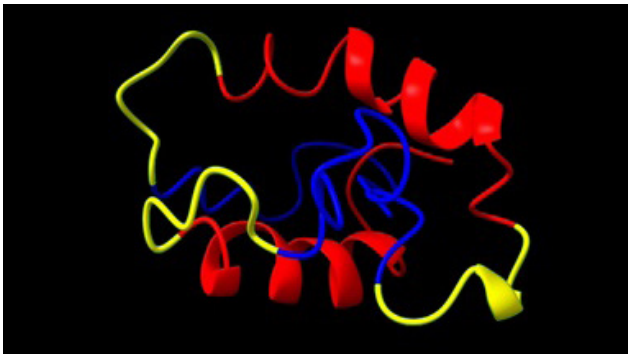
Зураг 4. EgTeg уургийн B эсийн эпитоп боломжит дараалал

Вакцины бүтцийн эсрэгтөрөгчийг таамаглах: Ming-kai Yu нарын олон эпитоп вакцин загварт ашигласан -GGSSGG дараалал бүхий линкер уургийг ашиглав. Уг онлайн программд уургийн sequence дарааллыг оруулахад антиген чанар 1.0101 тодорхойлогдов. (Зураг 4.)



Зураг 5. Вакцины 3-н хэмжээст орон зайн бүтцийг үүсгэх

Вакцины 3-н хэмжээст орон зайн бүтэц: EgTeg уургийн гурван хэмжээст вакцины загварыг I-TASSER онлайн программыг ашиглан боломжит 5-н загварыг боловсруулав. Эдгээрээс C-score индексээр үнэлэхэд, хамгийн боломжит загвар нь (C-score) -3.61 утгатай байсан ба бусад онлайн программ ашиглан шалгаж линкер ууриг болон пептидүүдийг дараах зургаар ялган харуулав. (Зураг 6.)



Зураг 6. Вакцины 3-н хэмжээст орон зайн бүтэц

Хэлцэмж: CE нь *E.g* шимэгч хорхойн авгалдайн халдвараас үүсдэг зоонозын өвчин юм. Энэхүү шимэгч хорхой нь элэг, уушги зэрэг эрхтнүүдэд халдварлаж, хүний эрүүл мэндэд ноцтой аюул учруулдаг. Шимэгч хорхойн хүндрэлийг арилгахын тулд халдвараас урьдчилан сэргийлэх вакциныг боловсруулах нь чухал ач холбогдолтой байдгийг судлаачид тэмдэглэсэн байна.[15-17]

Антигений эпитоп вакцин нь өвчнөөс урьдчилан сэргийлэхэд чухал үүрэг гүйцэтгэдэг. Антиген нь олон зуун аминхүчлээс бүрдэх бөгөөд имуноген шинж чанар бүхий молекул юм. Гэсэн хэдий ч антигений эпитоп нь эсрэгтөрөгчийн зөвхөн тодорхой хэсгийн нэгийг агуулдаг. Антигений эпитопийн үр дүнтэй вакциныг бий болгохын тулд Т болон В эсийн дархлааны хариу урвалыг идэвхжүүлэх эпитопууд шаардлагатайг цөөнгүй судлаачид дурджээ.[18,19]

In vitro болон *in vivo* судалгааны үр дүнгээс харахад иммуно-информатик аргийг ашиглаж бүтээсэн олон эпитопт вакцин нь дархлаа тогтоох чадвартай болохыг нотолсон. Сүүлийн жилүүдэд молекул дархлаа судлалын технологи үсрэнгүй хөгжихийн

хэрээр бэтэг өвчний оношлогоо, эмчилгээнд дархлаа судлалын аргуудыг хэрэглэх нь бүр чухал болж байна. Хэд хэдэн нэг уургаас бүрдэх олон эпитопт шинэ вакциныг зохион бүтээхэд иммуно-информатик аргийг ашиглах нь дархлааны хамгаалах урвалыг бий болгох шинэ арга болж байна.[20,21]

In silico орчинд инмуно-имформатик загвараар боловсруулсан пептид вакцины үр дүнг *In vivo* болон *in vitro* туршилтаар үнэлсэн байна. Тухайлбал Mingkia Yu (2021) нарын судалгаанд олон эпитопт вакцины бүтцийг иммуно-информатик загвараар боловсруулж дээрх үр дүнг хэд хэдэн төрлийн лабораторийн судалгааны аргаар нарийвчлан судлаж үзсэн байна.

Шингэний дархлаанд вакцины нөлөөг тодорхойлоход 14 хоногийн дараа дархлаажсан бөгөөд эсрэгбиеийн титрийг ФХЭБУ-аргаар тодорхойлсон. *E.g* эсрэг өвөрмөц вакцины нөлөөг ФХЭБУ болон Western blot-оор үнэлж баталгаажуулсан. Хулгана дэх эсрэгбиеийн титрийг ФХЭБУ-үнэлхэд *E.g* өвөрмөц вакцинаар дархлаажуулсан болон дархлаажуулаагүй 2 бүлгийн хулганад статистик ач холбогдол бүхий ялгаа ажиглагдсан. ($p<0.001$)

Шимэгчийн болон бусад төрлийн халдварт өвчнөөс урьдчилан сэргийлэх зорилгоор вакцин бүтээхэд иммуно-информатик аргийг ашиглан молекул угсралт антиген шинж чанарыг судлахад *In silico* орчин ашиглан туршилт судалгаа явуулах нь эдийн засгийг болон цаг хугацаа хэмнэх оновчтой үг дүнг богино хугацаанд гарган авах зэрэг олон давуу талыг бидэнд олгож байна.

