

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

Marcelo Silva Folhas Damas

**Desenvolvimento de vacina contra o patógeno emergente *Serratia marcescens*
utilizando análises bioinformáticas de vacinologia reversa**

São Carlos-SP

2022

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

Marcelo Silva Folhas Damas

**Desenvolvimento de vacina contra o patógeno emergente *Serratia marcescens*
utilizando análises bioinformáticas de vacinologia reversa**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
junto à Universidade Federal de São Carlos
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius

São Carlos-SP

2022

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Sandra, meu padrasto, Adavil e meus irmãos, Fabricio e Felipe, que sempre me apoiaram nas minhas decisões, sempre estiveram presentes, sempre me respeitaram e sempre auxiliaram no que precisei.

À minha querida orientadora, Prof.^a Dra. Maria Cristina Pranchevicius, por me conceder minha primeira oportunidade no mundo acadêmico, por ser uma ótima mentora e auxiliar no meu caminho como pesquisador, por ser uma excelente amiga.

Aos meus amigos, Juliana, Pietra, Gilberto e Aline, que me fizeram companhia, que compartilhei minhas dores e minhas alegrias, obrigado por estarem sempre comigo.

Ao meu namorado, Guilherme, minha cunhada, Laura e meus sogros, Maria e Douglas, por me receberem na família de vocês de braços abertos.

À FAPESP, pelo seu auxílio financeiro sem o qual eu não teria desenvolvido este projeto.

Ao Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha, Prof. Dr. Iran Malavazi, por terem cedido espaço em seus laboratórios, pela compreensão que tiveram comigo em meu aprendizado.

Aos meus colegas de laboratório, por me auxiliarem, me ensinarem e pelas boas conversas.

RESUMO

Serratia marcescens é uma bactéria gram-negativa patogênica nosocomial oportunista com resistência intrínseca e adquirida a diversas classes de antibióticos. Vacinas são um meio eficiente, rápido e com o melhor custo-benefício para proteger de uma variedade de doenças graves e de suas complicações. A abordagem de Vacinologia Reversa permite a identificação de potenciais alvos de vacina através de análises computacionais, reduzindo o tempo e dinheiro gastos em relação às abordagens tradicionais. Neste estudo, a abordagem de vacinologia reversa e subtração proteômica foi realizada contra 49 proteomas de *S. marcescens* depositados no NCBI para a identificação de potenciais alvos de vacina. Um total de 5 proteínas eram conservadas entre as cepas, tinham perfil de essencialidade, resistência ou virulência e se encontravam na porção extracelular da bactéria, além de serem antigênicas. Destas proteínas, foram identificados 7, 16 e 12 epítomos de MHC-I, MHC-II e células B, respectivamente, considerados antigênicos, imunogênicos, conservados, hidrofílicos, não tóxicos e não alergênicos. Esses epítomos de MHC-I, MHC-II e de células B foram selecionados e ligados através de *linkers* entre si e com adjuvantes, compondo 4 modelos de vacina, denominados SMV1, SMV2, SMV3 e SMV4. A estrutura secundária e terciária dos modelos de vacina foram analisadas, assim como sua antigenicidade, toxicidade, alergenicidade e hidrofiliabilidade. Os modelos foram *dockados* com o complexo TLR4-MD2. O modelo SMV4, que possuía o adjuvante de proteína ribossomal 50s L7/L12 apresentou a melhor afinidade de ligação. Em seguida, a vacina SMV4 foi analisada para a identificação de epítomos conformacionais de linfócitos B e utilizada em duas simulações: uma simulação molecular de dinâmica e uma simulação imune. Análises *in silico* de tradução reversa, adaptação de códons e clonagem através do vetor pET-28a (+) foram realizadas, e a construção mostrou-se estável para futuras análises de expressão em *E. coli* K12. Embora, a vacina SMV4 se mostra como um candidato promissor, mais estudos laboratoriais para definir sua real segurança e eficácia são necessários.

Palavras-chave: *Serratia marcescens*. Vacinologia Reversa. Resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Serratia marcescens is a nosocomial opportunistic gram-negative bacterium with intrinsic and acquired resistance to several antibiotic classes. Vaccines are an efficient, fast way to improve public health with a great cost-benefit. Reverse Vaccinology allows the identification of potential vaccine targets through computational analysis, reducing time and money spent in vaccine development. In this study, Reverse Vaccinology and Subtractive Proteomics were utilized to identify potential vaccine targets of 49 *S. marcescens* proteomes recovered from NCBI. Five proteins were conserved between strains and were associated with essential, resistance or virulence functions. Those proteins were present in the extracellular environment and were antigenic. A total of 7, 16 and 12 MHC-I, MHC-II and B cell epitopes, respectively, were identified from those 5 proteins. These epitopes were antigenic, immunogenic, conserved, hydrophilic, nontoxic, and non-allergenic. The MHC-I epitopes, 12 MHC-II epitopes and 12 B cell epitopes were conjugated among themselves and with adjuvants with the help of linkers, creating four vaccine constructs. The secondary and tertiary structure of the vaccine constructs were analyzed, along with their antigenicity, toxicity, allergenicity and hydrophobicity. All the four models were docked Against TLR4-MD2 complex and the SMV4 model, which had the 50s ribosomal protein L7/L12 had the better binding affinity. The protein was *in silico* reverse-translated and was codon adapted to *E. coli* K12. The protein was also *in silico* cloned in the vector pET-28a (+). Although SMV4 is a promising vaccine candidate, further experimental validation is necessary to confirm its safety and efficacy.

Key words: *Serratia marcescens*. Reverse Vaccinology. Antimicrobial Resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Infecções comuns por <i>S. marcescens</i>	10
Figura 2. Mecanismos de resistência	12
Figura 3. Bomba de efluxo RND genérica	14
Figura 4. Propriedades dos fatores de virulência	15
Figura 5. Representação da construção de vacina	25
Figura 6. Quantidade de proteínas essenciais, de virulência e de resistência	30
Figura 7. Estrutura secundária de cada construção de vacina	40
Figura 8. Características e estruturas das construções de vacina.....	41
Figura 9. Validação da estrutura tridimensional da proteína.....	42
Figura 10. Características do <i>docking</i> molecular de SMV4 com o complexo TLR4-MD2 e estrutura do complexo <i>dockado</i>	43
Figura 11. Simulação molecular dinâmica do complexo SMV4-TLR2-MD2.....	44
Figura 12. Epítomos descontínuos de células B presentes em SMV4.....	45
Figura 13. Simulação imune de SMV4	46
Figura 14. Vetor de expressão pET28A (+) contendo SMV4.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de cepas de <i>S. marcescens</i> usadas no estudo.....	28
Tabela 2. Características das 5 proteínas selecionadas para análise de identificação de epítomos.....	32
Tabela 3. Epítomos de MHC-I considerados e suas características	34
Tabela 4. Epítomos de MHC-II considerados e suas características	35
Tabela 5. <i>Docking</i> molecular dos epítomos de MHC-I	35
Tabela 6. <i>Docking</i> molecular dos epítomos de MHC-II	36
Tabela 7. Epítomos de células B e suas características	37
Tabela 8. Construções de vacina e suas características	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 <i>Serratia marcescens</i>	9
1.1.1 Resistência antimicrobiana de <i>S. marcescens</i>	11
1.1.2 Mecanismos de virulência de <i>S. marcescens</i>	15
1.2 Vacinas	16
2 OBJETIVO GERAL	19
2.1 Objetivos específicos	19
3 METODOLOGIA	20
3.1 Coleção de proteomas e identificação de proteínas conservadas	20
3.2 Identificação de proteínas essenciais, fatores de virulência e proteínas associadas com resistência	20
3.3 Subtração de proteínas homólogas a microbiota intestinal e a proteínas humanas	21
3.4 Predição de localização subcelular	21
3.5 Análise de propriedades físico-químicas e antigenicidade das proteínas	21
3.6 Identificação de hélices trans-membranas e caminhos secretórios	21
3.7 Caminhos metabólicos unicamente associados ao patógeno e análise de funcionalidade proteica	22
3.8 Predição de epítomos de células T e de células B	22
3.9 Determinação da imunogenicidade de epítomos de MHC-I	23
3.10 Antigenicidade, toxicidade e alergenicidade dos peptídeos selecionados	23
3.11 Conservação, hidrofobicidade e indução de IFN-γ dos peptídeos selecionados	23
3.12 Modelagem tridimensional dos peptídeos selecionados e <i>docking</i> molecular	24
3.13 Construção de vacinas	24
3.14 Antigenicidade, alergenicidade solubilidade e propriedades físico-químicas dos constructos de vacina	25
3.15 Clivagem peptídica dos epítomos nos constructos de vacina	25
3.16 Predição de estrutura secundária e terciária dos constructos de vacina	25
3.17 Refinamento e validação dos constructos de vacina	25
3.18 <i>Docking</i> proteína-proteína	26
3.19 Simulação de dinâmica molecular	26
3.20 Epítomos descontínuos de células B	26
3.21 Simulação imune do constructo de vacina	26
3.22 Adaptação de códon e clonagem in silico	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Coleção de dados iniciais	28

SUMÁRIO - CONTINUAÇÃO

4.2 Identificação de proteínas essenciais, fatores de virulência e proteínas de resistência	29
4.3 Localização subcelular e caracterização das proteínas selecionadas	31
4.4 Predição, análise e caracterização dos epítomos de MHC-I e MHC-II	33
4.5 Modelagem tridimensional dos epítomos e <i>docking</i> molecular	35
4.6 Identificação e caracterização dos epítomos lineares de células B	36
4.7 Construção de sequência e caracterização das vacinas.....	37
4.8 Predição de estrutura secundária e modelagem tridimensional, refinamento e validação das vacinas.....	39
4.9 <i>Docking</i> proteína-proteína e simulação molecular dinâmica	42
4.10 Análise de epítomos descontínuos de células B e simulação imune de eficiência	44
4.11 Adaptação de códon e clonagem in silico.....	46
5 CONCLUSÃO.....	48
6 REFERÊNCIAS	49
7 ARTIGO EM PRELO	59

1 INTRODUÇÃO

Os resultados obtidos no trabalho descrito adiante geraram um artigo científico internacional intitulado “*A systematic Immuno-Informatic Approach to Design a Multiepitope-Based Vaccine Against Emerging Multiple Drug Resistant Serratia marcescens*”, publicado na revista *Frontiers in Immunology*, (Fator de Impacto: 8.786), em 2022, sob o DOI: **10.3389/fimmu.2022.768569**.

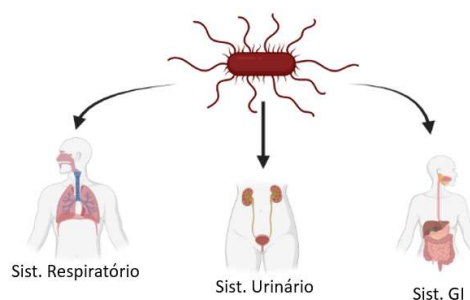
Os antibióticos foram responsáveis por uma grande revolução na medicina a partir da segunda metade do século 20, tratando diversas infecções ocasionadas por bactérias até então incuráveis e se tornando rotineiramente utilizados na prática médica (HUEMER et al., 2020). Concomitantemente com o aumento do uso de antibióticos, a resistência antimicrobiana (AMR) surgiu e se disseminou, e, infelizmente, não foi acompanhada pelo surgimento de novos antibióticos, causando um grande risco de falha de tratamento, relapso e aumento da taxa de mortalidade dos pacientes. Essa situação ocasionou um grande problema de saúde pública, além de ser um grande desafio social e econômico para organizações globais (BLOOM et al., 2018; HUEMER et al., 2020; JANSEN; ANDERSON, 2018; MICOLI et al., 2021; MURRAY et al., 2022). Estima-se que até 2050, a resistência antimicrobiana causará 10 milhões de mortes e uma perda cumulativa de até \$100 trilhões, levando a Organização Mundial de Saúde (OMS) a direcionar seus esforços e traçar estratégias para a prevenção e combate à disseminação da AMR. Adicionalmente à descoberta por novos fármacos, busca-se o desenvolvimento de novas estratégias para o combate das bactérias AMR, como a produção de vacinas. (ASLAM et al., 2021; BLOOM et al., 2018; JANSEN; ANDERSON, 2018; LÓPEZ-SILES; CORRAL-LUGO; MCCONNELL, 2021; MICOLI et al., 2021).

1.1 *Serratia marcescens*

A espécie *Serratia marcescens* foi descoberta em 1819, na Itália, através de um evento conhecido como “polenta sangrenta”. Em julho de 1819, na região de Padua, uma onda de calor e umidade maior que o normal fez com que a polenta – um prato tradicional da região – adquirisse a coloração vermelha. As famílias camponesas acreditavam que este evento estava associado com espíritos malignos. A polícia foi chamada e enviou uma amostra para a Universidade de Padua, onde Bartolomeo Bizio, um farmacêutico, conseguiu cultivar a bactéria, erroneamente categorizando-a

como um fungo (MAHLEN, 2011). Atualmente, sabemos que se trata de uma enterobactéria em forma de bacilo, extremamente plástica, podendo sobreviver no solo, água e alimentos (como a polenta), além de ser capaz de infectar plantas, invertebrados e vertebrados, incluindo seres humanos (MAHLEN, 2011). Sua alta adaptabilidade a permite causar uma variedade de infecções, incluindo infecções respiratórias, urinárias, oculares e na pele, além de ser capaz de causar sepse e meningite em pacientes imunocomprometidos ou hospitalizados (**Figura 1**) (FERREIRA et al., 2020; KHANNA; KHANNA; AGGARWAL, 2013).

Figura 1. Infecções comuns por *S. marcescens*.



Fonte: Autoria própria.

Os principais fatores de risco para aquisição da infecção por *S. marcescens* parecem ser a baixa imunidade presente em neonatos, pacientes idosos ou imunocomprometidos; o tempo de estadia durante hospitalizações; má administração de antibióticos e utilização de equipamentos invasivos como cateteres venosos, intraperitoneais ou urinários, além de equipamentos de ventilação mecânica (CRISTINA; SARTINI; SPAGNOLO, 2019).

A utilização de antibióticos β -lactâmicos, como os carbapenêmicos, é preconizada para o tratamento de enterobactérias. No entanto, a disseminação de resistência aos antimicrobianos preconizados tem feito com que diversos surtos de infecção ocorram em hospitais. Até o momento, o melhor manejo clínico para enterobactérias resistentes não foi estabelecido, embora algumas abordagens como o tratamento com polimixinas, tigeciclina ou aminoglicosídeos e a combinação de drogas diferentes tenham sido propostas (TRECARCHI e TUMBARELLO, 2017). Estudos recentes mostram que a resistência a estes antibióticos de último recurso já está presente em

ambientes hospitalares, chegando a 35% dos isolados, em alguns casos (GIACOBBE, et al., 2015).

