

# Применение методов обратной вакцинологии для разработки новых вакцин против бруцеллеза

В.И.Дятлова

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Бруцеллез – одно из наиболее распространенных зоонозных заболеваний, передающихся человеку от инфицированных животных, которое наносит как экономический, так и социальный урон государствам. Существующие сертифицированные вакцины против бруцеллеза не соответствуют в полной мере всем необходимым требованиям безопасности и эффективности для их широкого применения, в первую очередь для людей. Стремительное развитие новых технологий, в частности биоинформатики, может позволить получить качественно новые препараты для профилактики данного заболевания. С помощью методов обратной вакцинологии можно уже на начальном этапе создания вакцин выбрать наиболее иммуногенные белки, способные обеспечить долговременный протективный иммунитет против патогена. В настоящем исследовании был проведен биоинформатический анализ 45 предсказанных поверхностных белков с использованием 24 компьютерных программ и нескольких баз данных с целью выявления наиболее перспективных кандидатов для вакцин. Исследование включало 11 основных этапов. В результате анализа было определено 8 наиболее перспективных кандидатов в вакцины против бруцеллеза, среди которых ЛПС-сборочный белок внешней мембраны бруцелл LptD наиболее полно отвечал всем критериям отбора. LptD является перспективным кандидатом для создания субъединичных и ДНК-вакцин против бруцеллеза.

**Ключевые слова:** *Brucella*, бруцеллез, антигены, вакцина, обратная вакцинология, биоинформатика

**Для цитирования:** Дятлова В.И. Применение методов обратной вакцинологии для разработки новых вакцин против бруцеллеза. Бактериология. 2021; 6(4): 16–29. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-16-29

## Application of reverse vaccinology methods for the development of new vaccines against brucellosis

V.I.Dyatlova

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Brucellosis is one of the most common zoonotic diseases transmitted to humans from infected animals. The disease has negative consequences for the state, both economically and socially. The existing certified brucellosis vaccines do not fully meet all the necessary safety and efficacy requirements for their widespread use, primarily for humans. The rapid development of new technologies, in particular bioinformatics, can make it possible to obtain qualitatively new preparations for the prevention of this disease. Using the methods of reverse vaccinology, it is possible to select the most immunogenic proteins that can provide long-term protective immunity against the pathogen. In the present study, a bioinformatic analysis of 45 predicted surface proteins of *Brucella abortus* were carried out using 24 computer programs in order to identify the most promising candidates for vaccines. The study included 11 main stages. As a result, 8 most promising candidates for vaccines against brucellosis were identified, among which the LPS-assembly protein of the outer membrane of brucella LptD most fully met all selection criteria. LptD is a promising candidate for the development of subunit and DNA vaccines against brucellosis.

**Key words:** *Brucella*, brucellosis, antigens, vaccine, reverse vaccinology, bioinformatics

**For citation:** Dyatlova V.I. Application of reverse vaccinology methods for the development of new vaccines against brucellosis. Bacteriology. 2021; 6(4): 16–29. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-16-29

### Для корреспонденции:

Дятлова Варвара Ивановна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003  
E-mail: varya\_dyatlova@mail.ru

Статья поступила 06.12.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

### For correspondence:

Varvara I. Dyatlova, MD, PhD, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003  
E-mail: varya\_dyatlova@mail.ru

The article was received 06.12.2021, accepted for publication 27.12.2021

**Б**руцеллез – одно из наиболее распространенных зоонозных заболеваний, передающихся человеку от инфицированных животных как при непосредственном контакте, так и при употреблении непастеризованных молочных продуктов. Оно наносит и экономический, и социальный урон государствам, обусловленный частым развитием хронического течения инфекции и инвалидизации переболевших людей.

Вакцинация является перспективным методом профилактики бруцеллеза. В настоящее время широко используются ветеринарные живые аттенуированные вакцины против этого заболевания. Они играют важную роль в борьбе с эпидемиями бруцеллеза, но все же имеют ряд недостатков, включая патогенность для человека, потенциальную возможность самопроизвольного аборта у беременных животных, затруднения при интерпретации диагностических тестов и др. Применяемая в нашей стране для людей сухая живая вакцина на основе штамма *Brucella abortus* 19BA имеет ограниченное использование в связи с большим числом противопоказаний. Международной лицензированной вакцины против бруцеллеза для человека до сих пор не существует. Профилактика заражения людей в первую очередь основана на повышении осведомленности населения, контроле пищевых продуктов, гигиене труда и безопасности лабораторий [1].

Субъединичные и ДНК-вакцины за счет таких преимуществ, как безопасность, экономичность и эффективность, могут решить данную проблему [2, 3]. Однако для их создания необходим тщательный отбор мишеней, способных индуцировать протективный иммунный ответ против патогена. В течение последних двух десятилетий был исследован вакцинный потенциал различных антигенов бруцелл (Omp16, Omp19, Omp25, Omp28, Omp31, GroES, L7/L12, BCSP31, SOD, P39 и др.) и показано значительное снижение бактериальной нагрузки на органы у иммунизированных ими мышей [4–9]. Тем не менее использование одного антигена, как правило, не может обеспечить уровень защиты от бруцеллеза, сопоставимый с живыми аттенуированными вакцинами [3]. Необходимы дальнейшие исследования по выявлению новых антигенов и созданию на их основе мультиантигенных или мультисубъединичных вакцин.

В настоящее время все больше становятся востребованы новые стратегии разработки безопасных, стабильных и эффективных вакцин с помощью таких технологий биоинформатики, как обратная вакцинология, иммуноинформатика и структурная вакцинология.

Обратная вакцинология (ОВ) – это широко распространенный подход для прогнозирования потенциальных вакцин-кандидатов путем скрининга протеома патогена с помощью компьютерного анализа. Он включает определение субклеточной локализации белков, их антигенных, физико-химических свойств и пр. ОВ значительно сокращает время и затраты на разработку вакцин по сравнению с традиционным подходом, позволяет идентифицировать и изучать антигены, присутствующие в небольших количествах или только на определенных этапах жизненного цикла организма, а также белки некультивируемых или опасных микроорганизмов [10, 11].

Первой лицензированной вакциной, созданной с помощью методов ОВ, была вакцина против *Neisseria meningitidis* серо-

группы В (MenB) [12]. Анализ *in silico* генома изолята MenB позволил идентифицировать 600 генов, кодирующих потенциальные поверхностные белки, 350 из которых удалось получить в экспрессионной системе *Escherichia coli* и использовать для иммунизации мышей. Окончательный выбор трех антигенов (NadA, fHbp, NHBA) был обусловлен их высокой защитной способностью, определяемой по бактерицидной активности сывороток мышей и максимальному охвату антигенной изменчивости штаммов MenB. В результате была создана четырехкомпонентная вакцина 4CMenB (Bexsero® (GSK Vaccines)), включающая, кроме трех отобранных белков, также высокоиммуногенный компонент везикул наружной мембраны менингококков PorA P1.4 [13, 14]. Она была одобрена для применения в Европе в 2013 г. для всех возрастных групп и в США в 2015 г. для лиц от 10 до 25 лет [15]. Также в настоящее время с помощью методов ОВ разрабатываются вакцины против *Acinetobacter baumannii*, *Campylobacter jejuni*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* и др. [16–20]. Методы ОВ широко используются и при создании вакцин против COVID-19 [21, 22].

**Целью данного исследования** являлось вычисление белков-кандидатов в вакцины против бруцеллеза методами обратной вакцинологии.

## Материалы и методы

Для анализа были использованы последовательности геномов и протеомов бруцелл, полученные в базах данных Genbank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и UniProt (<http://www.uniprot.org/proteomes>), а именно 10 штаммов *B. abortus*: *B. abortus* 2308 (NCBI:txid359391; NC\_007618.1, NC\_007624.1; UP000002719), *B. abortus* bv. 1 str. 9-941 (NCBI:txid262698; NC\_006932, NC\_006933; UP000000540), *B. abortus* bv. 2 str. 86/8/59 (NCBI:txid520450; CP007765.1, CP007764.1; UP000028807), *B. abortus* bv. 6 str. 870 (NCBI:txid520454; CP007709.1, CP007710.1; UP000005091), *B. abortus* str. 63/75 (NCBI:txid:235; CP007663.1, CP007662.1; UP000028790), *B. abortus* bv. 9 str. C68 (NCBI:txid520455; CP007705.1, CP007706.1; UP000003961), *B. abortus* str. BAB8416 (NCBI:txid235; CP008774.1, CP008775.1; UP000035967), *B. abortus* A13334 (NCBI:txid1104320; NC\_016795.1, NC\_016777.1; UP000006807), *B. abortus* str. NCTC 10505 (NCBI:txid235; CP009625.1, CP009626.1; UP000028785), *B. abortus* 104M (NCBI:txid1210454; CP009625.1, CP009626.1; UP000064067); геномы видов *B. abortus* (NCBI:txid235), *B. melitensis* (NCBI:txid29459), *B. suis* (NCBI:txid29461), *B. canis* (NCBI:txid36855), *B. pinnipedialis* (NCBI:txid120576). Также использовались аминокислотные последовательности протеомов человека (*Homo sapiens*, NCBI:txid9606; UP000005640), мыши (*Mus musculus*, NCBI:txid10090; UP000000589), морской свинки (*Cavia porcellus*, NCBI:txid10140; UP000005447), кролика (*Oryctolagus cuniculus*, NCBI:txid9986; UP000001811), крупного рогатого скота (*Bos taurus*, NCBI:txid9913; UP000009136), козы (*Capra hircus*, NCBI:txid9925; UP000291000), овцы (*Ovis aries*, NCBI:txid9940; UP000002356), свиньи (*Sus scrofa*, NCBI:txid9823; UP000008227) и собаки (*Canis lupus familiaris*, NCBI:txid9615; UP000002254).