Дүгнэлт:

1. EgTeg уургийн аминхүчлийн дараалал, нийт атомын тоо, молекул бүтэц, молекул жин нь theoretical (pI), Instability index (II), Aliphatic index, Grand average hydropathicity (GRAVY), домейны байршил, хоёрдогч бүтцийн мэдээллийн үзүүлэлтүүд тус тус тодорхойлов.
2. EgTeg уургийн B эсийн эпитопийг тодорхойлон (TMSRSEVEVLKSDMPTEM EYNADSSRPIKL)–GGSSGG линкер уургаар холбож вакцины гурван хэмжээст бүтцийг таамаглах боломжтой юм.

Ном зүй:

1. *Agudelo Higuita NI, Brunetti E, McCloskey C. Cystic Echinococcosis. J Clin Microbiol. 2016;54(3):518-523.*
2. *Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas CA, et al. Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. Advances in parasitology. 2017;95:315-493.*
3. *Banda F, Sikasunge C, Addy F, et al. Echinococcus ortleppi and Echinococcus canadensis G6/7 affect domestic animals in western Zambia. Acta Trop. 2020;211:105648.*
4. *do Carmo Pereira Soares M, Souza de Souza AJ, Pinheiro Malheiros A, et al. Neotropical echinococcosis: second report of Echinococcus vogeli natural infection in its main definitive host, the bush dog (Speothos venaticus). Parasitology international. 2014;63(2):485-487.*
5. *Romig T, Ebi D, Wassermann M. Taxonomy and molecular epidemiology of Echinococcus granulosus sensu lato. Veterinary parasitology. 2015;213(3-4):76-84.*
6. *Prevention CfDCa. Echinococcus granulosus Epidemiology Centers for Disease Control and Prevention 2012.*
7. *Kern P. Echinococcus granulosus infection: clinical presentation, medical treatment and outcome. Langenbecks Arch Surg. 2003;388(6):413-420.*
8. *Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. Clinical microbiology reviews. 2004;17(1):107-135.*
9. *Velasco-Tirado V, Alonso-Sardón M, Lopez-Bernus A, et al. Medical treatment of cystic echinococcosis: systematic review and meta-analysis. BMC infectious diseases. 2018;18(1):306.*
10. *Woolsey ID, Miller AL. Echinococcus granulosus sensu lato and Echinococcus multilocularis: A review. Research in veterinary science. 2021;135:517-522.*
11. *D'Alessandro A, Rausch RL. New aspects of neotropical polycystic (Echinococcus vogeli) and unicystic (Echinococcus oligarthrus) echinococcosis. Clinical microbiology reviews. 2008;21(2):380-401, table of contents.*
12. *Gessese AT. Review on Epidemiology and Public Health Significance of Hydatidosis. Veterinary medicine international. 2020;2020:8859116*

Determining a multi-epitope vaccine of EgTeg protein using immuno-informatics approach

Amarbayasgalan Z[1], Ulziisaikhan B[2], Agarzandan B[1], Mungunzaya T[1], Burnee M[1], Giimaa N[1], Narankhajid M[1], Gurbadam A[1], Temuulen B[1], ChimidtserenS[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: The results of studies using immuno-informatic tools and molecular modeling methods to predict and detect *Echinococcus granulosus* antigen epitopes and to design multi-epitope vaccines containing B and T cell epitopes are being studied. Therefore, it is time and economically advantageous to develop a peptide vaccine model predicted by the immuno-informatic model of multi-epitopes vaccines using the *Echinococcus granulosus* antigen nucleotide sequence.
Aim: To develop a possible model of a multi-epitope vaccine against Echinococcus granulosus.
Materials and Methods: To determine the amino acid sequence of the EgTeg protein, a searching by GenBank, the physicochemical parameters were processed by Expasy software, transmembrane domain and protein signal peptide information was processed by TMHMM online server, and EgTeg protein phosphorylation was used by NetPhos3.1 online server. Sopma and swiss-model online programs were used to determine the three dimensional structure of the protein, and the B-cell epitope was developed using the IEDB and I-TASSER online programs to develop a three-dimensional structure of the vaccine.
Results: EgTeg protein consists of 105 amino acid residues with a total number of atoms are 1705, a molecular structure is $C_{547}H_{848}N_{142}O_{165}S_3$, and a molecular weight are 12 kDa. Testing of the EgTeg protein on the TMHMM online server revealed that between 65 and 87 of the amino acid sequences were transmembrane domains. The secondary structure of the EgTeg protein was determined by alpha helix (Hh) 36.54%, Extended strand (Ee) 23.08%, Beta turn (Tt) 8.65%, and Random coil (Cc) 31.73% of the total amino acid sequence in the Sopma online application.
Conclusion: EgTeg protein amino acid sequence, total atomic number, molecular structure, molecular weight, theoretical pI, Instability index (II), Aliphatic index, Grand average hydropathicity (GRAVY), domain location, and secondary structure information were determined. A possible model of a multi-epitope vaccine against *Echinococcus granulosus* was identified by the EgTeg protein B cell epitope (TMSRSEVEVLKSDMPTEM EYNADSSRPIKL) –GGSSGG linker protein and the three-dimensional structure of the vaccine was predicted.

Keywords: Nucleotide sequence, Protein phosphorylation, Transmembrane domain