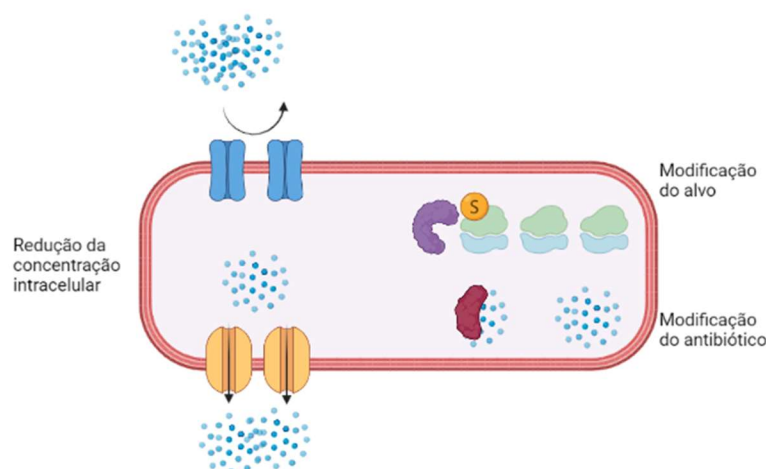
A espécie *S. marcescens* apresenta resistência intrínseca e adquirida a diversas classes de antibióticos, que dificultam seu tratamento (FERREIRA et al., 2020), além de fatores de virulência que permitem sua sobrevivência em equipamentos hospitalares, facilitam sua transmissão entre pacientes e facilitam a transferência horizontal de genes (SANDNER-MIRANDA et al., 2018). Diversos estudos demonstram um aumento no número de casos de infecções multirresistentes por cepas de *S. marcescens* ao redor do mundo, normalmente relacionados surtos em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), com prognóstico clínicos severos e uma alta taxa de mortalidade (ENGEL et al., 2009; FERREIRA et al., 2020; KHANNA; KHANNA; AGGARWAL, 2013; KIM et al., 2015; MORADIGARAVAND et al., 2016). Além disso, *S. marcescens* corresponde a 15% de todos os isolados de infecções nosocomiais em UTIs (GASTMEIER, et al., 2007). Neste contexto, *S. marcescens* se encontra na lista das 12 espécies prioritárias da Organização Mundial de Saúde de bactérias multirresistentes com maior ameaça à saúde humana e que exigem o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e profiláticas (Organização Mundial de Saúde, 2021).

1.1.1 Resistência antimicrobiana de *S. marcescens*

A espécie *S. marcescens* possui resistência intrínseca, isto é, codificada cromossomicamente, a diversos antibióticos como: penicilinas, cefalosporinas, macrolídeos, glicopeptídeos, rifampicina e colistina (CHEN et al., 2003; CRISTINA; SARTINI; SPAGNOLO, 2019; MAHLEN, 2011; PARENTE et al., 2016; RUIZ et al., 2003a). Além disso, é conhecida por ter adquirido resistência a tetraciclina, diversos agentes β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas e tetraciclinas (BARCHIESI et al., 2012; FERREIRA et al., 2020; HUANG et al., 2021; IGUCHI et al., 2014; KHANNA; KHANNA; AGGARWAL, 2013; MAHLEN, 2011; PARENTE et al., 2016).

Um patógeno pode se tornar resistente ao antimicrobiano através da redução da concentração intracelular da molécula, modificação do alvo de ação ou modificação/inativação da molécula (**Figura 2**) (BLAIR et al., 2015).

Figura 2. Mecanismos de resistência.



Fonte: Autoria própria.

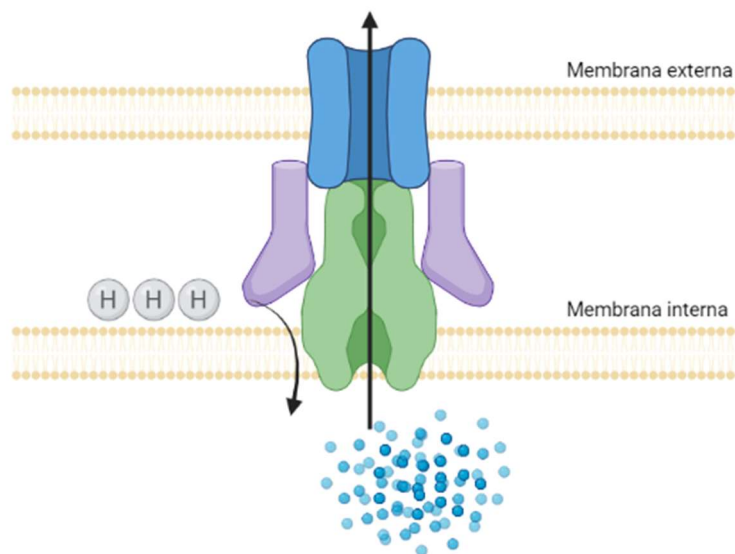
A redução da concentração intracelular do antibiótico pode ser atingida de duas principais formas: redução da permeabilidade de membrana e através de bombas de efluxo (MUNITA; ARIAS, 2016).

A entrada de moléculas hidrofílicas, incluindo antibióticos como β -lactâmicos, tetraciclinas e algumas fluoroquinolonas é severamente afetada por mudanças na permeabilidade de membrana de bactérias gram-negativas (PAGÈS; JAMES; WINTERHALTER, 2008). A mudança de permeabilidade celular ocorre principalmente por conta de modificações nas porinas, proteínas que atuam como canais de membrana (NIKAIDO, 2003; PAGÈS; JAMES; WINTERHALTER, 2008). Estas modificações incluem a mudança no tipo de porina expressa, diminuição do nível de expressão de porinas ou mutações que levam a perda de função da porina (NIKAIDO, 2003). Em *S. marcescens*, acredita-se que a perda de função de porinas esteja associada com um aumento de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, principalmente quando essa perda de função de porinas está combinada com a presença de β -lactamases (CAI et al., 2008; RUIZ et al., 2003b).

Bombas de efluxo consistem em um sistema proteico responsável pela extrusão da molécula antibiótica do meio celular, podendo ser substrato específico ou, mais comumente encontrado em bactérias MDR, com um amplo espectro de substratos (POOLE, 2005). Este mecanismo é responsável pela resistência de diversas classes de antimicrobianos, incluindo β -lactâmicos, carbapenêmicos, fluoroquinolonas e polimixinas (MUNITA; ARIAS, 2016). Interessantemente, os genes codificantes para

bombas de efluxo podem estar localizados em Elementos Genéticos Móveis (MGEs) ou no cromossomo bacteriano. Os MGEs são responsáveis por transferências horizontais de diversos genes, inclusive genes de resistência, entre diferentes microrganismos (FROST et al., 2005). Estas transferências horizontais podem ocorrer através 3 mecanismos diferentes: transformação (coleta de DNA do ambiente), transdução (transferência de DNA através de um vetor bacteriófago) e conjugação (transferência de DNA dependente de contato célula-célula, normalmente mediada por plasmídeos e transposons) (RANKIN; ROCHA; BROWN, 2011). Bombas de efluxo presentes no cromossomo bacteriano pode explicar a resistência intrínseca de algumas bactérias para diversas classes de antibióticos (MUNITA; ARIAS, 2016; POOLE, 2005). Bombas de efluxo são categorizadas conforme seu mecanismo de ação, sendo RND (*Resistance Nodulation Cell Division Superfamily*) a principal família de bombas de efluxo em bactérias gram-negativas, um sistema tripartite cuja força motriz para a extrusão de molecular parece ser o potencial eletroquímico de prótons (**Figura 3**) (TOBA et al., 2019). Em *S. marcescens*, 3 bombas de efluxo RND (*SdeAB*, *SdeCDE*, *SdeXY*) foram descritas, sendo associadas com resistência intrínseca a fluoroquinolonas, cloranfenicol, novobiocina, SDS e brometo de etídeo e baixa susceptibilidade a ciprofloxacina, tigeciclina, tetraciclina e cefpiroma (FERREIRA et al., 2020; TOBA et al., 2019). Além disso, um novo estudo demonstrou que a presença de uma bomba de efluxo homóloga a MacAB (bomba de efluxo tipo ABC) em *S. marcescens* diminuía a sensibilidade do patógeno a aminoglicosídeos e polimixinas e estava associada com motilidade e formação de biofilme (SHIRSHIKOVA et al., 2021).

Figura 3. Bomba de efluxo RND genérica.



Fonte: Autoria própria

A modificação do alvo de uma molécula antibiótica ocorre através de 4 principais mecanismos: proteção do sítio alvo, através da produção de pequenos peptídeos que se ligam ao sítio alvo de maneira competitiva; mutações pontuais no sítio alvo ou alterações enzimáticas no sítio alvo, dificultando a atuação do antibiótico; substituição do alvo original, por exemplo, ao utilizar proteínas homólogas para a mesma função molecular mas que não são inibidas pela molécula antimicrobiana (MUNITA; ARIAS, 2016).

A estratégia mais bem sucedida consiste na inativação (através de modificações como acetilação, fosforilação e adenilação) ou destruição da molécula antibiótica, impedindo-o de interagir com seu alvo (MUNITA; ARIAS, 2016). *S. marcescens* é conhecida por carregar genes de resistência que promovem a acetilação de antibióticos aminoglicosídicos ou fluoroquinolonas (FERREIRA et al., 2020; MORADIGARAVAND et al., 2016). O exemplo mais conhecido para a destruição de antibióticos talvez seja a produção de β -lactamases, enzimas presentes naturalmente em algumas bactérias e que desde a invenção da penicilina, tem se disseminado amplamente em diversos grupos taxonômicos (D’COSTA et al., 2011). Mais de 1000 β -lactamases já foram descritas na literatura e sua classificação é feita principalmente pelo sistema de Ambler, dividindo-as em 4 grupos (A, B, C e D) (BUSH, 2013).

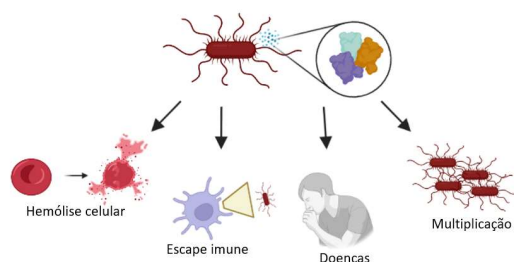
A classe A possui um grande leque de enzimas, incluindo penicilinas (capazes de hidrolisar apenas penicilinas, como TEM-1 e SHV-1), ESBLs ([*Extended-Spectrum*

Beta-Lactamases] como CTX-M) e carbapenemases como KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) (MUNITA; ARIAS, 2016). Enzimas ESBL são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de 3ª geração (sua principal característica) e monobactâmicos, mas possuem baixa atividade contra carbapenêmicos e cefamicinas (SIROT et al., 1987). Em contraste, carbapenemases são enzimas capazes de degradar carbanêmicos e são divididas em serino-carbapenemases e metallo-carbapenemases (TZOUVELEKIS et al., 2012). A classe B consiste em enzimas conhecidas como metallo- β -lactamases, pois utilizam íons metálicos como cofatores enzimáticos, e são bastante semelhantes com as carbapenemases da classe A (QUEENAN; BUSH, 2007). A classe C de β -lactamases confere resistência a todas as penicilinas e cefalosporinas (JACOBY, 2009), e a classe D possui uma grande variedade de enzimas, inicialmente diferenciada das penicilinas da classe A devido a sua capacidade de hidrolisar oxacilina (EVANS; AMYES, 2014). *S. marcescens* carrega um gene de AmpC, uma β -lactamase de classe C, em seu cromossomo, conferindo resistência intrínseca a penicilinas e cefalosporinas (MAHLEN, 2011). Sua resistência adquirida a demais classes de β -lactâmicos, como carbapenêmicos, se deve a aquisição de carbapenemases como KPC e os genes OXA (FERREIRA et al., 2020; HUANG et al., 2021).

1.1.2 Mecanismos de virulência de *S. marcescens*

Fatores de virulência consistem em um grande e variado grupo de moléculas produzidas por microrganismos patogênicos, como toxinas e enzimas hidrolíticas, que conferem a habilidade de burlar as defesas do hospedeiro, estimulam a proliferação bacteriana e causam doenças (**Figura 4**) (LEITÃO, 2020).

Figura 4. Propriedades dos fatores de virulência.



Fonte: Autoria própria.

Um caminho importante da patogênese de *S. marcescens* é o caminho RssAB-FlhDC-ShlBA. ShlA consiste numa hemolisina capaz de formar poros quando expressa junto com ShlB, responsável por sua ativação, sendo responsáveis por causar citotoxicidade em diversas células eucarióticas, incluindo células vermelhas do sangue, epiteliais e fibroblastos (SHIMUTA et al., 2009). FlhDC são responsáveis por controlar a biogênese flagelar, formação de biofilme, *swarming* e é responsável por regular positivamente a expressão de ShlBA, fazendo com que o patógeno se torne mais virulento ao ter FlhDC ativo (MAHLEN, 2011). O sistema bipartite RssAB é responsável por regular negativamente FlhDC, promovendo a formação de biofilme bacteriano, inibindo o *swarming* e reduzindo a quantidade de hemolisina produzida (MAHLEN, 2011). Outro fator de virulência importante de *S. marcescens* é a fosfolipase PhIA, responsável por perturbar as membranas celulares, resultando em hemólise e morte celular (SHIMUTA et al., 2009).

S. marcescens é capaz de realizar um movimento coletivo conhecido como *swarming*, um comportamento onde um grande grupo bacteriano se locomove sob uma superfície úmida, incluindo equipamentos médicos, aumentando a sobrevivência do grupo, diminuindo a eficácia de antibióticos e ativando outros fatores de virulência, incluindo hemolisinas (YANG et al., 2017). A formação de biofilme e a capacidade de *swarming* é dependente de um sistema de comunicação célula-célula, conhecido como QS (*Quorum Sensing*) (MAHLEN, 2011). Em *S. marcescens*, a comunicação célula-célula por QS ocorre principalmente através da expressão dos genes *swr*, que consistem em um sistema de QS semelhante ao sistema LuxIR (MAHLEN, 2011). O sistema LuxIR foi previamente descrito em *Vibrio fischeri*, e possui homólogos em diversas espécies de bactérias gram-negativas. O sistema utiliza moléculas N-acil homoserina lactonas (*Acyl-Homoserine Lactones*) para conseguir identificar a densidade populacional bacteriana no local (ABISADO et al., 2018).