Этапы анализа протеомов представлены на рис. 1.



Рис. 1. Этапы анализа протеомов бруцелл методами обратной вакцинологии.

### 1. Определение субклеточной локализации белков

Для прогноза субклеточной локализации белков протеомов исследуемых штаммов были использованы компьютерные программы PSORTdb4.0 (<https://db.psорт.org>), Vaxign2 (<http://www.violinet.org/vaxign2>), CELLOv.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>). PSORTdb4.0 включает набор аналитических алгоритмов, таких как метод опорных векторов (Support Vector Machine/SVM), скрытую марковскую модель (Hidden Markov Model/HMM), средство поиска основного локального

выравнивания (Basic Local Alignment Search Tool/BLAST), алгоритм поиска ассоциативных правил (Apriori) и др. Данный многокомпонентный подход позволяет учитывать одновременно несколько характеристик каждого белка, включая наличие у него сигнальных последовательностей, трансмембранных петель, специфических мотивов и участков гомологии с белками известной локализации, с целью более точного предсказания расположения его в клетке [23–25].

Vaxign2 – это первая зарегистрированная публично доступная система дизайна вакцин, включающая множество программ, позволяющих определять субклеточную локализацию белка (PSORTb2.0), его трансмембранные сегменты (HMMTOP, основанная на HMM), адгезивность (SPAAN), консервативные участки между разными геномами, исключая при анализе сходные участки с непатогенными штаммами микроорганизмов, сравнивать аминокислотные последовательности предсказанных белков и белков хозяина (OrthoMCL, основанная на BLAST), предсказывать Т-клеточные эпитопы, связывающие молекулы МНС I и МНС II (Vaxitope, основанная на методе позиционной весовой матрицы PSSM (Position Specific Scoring Matrix)), проводить функциональный анализ белков (DAVID) [26].

Для предсказания субклеточной локализации белков была также использована программа CELLOv.2.5, которая включает многокомпонентную систему классификации SVM с 4 типами схем кодирования последовательностей: аминокислотный состав, дипептидный состав, расщепленный аминокислотный состав и состав последовательности на основе физико-химических свойств аминокислот [25].

С помощью программ PSORTdb4.0, Vaxign2, CELLOv.2.5 были отобраны белки, находящиеся во внешней мембране и внеклеточном матриксе бруцелл, общие для всех 10 исследуемых штаммов.

### 2. Идентификация гомологов белков человека

Предсказанные общие для всех штаммов поверхностные мембранные и секретируемые белки были подвергнуты анализу локального выравнивания BLASTp ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=&LINK\\_LOC=blasttab&LAST\\_PAGE=blastx](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastx)) против протеома человека на серверах NCBI и UniProt (cutoff для гомологов: E-value <0,005, идентичность >35%). Белки, удовлетворяющие этим критериям, рассматривались как гомологи человеческих и исключались из исследования [27].

Кроме того, с помощью программы PBIT (<http://www.pbit.bicnirrh.res.in/index.php>), основанной на BLAST, были вычислены гомологи белков микробиоты кишечника человека, (E-value <0,005, идентичность >50%), и в BLASTp – гомологи белков лабораторных животных (мыши, морские свинки, кролики) и млекопитающих, восприимчивых к патогенным для человека видам бруцелл (крупный рогатый скот, козы, овцы, свиньи, собаки) (E-value <0,005, идентичность >35%), которые исключались из анализа [28].

### 3. Вычисление адгезинов

Вероятность того, что белок является адгезином, рассчитывалась в программе Vaxign2. При коэффициенте адгезии более 0,5 белок рассматривался как адгезивный.

#### 4. Анализ антигенности белков. Прогнозирование вирулентных, патогенных и протективных антигенов

Антигенность белков анализировали с помощью VaxiJen v.2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>). Этот метод основан на автокросс-ковариантном преобразовании белковых последовательностей в однородные векторы без их выравнивания [29]. В целях повышения точности прогноза и минимизации ложноположительных результатов использовали пороговое значение  $\text{cutoff} \geq 0,4$ .

Вирулентность белков рассчитывалась в программе VirulentPred (<http://203.92.44.117/virulent/>), основанной на двухслойном каскадном SVM: первый слой включал оценку индивидуальных особенностей белковых последовательностей и профилей сходства белков методами SVM и PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST) с пятикратной перекрестной проверкой, второй слой – финальный прогноз с SVM [30]. Пороговое значение для отбора вирулентных белков составляло  $\text{cutoff} \geq 1$ .

Патогенные белки определяли в программе MP3 (<http://metagenomics.iiserb.ac.in/mp3/index.php>). Инструмент MP3 использует интегрированный подход с двумя методами (SVM и HMM) для повышения эффективности и точности предсказания патогенных белков в геномных и метагеномных базах данных [31]. Пороговое значение составляло  $\text{cutoff} > 0$ .

Прогноз протективных антигенов осуществлялся в Vaxign-ML (<http://www.violinet.org/vaxign/vaxign-ml/index.php>), которая использует до 509 биологических и физико-химических характеристик каждой белковой последовательности для предсказания защитных антигенов. В ее основе лежит алгоритм экстремального градиентного бустинга (XGBoost) и данные базы защитных антигенов Protegen [32]. Белки, для которых в программе было получено значение протективности  $< 90\%$  и классифицированные в программе как «непротективные», исключались из работы.

#### 5. Аллергенность белков

Аллергенность белков определялась в программе AllerTOPv.2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/index.html>), основанной на автокросс-ковариантном преобразовании белковых последовательностей в однородные векторы одинаковой длины, в ней белки классифицируются с помощью алгоритма  $k$ -ближайших соседей на основе обучающего набора из почти 2500 известных аллергенов и неаллергенов [33].

#### 6. Расчет иммуногенности белков

С помощью NetMHC4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) и NetMHCII-2.3 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCII-2.3>), использующих для расчетов искусственные нейронные сети, были предсказаны 9-мерные и 15-мерные Т-эпитопы, связывающие MHC I (аллеля HLA-A0201) и MHC II (аллеля HLA-DRB1\_0101) соответственно. Показатели плотности Т-эпитопов (ПЭ) в белках вычислялись по формуле:  $\text{ПЭ} = \text{число рассчитанных эпитопов} / \text{длина полипептида}$ . Затем рассчитывалось среднее значение двух ПЭ для каждого белка [34–36].

Общая иммуногенность белков (как сумма показателей иммуногенности составляющих их пептидов, связывающих

MHC I) определялась в программе Class I Immunogenicity на сервере базы данных иммунных эпитопов IEDB (Immune Epitope Database) (<http://tools.iedb.org/immunogenicity/>), которая использует свойства аминокислот, а также их положение в пептиде для прогнозирования иммуногенности комплекса пептида-MHC I. Более высокая оценка указывает на большую вероятность индукции иммунного ответа. Белки, для которых получены отрицательные значения иммуногенности, исключались из работы [37].

#### 7. Выявление белок-белковых взаимодействий

Взаимодействие между белками определяли с помощью базы данных STRING v.11.5 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, <https://string-db.org/>). Для расширенного анализа STRING использует как хорошо известные системы классификации (Gene Ontology/GO и Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes/KEGG), так и новые системы, основанные на высокопроизводительном интеллектуальном анализе текста, а также на иерархической кластеризации самой сети ассоциаций [38, 39]. Параметрами отбора белков в работе служили следующие параметры:  $p$ -значение обогащения белок-белковых взаимодействий (при значении ниже порогового указывает на то, что узлы не являются случайными и наблюдаемое количество ребер является значительным)  $< 0,05$ , средний коэффициент локальной кластеризации (показывает степень связи узлов (nodes) в сети)  $> 0,7$ , средняя степень узла (количество взаимодействий, которое в среднем имеет белок в сети)  $> 3$ , превышение количества ребер (edges) над ожидаемым (в случае, если бы узлы были выбраны случайным образом). Белки, для которых не выявлено достоверное число взаимодействий, исключались из работы.

#### 8. Прогнозирование мембранной топологии белков

Для прогнозирования мембранной топологии белков использовали программу DeepTMHMM (<https://biolib.com/DTU/DeepTMHMM/>), модель глубокого обучения, основанную на блоках долгой краткосрочной памяти и условных случайных полях. В ней определялись наиболее вероятная топология белков (трансмембранная локализация, внешняя или внутренняя поверхности наружной бактериальной мембраны), расположение структурных элементов (сигнальной последовательности, трансмембранных  $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -тяжей), тип белка (трансмембранный, секреторный, глобулярный).

Трансмембранные  $\alpha$ -спирали в структуре белков также вычислялись в TMHMMv.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), основанной на HMM [40]. Аминокислотная последовательность белков, как и во всех программах, использованных в работе, вводилась в FASTA-формате, результаты демонстрировали количество, размер и локализацию трансмембранных  $\alpha$ -спиралей. Белки, в которых было вычислено более 1 трансмембранной спирали, исключались из анализа.

Прогнозирование топологии предполагаемых трансмембранных  $\beta$ -цилиндрических белков проводили методом VOSTOPUS2 (<https://b2.topcons.net/pred/>) в режиме двухэтапного подхода вычислений: на первом этапе применяют 4 отдельных SVM для определения местоположения каждого остатка (обращенного к поре или липидному слою,

внутренние и наружные петли), на втором этапе – HMM для прогнозирования общей топологии [41, 42].

В SignalP-6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0>), основанной на языковой модели-трансформере с условным случайным полем для структурированного прогнозирования, вычислялись тип сигнальной последовательности (сигнальный пептид Sec/SPI, транспортируемый транслоконом Sec и расщепляемый сигнальной пептидазой I (Lep), Sec/SPII – липопротеиновый сигнальный пептид, расщепляемый сигнальной пептидазой II (Lsp), Tat/SPI и Tat/SPII – Tat-сигнальные пептиды, транспортируемые Tat, Sec/SPIII – пилин и пилин-подобные сигнальные пептиды, транспортируемые Sec и расщепляемые сигнальной пептидазой III (PiiD/PibD)), сайты расщепления в анализируемых поверхностных бруцеллезных белках и соответствующая вероятность [43, 44].