1.2 Vacinas

A vacinação foi uma tecnologia revolucionária na medicina, salvando milhões de vidas ao longo de anos e que representa um dos meios mais eficientes, rápidos e com o melhor custo-benefício para melhorar a saúde pública, além de ser uma maneira plausível de erradicar diversas doenças infecciosas (LATA et al., 2018).

A história da vacinação data do final do século XVIII, com os experimentos de Jenner, que inoculava a varíola de vacas em humanos para conferir proteção contra a varíola humana (PLOTKIN, 2014). A atenuação de microrganismos virulentos consistiu a primeira ideia para o desenvolvimento de vacinas, seguido da inativação completa do microrganismo, através de morte induzida por calor ou tratamentos químicos, por exemplo (PLOTKIN, 2014). O desenvolvimento de estudos genômicos levaram ao surgimento de abordagens como a vacinologia reversa, a subtração proteômica e a modelagem de proteínas de interesse vacinal. As abordagens de vacinologia reversa e subtração proteômica são chamadas assim pois, ao contrário da metodologia tradicional, não exigem a cultura do microrganismo, apenas os dados genômicos do mesmo. São especialmente úteis para o desenvolvimento de vacinas proteicas ou de subunidades, pois permitem a identificação *in silico* de antígenos imunogênicos e alvos de drogas. Estas abordagens, além de reduzirem drasticamente o tempo e gasto econômico (Naz et al., 2020), garantem maior estabilidade e segurança durante o desenvolvimento de vacinas (MOXON; RECHE; RAPPUOLI, 2019). Isto é especialmente interessante pois as vacinas de subunidades contém diversos componentes imunogênicos específicos contra o patógeno e favorece o desenvolvimento de uma imunização mais ampla e eficiente contra o patógeno, além de auxiliar no problema de cobertura vacinal caso ocorram mutações no patógeno (RAHMAN et al., 2020). Além disso, vacinas que utilizam epítomos são responsáveis por desencadear respostas celulares e humorais mais eficientes (BIBI et al., 2021). A imunidade celular é mediada por linfócitos T auxiliares (*Helper T Lymphocytes*), responsáveis por desencadear as respostas imunes através de citocinas e por linfócitos T citotóxicos (*Cytotoxic T Lymphocytes*), responsáveis por eliminar células infectadas com patógenos (KRÖNKE et al., 1982). A imunidade humoral consiste na imunidade desenvolvida após o encontro de um antígeno com um linfócito B, resultando na produção de anticorpos, que irão facilitar a identificação e destruição do antígeno (KANELLOPOULOS; OJCIUS, 2019).

A primeira aplicação destas abordagens *in silico* foi para o desenvolvimento de uma vacina contra o sorogrupo B da bactéria *Neisseria meningitidis* (MenB) (PIZZA et al., 2000) e, deste então, tem sido utilizada para a identificação de numerosos candidatos de vacina contra patógenos bacterianos, incluindo *Mycoplasma pneumoniae* (RODRIGUES et al., 2019), *Pseudomonas aeruginosa* (SOLANKI; TIWARI; TIWARI,

2019), *Mycobacterium tuberculosis* (MONTERRUBIO-LÓPEZ; GONZÁLEZ-Y-MERCHAND; RIBAS-APARICIO, 2015) e *Acinetobacter baumannii* (SOLANKI; TIWARI, 2018).

O desenvolvimento de vacinas contra bactérias tem um longo histórico de falhas durante os últimos testes clínicos. Acredita-se que o principal desafio para o desenvolvimento de vacinas contra bactérias seja a alta variabilidade genética entre serotipos (BEKEREDJIAN-DING, 2020). No entanto, estudos e experimentos médicos prévios sugeriram que *S. marcescens* poderia ser utilizada para o desenvolvimento de vacinas. Field e colaboradores (FIELD; ALLEN; FRIEDMAN, 1970) realizaram um experimento de imunização em camundongos adultos com lipopolissacarídeos (LPS) antigênicos de *S. marcescens* e com os patógenos mortos por calor. Observaram uma rápida presença de células produtoras de anticorpos específicos contra o patógeno no baço, timo e nos linfonodos mesentéricos. Posteriormente, Kreger e colaboradores (KREGER et al., 1986) demonstraram que a severidade de doenças córneas induzidas por *S. marcescens* é consideravelmente reduzida através da imunização com endotoxinas lipopolissacarídeas ou com proteases da bactéria. Kumagai e colaboradores (KUMAGAI; OKADA; SAWAE, 1992) demonstraram que a proteção contra infecções experimentais de *S. marcescens* em camundongos podia ser atingida através da inoculação de amostras mortas com formalina ou de bactérias viáveis da mesma cepa, sugerindo que a imunidade humoral e celular estavam associadas com a proteção contra a infecção sistêmica causada pela bactéria.

Apesar destes estudos, atualmente não existe uma vacina comercial disponível para *S. marcescens*. Além disso, poucos estudos sistemáticos para a identificação de potenciais alvos de vacina contra o patógeno foram realizados.

2 OBJETIVO GERAL

Projetar uma vacina de subunidades contra *S. marcescens* através de abordagens computacionais, usando proteômica subtrativa e vacinologia reversa.

2.1 Objetivos específicos

- Coletar dados de sequenciamento completo de diversas cepas de *S. marcescens* depositadas no NCBI e identificar proteínas conservadas.
- Identificar proteínas essenciais, de resistência e de virulência, presentes no ambiente extracelular, com características antigênicas e de fácil purificação e que não possuam homologia com proteínas humanas ou da microbiota intestinal.
- Identificar epítomos de linfócitos B e de linfócitos T e analisar as características de imunogenicidade, antigenicidade, hidropaticidade, conservação, toxicidade, alergenicidade e indução de IFN- γ .
- Realizar o *docking* molecular dos epítomos de células T com diversos alelos de MHC para a seleção dos epítomos com maior afinidade a múltiplos alelos.
- Construir modelos de vacina e analisar sua antigenicidade, solubilidade, toxicidade, alergenicidade, ponto isoelétrico, estabilidade e sítios de clivagem proteossomal e de catepsinas.
- Identificar a estrutura secundária, realizar a modelagem tridimensional dos modelos e refinar os modelos produzidos.
- Realizar o *Docking* molecular dos modelos tridimensionais de vacina contra o complexo TLR4-MD2 e identificar o modelo com maior afinidade ao complexo.
- Realizar a simulação da dinâmica molecular, simulação da resposta imune e identificar os epítomos tridimensionais de linfócitos B do modelo de maior afinidade ao complexo TLR4-MD2.
- Realizar *in silico* a tradução reversa do modelo de maior afinidade ao complexo TLR4-MD2,
- Projetar *in silico* a adaptação de códons para *E. coli* e a clonagem do modelo no vetor pET-28a (+).

3 METODOLOGIA

Através da análise de diversos trabalhos científicos, a metodologia empregada consistiu na proteômica subtrativa e vacinologia reversa para identificar potenciais candidatos à vacina contra *S. marcescens*.

3.1 Coleção de proteomas e identificação de proteínas conservadas

As sequências proteômicas de 49 isolados de *S. marcescens* foram recolhidas do banco de dados do Projeto Genoma do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Destas 49 sequências, uma correspondia ao proteoma representativo da espécie (*Serratia marcescens* subsp. *Marcescens* Db11) e as demais sequências correspondiam a isolados associados com infecções humanas. A ferramenta de análise *Bacterial Pan Genome Analysis* (BPGA), versão 1.3, foi utilizada para identificar as proteínas conservadas.

3.2 Identificação de proteínas essenciais, fatores de virulência e proteínas associadas com resistência

As famílias proteicas conservadas dos 49 isolados foram utilizadas em uma análise de BLASTp (BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*, uma ferramenta utilizada para alinhar sequências com referência a banco de dados), utilizando os parâmetros de E-value $\leq 10^{-4}$ e *bitscore* ≥ 100 , contra o banco de dados *Database of Essential Genes* (DEG 10), fornecendo informação sobre a essencialidade de cada uma. Além disso, dois bancos de dados contendo informações sobre fatores de virulência (VFdb – *Virulence Factor database* e MvirDB – *Microbial virulence DataBase*) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/> e <http://mvirdb.lnl.gov/>) foram utilizados, seguindo os mesmos parâmetros, para identificação de potenciais fatores de virulência. Por último, uma análise de BLASTp, com parâmetros de E-value $\leq 10^{-4}$, contra dois bancos de dados contendo informações sobre proteínas associadas a resistência antibiótica: ARG-ANNOT (*Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation*) e CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*), foi realizada.

3.3 Subtração de proteínas homólogas a microbiota intestinal e a proteínas humanas

Proteínas identificadas como essenciais, de virulência ou associadas com resistência antimicrobiana foram filtradas quanto a sua homologia com proteínas pertencentes ao hospedeiro *Homo sapiens* (taxid:9606), através de um BLASTp, considerando um E-value $\leq 10^{-4}$. Um banco de dados de proteínas customizado, contendo informações sobre 79 espécies da microbiota intestinal humana foi utilizada para subtração de homólogos presentes no patógeno, utilizando um E-value $\leq 10^{-4}$ e cuja similaridade fosse maior que 50%. As proteínas identificadas como homólogas foram excluídas das análises futuras.

3.4 Predição de localização subcelular

Os servidores PSORTb v.3.02 (<https://www.psort.org/psortb/>) e CELLO v2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw>) foram utilizados para identificação da localização subcelular (membrana citoplasmática, membrana externa, periplasma, citoplasma ou extracelular) das proteínas selecionadas.

3.5 Análise de propriedades físico-químicas e antigenicidade das proteínas

Propriedades físico-químicas como o comprimento da sequência e peso molecular foram analisados através do servidor Expasy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) e do servidor UniProt (<https://www.uniprot.org/>). A predição de antigenicidade foi feita com os servidores VaxiJen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>), que analisa propriedades físico-químicas da sequência peptídica para determinação da antigenicidade, com um valor de corte $\geq 0,50$ e AntigenPRO (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>), que prediz a antigenicidade baseado em sequência com uma acurácia de 79%.

3.6 Identificação de hélices trans-membranas e caminhos secretórios

As proteínas de membrana externa, periplasmáticas e extracelulares foram utilizadas para análise de suas respectivas topologias, através do servidor TMHMM v2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) e para a presença de peptídeos sinais, através do servidor *SignalP-5.0* (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>). As proteínas que

possuíam mais de 3 domínios topológicos transmembrana foram excluídas de análises futuras.

3.7 Caminhos metabólicos unicamente associados ao patógeno e análise de funcionalidade proteica

Uma comparação manual foi feita entre os caminhos metabólicos associados com *S. marcescens* e seres humanos, utilizando o banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), permitindo a identificação de proteínas que possuíam funções únicas no patógeno ou compartilhadas com o hospedeiro. A predição de função das proteínas selecionadas foi feita utilizando os servidores do UniProt, KEGG e InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

3.8 Predição de epítomos de células T e de células B

A predição de epítomos de MHC-I foi feita através de 3 servidores: IEDB (*Immune Epitope DataBase*) Tepitool (<http://tools.iedb.org/tepitool/>), utilizando 27 alelos que cobrem mais de 97% da população global, seguindo a metodologia recomendada pelo servidor e filtrando os epítomos para aqueles que possuíam um $IC_{50} \leq 50$ nM para os respectivos alelos analisados; NetMHCpan 4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCpan-4.1>), um servidor que utiliza redes neurais artificiais (ANNs), seguindo a metodologia recomendada e filtrando os epítomos de alta afinidade baseado em um $IC_{50} \leq 50$ nM e rank percentual $\leq 0,20$ para os respectivos alelos analisados; por último, o servidor NetCTLpan 1.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetCTLpan-1.1>), cuja predição integrada analisa a ligação do peptídeo ao MHC-I, terminais de clivagem proteassomal e transporte TAP, seguindo um valor de corte de 0,75 para a identificação dos epítomos.

Para a predição de epítomos de MHC-II, utilizados o servidor IEDB Tepitool, através do método recomendado. Um conjunto de 26 alelos de MHC-II mais frequentes em humanos, dos *loci* DP, DQ e DR foi selecionado e o critério de seleção foi um $IC_{50} \leq 50$ nM para os respectivos alelos analisados.

Epítomos lineares de células B (epítomos BCL) foram preditos com múltiplos servidores. O servidor do IEDB foi utilizado, performando análises de antigenicidade, acessibilidade e baseado na sequência peptídica. O servidor ABCpred

(<https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/>) utiliza ANNs e possui uma acurácia de 65,93% em seus padrões recomendados. Por último, o servidor Bcepred (https://webs.iitd.edu.in/raghava/bcepred/bcepred_instructions.html) realiza a predição baseada em propriedades dos aminoácidos (hidrofilicidade, flexibilidade, polaridade e exposição à superfície), com 58,70% de acurácia a um valor de corte de 2,38.

3.9 Determinação da imunogenicidade de epítomos de MHC-I

A ferramenta de imunogenicidade do IEDB (<http://tools.immuneepitope.org/immunogenicity/>) foi usada para avaliar a potencial imunogenicidade dos epítomos de MHC-I identificados, onde quanto maior o valor, maior a chance de estimular uma resposta imune. Aqueles com valores positivos foram selecionados para análises futuras.

3.10 Antigenicidade, toxicidade e alergenicidade dos peptídeos selecionados

Os epítomos identificados para MHC-I, MHC-II e BCL foram analisados quanto a sua antigenicidade pelo servidor VaxiJen 2.0, considerando um valor de corte $\geq 0,50$ para MHC-I e MHC-II e $\geq 0,70$ para BCL. Os epítomos BCL considerados antigênicos que possuíam 9 ou mais aminoácidos sobrepostos entre as diferentes ferramentas de predição (IEDB, ABCpred e Bcepred) foram utilizados para as análises posteriores. A predição de toxicidade do conjunto de epítomos foi feita pelo servidor ToxinPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/toxinpred/index.html>) nos parâmetros recomendados e a antigenicidade foi predita através do servidor AllerTOP v2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/feedback.py>). Epítomos não-alérgenos e não-tóxicos foram selecionados para análises posteriores.