### 9. Определение физико-химических характеристик белков

Основные физико-химические характеристики белков (аминокислотный состав, молекулярную массу, теоретическую изоэлектрическую точку (pI), коэффициент экстинкции, расчетный период полураспада *in vivo*, алифатический индекс (AI) (чем выше AI, тем выше термостабильность белка), индекс нестабильности (ИН) (белок стабилен в пробирке при ИН <40), среднее значение гидроксипатичности GRAVY (GRAVY <0 характеризует гидрофильность белка) и др.) определяли с помощью инструмента ProtParam tool на сервере ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) [45].

Наличие и расположение дисульфидных мостиков в белках рассчитывали в программе DiANNA 1.1 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>), которая использует нейронную сеть прямого распространения для определения степени окисления цистеина и дисульфидной связности белка, учитывая только его аминокислотную последовательность [46].

Растворимость белка при избыточном его производстве в *E. coli* определялась в программе SOLpro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu>), в которой применяется двухстадийная архитектура SVM [47], а также в программе Protein-Sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>), которая использует модели машинного обучения, тренированные на наборе данных из 137 последовательностей терапевтических антител и на 12 биофизических платформах, для прогнозирования растворимости белков [48].

### 10. Определение основных (незаменимых) белков

На сервере DEG v.15.0. (<http://www.essentialgene.org>) методом BLASTp было проведено сравнение последовательностей исследуемых белков с незаменимыми белками из базы DEG v.15.0 [49]. Параметры отбора для основных белков были следующие: идентичность >35%, bit score >100, E-value >1E-15.

### 11. Анализ консервативности гена выбранного белка для патогенных для человека видов *Brucella*

С помощью BLASTn ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=&LINK\\_LOC=blasttab&LAST\\_PAGE=blastn](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn)) было проведено локальное выравнивание гена выбранного белка

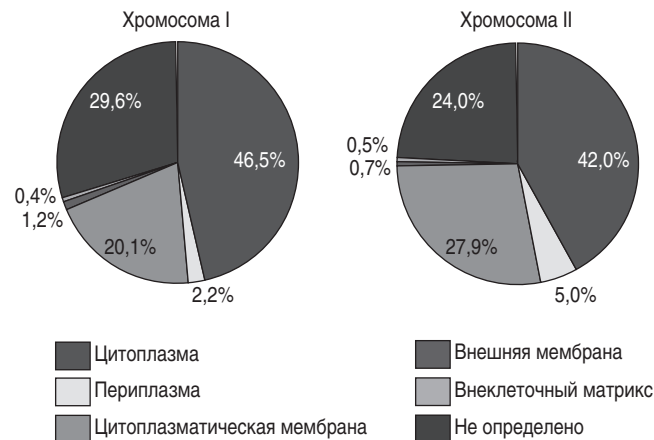


Рис. 2. Процентное распределение прогнозируемых белков *B. abortus* bv. 1 str. 9-941 по их субклеточной локализации (PSORTdb 4.0).

против генома рода *Brucella*, а также против геномов патогенных для человека видов бруцелл: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. pinnipedialis*. При оценке гомологии нуклеотидных последовательностей учитывались показатели идентичности (99–100%), охвата (100%) и значимости выравнивания (E-value <0,05).

## Результаты и обсуждение

### 1. Определение субклеточной локализации белков

Протеомы 10 исследуемых штаммов *B. abortus*, представленные в базе UniProt, включают от 3023 до 3326 белков. Из них, согласно расчетам в программах PSORTdb 4.0 и Vaxign 2, по крайней мере 25–31 белок каждого штамма располагается во внешней мембране клетки и 12–14 белков – это секретируемые внеклеточные белки. С помощью программ Vaxign 2, BLAST, CELLO v.2.5 было вычислено 45 поверхностных белков, общих для всех исследуемых штаммов *B. abortus* (табл. 1). На рис. 2 представлена диаграмма процентного распределения белков, экспрессирующихся с двух хромосом *B. abortus* bv. 1 str. 9-941, составленная по данным программы PSORTdb 4.0.

### 2. Идентификация гомологов белков человека

Идентифицированные поверхностные бруцеллезные белки исследовали на предмет их сходства с белками протеома человека с помощью программы BLASTp. Из 45 белков только 39 соответствовали заявленным выше критериям, то есть не являлись гомологами человеческих белков (табл. 1). Также для 8 белков выявлена гомология с белками микробиоты кишечника человека и для 2 белков – с белками лабораторных животных (мыши, морские свинки, кролики) и млекопитающих, восприимчивых к патогенным для человека видам бруцелл (крупный и мелкий рогатый скот, свиньи, собаки).

### 3. Расчет адгезивности белков

Из 34 отобранных поверхностных и секретируемых бруцеллезных белков 26 были идентифицированы как адгезины в программе Vaxign2. Среди них наибольшие значения адгезивности были вычислены для WP\_002967016.1 (0,9) и WP\_002964998.1 (0,88).

Таблица 1. Анализ поверхностных бруцеллезных белков методами обратной вакцинологии																			
Номер белка в NCBI-Protein	Название белка	Количество aa																	
			–	=	≡	≥	>	∇	∇	∇	∇	∇	∇	∇	∇	∇	∇	∇	
WP_002966739.1	LptD	792	м	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	с	-	26	а	+
WP_002965367.1	Omp25d	230	м	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	с	-	8	а	-
WP_002965368.1	Omp25c	228	м	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	с	-	8	а	-
WP_002964462.1	BhuA	620	м	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	с	-	22	а	-
WP_002966644.1	FlgE	396	в	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	г	-	-	-	-
WP_002967184.1	FlgH	242	м	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	с	-	-	б	-
WP_002969598.1	AlgEfp	417	м	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	г	-	18	-	-
WP_002963597.1	MliCfp	121	м	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	с	-	-	а	-
WP_002966591.1	TonB	661	м	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	с	-	22	а	-
WP_002965376.1	FghA	278	в	г	г	г	-	+	-	-	+	-	+	+	г	-	2	-	+
WP_002963836.1	Ndk	140	в	г	г	г	-	-	-	-	-	а	+	+	г	-	-	-	+
WP_002963986.1	PGb3dp	253	в	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	т	1	-	-	-
WP_002971034.1	PNPLA	315	в	-	г	-	-	-	-	-	-	-	+	+	г	-	-	-	+
WP_002964637.1	Lp	184	в	-	-	-	+	+	+	+	+	а	-	+	с	-	-	б	-
WP_002966987.1	Phagep	458	в	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	г	-	-	-	-
WP_002966988.1	TsaD	359	в	г	г	г	+	+	-	-	+	-	+	+	т	-	-	-	+
WP_002967016.1	BigB	518	в	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	г	-	-	-	-
WP_002965213.1	M22	229	в	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	т	-	-	-	+
WP_002971772.1	D15	639	м	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	с	-	16	-	-
WP_002969669.1	YadAfp	1333	м	-	г	-	+	+	+	+	+	а	+	+	г	-	4	а	-
WP_002969883.1	Omp2a	321	м	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	с	-	14	а	-
WP_002971512.1	Omp2b	362	м	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	с	-	16	а	-
WP_002963844.1	Omp25	213	м	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	с	-	8	а	-
WP_002964008.1	SPORdp	990	м	г	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	г	2	-	-	-
WP_002964019.1	LysM	432	м	-	г	-	+	+	-	+	+	а	-	+	г	-	-	б	+
WP_002964049.1	RNA-bp	1132	м	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	т	1	2	-	-
WP_011265341.1	BepC	456	м	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	г	-	4	а	-
WP_075589504.1	Trp	323	м	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	г	-	12	-	-
WP_002964282.1	BamA	781	м	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	с	1	16	а	+
WP_002964402.1	Omp22	212	м	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	с	1	8	а	-
WP_002964530.1	BamD	287	м	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	с	-	-	б	+
WP_011265365.1	OmpW	227	м	-	-	-	+	+	-	-	+	а	+	+	с	1	8	а	-
WP_002964719.1	Omp31b	261	м	-	-	-	+	+	+	+	+	а	+	+	с	-	8	а	-
WP_002964782.1	YbgF	488	м	г	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	г	-	-	а	-
WP_002966947.1	Pal	168	м	-	-	-	-	+	-	+	-	а	+	+	с	-	-	б	+
WP_002964998.1	Omp19	177	м	-	-	-	+	+	+	+	+	а	-	+	с	-	-	б	-
WP_002967168.1	Ompβb	512	м	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	с	-	18	а	-
WP_002966502.1	Omp10	126	м	-	-	-	+	+	+	+	-	а	+	+	с	-	-	б	-
WP_002971189.1	BhuA	676	м	-	г	-	-	+	-	+	+	-	+	-	с	-	22	а	-
WP_002965726.1	Porinfp	284	м	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	с	1	8	а	-
WP_002967131.1	FlgK	484	м	-	-	-	+	+	+	+	+	а	-	+	г	-	-	-	-
WP_002966373.1	Patatin	293	в	-	-	-	-	+	-	-	-	а	+	+	г	-	-	-	-
WP_002965683.1	TPRdp	295	в	г	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	с	-	-	б	-
WP_002966649.1	FlgD	137	в	-	г	-	+	+	+	+	+	а	-	+	г	-	-	-	-
WP_002966636.1	FliC	282	в	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	г	-	-	-	-

Условные обозначения: aa – аминокислоты; bp (binding protein) – связывающий белок; dp (domain protein) – белок, содержащий домен; fp (family protein) – белок, принадлежащий семейству; Lp – липопротейн; Trp – транспортер; l – субклеточная локализация (м – мембрана, в – внеклеточный матрикс) (PSORTdb); II – гомологи (г) белков человека (BLASTp); III – гомологи белков микробиоты кишечника человека (PBIT); IV – гомологи белков животных (лабораторных и чувствительных к бруцеллезу)(BLASTp); V – адгезины (Vaxign2); VI – антигены (Vaxijen2); VII – вирулентные антигены (VirulentPred); VIII – патогенные антигены (MP3); IX – протективные антигены (Vaxign-ML); X – аллергены (a) (AllerTOPv.2); XI – иммуногенность; XII – достоверное количество белок-белковых взаимодействий (STRINGv11.5); XIII – мембранная топология (т – трансмембранные, с – секретируемые, г – глобулярные белки) (DeepTMHMM); XIV – число трансмембранных α-спиралей (TMHMMv.2); XV – число трансмембранных β-тяжей (BOCTOPUS2); XVI – тип сигнального пептида (а – Sec/SPI, б – Sec/SPII) (SignalP-6); XVII – гомологи незаменимых белков (DEG v.15).