3.11 Conservação, hidrofobicidade e indução de IFN- γ dos peptídeos selecionados

A conservação dos epítomos identificados de MHC-I e MHC-II entre todas as cepas coletadas foi analisada pela ferramenta de conservação do IEDB, considerando uma identidade de 100% entre as diferentes cepas. Uma análise de GRAVY, que avalia a hidrofobicidade de uma sequência peptídica, foi realizada pelo servidor ExPASy-ProtParam, para identificar o potencial hidrofílico das sequências. Além disso, os

epítomos de MHC-II foram avaliados quanto a sua capacidade de induzir IFN- γ , através do servidor *IFN epitope* (<http://crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/>).

3.12 Modelagem tridimensional dos peptídeos selecionados e *docking* molecular

Os epítomos mais bem conservados, hidrofílicos e capazes de induzir IFN- γ foram selecionados e submetidos ao servidor PEP-FOLD3 (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>), responsável por gerar uma estrutura tridimensional *de novo* das sequências. O experimento de *docking* molecular foi realizado pelo servidor PatchDock (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/php.php>), usando os parâmetros recomendados e cujos resultados foram refinados pelo servidor FireDock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/>), classificando os modelos pela sua energia global. Os epítomos de MHC-I foram *dockados* com os alelos: HLA-A*0101 (PDB: 6AT9), HLA-A*0201 (PDB: 3UTQ), HLA-B*1501 (PDB: 1XR8), HLA-B*3501 (PDB: 1ZSD), HLA-B*3901 (PDB: 4O2E), HLA-B*4403 (1SYS), HLA-B*5301 (PDB: 1A1M) e HLA-B*5801 (PDB: 5IM7). Os epítomos de MHC-II foram *dockados* com os alelos: HLA-DRB1*0101 (PDB: 2FSE), HLA-DRB1*0301 (PDB: 1A6A), HLA-DRB1*0401 (PDB: 2SEB), HLA-DRB1*1501 (PDB: 1BX2), HLA-DRB3*0101 (PDB: 2Q6W), HLA-DRB3*0202 (PDB: 3C5J) e HLA-DRB5*0101 (PDB: 1H15). Os resultados foram visualizados com o *software* PyMol. Os epítomos com a melhor afinidade de ligação foram selecionados para a construção de vacina.

3.13 Construção de vacinas

Para a construção de vacinas, a ligação dos epítomos CTL, HTL e BCL, foram através dos *linkers* GGGS, GPGPG e KK. Os *linkers* GGGS foram utilizados para conjugar a sequência PADRE (*Pan HLA DR sequence*) com os epítomos CTL e os epítomos CTL entre si. Já a sequência GPGPG foi utilizada para conjugar os epítomos CTL com os epítomos HTL e os epítomos HTL entre si. Por último, os *linkers* KK foram utilizados para conjugar os epítomos HTL com os epítomos BCL e os epítomos BCL entre si. Sequências adjuvantes foram conjugadas através da sequência EAAAK nas regiões N- e C-terminais e com a sequência PADRE (**Figura 5**). Foram utilizados 5 adjuvantes diferentes: Proteína ribossomal 50s L7/L12, beta-defensina, proteína HBHA e domínio conservado da proteína HBHA.

Figura 5. Representação da construção de vacina.

EAAAK Adjuvante EAAAK PADRE GGGS CTL GGGS CTL GPGPG HTL GPGPG HTL KK BCL KK BCL KK PADRE GGGS

Fonte: Autoria própria.

3.14 Antigenicidade, alergenicidade solubilidade e propriedades físico-químicas das construções de vacina

A antigenicidade das construções foi avaliada através dos servidores VaxiJen 2.0 e ANTIGENpro. Os servidores AllerTOP e AlgPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/algpred/>) foram utilizados para avaliar a alergenicidade dos constructos. SOLpro foi responsável por estimar a solubilidade da sequência de cada constructo e o servidor Expasy-ProtParam foi usado para determinar propriedades físico-químicas, como o tamanho da sequência, peso molecular, ponto-isoeletrico teórico, index de instabilidade e alifático e os valores de GRAVY.

3.15 Clivagem peptídica dos epítomos nas construções de vacina

Clivagem proteassomal é importante no contexto de apresentação a células T e, por isso, o servidor NetChop 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/>) foi utilizado para analisar possíveis sítios de clivagem proteassomal para os epítomos de MHC-I e o servidor SitePrediction (<http://www.dnbr.ugent.be/prx/bioit2-public/SitePrediction/index.php>) foi utilizado para prever sítios de clivagem por catepsinas para os epítomos de MHC-II.

3.16 Predição de estrutura secundária e terciária das construções de vacina

A sequência peptídica de cada constructo foi submetida ao servidor PSIPRED 4.0 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) para determinação da estrutura secundária das vacinas e ao servidor I-TASSER (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*) (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), classificado como o melhor servidor para predição de estrutura 3D em cinco experimentos de CASP.

3.17 Refinamento e validação das construções de vacina

As estruturas tridimensionais geradas pelo servidor I-TASSER foram refinadas pelo servidor 3Drefine (<http://sysbio.rnet.missouri.edu/3Drefine/>), responsável por realizar otimizações na rede de ligações de hidrogênio e implementar campos de força que

geram minimização de energia ao nível atômico. A validação do processo de refinamento foi feita através de uma análise de Ramachandran pela ferramenta PROCHECK (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>), pela análise de Z-score, através do servidor ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) e pela análise de qualidade geral, da ferramenta ERRAT (<http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>).

3.18 Docking proteína-proteína

Cada construção de vacina foi *dockada* contra o complexo TLR4-MD2 (PDB: 3FXI), através de dois servidores: ClusPro 2.0 (<https://cluspro.bu.edu/login.php>), cujos resultados foram refinados pela ferramenta PRODIGY (<https://haddock.science.uu.nl/>) do servidor HADDOCK, classificando os modelos pela afinidade de ligação e através do servidor PatchDock, cujos resultados foram refinados pelo servidor FireDock, classificando os resultados pela energia global.

3.19 Simulação de dinâmica molecular

A melhor construção de vacina (SMV4), complexada com TLR4-MD2 foi enviado para o servidor online iMODS (<http://imods.chaconlab.org/>), responsável pela simulação de dinâmica molecular, em termos de deformabilidade, rede elástica, mapa de covariância e demais propriedades.

3.20 Epítomos descontínuos de células B

A construção SMV4 foi submetida ao servidor ElliPro (<http://tools.iedb.org/ellipro/>), responsável por prever epítomos descontínuos de células B baseado em acessibilidade ao solvente e flexibilidade. A pontuação mínima foi definida como 0,70 e os demais parâmetros utilizados foram os recomendados pelo próprio servidor.

3.21 Simulação imune da construção de vacina

O servidor C-ImmSim (<http://150.146.2.1/C-IMMSIM/index.php?page=1>) foi utilizado para realizar a simulação de resposta imune. As regiões anatômicas de mamíferos utilizadas para simulação foram o timo, medula óssea e um órgão linfático qualquer, para exibir a resposta imune. Todos os parâmetros foram mantidos no recomendado.

O esquema de dose de vacina foi de 3 doses, com 30 dias de intervalo; o volume simulado foi de 10 e o número de passos de simulação foi de 600.

3.22 Adaptação de códon e clonagem *in silico*

A tradução reversa e a adaptação de códons foi realizada pelo servidor JCat (*Java Codon Adaptation Tool*) (<http://www.prodoric.de/JCat>). Os resultados do programa incluem o index de adaptação de códon (CAI) e a percentagem de conteúdo G+C. A cepa *E. coli* K12 foi seleccionada como hospedeiro para a clonagem do constructo, evitando sítios de terminação de transcrição Rho-independentes, sítios de ligação ribossomal procarióticos e sítios de clivagem de enzimas de restrição. A construção foi clonada no vetor plasmidial Pet28A (+) através da adição de sítios de restrição XhoI e NdeI nas regiões C- e N- terminal, respectivamente. A sequência otimizada foi inserida no vetor de expressão utilizando o servidor Benchling (<https://www.benchling.com/>).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e sua respectiva relevância no estudo serão discutidos adiante.

4.1 Coleção de dados iniciais

O genoma representativo de *S. marcescens* (subsp. *Marcescens* Db11) e outros 48 genomas com associação clínica, disponibilizados através do Projeto Genoma do NCBI, foram utilizados neste estudo (**Tabela 1**). Os genomas foram utilizados para extração dos dados de proteoma, analisados pela ferramenta BPGA (*Bacterial Pan Genoma Analysis*), que identificou 2832 proteínas conservadas entre todas as amostras. Proteínas conservadas entre diferentes cepas de uma espécie são frequentemente essenciais para sua sobrevivência e são reconhecidas por receptores imunológicos (JALAL et al., 2021). Portanto, essas proteínas devem ser priorizadas durante a identificação de alvos de vacina para se obter uma alta cobertura contra o maior número de cepas possível (ALLEMAILEM, 2021).

Tabela 1. Relação de cepas de *S. marcescens* usadas no estudo.

Nº.	Cepa	Fonte de Isolamento	País	Número de acesso RefSeq
1	95	Escarro	EUA	GCA_003031545.1
2	332	Ferida	EUA	GCA_003186475.1
3	1602	Sangue	China	GCA_009858195.1
4	2838	Fluido corporal	China	GCA_009909405.1
5	3024	Sangue	China	GCA_009909365.1
6	4201	Escarro	China	GCA_009909345.1
7	1140-	Fluido corporal	China	GCA_009909385.1
8	AR_0027	Associado a paciente	Desconhecido	GCA_002947235.1
9	AR_0091	Associado a paciente	Desconhecido	GCA_002996885.1
10	AR_0099	Associado a paciente	Desconhecido	GCA_002997125.1
11	AR_0121	Associado a paciente	Desconhecido	GCA_003071625.1
12	AR_0122	Associado a paciente	Desconhecido	GCA_003204405.1
13	AR_0123	Associado a paciente	Desconhecido	GCA_003071605.1
14	AR_0124	Associado a paciente	Desconhecido	GCA_003071565.1
15	AR_0130	Associado a paciente	Desconhecido	GCA_003071585.1
16	AR_0131	Associado a paciente	Desconhecido	GCA_003204075.1
17	BWH-23	Sangue	EUA	GCA_003032415.1
18	BWH-35	Escarro	EUA	GCA_003031645.1
19	C110	Escarro	China	GCA_009909425.1
20	CAV1492	Respiratório	EUA	GCA_001022215.1
21	CAV1761	Peri-retal	EUA	GCA_003146705.1
22	FDAARGOS_65	Aspirado endotraqueal	EUA	GCA_000783915.2
23	SER00094	Escarro	EUA	GCA_011769885.1
24	SM39	Septicemia	Japão	GCA_000828775.1

25	SMB2099	Associado a paciente	Alemanha	GCA_900029885.1
26	SmUNAM836	Amostra bronquial	México	GCA_001294565.1
27	U36365	Urina	Índia	GCA_001672055.1
28	UMH1	Bacteremia	EUA	GCA_002220615.1
29	UMH10	Bacteremia	EUA	GCA_002220695.1
30	UMH11	Bacteremia	EUA	GCA_002220575.1
31	UMH12	Bacteremia	EUA	GCA_002220595.1
32	UMH2	Bacteremia	EUA	GCA_002220515.1
33	UMH3	Bacteremia	EUA	GCA_002220655.1
34	UMH5	Bacteremia	EUA	GCA_002220635.1
35	UMH6	Bacteremia	EUA	GCA_002220675.1
36	UMH7	Bacteremia	EUA	GCA_002220715.1
37	UMH8	Bacteremia	EUA	GCA_002220535.1
38	UMH9	Bacteremia	EUA	GCA_002220555.1
39	WVU-001	Sangue	EUA	GCA_006838705.1
40	WVU-002	Sangue	EUA	GCA_006842785.1
41	WVU-003	Sangue	EUA	GCA_006711105.1
42	WVU-004	Sangue	EUA	GCA_006711125.1
43	WVU-005	Sangue	EUA	GCA_006711145.1
44	WVU-006	Sangue	EUA	GCA_006711245.1
45	WVU-007	Sangue	EUA	GCA_006711405.1
46	WVU-008	Sangue	EUA	GCA_006711525.1
47	WVU-009	Sangue	EUA	GCA_006716725.1
48	WVU-010	Sangue	EUA	GCA_006716825.1
49	Db-11	Patógeno de inseto	Suécia	GCA_000513215.1

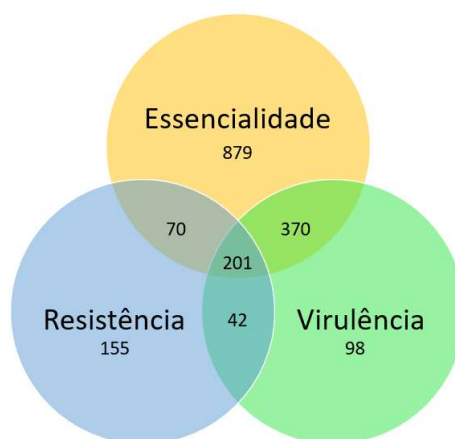
Fonte: Autoria própria.

4.2 Identificação de proteínas essenciais, fatores de virulência e proteínas de resistência e subtração de homólogos a flora intestinal e a proteínas humanas

As 2832 proteínas conservadas identificadas foram analisadas quanto a sua essencialidade e funções de virulência e resistência, através da análise de BLASTp. Foram identificadas um total de 879 proteínas unicamente essenciais, 155 unicamente associadas com virulência e 98 unicamente associadas com resistência, 370 proteínas tinham características de virulência e eram consideradas essenciais, 70 eram associadas com resistência e essenciais, 42 eram associadas com resistência e virulência e 201 proteínas eram associadas com as três características (essencialidade, virulência e resistência), totalizando 1815 proteínas (**Figura 6**). A essencialidade é uma característica importante na busca de alvos de vacinas e drogas terapêuticas, tendo em vista que as proteínas essenciais para a sobrevivência bacteriana não serão facilmente perdidas no processo evolutivo e estão envolvidas em vias metabólicas básicas (KATHWATE, 2022). Os fatores de virulência garantem traços adaptativos para a sobrevivência do patógeno em meio hostil, incluindo seu

hospedeiro, além de serem frequentemente imunogênicos e responsáveis pelo desenvolvimento da imunidade de longo prazo contra o patógeno (DELANY; RAPPUOLI; SEIB, 2013; WASSENAAR; GAASTRA, 2001). Alvejar determinantes de resistência já foi proposto como uma maneira eficiente para neutralizar a pressão de seleção que existe para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana (JOICE; LIPSITCH, 2013). Além disso, estudos prévios demonstram que animais imunizados com estes determinantes induziam fortes respostas humorais e possuíam uma carga bacteriana significativamente menor (CIOFU, 2003; CIOFU; BAGGE; HOIBY, 2002).

Figura 6. Quantidade de proteínas essenciais, de virulência e de resistência.



Fonte: Autoria própria.

Das 1815 proteínas com funções essenciais, de resistência e virulência, 1106 eram não homologas às proteínas humanas e destas, 20 eram não homologas às proteínas da microbiota intestinal, portanto, foram utilizadas para análises posteriores. A relação entre a flora intestinal e os seres humanos não é meramente comensal, mas simbiótica, com diferentes funções benéficas (Guarner & Malagelada, 2003; Seib et al., 2012). O bloqueio ou inibição de proteínas presentes na microbiota intestinal pode levar a efeitos negativos adversos no hospedeiro (SEIB; ZHAO; RAPPUOLI, 2012) e deve ser evitada durante a identificação de alvos de vacina. Paralelamente, proteínas do patógeno homologas às proteínas humanas podem causar reações autoimunes (MONTERRUBIO-LÓPEZ; DELGADILLO-GUTIÉRREZ, 2021).

4.3 Localização subcelular e caracterização das proteínas selecionadas

A localização subcelular é um importante fator a ser considerado, pois as proteínas presentes na superfície celular da bactéria ou que sejam secretadas são facilmente acessíveis e identificadas pelo sistema imune do hospedeiro (MURUATO et al., 2017), o que as caracterizam como potenciais alvos de medicamentos e vacinas (BALIGA; SHEKAR; VENUGOPAL, 2018; MICHAEL; DOMINEY-HOWES; LABBATE, 2014). A antigenicidade é a propriedade de uma proteína de ser reconhecida pelo sistema imunológico do hospedeiro e, portanto, é desejável utilizar proteínas antigênicas no desenvolvimento de vacinas (HE; XIANG; MOBLEY, 2010).

A localização subcelular das 20 proteínas não-homologas foi avaliada e resultou em 10 proteínas, das quais 3 eram proteínas de membrana externa (D-alanil-D-alanina, fosfolipase semelhante a patatina, receptor dependente de TonB) e 2 proteínas eram extracelulares (fosfolipase C fosfocolina-específica e *spore coat* contendo o domínio U). Estas 5 proteínas apresentavam um bom perfil antigênico (> 0,50) e a análise de peptídeo sinal demonstrou que 2 proteínas possuíam peptídeo sinal secretório pelo translocon Sec e clivagem pela Peptidase Sinal I (Sec/SPI); 1 proteína possuía peptídeo sinal lipoproteico pelo translocon Sec e clivagem pela Peptidase Sinal II (Sec/SPII); uma proteína possuía peptídeo sinal Tat, transportado pelo respectivo translocon e clivagem pela Peptidase Sinal I (Tat/SPI) e uma delas não teve peptídeo sinal identificado (**Tabela 2**). Nenhuma delas tinha domínio de hélices-transmembrana. Portanto, as 5 proteínas foram selecionadas para as análises de identificação de epítomos.

Tabela 2. Características das 5 proteínas selecionadas para análise de identificação de epítomos.

Sequência de referência	Nome da proteína	Comprimento (a.a.)	Peso molecular (kDa)	Peptídeo sinal	Localização	Descrição funcional	TMHMM	Antigenicidade (Vaxijen, AntigenPRO)
Proteínas Essenciais								
WP_041033700.1	D-alanil-D-alanina carboxipeptidase	489	51,35	Sec/SPII (17 e 18, LAG-CS)	Membrana externa	Ligação a penicilina/Atividade endopeptídica contra serina	0	0,5856, 0,5066
WP_084827239.1	Fosfolipase semelhante a patatina	323	35,68	Não identificado	Membrana externa	Atividade de hidrolase/processo catabólico de lipídeos	0	0,6024, 0,8235
Proteínas de virulência								
WP_141960268.1	Fosfolipase C, fosfocolina específica	715	79,68	Tat/SPI (31 e 32, ALA-IP)	Extracelular	Toxina de membrana, hidrolase diéster-fosfórica	0	0,4097, 0,6277
WP_048321499.1	Proteína <i>spore coat</i> contendo o domínio U	311	33,28	Sec/SPI (23 e 24, AFA-DC)	Extracelular	Envolvida em motilidade e formação de biofilme	0	0,6887, 0,8719
Proteína de Resistência								
WP_033636744.1	Receptor dependente de TonB	697	76,9	Sec/SPI (44 e 45, VNA-AE)	Membrana externa	Receptor proteico de complexos férricos, canal transportador de sideróforos	0	0,6847, 0,7910

Fonte: Autoria própria.

A carboxipeptidase D-alanil-D-alanina (DD-CPase), é uma carboxipeptidase periplasmática essencial para a sobrevivência bacteriana, membro da família de proteínas ligantes da penicilina (PBPs), inibidas pela ação de antibióticos β -lactâmicos e envolvidas na síntese e remodelamento do peptidoglicano (RIOSERAS et al., 2016). A família de enzimas PNPLA (fosfolipases semelhantes a patatina) consiste em uma família de enzimas essenciais de membrana externa, conservada em organismos eucariotos e procariotos, com funções de homeostasia de lipídeos e associada com o escape de fagossomo em diversas bactérias patogênicas (CUI et al., 2020; GASPAR; MACHNER, 2014). A fosfolipase C, fosfocolina-específica (PLC-PC) é considerada um fator de virulência importante, exportado para fora do citoplasma pelos caminhos Tat ou Sec e fortemente associado com o processo infeccioso bacteriano, incluindo lise de membrana celular, sinalização intracelular e metabolismo de lipídeos (DEDIEU et al., 2013; SCHMIEL; MILLER, 1999). A *spore coat* contendo o domínio U foi outra proteína selecionada para análises. O domínio U é encontrado em proteínas associadas com o pili bacteriano, envolvido na virulência através da motilidade e formação de biofilme (GOLLOP; INOUYE; INOUYE, 1991; TOMARAS et al., 2003). Os receptores dependentes de TonB consistem em uma família de proteínas beta-barril de membrana externa, associada com resistência antibiótica progressiva, transporte de complexos férricos-sideróforos, vitaminas e carboidratos (GÓMEZ-

SANTOS et al., 2019; KOEBNIK; LOCHER; VAN GELDER, 2000; LI et al., 2021; SCHALK; MISLIN; BRILLET, 2012; ZHANG et al., 2020).

4.4 Predição, análise e caracterização dos epítomos de MHC-I e MHC-II

Os epítomos consistem na menor porção de um antígeno proteico capaz de gerar uma resposta imune, sendo cruciais para o desenvolvimento da imunidade celular e humoral (de Groot et al., 2020). Os epítomos de células T são processados de duas maneiras diferentes: as proteínas intracelulares são processadas e seus peptídeos são apresentados no complexo de MHC-I, enquanto as proteínas extracelulares são processadas em compartimentos proteolíticos e seus peptídeos são apresentados no complexo de MHC-II (DE GROOT et al., 2013). O potencial imunogênico dos epítomos de células T é altamente dependente da afinidade de ligação ao Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) (GHAFARI-NAZARI et al., 2015; RASHID et al., 2019). Ao projetar uma vacina, alguns critérios dos epítomos precisam ser considerados, como por exemplo: os epítomos que permanecem conservados em várias cepas possuem maior prioridade, pois fornecem proteção mais ampla, abrangendo diversas cepas; os epítomos devem ser hidrofílicos, para maior acessibilidade e facilitação no reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro (BUI et al., 2007); os epítomos devem ser não-alergênicos e não-tóxicos, deste modo, não serão capazes de induzir reações indesejadas no hospedeiro, ao mesmo tempo que mantêm sua antigenicidade, para ativar as respostas linfocitárias (ANDREAE; NOWAK-WĘGRZYN, 2017).

As sequências das 5 proteínas selecionadas foram utilizadas para a identificação de todos os epítomos. Para os alelos de MHC-I, foram encontrados 284 epítomos de alta afinidade, sendo que 123 destes eram comuns dentre todos os servidores utilizados e foram selecionados para a análise de imunogenicidade, resultando em 59 epítomos. Destes, 31 eram antigênicos, nenhum era tóxico e 17 eram não-alergênicos. A análise de conservação mostrou que dos 17 epítomos, 14 eram completamente conservados (100% de identidade) em pelo menos 50% das cepas e, destes, 7 eram hidrofílicos. Estes 7 peptídeos foram selecionados para as análises futuras (**Tabela 3**).

Tabela 3. Epítomos de MHC-I considerados e suas características.

No.	Nome e ID da proteína	Começo	Fim	Epítopo	Imunogenicidade	Antigenicidade	Toxicidade	Alergenicidade	Conservação	Hidropaticidade
1	WP_041033700.1 D-alanil-D-alanina carboxipeptidase	156	164	TPFGAGWSW	0,23238	0,5798	Não tóxico	Não alérgeno	100,00%	-0,12
		471	479	LEDRLVETL	0,19452	0,7321	Não tóxico	Não alérgeno	100,00%	-0,01
2	WP_141960268.1 Fosfolipase C, fosfocolina específica	74	82	FTIPLPGDR	0,1275	0,983	Não tóxico	Não alérgeno	63,27%	-0,08
3	WP_048321499.1 Proteína <i>spore coat</i> contendo o domínio U	127	135	SSNVNPLY	0,1275	0,983	Não tóxico	Não alérgeno	63,27%	-0,08
4	WP_033636744.1 Receptor dependente de TonB	469	477	QTYGAKIAR	0,00318	1,2908	Não tóxico	Não alérgeno	100%	-0,69
		499	507	SEYVWNYEL	0,30533	1,4052	Não tóxico	Não alérgeno	100%	-0,76
		608	616	YQFLKGWEL	0,09418	0,561	Não tóxico	Não alérgeno	100%	-0,34

Fonte: Autoria própria.

Um aspecto importante do patógeno *S. marcescens* é sua capacidade de invadir células não-fagocitárias, como as células epiteliais (BARCHIESI et al., 2012; FEDRIGO et al., 2011; HERTLE; SCHWARZ, 2004). Depois de sua internalização, o patógeno é capaz de controlar o tráfico autofágico, gerando um nicho apropriado para sua sobrevivência e replicação dentro da célula hospedeira (FEDRIGO et al., 2011; XIONG et al., 2019). A proteção contra patógenos intracelulares é extremamente dependente da imunidade celular, mediada por células T citotóxicas e por isso a identificação de epítomos de MHC-I é crucial para a projeção de uma vacina contra o patógeno (KAUFMANN, 2005; OZAWA et al., 2009).

Com relação aos alelos de MHC-II, foram encontrados 415 peptídeos de alta afinidade, dos quais 196 eram antigênicos, nenhum destes foi considerado tóxico e 114 tinham uma natureza não-alérgênica. Noventa e três epítomos apresentaram 100% de identidade entre mais de 50% das cepas analisadas e 70 deles tinham natureza hidrofílica.

Os epítomos de MHC-II que possuem um alto potencial indutor de IFN- γ são desejáveis em uma vacina, tendo em vista que estas citocinas possuem um papel crucial nas respostas imunes inata e adaptativa, estimulam macrófagos e células NKs e provocam uma resposta acentuada aos antígenos (SHEY et al., 2019). Portanto, dos 70 epítomos selecionados, 31 com perfis mais antigênicos, conservados, hidrofílicos e que eram não alérgênicos e não tóxicos, foram escolhidos para determinar o potencial de indução de IFN- γ . A análise resultou em 16 epítomos capazes de induzir IFN- γ , que foram selecionados para a análise de *docking* molecular (**Tabela 4**).

Tabela 4. Epítomos de MHC-II considerados e suas características.

No.	Nome e ID da proteína	Começo	Fim	Epítopo	Antigenicidade	Toxicidade	Alergenicidade	Conservação	Hidropaticidade	Indução de IFN
1	WP_041033700.1 D-alanil-D-alanina carboxipeptidase	7	21	WLLPAILALAGCSSS	1,0376	Não tóxico	Não alérgeno	83,67%	-0,93	0,476
		170	184	AFAAPISALNYAFTP	0,6842	Não tóxico	Não alérgeno	75,51%	-0,89	0,228
		197	211	PGARAGAPGRVSYFP	1,0191	Não tóxico	Não alérgeno	61,22%	-0,1	0,329
		451	465	PLAFAIISNNYLVP	0,5584	Não tóxico	Não alérgeno	100%	-0,92	0,089
2	WP_084827239.1 Fosfolipase semelhante a patalina	40	54	SGASAGAIAALLVGL	0,8684	Não tóxico	Não alérgeno	100%	-0,71	0,416
3	WP_141960268.1 Fosfolipase C, fosfocolina específica	243	257	RQYRAASIQVGNPAR	0,5796	Não tóxico	Não alérgeno	97,96%	-0,93	0,131
		452	466	EKRQVQHEPNISAWR	0,8644	Não tóxico	Não alérgeno	100%	-1,34	0,673
4	WP_048321499.1 Proteína <i>spore coat</i> contendo o domínio U	117	131	SLNLLSLIISNNVN	0,6343	Não tóxico	Não alérgeno	97,96%	-0,82	0,041
		121	135	LSLIISSNVNPLY	0,5934	Não tóxico	Não alérgeno	63,27%	-1,05	0,41
5	WP_033636744.1 Receptor dependente de TonB	125	139	NVGANAFLSGTRPRL	0,7968	Não tóxico	Não alérgeno	87,76%	-0,11	0,314
		129	143	NAFLSGTRPRLNLSL	0,8159	Não tóxico	Não alérgeno	87,76%	-0,03	0,136
		339	353	TDFNINRPTAYNIQY	0,6574	Não tóxico	Não alérgeno	87,76%	-0,93	0,154
		372	386	ADSRHLGLAGLRYFH	0,5227	Não tóxico	Não alérgeno	100%	-0,27	0,494
		565	579	RWDFELFGNLLGKT	0,5005	Não tóxico	Não alérgeno	87,76%	-0,03	0,108
		595	609	ARAPAYTANMGAKYQ	0,9467	Não tóxico	Não alérgeno	87,76%	-0,65	0,04
		606	620	AKYQFLKGWELSSNV	0,7445	Não tóxico	Não alérgeno	87,76	-0,41	0,63

Fonte: Autoria própria.