#### 4. Анализ антигенности белков. Вычисление вирулентных, патогенных и протективных антигенов

Антигенность белков оценивали с использованием Vaxijen v2.0. У 25 из 26 белков значение антигенности было  $>0,4$  (кроме WP\_002964530.1, 0,284). Наиболее высокий показатель антигенности – у белка WP\_002966502.1 (0,82). В программе VirulentPred 16 из 25 белков были определены как вирулентные. Из них все 16 были классифицированы как патогенные в MP3.

Наибольшие значения вероятности патогенности белка были получены для WP\_002964998.1 (4,36), WP\_002967016.1 (3,43). В Vaxign-ML протективность всех 16 исследованных белков была  $>90\%$ , однако WP\_002966502.1 был классифицирован в программе как «непротективный» и исключен из работы. Максимальные значения показателя были вычислены для WP\_002966591.1 (99,3%) и WP\_002966636.1 (98,6%).

#### 5. Определение аллергенности

Согласно результатам анализа *in silico* (AllerTOP v.2.0), 4 белка (WP\_002964637.1, WP\_002964719.1, WP\_002964998.1, WP\_002967131.1) из 15 прогностически являлись аллергенами и были исключены из анализа.

#### 6. Расчет иммуногенности белков

Показатели плотности Т-эпитопов, связывающих MHC I и MHC II, для всех 11 белков были  $>0,9$ , что косвенно указывает на иммуногенность белков. Наибольшее значение среднего двух показателей было получено для белка WP\_002966739.1 (0,985), наименьшее – для WP\_002966644.1 (0,903).

Среди 11 белков на сервере IEDB отрицательные значения показателей иммуногенности были получены для WP\_002966636.1 (-4,18) и WP\_002967016.1 (-0,01), они были исключены из исследования. Для остальных 9 белков были вычислены положительные значения показателя (максимальные значения для WP\_002966591.1 (7,44) и WP\_002966739.1 (7,33)).

#### 7. Выявление белок-белковых взаимодействий

В программе STRING v11.5 для 8 (WP\_002965367.1, WP\_002965368.1, WP\_002966739.1, WP\_002964462.1, WP\_002967184.1, WP\_002966644.1, WP\_002969598.11PL35, WP\_002963597.1) из 9 белков выявлено достоверное количество взаимодействий ( $p$ -значение  $<0,05$ , средний коэффициент локальной кластеризации  $>0,7$ ) для утверждения, что эти белки являются биологически значимыми. Например, для белка WP\_002967184.1 (FlgH) получены следующие данные:  $p$ -значение  $<1,0e-16$ , средний коэффициент локальной кластеризации = 1, средняя степень узла = 10, количество ребер (55) превышает ожидаемое число (11) (рис. 3).

#### 8. Прогнозирование мембранной топологии белков

При вычислении мембранной топологии всех 45 белков в DeepTMHMM 4 белка были определены как трансмембранные (WP\_002963986.1, WP\_002966988.1, WP\_002965213.1, WP\_002964049.1), 24 белка – секретиремые и 17 – глобулярные белки, расположенные на внутренней стороне наружной бактериальной мембраны. Из 8 отобранных белков только WP\_002966644.1 (Рис. 4б) и WP\_002969598.11PL35 были определены как глобулярные белки, остальные 6 – се-

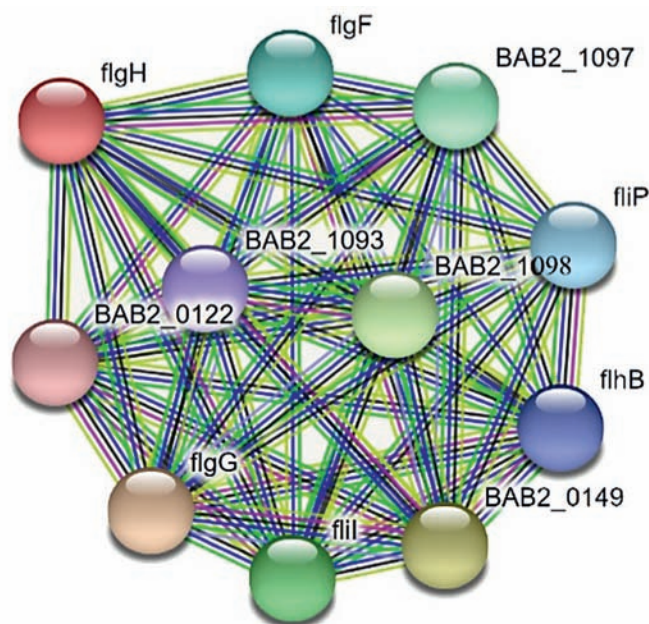


Рис. 3. Графическое изображение белок-белковых взаимодействий белка WP\_002967184.1 (FlgH) (STRING v11.5).

Цвет линий: розовый – взаимодействия, выявленные экспериментально, голубой – отобранные из баз данных, зеленый – гены белков расположены рядом, красный – слияние генов, синий – совместное возникновение генов, светло-зеленый – интеллектуальный анализ текстов, черный – ко-экспрессия белков, фиолетовый – гомология белков.

кретируемые белки, содержащие сигнальные пептиды длиной от 17 до 35 аминокислотных остатков, расположенные на внешней стороне наружной мембраны бруцелл (рис. 4).

Среди 45 белков первично только у WP\_002964008.1 в TMHMMv.2.0 и WP\_002963986.1 в DeepTMHMM было выявлено по 2 трансмембранных  $\alpha$ -спирали, и они уже были исключены из работы на предыдущих этапах отбора. В структурах всех 8 отобранных кандидатов отсутствуют трансмембранные  $\alpha$ -спирали.

С помощью программы VOSTOPUS2 было выявлено 22 белка (из 45), содержащих  $\beta$ -тяжи (от 2 до 26). В 5 из 8 отобранных белков обнаружены трансмембранные  $\beta$ -цилиндры (с числом  $\beta$ -тяжей от 8 до 26). Пример графического анализа топологии белка в программе VOSTOPUS2 представлен на рис. 5.

В программе SignalP-6.0 у 19 из 45 белков были выявлены сигнальные последовательности типа Sec/SPI, у 8 – липидные сигнальные пептиды Sec/SPII, у остальных 18 они не были обнаружены. Во всех отобранных белках, кроме WP\_002966644.1 и WP\_002969598.1, присутствуют сигнальные пептиды типа Sec/SPI (для 5 белков) или Sec/SPII (WP\_002967184.1) (рис. 6).

#### 9. Определение физико-химических характеристик белков

При помощи ProtParam tool рассчитали физико-химические параметры 8 отобранных бруцеллезных белков: число аминокислотных остатков, теоретическая изоэлектрическая точка (pI), коэффициент молярной экстинкции белка на длине волны 280 нм, общее количество отрицательно (Asp + Glu) и положительно (Arg + Lys) заряженных остатков и др.) (табл. 2).

Таблица 2. Физико-химические характеристики 8 бруцеллезных белков

Номер белка в NCBI-Protein / Характеристики белков	WP_002966739.1	WP_002964462.1	WP_002967184.1	WP_002965367.1	WP_002965368.1	WP_002966644.1	WP_002969598.1	WP_002963597.1
Название белка	LptD	BhuA	FlgH	Omp25d	Omp25c	FlgE	AlgEfp	MliCfp
Количество аа	792	620	242	230	228	396	417	121
Мм, кДа	88,5	66,8	25,9	24,7	24,5	40,8	46,2	12,8
pI	5,37	5,26	9,21	9,28	4,78	4,49	5,34	5,04
ЧЗО- (Asp+Glu)	91	73	24	19	25	38	42	13
ЧЗО+ (Arg+Lys)	78	60	28	24	19	24	33	11
Индекс нестабильности	32,17	36,77	33,45	11,9	22,47	20,34	19,31	27,76
GRAVY	-0,416	-0,346	-0,386	-0,255	-0,092	-0,112	-0,346	0,092
Алифатический индекс	70,98	73,23	82,69	73,48	78,38	82,5	74	93,64
Коэффициент экстинкции <sup>1</sup>	129860	76335	14440	41370	42860	29340	91790	25565
Дисульфидные мостики, аа	18–165, 168–751	14–166	-	-	-	-	-	47–118
Растворимость <sup>2</sup>	0,189	0,309	0,496	0,522	0,57	0,593	0,238	0,637
Растворимость <sup>3</sup>	0,655	0,442	0,61	0,367	0,341	0,188	0,214	0,946

Условные обозначения: аа – аминокислоты; Мм – молекулярная масса, ЧЗО – число заряженных остатков, <sup>1</sup> – единицы измерения М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>, <sup>2</sup> – вероятность растворимости белка в Protein-Sol (cutoff >0,45), <sup>3</sup> – в SolPro (cutoff >0,5).