4.5 Modelagem tridimensional dos epítomos e *docking* molecular

Todos os 7 epítomos de MHC-I e os 16 epítomos de MHC-II foram modelados tridimensionalmente pelo servidor PEP-FOLD3 e foram *dockados* com 8 alelos de MHC-I e 7 alelos de MHC-II, respectivamente. Dentre eles, 5 epítomos de MHC-I (**Tabela 5**) e 12 de MHC-II (**Tabela 6**) apresentaram os melhores resultados, com a menor energia global de -34,89 e -70,54, respectivamente e foram utilizados nos constructos de vacina.

Tabela 5. *Docking* molecular dos epítomos de MHC-I.

No.	Nome e ID da proteína	Epítopo	Energia Global								Média
			HLA-A*0101 (PDB: 6AT9)	HLA-A*0201 (PDB: 3UTQ)	HLA-B*1501 (PDB: 1XR8)	HLA-B*3501 (PDB: 1ZSD)	HLA-B*3901 (PDB: 4O2E)	HLA-B*4403 (PDB: 1SYS)	HLA-B*5301 (PDB: 1A1M)	HLA-B*5801 (PDB: 5IM7)	
1	WP_041033700.1 D-alanil-D-alanina carboxipeptidase	TPFGAGWSW	-54,89	-18,06	-34,65	-42,60	-13,15	-43,74	-38,83	-33,18	-34,89
		LEDRLVETL	-41,35	-22,48	-43,79	-24,36	-35,34	-16,97	-38,4	-23,62	-30,79
2	WP_141960268.1 Fosfolipase C, fosfocolina específica	FTIPLPGDR	-46,08	-24,55	-15,99	-24,14	-6,21	-15,41	-33,75	-23,74	-23,73
3	WP_048321499.1 Proteína <i>spore coat</i> contendo o domínio U	SSNVNPLY	-56,28	-23,22	-32,65	-9,88	-19,00	-36,62	-37,51	-30,24	-30,68
4	WP_033636744.1 Receptor dependente de TonB	QTYGAKIAR	-43,86	-4,69	-22,38	-19,36	-15,9	-25,6	-18,49	-26,75	-22,13
		SEYVWNYEL	-40,96	-17,05	-33,96	-25,68	-8,14	-15,25	-42,89	-39,22	-27,89
		YQFLKGWEL	-49,03	-18,24	-15,98	-8,29	-15,5	-25,71	-47,98	-35,74	-27,06

Fonte: Autoria própria. Os epítomos em negrito correspondem aos utilizados nas análises posteriores.

Tabela 6. Docking molecular dos epítomos de MHC-II.

No.	Nome e ID da proteína	Epítopo	Energia Global							Média
			HLA-DRB1*010 1 (PDB: 2FSE)	HLA-DRB1*030 1 (PDB: 1A6A)	HLA-DRB1*040 1 (PDB: 2SEB)	HLA-DRB1*150 1 (PDB: 1BX2)	HLA-DRB3*010 1 (PDB: 2Q6W)	HLA-DRB3*020 2 (PDB: 3C5J)	HLA-DRB5*010 1 (PDB: 1H15)	
1	WP_041033700.1 D-alanil-D-alanina carboxipeptidase	WLLPAILALAGCSSS	-89,74	-79,65	-74,83	-68,81	-65,01	-43,2	-72,52	-70,54
		PGARAGAPGRVSFYF	-74,58	-62,83	-62,02	-62,94	-41,19	-30,71	-64,83	-57,01
		LAVTFLKVSNNGYGE	-66,12	-73,03	-51,81	-54,69	-36,28	-30,34	-61,55	-53,40
		PLAFAIISNNYLVP	-72,30	-57,61	-55,05	-62,76	-58,50	-47,77	-89,92	-63,42
2	WP_084827239.1 Fosfolipase semelhante a patatina	SGASAGAIAALLVGL	-58,55	-72,12	-64,58	-75,20	-59,65	-41,55	-64,48	-62,30
3	WP_141960268.1 Fosfolipase C, fosfocolina específica	RQYRAASIQVGNPAR	-61,17	-55,80	-47,44	-47,05	-13,96	-30,96	-69,12	-46,50
		EKRQVHEPNISAWR	-38,13	-38,77	-45,12	-8,34	-16,93	-24,41	-27,34	-28,43
4	WP_048321499.1 Proteína <i>spore coat</i> contendo o domínio U	SLNLLSLISSNVN	-88,21	-56,66	-52,15	-68,53	-29,65	-50,1	-89,29	-62,08
		LSLISSNVNFPLY	-93,62	-65,33	-50,97	-82,72	-16,16	-46,28	-45,35	-57,20
5	WP_033636744.1 Receptor dependente de TonB	NVGANAFSLGTRPRL	-65,95	-52,33	-55,04	-61,88	-20,96	-31,18	-58,32	-49,38
		NAFLSGTRPRLNLSL	-74,06	-48,43	-59,42	-37,86	-35,10	-31,70	-35,66	-46,03
		TDFNINRPTAYNIQY	-42,87	-44,67	-49,32	-32,67	-13,94	-34,32	-43,83	-37,37
		ADSRHLGLAGLRYFH	-62,54	-47,66	-53,30	-61,08	-24,56	-25,95	-58,13	-47,60
		RWDFELFGNLGLLKT	-45,56	-55,26	-56,56	-51,49	-16,14	-32,27	-63,07	-45,76
		ARAPAYTANMGAKYQ	-45,59	-44,37	-51,96	-44,44	-22,36	-29,58	-34,58	-38,98
		AKYQFLKGWELSSNV	-54,33	-61,70	-39,90	-59,14	-18,93	-25,68	-38,05	-42,53

Fonte: Autoria própria. Os epítomos em negrito correspondem aos utilizados nas análises posteriores.

Em seres humanos, as moléculas de MHC são conhecidas como antígenos leucocitários humanos (HLAs). Altamente polimórficos, suas frequências alélicas variam entre diferentes grupos populacionais (LATA et al., 2018). Epítomos considerados promíscuos, isto é, que possuem uma alta afinidade de ligação a diversos alelos diferentes e que cobrem uma grande parcela da população (como HLA-A1, HLA-A2, DRB1) ajudam a contornar o problema da alta variabilidade de HLAs na população humana (EBRAHIMI; MOHABATKAR; BEHBAHANI, 2019).

4.6 Identificação e caracterização dos epítomos lineares de células B

Os epítomos de células B são responsáveis por ativar a resposta humoral que irá produzir anticorpos (JESPERSEN et al., 2017). Estes epítomos podem ser divididos em dois grupos: epítomos conformacionais, que formam uma estrutura tridimensional ou epítomos lineares, que consistem em uma sequência direta de aminoácidos (JESPERSEN et al., 2017). Embora os epítomos conformacionais correspondam a vasta maioria dos epítomos de células B, frequentemente, estas regiões possuem

epítomos lineares também, tornando interessante sua identificação numa projeção de vacina (GALANIS et al., 2021; JESPERSEN et al., 2017).

Um total de 503 epítomos identificados entre os servidores foram sujeitos a avaliação de antigenicidade, dos quais, 236 foram considerados antigênicos. Através de uma análise manual, 23 epítomos com regiões sobrepostas de aminoácidos preditas pelos diferentes servidores foram selecionados e testados para sua toxicidade, alergenicidade, conservação e hidrofiliabilidade, resultando em 12 epítomos com características desejadas e selecionados para a construção de vacina (**Tabela 7**). Os receptores de células B (BCR) apresentam uma alta variabilidade devido aos processos de recombinação somática que a célula sofre para gerar a cadeia de imunoglobulina do receptor (TREANOR, 2012). Por conta desta alta variabilidade, uma análise de *docking* molecular se torna inviável, considerando o alto número de possibilidades de BCRs. Os epítomos lineares de células B são, portanto, introduzidos diretamente na sequência de vacina e posteriormente avalia-se a presença de epítomos conformacionais.

Tabela 7. Epítomos de células B e suas características.

No.	Nome e ID da proteína	Começo	Fim	Comprimento	Epítomo	Antigenicidade	Toxicidade	Alergenicidade	Hidropaticidade
1	WP_041033700.1 D-alanil-D-alanina carboxipeptidase	100	108	9	TGEQRGDTL	1,4316	Não tóxico	Não alérgeno	1,49
		117	127	11	SGDPTLHPDDL	0,7116	Não tóxico	Não alérgeno	-1,02
		331	339	9	GRKTQGKGD	2,7203	Não tóxico	Não alérgeno	2,36
2	WP_084827239.1 Fosfolipase semelhante a patatina	147	159	13	QREVYSHRTTPRM	0,7944	Não tóxico	Não alérgeno	-2,05
		214	229	16	SSQRINRRTLGLRLDS	1,7872	Não tóxico	Não alérgeno	-0,77
3	WP_141960268.1 Fosfolipase C, fosfocolina específica	620	629	10	QPEVRLRPTG	1,3449	Não tóxico	Não alérgeno	-1,23
4	WP_048321499.1 Proteína <i>spore</i> <i>coat</i> contendo o domínio U	81	91	11	MAVANTDGSGD	1,8801	Não tóxico	Não alérgeno	-0,28
		263	277	15	TTVWSDTNKQSGAGT	1,023	Não tóxico	Não alérgeno	-0,97
5	WP_033636744.1 Receptor dependente de TonB	5	15	11	FAAQRHESVGN	0,8087	Não tóxico	Não alérgeno	-0,80
		45	55	11	AETKSNETYQD	1,6267	Não tóxico	Não alérgeno	-2,10
		233	243	11	DRQRRRSEADL	1,2989	Não tóxico	Não alérgeno	-2,47
		429	439	11	RLEREHRRRDG	1,6679	Não tóxico	Não alérgeno	-2,98

Fonte: Autoria própria.

4.7 Construção de sequência e caracterização das vacinas

A construção de 4 modelos de vacina (SMV1, SMV2, SMV3 e SMV4) foi realizada através da combinação de um adjuvante, a sequência PADRE, 5 epítomos CTL (MHC-I), 12 epítomos HTL (MHC-II) e 12 epítomos BCL (Células B), de maneira sequencial e

separada por *linkers* GGGS, GPGPG e KK e finalizada com um *linker* EAAAK. Cada constructo diferia apenas no seu adjuvante, sendo utilizados a proteína ribossomal 50s L7/L12, β -defensina, proteína HBHA e sequência conservada da proteína HBHA. A sequência PADRE consiste em um peptídeo sintético universal, capaz de induzir células T CD4+, aumentando a eficiência e potência de uma vacina baseada em epítomos, além de auxiliar no contorno do problema do alto polimorfismo dos alelos de HLA (GHAFARI-NAZARI et al., 2015; KHAN et al., 2021). Os adjuvantes HBHA e proteína ribossomal L7/L12 são agonistas do complexo TLR4/MD2 e a beta-defensiva pode atuar como agonista do TLR1, TLR2, TLR4, favorecendo o processo de apresentação de antígeno (AZIM et al., 2019). Os epítomos CTL, HTL e BCL foram conjugados através de *linkers* GGGS, GPGPG e KK, respectivamente, responsáveis por garantir a separação efetiva dos epítomos individuais *in vivo* e favorecer sua apresentação (HAJIGHAHRAMANI et al., 2017).

Cada construção possuía 668 (SMV1), 659 (SMV2), 554 (SMV3) e 639 (SMV4) resíduos de aminoácidos de comprimento e um peso molecular de 70,335, 69,217, 57,867 e 66,147 kDa, respectivamente. O ponto-isoelétrico teórico variou de 9,85 até 10,36, sugerindo que cada construção possuía carga positiva em condições fisiológicas (KOZLOWSKI, 2016). O index de instabilidade variou entre 28,01 até 35,66, demonstrando a natureza estável das vacinas e, ao mesmo tempo, o index alifático variou entre 66,68 até 74,19, sugerindo a estabilidade das proteínas em diferentes temperaturas (CHUKWUDOZIE et al., 2021). As construções de vacina também possuíam uma natureza hidrofílica e todas apresentaram uma boa solubilidade ($> 0,873$) quando em expressão heteróloga em *E. coli*, algo importante para muitos estudos bioquímicos, de caracterização funcional e de purificação da proteína (CHEN et al., 2021). Além disso, nenhuma construção apresentou características tóxicas ou alergênicas, todas foram consideradas antigênicas e devido a sua natureza solúvel, estável e hidrofílica (**Tabela 8**), todas foram mantidas para os experimentos seguintes.

Tabela 8. Construções de vacina e suas características.

Vacina/ adjuvante	Antigenicidade	Alergenicidade	Comprimento de a.a.	Peso molecular (kDa)	pl	Index de instabilidade	Index alifático	Hidropaticidade	Solubilidade
SMV1 (HBHA)	Vaxijen: 1.0377	Não alérgeno	668	70,335	9,91	33,33	72,46	-0,525	0,967
	ANTIGENpro: 0.835								
SMV2 (Sequência Conservada de HBHA)	Vaxijen: 1.0449	Não alérgeno	659	69,217	9,86	35,66	73,87	-0,510	0,974
	ANTIGENpro: 0.851								
SMV3 (β - Defensina)	Vaxijen: 1.1417	Não alérgeno	554	57,867	10,36	31,21	66,68	-0,547	0,873
	ANTIGENpro: 0.827								
SMV4 (Proteína ribossomal 50s L7/L12)	Vaxijen: 1.0210	Não alérgeno	639	66,147	9,85	28,01	74,19	-0,389	0,957
	ANTIGENpro: 0.818								

Fonte: Autoria própria.

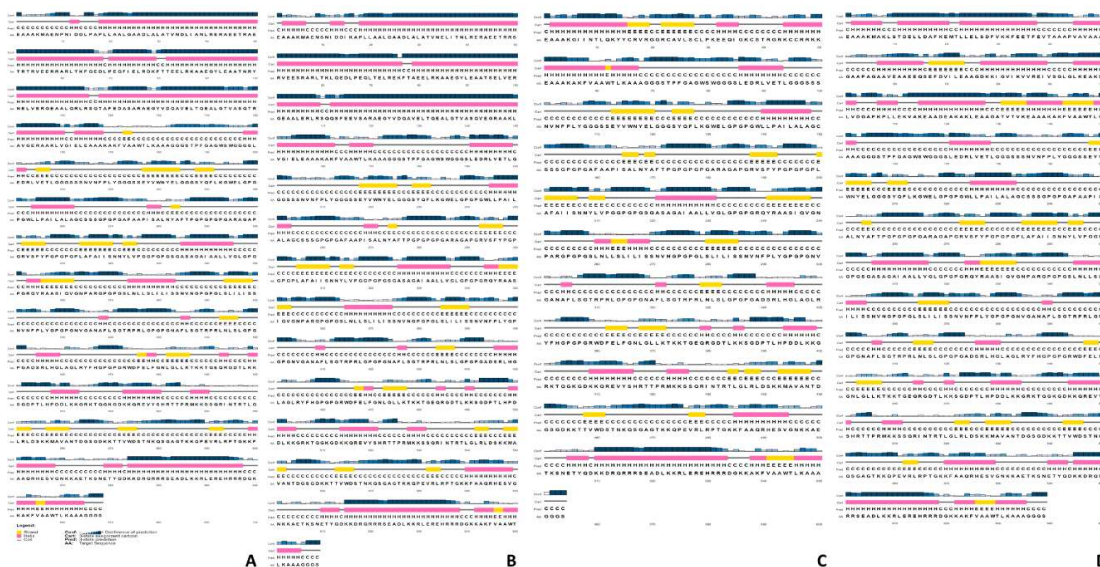
Interessantemente, foram identificados 17 sítios de clivagem proteassomal, 15 sítios de clivagem para catepsina B, 3 sítios para catepsina D, 8 sítios para catepsina E, 3 sítios para catepsina G, 6 sítios para catepsina K e 1 para catepsina L, todos com mais de 99% de especificidade, majoritariamente próximos dos *linkers*. Isto demonstra que a utilização dos *linkers* pode auxiliar o processamento e apresentação dos epítomos individuais para o sistema imune do hospedeiro, induzindo respostas humorais e celulares (MAJID; ANDLEEB, 2019).

4.8 Predição de estrutura secundária e modelagem tridimensional, refinamento e validação das vacinas

A análise da estrutura secundária e terciária é necessária durante um desenvolvimento de uma vacina por metodologias *in silico*, pois permite observar as possíveis interações da vacina com componentes do sistema imune, sua estabilidade e seu enovelamento (MAJID; ANDLEEB, 2019). As estruturas secundárias das construções de vacina foram avaliadas pelo servidor PSIPRED. A vacina SMV1 possuía 48,35% de seus aminoácidos em estrutura desordenada, 40,12% em α -hélice e a menor porcentagem de aminoácidos em folhas- β , 11,23%. SMV2 tinha 49,75% da sua estrutura desordenada, 38,56% em α -hélice e 11,69% em folhas- β . SMV3 teve a maior porcentagem de estrutura desordenada (55,05%), 27,62% da estrutura em α -hélice e a maior porcentagem de folhas- β , 17,33%. Por último, SMV4 tinha 54,23% de sua estrutura desordenada, 30,05% em α -hélice e 15,72% em folha- β . É interessante destacar que todas as construções possuíam boa parte de sua estrutura como

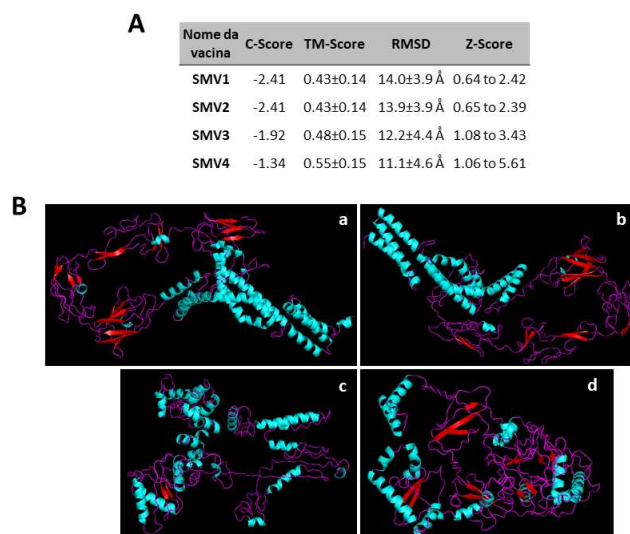
desordenada ou em α -hélice e que essas formas estão associadas com importantes estruturas antigênicas e sensíveis aos anticorpos induzidos durante a infecção (BIBI et al., 2021; SHEY et al., 2021). Os resultados estão apresentados na **Figura 7**.

Figura 7. Estrutura secundária de cada construção de vacina.



Fonte: autoria própria. As regiões azuis representam as regiões desordenadas, as rosas, de α -hélice, as amarelas, de folhas- β . A) SMV1, B) SMV2, C) SMV3, D) SMV4.

A estrutura 3D das vacinas foi obtida utilizando o servidor I-TASSER. O *C-score* é uma medida que varia de -5 até 2, onde um valor maior representa um modelo de maior confiança e topologia correta. SMV1 teve um *Z-score* de 0,64 até 2,42 e um *C-score* de -2,41. SMV2 teve um *Z-score* de 0,65 até 2,39 e um *C-score* de -2,41. SMV3 teve um *Z-score* de 1,08 até 3,43 e um *C-score* de -1,92. SMV4 apresentou um *Z-score* de 1,06 até 5,61 e o maior *C-score*, 1,34 (**Figura 8A**). Além dessas classificações, o servidor também atribui um *TM-score*, uma métrica para mensurar a similaridade de duas estruturas proteicas e que visa contornar a possibilidade de um baixo *C-score*, mesmo com a topologia geral entre as duas sequências sendo semelhantes e um valor de RMSD (desvio médio quadrático). Os valores do *TM-score* variaram de $0,43 \pm 0,14$ até $0,55 \pm 0,15$; um *TM-score* maior que 0,50 indica uma maior acurácia na predição da topologia geral. Já o RMSD variou de $11,1 \pm 4,6 \text{ \AA}$ até $14,0 \pm 3,9 \text{ \AA}$ (**Figure 8B**).

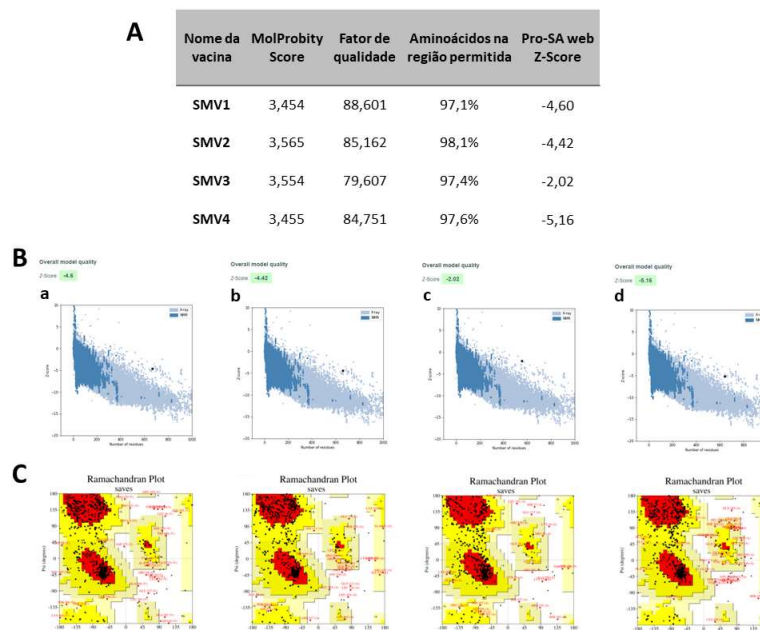
Figura 8. Características e estruturas das construções de vacina.

Fonte: Autoria própria. A) Características, B) Estruturas. a) SMV1, b) SMV2, c) SMV3, d) SMV4.

As estruturas tridimensionais das construções foram submetidas ao servidor 3Drefine, responsável pelo refinamento e otimização das energias de ligação dentro da proteína. Os modelos refinados com o menor valor de *MolProbity* foram selecionados, pois quanto menor o valor de *MolProbity*, maior a qualidade do modelo (**Figura 9A**). A validação do refinamento foi feita através de diferentes servidores. O servidor ERRAT atribui um fator de qualidade para a estrutura da proteína, entre 0 e 100. Todas as construções de vacina obtiveram fatores de qualidade superiores a 75 (**Figura 9A**). O servidor ProSA-web foi utilizado para avaliar o *Z-score* das construções de vacina. O *Z-score*, neste contexto, é uma medida de desvio de energia entre duas estruturas proteicas de tamanho semelhante (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). No servidor, o *Z-score* das construções de vacina é comparado com o *Z-score* de proteínas nativas analisadas por cristalografia de raio-X ou por espectroscopia NMR (*Nuclear magnetic resonance*), cuja estrutura tenha sido depositada no PDB (*Protein Data Bank*). Todas as proteínas apresentaram um *Z-score* semelhante ao de proteínas nativas, como demonstrado na **Figura 9B**, pelos pontos negros em relação às áreas azuis. Além disso, a estrutura tridimensional das vacinas foi avaliada através da plotagem de Ramachandran. A plotagem de Ramachandran é uma maneira de visualizar regiões energeticamente permitidas na “espinha dorsal” da proteína (ZHOU; O’HERN; REGAN, 2011). Todas as construções de vacina tinham mais que 97% dos aminoácidos em regiões energeticamente permitidas (**Figura 9A**), representados

pelos pontos pretos nas regiões amarelas e vermelha, na **Figura 9C**. Os resultados indicaram, portanto, uma boa qualidade geral da estrutura tridimensional das vacinas.

Figura 9. Validação da estrutura tridimensional da proteína.

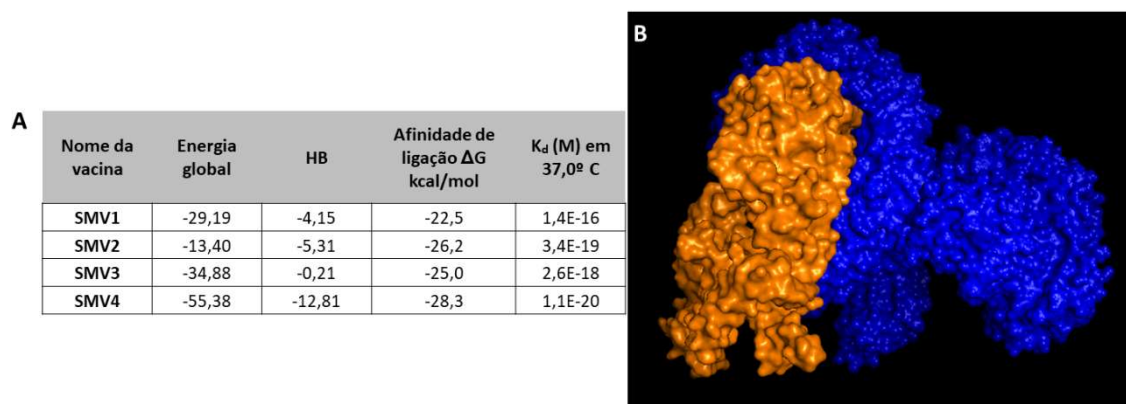


Fonte: autoria própria. A) Características da estrutura refinada, B) Z-score do ProSA-web, C) plotagem de Ramachandran. a) SMV1, b) SMV2, c) SMV3, d) SMV4.

4.9 Docking proteína-proteína e simulação molecular dinâmica

O *docking* molecular é muito utilizado para explorar a afinidade de ligação entre proteínas e consiste numa estratégia essencial para o desenvolvimento de vacinas (ALOM et al., 2021). Cada construção foi avaliada quanto sua interação com o complexo TLR4-MD2 (PDB: 3FXI), um complexo presente em células do sistema imune inato. A vacina SMV4 foi a que apresentou a melhor afinidade de ligação, -28,3 kcal/mol, com um Kd (constante de dissociação) de 1,1E-20 a 37°C, uma energia global de -55,38 e uma energia de ligação de hidrogênio (HB) de -12,81 (**Figura 10A**). Estes resultados demonstram a interação estável de SMV4 com o complexo. Deste modo, dentre as quatro vacinas, a SMV4 foi selecionada para a continuidade dos experimentos (**Figura 10B**).

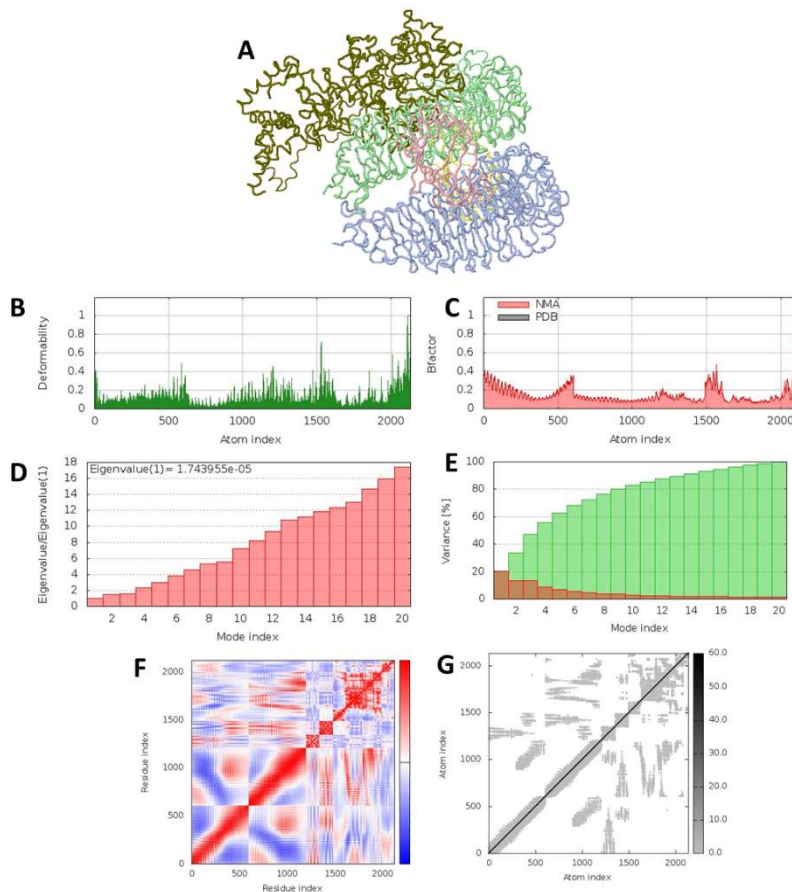
Figura 10. Características do *docking* molecular de SMV4 com o complexo TLR4-MD2 e estrutura do complexo *dockado*.