Расчетные молекулярные массы белков составили от 12,8 кДа (WP\_002963597.1) до 88,5 кДа (WP\_002966739.1), что соответствует значениям, установленным в качестве критерия отбора. Индексы нестабильности всех кандидатов в вакцины были <40, что указывает на стабильную природу белков в пробирке. Алифатический индекс кандидатов – >70, что позволяет предположить, что все белки имеют высокую термостабильность. Расчетный период полураспада «вакцин», прогнозируемый с помощью ExPASy, составил >30 ч в ретикулоцитах млекопитающих, >20 ч в дрожжах и >10 ч в *E. coli*. Общая средняя оценка гидрофобности (GRAVY) для всех белков была ниже нуля (кроме WP\_002963597.1 (0,092), что указывает на то, что большинство вакцинных кандидатов имеют гидрофильную природу, то есть могут взаимодействовать с водной средой.

Согласно расчетам в программе Protein-Sol большую растворимость, чем средний растворимый белок *E. coli* (cutoff >0,45) из экспериментального набора данных, при экспрессии в *E. coli* должны иметь WP\_002963597.1, WP\_002967184.1, WP\_002965367.1, WP\_002965368.1 и WP\_002966644.1. Однако в программе Solpro только белки WP\_002963597.1, WP\_002966739.1 и WP\_002967184.1 были определены как «растворимые при сверхэкспрессии в *E. coli*» (cutoff >0,5). Дисульфидные мостики, обеспечивающие стабильность третичных структур белков, вычислены для WP\_002963597.1, WP\_002966739.1 и WP\_002964462.1.

#### 10. Определение основных (незаменимых) белков

Анализ BLASTp показал, что из 8 бруцеллезных белков только для WP\_002966739.1 выявлена достоверная гомоло-

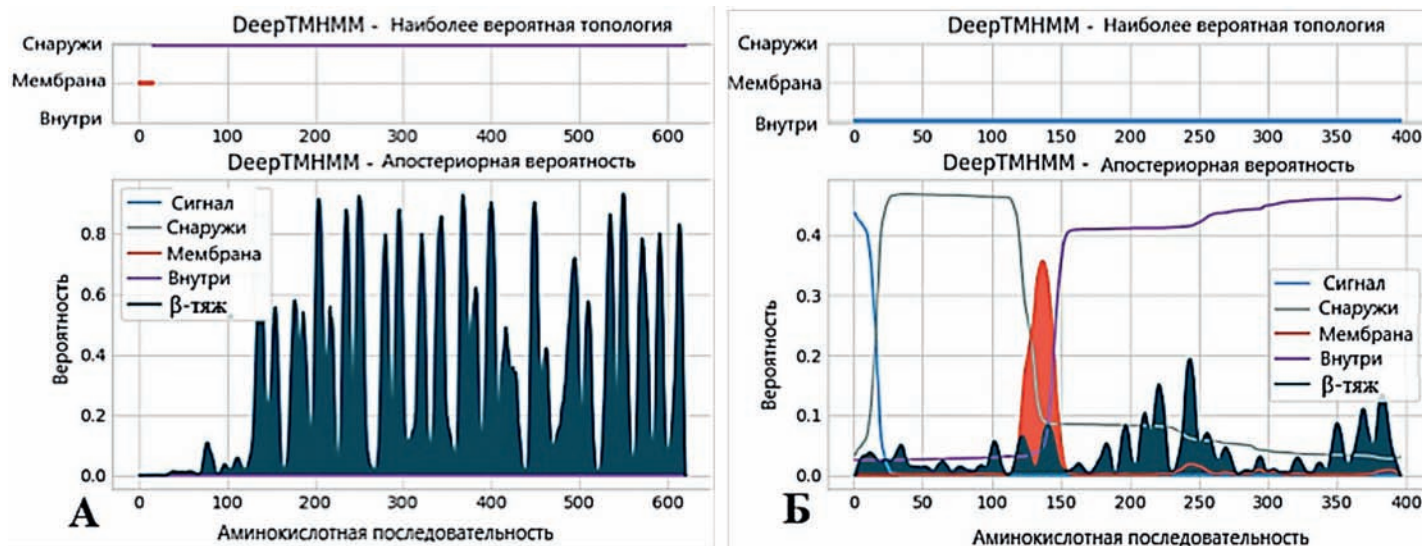


Рис. 4. Мембранная топология белков WP\_002964462.1 (А) и WP\_002966644.1 (Б) (DeepTMHMM).





На первом этапе работы с помощью трех серверов вычислялись поверхностные секретируемые белки и белки внешней мембраны бруцелл как наиболее доступные для иммунной системы и, наиболее вероятно, являющиеся антигенами [52]. Для более чем 23% белков протеомов *B. abortus* не была определена субклеточная локализация, и, таким образом, некоторые поверхностные антигены бруцелл могли быть упущены из анализа. Тем не менее в работе было определено 45 поверхностных белков, общих для всех 10 штаммов *B. abortus*.

Важным этапом анализа протеомов было исключение из работы белков, имеющих высокую гомологию (>35%) с белками человека. Это обусловлено тем, что сходство вакцинного препарата с белками человека может стать причиной возникновения в организме перекрестной реактивности на него и формирования аутоиммунного ответа [53].

Так как микробиота кишечника человека является важным компонентом иммунной защиты организма от патогенных микроорганизмов, из работы исключались белки, гомологичные белкам микроорганизмов нормальной микрофлоры кишечника. С одной стороны, при использовании подобных антигенов возможна перекрестная реактивность с белками микробиоты кишечника и развитие дисбактериоза, с другой – толерантность к антигенным детерминантам нормофлоры может распространиться и на вакцинные белки [54, 55].

Кроме того, гомологи белков лабораторных животных (мышей, морских свинок, кроликов) и животных, чувствительных к патогенным для человека видам бруцелл (коров, коз, овец, свиней, собак), также отсеивались на данном этапе исследования в связи с теоретической необходимостью испытания вакцин на животных.

В связи с тем, что способность к адгезии является ключевой характеристикой, общей для многих экспериментально подтвержденных протективных антигенов, высокая адгезивность белков рассматривалась как один из положительных факторов отбора [42].

Вакцина против бруцеллеза должна быть как антигенной, так и иммуногенной по своей природе. С помощью компьютерных программ были предсказаны антигены среди исследуемых белков, отобраны антигены с высокими расчетными показателями вирулентности, патогенности, протективности, а также не являющиеся аллергенами.

Плотность Т-эпитопов в белках является одним из косвенных показателей иммуногенности белков. Таким образом, согласно результатам анализа, можно предположить, что все исследуемые белки обладают потенциалом для стимулирования клеточного звена иммунитета. Однако M.Halling-Brown et al. высказывают точку зрения, что прогнозирование вакцин-кандидатов на основе высокой плотности эпитопов, связывающих МНС, в белках не имеет большого значения, так как, вероятнее всего, из-за недостаточной точности программного обеспечения для прогнозирования, низкой частоты гидрофобных остатков, особенно в N-концевом положении, в вакцинных антигенах или эволюционного давления, оказываемого на бактерии иммунной системой, число пептидов, связывающих HLA, оказывается гораздо меньше, чем предсказано *in silico* [56, 57].

На сервере базы данных иммунных эпитопов IEDB с помощью инструмента Class I Immunogenicity было определе-

но, что 80% анализируемых в работе поверхностных белков бруцелл обладают иммуногенностью. Высокая оценка (>5), полученная для 7 белков, указывает на большую вероятность индукции ими выраженного иммунного ответа.

Белок-белковые взаимодействия, прямые (физические) и косвенные (функциональные), определяли с помощью базы данных STRING v11.5, которая содержит информацию о 67,6 млн белков от более чем 14000 организмов и более 20 млрд взаимодействий, полученную из экспериментальных данных, литературных источников, других баз данных и с помощью методов вычислительного прогнозирования (на основе ко-экспрессии и сравнительного анализа геномного контекста) [39]. В данной работе для 8 из 9 отобранных белков было выявлено достоверное число взаимодействий с другими белками.

Многие исследователи отмечают, что мембранная топология белков коррелирует с их иммуногенностью. Так, в исследовании E.Ong et al. выявлена положительная взаимосвязь между антигенопротективностью белков граммотрицательных патогенов и присутствием в их структурах трансмембранных  $\beta$ -цилиндров и отсутствием трансмембранных  $\alpha$ -спиралей [41, 42]. Было показано, что белки с более чем одной трансмембранной  $\alpha$ -спиралью не всегда возможно получить в пространственных экспрессионных системах, поэтому такие белки были исключены из исследования. Так, в статье M.Pizza et al. сообщалось, что из 600 вакцинных кандидатов против менингококка группы B, вычисленных методом ОВ, 250 белков *N. meningitidis* не удалось экспрессировать в системе *E. coli* из-за присутствия в их структуре двух и более трансмембранных спиралей [13]. Наличие трансмембранных  $\beta$ -цилиндров рассматривалось как дополнительный положительный фактор при отборе кандидатов в вакцины.

Также определялись наличие и типы сигнальных последовательностей в белках. Присутствие лидерного пептида в белке может способствовать увеличению растворимости и стабильности целевого белка при его гетерологичной экспрессии, повышению уровней его внеклеточной секреции и в целом жизнеспособности клеток [58].

Кроме того, в недавних исследованиях было показано, что сигнальный пептид не только обеспечивает секрецию белка, но способен стимулировать клеточный ответ и сам может быть использован как кандидат в вакцины [59]. Например, в работе D.Vatakis et al. включение нуклеотидной последовательности лидерного пептида КС хемокина крысы в состав ДНК-вакцины привело к повышению ее иммуногенности (улучшенным ответам против Т-клеточных эпитопов), что, предположительно, было связано с повышенной секрецией белка и презентацией антигена [60]. С другой стороны, сигнальные последовательности могут приводить и к накоплению белка в тельцах включения, что может быть использовано для получения трудноэкспрессируемых белков в нерастворимой форме. Так, слияние 39aa-сигнального пептида белка *E. coli* TorA с нестабильным hEGF и токсичными SymE-белками человека приводило к их агрегации в работе W.S.Jong et al. [61].

Для прогнозирования безопасности и эффективности применения белков в качестве вакцин, а также возможности их экспрессии в системе *E. coli* была проведена оценка их физико-химических свойств. В работе вычислялись такие

характеристики белков, которые оказывают влияние на их стабильность, растворимость при их экспрессии *in vitro* и применении *in vivo*. Все параметры белков соответствовали критериям отбора. В трех из восьми белков были предсказаны дисульфидные мостики, которые способствуют стабильности третичной и четвертичной структур белков.

Растворимость белков имеет важное значение при производстве вакцинных и терапевтических препаратов. Она зависит от числа гидрофильных групп, величины суммарного заряда, размеров, структуры белков, параметров среды и других факторов. В данной работе растворимость белков при экспрессии в *E. coli* вычислялась в двух программах, которые дали разные результаты. В большинстве случаев предпочтительно получать рекомбинантные белки в растворимой форме, однако для некоторых нестабильных и токсичных белков целесообразна их продукция в тельцах включения [61, 62]. С другой стороны, существуют эффективные методы повышения растворимости белков (изменение концентрации индукторов, времени индукции, температуры и внесение дополнительных компонентов в среду). Например, S.Ghosh et al. было обнаружено, что присутствие от 100 мМ до 1 М дипептида глицилглицина в среде значительно увеличивает растворимость экспрессированных белков (до 170 раз). Применение ими этого метода привело к повышению солюбилизации трудноэкспрессируемых микобактериальных белков при их получении в экспрессионной системе *E. coli* [63].

Незаменимые (основные), жизненно важные для патогена, белки определялись на сайте Центра биоинформатики Тяньцзиньского университета (<http://www.essentialgene.org/>) с помощью BLASTr и базы данных DEG. DEG хранит записи доступных в настоящее время основных геномных элементов (таких как гены, кодирующие белки, и некодирующие РНК) бактерий, архей и эукариот. Среди отобранных на предыдущих этапах 8 иммунодоминантных белков бруцелл только для WP\_002966739.1 (LptD) была выявлена достоверная гомология с незаменимыми белками из базы данных DEG, следовательно, только его можно расценивать как белок, необходимый для выживания бруцелл, т.е. экспрессирующийся при любой стадии и форме бруцеллеза. База DEG постоянно обновляется, поэтому при появлении новых ее версий возможно выявление большего числа гомологов незаменимых белков среди выбранных кандидатов.

Геном рода *Brucella* высоко консервативен (все виды бруцелл имеют более 90% генетического сходства) и включает в себя растущее число видов (в настоящее время известно по крайней мере 12). Для человека наиболее патогенными считаются *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* и *B. canis*. Кроме того, показано, что заболевание у людей могут вызывать также *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. inopinata* и недавно выделенный из лягушки вид *Brucella* sp. BO3 (NCBI:txid2691913) [64–66]. Анализ локального выравнивания гена белка *lptD* показал, что выбранный ген консервативен для 5 видов бруцелл, патогенных для человека, а следовательно, белок LptD может быть использован в разработке вакцин против бруцеллеза.

Бруцеллезный LptD (ЛПС-сборочный белок внешней мембраны LptD, или органический белок толерантности к растворителям OstA) принадлежит к семейству LptD. В базе данных семейств белковых доменов Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) на его С-конце определен консервативный домен «транспорт-

ной системы ЛПС D» (в позиции 308–723aa (Pfam:PF04453)) [67]. В это семейство также входят хорошо изученные белки LptD, обнаруженные у других грамотрицательных бактерий (*S. flexneri*, *Y. pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* и др.). Структурный анализ данных белков показывает, что они образуют 26-тяжевые β-цилиндры, которые формируют с LptE архитектуру по типу «бочонка и пробки» для транспорта ЛПС. Согласно данным сервера геной онтологии (The Gene Ontology/GO, <http://geneontology.org/>), LptD участвует в таких жизненно важных биологических процессах, как сборка внешней мембраны клеток грамотрицательных бактерий (GO:0043165), транспорт ЛПС (GO:0015920), а также осуществляет реакцию на органическое вещество (GO:0010033) [38]. Таким образом, LptD является наиболее перспективным кандидатом для разработки эффективных вакцин против бруцеллеза [68–70].

Несмотря на логичность и обоснованность подхода ОВ, только экспериментальные данные можно рассматривать как надежный источник информации об эффективности вакцинного препарата. Вакцинный потенциал многих из анализируемых в работе белков уже был ранее исследован *in vitro* и *in vivo*: в частности, белков внешней мембраны Omp2b, Omp16, Omp19, Omp22, Omp25, Omp25c и OmpW, флагеллинов FlcC и FlgK, гем-транспортера BhuA, ЛПС-сборочного белка LptD, нуклеозид дифосфаткиназы Ndk и др. [6, 7, 71–79].

Более того, некоторые бруцеллезные белки обладают адьювантными свойствами. Например, Pasquevich K.A., Li J.Y. et al. показали, что рекомбинантные белки *B. abortus* Omp16, Omp19, BLS, BCSP31 являются агонистами Толл-подобных рецепторов (TLR) 2 и 4, стимулируют созревание дендритных клеток, их рекрутирование в лимфатические узлы, увеличивают экспрессию некоторых цитокинов и хемокинов, а также индуцируют адаптивный иммунный ответ типов Th1 и Th17 у мышей [80–82]. Также белки *B. abortus* используются в качестве адьювантов в разрабатываемых вакцинах против цистицеркоза (бруцеллезный белок BLS), сальмонеллеза (U-Omp19) и HPV-16 L1VLP (ЛПС) у мышей [81–83]. Также адьювантная способность флагеллинов, стимулирующих врожденный иммунитет через активацию TLR5, продемонстрирована во многих исследованиях [84, 85].

Включение в состав мультиантигенных вакцин хорошо изученных белков, в том числе обладающих адьювантными свойствами, а также «новых», вычисленных с помощью методов биоинформатики, антигенов может стать ключом к созданию эффективной вакцины против бруцеллеза.

Согласно проведенным расчетам, кроме соответствующего всем критериям отбора белка LptD, высоким вакцинным потенциалом против бруцеллеза могут также обладать такие белки, как WP\_002964462.1 (BhuA), WP\_002965367.1 (Omp25d), WP\_002965368.1 (Omp25c), WP\_002967184.1 (FlgH), WP\_002966644.1 (FlgE), WP\_002969598.1 (AlgEfp) и WP\_002963597.1 (MliCfp).

## Заключение

В настоящем исследовании был проведен биоинформатический анализ 45 предсказанных поверхностных белков бруцелл с использованием 24 компьютерных программ и

нескольких баз данных с целью выявления наиболее перспективных кандидатов для вакцин. По данным анализа *in silico* наибольшим потенциалом в качестве вакцинного препарата против бруцеллеза обладает ЛПС-сборочный белок внешней мембраны бруцелл LptD. Валидация иммуногенных свойств рекомбинантных иммунодоминантных белков бруцелл и их эпитопов (в составе мультиэпитопных вакцин) *in vivo* будет являться целью дальнейших исследований.

#### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания по НИОКР 3.1.2.

#### Financial support

The publication was carried out within the framework of the state assignment for R&D 3.1.2.

#### Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

#### Conflict of interest

Author declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

#### Литература / References

1. Бруцеллёз. Современное состояние проблемы. Под ред. Г.Г.Онищенко, А.Н.Куличенко. Ставрополь: ООО «Губерния»; 2019, 336 с. / Brucellosis. The current state of the problem. Edited by Onishchenko GG, Kulichenko AN. Stavropol: "Gubernia" Publ., 2019, 336 p. (In Russian).
2. Воробьев АА, Егорова НБ, Захарова НС, Курбатова ЕА, Семенов БФ, и др. Прогноз в области создания вакцин нового поколения для вакцинопрофилактики и вакцинотерапии инфекционных и неинфекционных болезней. Пульмонология. 2005;(6):15-36. DOI: 10.18093/0869-0189-2005-0-6-15-36 / Vorobyev AA, Egorova NB, Zakharova NS, Kurbatova EA, Semenov BF, et al. Prognosis of development of future vaccine generations for prevention and therapy of infectious and non-infectious diseases. Pulmonologiya. 2005;(6):15-36. DOI: 10.18093/0869-0189-2005-0-6-15-36 (In Russian).
3. Lalsiamthara J, Lee JH. Development and trial of vaccines against *Brucella*. J Vet Sci. 2017 Aug 31;18(S1):281-290. DOI: 10.4142/jvs.2017.18.S1.281
4. Дятлова ВИ. Состояние проблемы разработки новых вакцин против бруцеллеза. Бактериология. 2019;4(4):29-41. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-29-41 / Dyatlova VI Status of the problem of developing new anti-brucellosis vaccines. Bacteriology. 2019;4(4):29-41. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-29-41 (In Russian).
5. Avila-Calderón ED, Lopez-Merino A, Jain N, Peralta H, López-Villegas EO, Sriranganathan N, et al. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. Clin Dev Immunol. 2012;2012:352493. DOI: 10.1155/2012/352493
6. Pasquevich KA, Ibañez AE, Coria LM, García Samartino C, Estein SM, Zwerdling A, et al. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. PLoS One. 2011 Jan 14;6(1):e16203. DOI: 10.1371/journal.pone.0016203
7. Pasquevich KA, García Samartino C, Coria LM, Estein SM, Zwerdling A, Ibañez AE, et al. The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells *in vivo*, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuncting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. J Immunol. 2010 May 1;184(9):5200-12. DOI: 10.4049/jimmunol.0902209
8. Tadepalli G, Singh AK, Balakrishna K, Murali HS, Batra HV. Immunogenicity and protective efficacy of *Brucella abortus* recombinant protein cocktail (rOmp19+rP39) against *B. abortus* 544 and *B. melitensis* 16M infection in murine model. Mol Immunol. 2016 Mar;71:34-41. DOI: 10.1016/j.molimm.2016.01.001
9. Yu DH, Hu XD, Cai H. A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against *Brucella abortus* 2308 by inducing specific CTL responses. DNA Cell Biol. 2007 Jun;26(6):435-43. DOI: 10.1089/dna.2006.0552
10. María RR, Arturo CJ, Alicia JA, Paulina MG, Gerardo AO. The Impact of Bioinformatics on Vaccine Design and Development. Vaccines. InTech. 2017. DOI: 10.5772/intechopen.69273
11. Rappuoli R, De Gregorio E, Del Giudice G, Phogat S, Pecetta S, Pizza M, Hanon E. Vaccinology in the post-COVID-19 era. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Jan 19;118(3):e2020368118. DOI: 10.1073/pnas.2020368118
12. Massignani V, Pizza M, Moxon ER. The Development of a Vaccine Against Meningococcus B Using Reverse Vaccinology. Front Immunol. 2019 Apr 16;10:751. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00751
13. Pizza M, Scarlato V, Massignani V, Giuliani MM, Aricò B, Comanducci M, et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. Science. 2000 Mar 10;287(5459):1816-20. DOI: 10.1126/science.287.5459.1816
14. Vernikos G, Medini D. Bexsero® chronicle. Pathog Glob Health. 2014 Oct;108(7):305-16. DOI: 10.1179/2047773214Y.0000000162
15. Mbaeyi SA, Bozio CH, Duffy J, Rubin LG, Hariri S, Stephens DS, MacNeil JR. Meningococcal Vaccination: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, United States, 2020. MMWR Recomm Rep. 2020 Sep 25;69(9):1-41. DOI: 10.15585/mmwr.rr6909a1
16. Bibi S, Ullah I, Zhu B, Adnan M, Liaqat R, Kong WB, Niu S. In silico analysis of epitope-based vaccine candidate against tuberculosis using reverse vaccinology. Sci Rep. 2021 Jan 13;11(1):1249. DOI: 10.1038/s41598-020-80899-6
17. Leow CY, Kazi A, Hisyam Ismail CMK, Chuah C, Lim BH, Leow CH, et al. Reverse vaccinology approach for the identification and characterization of outer membrane proteins of *Shigella flexneri* as potential cellular- and antibody-dependent vaccine candidates. Clin Exp Vaccine Res. 2020 Jan;9(1):15-25. DOI: 10.7774/cevr.2020.9.1.15
18. Meunier M, Guyard-Nicodème M, Hirschaud E, Parra A, Chemaly M, Dory D. Identification of Novel Vaccine Candidates against *Campylobacter* through Reverse Vaccinology. J Immunol Res. 2016;2016:5715790. DOI: 10.1155/2016/5715790
19. Shahid F, Ashraf ST, Ali A. Reverse Vaccinology Approach to Potential Vaccine Candidates Against *Acinetobacter baumannii*. Methods Mol Biol. 2019;1946:329-336. DOI: 10.1007/978-1-4939-9118-1\_29
20. Soltan MA, Magdy D, Solyman SM, Hanora A. Design of *Staphylococcus aureus* New Vaccine Candidates with B and T Cell Epitope Mapping, Reverse Vaccinology, and Immunoinformatics. OMICS. 2020 Apr;24(4):195-204. DOI: 10.1089/omi.2019.0183
21. Enayatkhani M., Hasaniazad M., Faezi S., Gouklani H., Davoodian P, et al. Reverse vaccinology approach to design a novel multi-epitope vaccine candidate against COVID-19: an *in silico* study, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2021,39(8):2857-72. DOI: 10.1080/07391102.2020.1756411
22. Ong E, Wong MU, Huffman A, He Y. COVID-19 Coronavirus Vaccine Design Using Reverse Vaccinology and Machine Learning. Front Immunol. 2020 Jul 3;11:1581. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01581
23. Eftekhari MG. Prediction of protein subcellular localization using deep learning and data augmentation. bioRxiv 2020.05.19.068122. DOI: 10.1101/2020.05.19.068122
24. Lau WYV, Hoad GR, Jin V, Winsor GL, Madyan A, Gray KL, et al. PSORTdb 4.0: expanded and redesigned bacterial and archaeal protein subcellular localization database incorporating new secondary localizations. Nucleic Acids Res. 2021 Jan 8;49(D1):D803-D808. doi: 10.1093/nar/gkaa1095

25. Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins*. 2006 Aug 15;64(3):643-51. DOI: 10.1002/prot.21018
26. He Y, Xiang Z, Mobley HL. Vaxign: the first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:297505. DOI: 10.1155/2010/297505
27. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;215(3):403-10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
28. Shende G, Haldankar H, Barai RS, Bharmal MH, Shetty V, Idicula-Thomas S. PBIT: Pipeline Builder for Identification of drug Targets for infectious diseases. *Bioinformatics*. 2017 Mar 15;33(6):929-931. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw760
29. Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*. 2007 Jan 5;8:4. DOI: 10.1186/1471-2105-8-4
30. Garg A, Gupta D. VirulentPred: a SVM based prediction method for virulent proteins in bacterial pathogens. *BMC Bioinformatics*. 2008 Jan 28;9:62. DOI: 10.1186/1471-2105-9-62.
31. Gupta A, Kapil R, Dhakan DB, Sharma VK. MP3: a software tool for the prediction of pathogenic proteins in genomic and metagenomic data. *PLoS One*. 2014 Apr 15;9(4):e93907. DOI: 10.1371/journal.pone.0093907
32. Ong E, Wang H, Wong MU, Seetharaman M, Valdez N, He Y. Vaxign-ML: supervised machine learning reverse vaccinology model for improved prediction of bacterial protective antigens. *Bioinformatics*. 2020 May 1;36(10):3185-3191. DOI: 10.1093/bioinformatics/btaa119
33. Dimitrov I, Bangov I, Flower DR, Doytchinova I. AllerTOP v.2--a server for *in silico* prediction of allergens. *J Mol Model*. 2014 Jun;20(6):2278. DOI: 10.1007/s00894-014-2278-5
34. Andreatta M, Nielsen M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics*. 2016 Feb 15;32(4):511-7. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv639
35. Hisham Y, Ashhab Y, Hwang SH, Kim DE. Identification of Highly Conserved SARS-CoV-2 Antigenic Epitopes with Wide Coverage Using Reverse Vaccinology Approach. *Viruses*. 2021 Apr 28;13(5):787. DOI: 10.3390/v13050787.
36. Jensen KK, Andreatta M, Marcantili P, Buus S, Greenbaum JA, Yan Z, et al. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology*. 2018 Jul;154(3):394-406. DOI: 10.1111/imm.12889
37. Calis JJ, Maybeno M, Greenbaum JA, Weiskopf D, De Silva AD, Sette A, Keşmir C, Peters B. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. *PLoS Comput Biol*. 2013 Oct;9(10):e1003266. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003266
38. Gene Ontology Consortium. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;43(Database issue):D1049-56. DOI: 10.1093/nar/gku1179
39. Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan 8;49(D1):D605-D612. DOI: 10.1093/nar/gkaa1074. Erratum in: *Nucleic Acids Res*. 2021 Oct 11;49(18):10800.
40. Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*. 1998;6:175-82.
41. Hayat S, Peters C, Shu N, Tsigirigos KD, Elofsson A. Inclusion of dyad-repeat pattern improves topology prediction of transmembrane  $\beta$ -barrel proteins. *Bioinformatics*. 2016 May 15;32(10):1571-3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw025
42. Ong E, Wong MU, He Y. Identification of New Features from Known Bacterial Protective Vaccine Antigens Enhances Rational Vaccine Design. *Front Immunol*. 2017 Oct 26;8:1382. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01382
43. Almagro Armenteros JJ, Tsigirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol*. 2019 Apr;37(4):420-423. DOI: 10.1038/s41587-019-0036-z
44. Teufel F, Almagro Armenteros JJ, Johansen AR, Gislason MH, Pihl SI, et al. SignalP 6.0 achieves signal peptide prediction across all types using protein language models. *bioRxiv* 2021.06.09.447770. DOI: 10.1101/2021.06.09.447770
45. Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*. 2003 Jul 1;31(13):3784-8. DOI: 10.1093/nar/gkg563
46. Ferré F, Clote P. DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jul 1;34(Web Server issue):W182-5. DOI: 10.1093/nar/gkl189
47. Magnan CN, Randall A, Baldi P. SOLpro: accurate sequence-based prediction of protein solubility. *Bioinformatics*. 2009 Sep 1;25(17):2200-7. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp386
48. Hebditch M, Carballo-Amador MA, Charonis S, Curtis R, Warwicker J. Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinformatics*. 2017 Oct 1;33(19):3098-3100. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx345
49. Luo H, Lin Y, Gao F, Zhang CT, Zhang R. DEG 10, an update of the database of essential genes that includes both protein-coding genes and noncoding genomic elements. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(Database issue):D574-80. DOI: 10.1093/nar/gkt1131.
50. Малхазова СМ, Миронова ВА, Пестина ПВ, Орлов ДС. Новые и возвращающиеся инфекции в России: медико-географический аспект. *Вестник Московского университета. Серия 5, География*. 2016;5:24-32. / Malkhazova SM, Mironova VA, Pestina PV, Orlov DS. Emerging and re-emerging infections in Russia: a medico-geographical aspect. *Moscow University Bulletin. Series 5, Geography*. 2016;5:24-32. (In Russian).
51. Haider N, Rothman-Ostrow P, Osman AY, Arruda LB, Macfarlane-Berry L, Elton L, et al. COVID-19-Zoonosis or Emerging Infectious Disease? COVID-19-Zoonosis or Emerging Infectious Disease? *Front Public Health*. 2020 Nov 26;8:596944. DOI: 10.3389/fpubh.2020.596944
52. Dorneles EM, Teixeira-Carvalho A, Araújo MS, Sriranganathan N, Lage AP. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. *Vaccine*. 2015 Jul 17;33(31):3659-66. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.05.057
53. Zhang P. Autoantibodies and anti-microbial antibodies: Homology of the protein sequences of human autoantigens and the microbes with implication of microbial etiology in autoimmune diseases. *BioRxiv* 403519. DOI: 10.1101/403519
54. Оганезова ИА. Кишечная микробиота и иммунитет: иммуномодулирующие эффекты *Lactobacillus rhamnosus* GG. *PMЖ*. 2018;9:39-44. / Oganezova IA. Intestinal microbiota and immunity: immunomodulatory effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *RMJ (Russian Medical Journal)*. 2018;9:39-44. (In Russian).
55. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017 May 16;474(11):1823-1836. DOI: 10.1042/BCJ20160510
56. Dey AK, Malyala P, Singh M. Physicochemical and functional characterization of vaccine antigens and adjuvants. *Expert Rev Vaccines*. 2014 May;13(5):671-85. DOI: 10.1586/14760584.2014.907528
57. Halling-Brown M, Sansom CE, Davies M, Titball RW, Moss DS. Are bacterial vaccine antigens T-cell epitope depleted? *Trends Immunol*. 2008 Aug;29(8):374-9. DOI: 10.1016/j.it.2008.06.001
58. Low KO, Jonet MA, Ismail NF, Illias RM. Optimization of a *Bacillus* sp signal peptide for improved recombinant protein secretion and cell viability in *Escherichia coli*: Is there an optimal signal peptide design? *Bioengineered*. 2012 Nov-Dec;3(6):334-8. DOI: 10.4161/bioe.21454
59. Kovjazin R, Carmon L. The use of signal peptide domains as vaccine candidates. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(9):2733-40. DOI: 10.4161/21645515.2014.970916
60. Vataki D, McMillan M. The signal peptide sequence impacts the immune response elicited by a DNA epitope vaccine. *Clin Vaccine Immunol*. 2011 Oct;18(10):1776-80. DOI: 10.1128/CVI.05179-11

61. Jong WS, Vikström D, Houben D, van den Berg van Saparoea HB, de Gier JW, Luijck J. Application of an *E. coli* signal sequence as a versatile inclusion body tag. *Microb Cell Fact*. 2017 Mar 21;16(1):50. DOI: 10.1186/s12934-017-0662-4
62. Diaz AA, Tomba E, Lennarson R, Richard R, Bagajewicz MJ, Harrison RG. Prediction of protein solubility in *Escherichia coli* using logistic regression. *Biotechnol Bioeng*. 2010 Feb 1;105(2):374-83. DOI: 10.1002/bit.22537
63. Ghosh S, Rasheedi S, Rahim SS, Banerjee S, Choudhary RK, Chakhaiyar P, Ehtesham NZ, Mukhopadhyay S, Hasnain SE. Method for enhancing solubility of the expressed recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechniques*. 2004 Sep;37(3):418, 420, 422-3. DOI: 10.2144/04373ST07
64. Rajendhran J. Genomic insights into *Brucella*. *Infect Genet Evol*. 2021 Jan;87:104635. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104635
65. Rouzic N, Desmier L, Cariou ME, Gay E, Foster JT, Williamson CHD, et al. First Case of Brucellosis Caused by an Amphibian-type *Brucella*. *Clin Infect Dis*. 2021 May 4;72(9):e404-e407. DOI: 10.1093/cid/ciaa1082
66. Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Bollen AW, Wong JD, Grace EM, McDonald WC. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg Infect Dis*. 2003 Apr;9(4):485-8. DOI: 10.3201/eid0904.020576
67. Punta M, Coghill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*. 2012;40(D1):D290-D301. DOI: 10.1093/nar/gkr1065
68. Botos I, Majdalani N, Mayclin SJ, McCarthy JG, Lundquist K, Wojtowicz D, et al. Structural and Functional Characterization of the LPS Transporter LptDE from Gram-Negative Pathogens. *Structure*. 2016 Jun 7;24(6):965-976. DOI: 10.1016/j.str.2016.03.026
69. Dong H, Xiang Q, Gu Y, Wang Z, Paterson NG, Stansfeld PJ, He C, Zhang Y, Wang W, Dong C. Structural basis for outer membrane lipopolysaccharide insertion. *Nature*. 2014 Jul 3;511(7507):52-6. DOI: 10.1038/nature13464
70. Zha Z, Li C, Li W, Ye Z, Pan J. LptD is a promising vaccine antigen and potential immunotherapeutic target for protection against *Vibrio* species infection. *Sci Rep*. 2016 Dec 6;6:38577. DOI: 10.1038/srep38577
71. Cassataro J, Velikovskiy CA, Bruno L, Estein SM, de la Barrera S, Bowden R, et al. Improved immunogenicity of a vaccination regimen combining a DNA vaccine encoding *Brucella melitensis* outer membrane protein 31 (Omp31) and recombinant Omp31 boosting. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 Jul;14(7):869-74. DOI: 10.1128/CVI.00472-06
72. Goel D, Bhatnagar R. Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects Balb/c mice from virulent *B. abortus* 544. *Mol Immunol*. 2012 Jun;51(2):159-68. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.02.126
73. Golshani M, Rafati S, Nejati-Moheimani M, Ghasemian M, Bouzari S. Comparison of potential protection conferred by three immunization strategies (protein/protein, DNA/DNA, and DNA/protein) against *Brucella* infection using Omp2b in BALB/c Mice. *Vet Microbiol*. 2016 Dec 25;197:47-52. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.10.027
74. Gomez G, Pei J, Mwangi W, Adams LG, Rice-Ficht A, Ficht TA. Immunogenic and invasive properties of *Brucella melitensis* 16M outer membrane protein vaccine candidates identified via a reverse vaccinology approach. *PLoS One*. 2013;8(3):e59751. DOI: 10.1371/journal.pone.0059751
75. Hop HT, Arayan LT, Huy TXN, Reyes AWB, Min W, Lee HJ, et al. Immunization of BALB/c mice with a combination of four recombinant *Brucella abortus* proteins, AspC, Dps, InpB and Ndk, confers a marked protection against a virulent strain of *Brucella abortus*. *Vaccine*. 2018 May 17;36(21):3027-3033. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.04.019
76. Paul S, Peddayalachagiri BV, Nagaraj S, Kingston JJ, Batra HV. Recombinant outer membrane protein 25c from *Brucella abortus* induces Th1 and Th2 mediated protection against *Brucella abortus* infection in mouse model. *Mol Immunol*. 2018 Jul;99:9-18. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.04.002
77. Pnulley JT, Anderson ES, Roop RM 2<sup>nd</sup>. *Brucella abortus* requires the heme transporter BhuA for maintenance of chronic infection in BALB/c mice. *Infect Immun*. 2007 Nov;75(11):5248-54. DOI: 10.1128/IAI.00460-07
78. Sadeghi Z, Fasihi-Ramandi M, Azizi M, Bouzari S. Mannosylated chitosan nanoparticles loaded with FliC antigen as a novel vaccine candidate against *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* infection. *J Biotechnol*. 2020 Feb 20;310:89-96. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2020.01.016
79. Vishnu US, Sankarasubramanian J, Gunasekaran P, Rajendhran J. Novel Vaccine Candidates against *Brucella melitensis* Identified through Reverse Vaccinology Approach. *OMICS*. 2015 Nov;19(11):722-9. DOI: 10.1089/omi.2015.0105
80. Li JY, Liu Y, Gao XX, Gao X, Cai H. TLR2 and TLR4 signaling pathways are required for recombinant *Brucella abortus* BCSP31-induced cytokine production, functional upregulation of mouse macrophages, and the Th1 immune response *in vivo* and *in vitro*. *Cell Mol Immunol*. 2014 Sep;11(5):477-94. DOI: 10.1038/cmi.2014.28
81. Risso GS, Carabajal MV, Bruno LA, Ibañez AE, Coria LM, Pasquevich KA, et al. U-Omp19 from *Brucella abortus* Is a Useful Adjuvant for Vaccine Formulations against *Salmonella* Infection in Mice. *Front Immunol*. 2017 Feb 17;8:171. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00171
82. Rosas G, Fragoso G, Ainciart N, Esquivel-Guadarrama F, Santana A, Bobes RJ, et al. *Brucella* spp. lumazine synthase: a novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity. *Microbes Infect*. 2006 Apr;8(5):1277-86. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.12.006
83. Kianmehr Z, Soleimanjahi H, Ardestani SK, Fotouhi F, Abdoli A. Influence of *Brucella abortus* lipopolysaccharide as an adjuvant on the immunogenicity of HPV-16 L1VLP vaccine in mice. *Med Microbiol Immunol*. 2015 Apr;204(2):205-13. DOI: 10.1007/s00430-014-0356-z
84. Cui B, Liu X, Fang Y, Zhou P, Zhang Y, Wang Y. Flagellin as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*. 2018 Apr;17(4):335-349. DOI: 10.1080/14760584.2018.1457443
85. Hajam IA, Dar PA, Shah Nawaz I, Jaime JC, Lee JH. Bacterial flagellin—a potent immunomodulatory agent. *Exp Mol Med*. 2017 Sep 1;49(9):e373. DOI: 10.1038/emmm.2017.172