Fonte: autoria própria. A) Características, B) Complexo *dockado*. Em laranja, SMV4 e em azul, TLR4-MD2

A simulação molecular dinâmica (MD) e análise de modo normal (NMA) do complexo SMV4-TLR4-MD2 foi realizada pelo servidor iMODS. A simulação MD consiste numa maneira intuitiva de se ilustrar as dinâmicas de um complexo proteico a nível atômico, mostrando o movimento molecular realizado, sua função e estabilidade (HILDEBRAND; ROSE; TIEMANN, 2019). O complexo SMV4-TLR4-MD2 é representado na **Figura 11A**. Os picos no gráfico de deformabilidade do complexo indicam as regiões com maior deformabilidade (**Figura 11B**). O gráfico do Fator-B do complexo traz um fácil entendimento e visualização da comparação entre o NMA e o campo PDB do complexo (**Figura 11C**). O complexo é sugerido como estável, conforme **Figura 11D**. Os gráficos de variância e co-variância são mostrados na **Figura 11E** e **Figura 11F**. O mapa elástico (**Figura 11G**) do complexo descreve a conexão entre átomos, onde as regiões cinza-escuras representam regiões endurecidas. Os resultados obtidos demonstram a natureza estável do complexo em ambiente biológico.

Figura 11. Simulação molecular dinâmica do complexo SMV4-TLR2-MD2.

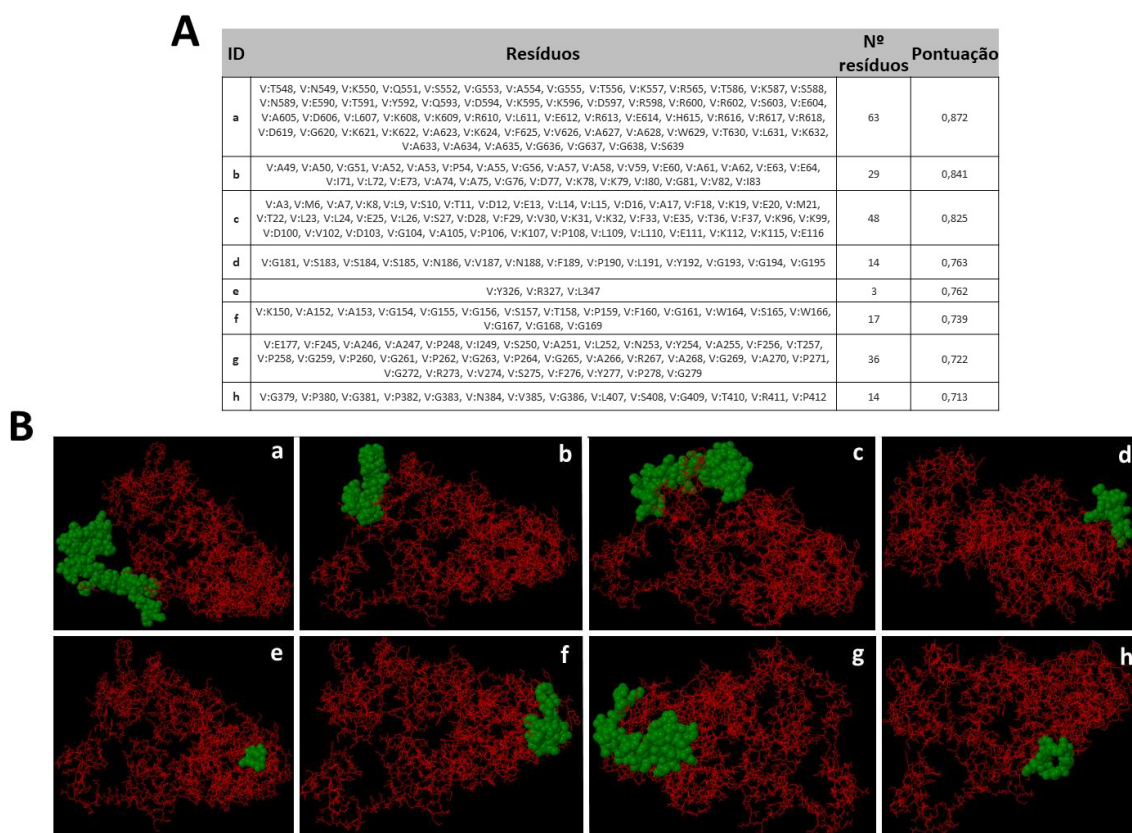


Fonte: autoria própria. A) Estrutura do complexo, B) Deformabilidade, C) Fator-B, D) *Eigenvalue*, E) Variância, F) Co-variância, G) Rede elástica.

4.10 Análise de epítomos descontínuos de células B e simulação imune de eficiência

A maioria dos epítomos de células B é conformacional, ou seja, seus aminoácidos constituintes se encontram próximos uns aos outros após o dobramento da proteína, criando uma estrutura tridimensional capaz de interagir com anticorpos (PALATNIK-DE-SOUSA; SOARES; ROSA, 2018). A estrutura da vacina SMV4 foi analisada no servidor Ellipro para a identificação de epítomos conformacionais de células B. Um total de oito epítomos conformacionais, com pontuações variando de 0,713 até 0,872 foram encontrados. O mais curto e mais longo epítomo possuíam 3 e 63 resíduos de comprimento, respectivamente. Os aminoácidos presentes nos epítomos, o número de resíduos, suas pontuações e a representação tridimensional destes epítomos estão presentes na **Figura 12**.

Figura 12. Epítomos descontínuos de células B presentes em SMV4.



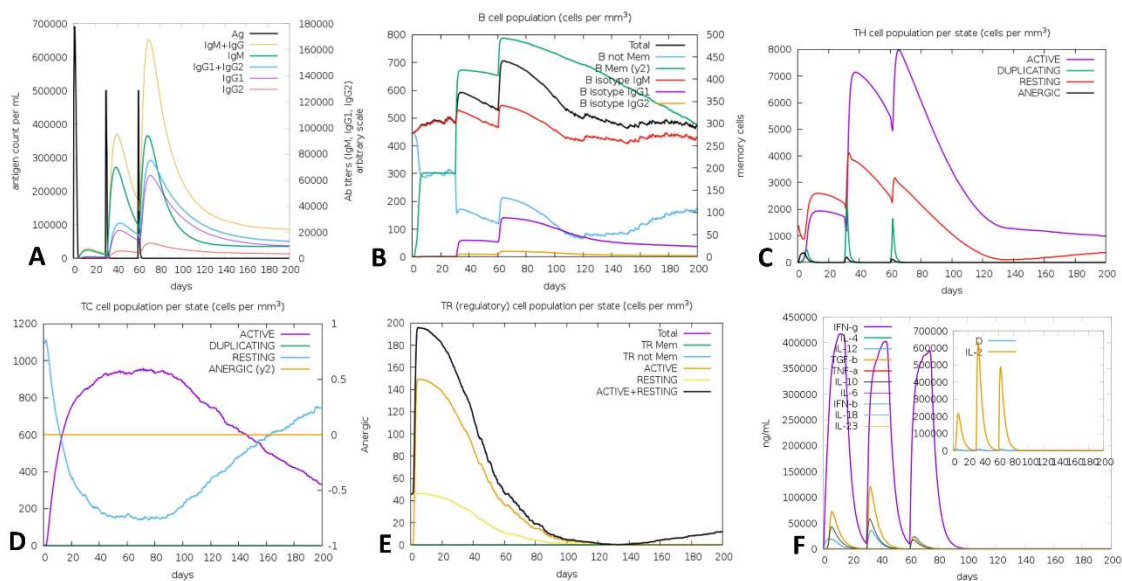
Fonte: autoria própria. A) Características dos epítomos descontínuos, B) Estrutura tridimensional dos epítomos.

Os epítomos de células B e T presentes na vacina devem ser capazes de estimular respostas humorais e celulares. A simulação imune com a vacina SMV4 no servidor C-ImmSim, com exposição repetida ao antígeno, mostrou um aumento consistente na geração de respostas imunes. Após a primeira exposição, ocorreu um grande aumento de níveis de IgM e a segunda e terceira exposição obteve respostas ainda maiores, distinguíveis pelo maior número de anticorpos IgM + IgG, IgG1 + IgG2, IgG1 e pela rápida limpeza na concentração do antígeno (**Figura 13A**). Populações de células B de isótipos IgM e IgG1 foram geradas de maneira considerável junto com células B de memória (**Figura 13B**). Além disso, células T, incluindo células TH (*helper*) e TC (citotóxicas) foram geradas em grande número (**Figura 13C, 13D**). Um nível significativo de células T regulatórias (Treg) foi encontrado após a exposição e sua consequente redução após alguns dias de exposição ao antígeno (**Figura 13E**).

Os níveis de IFN- γ e IL-2 tiveram um aumento após a primeira injeção e foram induzidos nas exposições seguintes (**Figura 13F**).

A presença de células B de isotópos IgM, IgG1 e de memória são requeridas para uma resposta humoral eficiente e para aquisição da imunidade de longo prazo (SHEY et al., 2019). As populações de células TH e TC demonstram uma resposta celular para defesa contra o patógeno em sua fase intra- e extracelular (QIN et al., 2021). Além disso, citocinas como IFN- γ e IL-2 contribuem para o desenvolvimento de respostas imunes celulares e pós-vacinação (CHAUDHURI et al., 2020). Ademais, o Index de Simpson demonstra que a vacina é capaz de estimular uma resposta imune robusta e diversa (RAHMAN et al., 2020).

Figura 13. Simulação imune de SMV4.



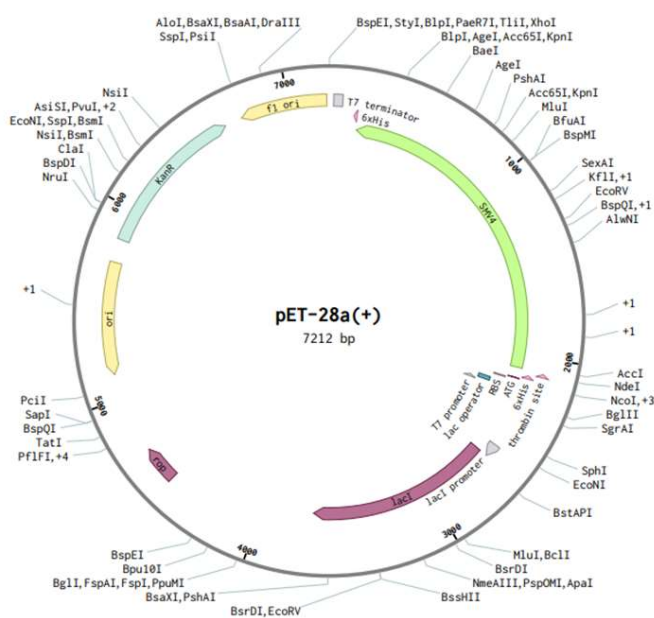
Fonte: Autoria própria. A) Imunoglobulinas após a injeção do antígeno, B) Populações de células-B, C) Geração de células HTL, D) Geração de células CTL, E) Níveis de células T-reg, F) Níveis de citocina e Index de Simpson.

4.11 Adaptação de códon e clonagem *in silico*

Durante a construção de uma vacina de epítotos, um estágio crítico é a clonagem eficiente e expressão em um vetor compatível (OBIDULLAH et al., 2021). A adaptação de códons é essencial por conta da degeneração do código genético, que permite que os aminoácidos sejam incorporados através de diversos códons (SHEY et al., 2021). Os códons de SMV4 foram adaptados para o vetor de expressão *E. coli*

K12, pelo servidor JCAT. A construção otimizada possuía 1917 pb de comprimento, um conteúdo G+C de 54,17%, além de possuir um CAI (*Codon Adaptation Index*, uma medida para avaliação da adaptação de códons), excelente (0,958), demonstrando a alta chance de expressão. Posteriormente, a sequência foi inserida entre os sítios XhoI e NdeI do plasmídeo pET-28a (+). O vetor tinha um comprimento total de 7212 pb (**Figura 14**).

Figura 14. Vetor de expressão pET28A (+) contendo SMV4.



Fonte: Autoria própria.

5 CONCLUSÃO

Um total de 49 isolados clínicos de *S. marcescens* completamente sequenciados foram utilizados e 5 proteínas essenciais, de virulência ou resistência, não homólogas a humanos, antigênicas, foram identificadas. Destas proteínas, epítomos de linfócitos T com alta afinidade a diversos alelos de HLA foram utilizados na construção de 4 modelos vacinais com diferentes adjuvantes. A modelagem tridimensional das construções foi satisfatória e SMV4 possuía a maior afinidade ao receptor TLR4. A vacina SMV4 apresentou 8 epítomos conformacionais de linfócitos B, que eram estáveis em meio fisiológico. A vacina era capaz de induzir respostas imunes celulares e humorais, através de estudos de simulação imune. Através dos resultados *in silico*, a construção possui a capacidade de ser expressa em *E. coli* K12. Futura validação experimental como a clonagem, expressão e purificação da vacina proposta, seguida da sua inoculação em murinos e ensaios citotóxicos serão necessários para estabelecer sua potência, eficácia e segurança.

6 REFERÊNCIAS

ABISADO, R. G. et al. Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. **mBio**, v. 9, n. 3, 2018.

ALLEMAILEM, K. S. A Comprehensive Computer Aided Vaccine Design Approach to Propose a Multi-Epitopes Subunit Vaccine against Genus *Klebsiella* Using Pan-Genomics, Reverse Vaccinology, and Biophysical Techniques. **Vaccines**, v. 9, n. 10, 27 set. 2021.

ALOM, M. W. et al. Exploring E, NS3, and NS5 proteins to design a novel multi-epitope vaccine candidate against West Nile Virus: An in-silico approach. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 25, p. 100644, 2021.

ANDREAE, D.; NOWAK-WĘGRZYN, A. The Effect of Infant Allergen/Immunogen Exposure on Long-Term Health. In: **Early Nutrition and Long-Term Health**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 131–173.

ASLAM, B. et al. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 771510, 2021.

AZIM, K. F. et al. Immunoinformatics approaches for designing a novel multi epitope peptide vaccine against human norovirus (Norwalk virus). **Elsevier B.V**, 2019. v. 74

BALIGA, P.; SHEKAR, M.; VENUGOPAL, M. N. Potential Outer Membrane Protein Candidates for Vaccine Development Against the Pathogen *Vibrio anguillarum*: A Reverse Vaccinology Based Identification. **Current Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 368–377, 8 mar. 2018.

BARCHIESI, J. et al. The PhoP/PhoQ System and Its Role in *Serratia marcescens* Pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 11, p. 2949–2961, jun. 2012.

BEKEREDJIAN-DING, I. Challenges for Clinical Development of Vaccines for Prevention of Hospital-Acquired Bacterial Infections. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 1755, 2020.

BIBI, S. et al. In silico analysis of epitope-based vaccine candidate against tuberculosis using reverse vaccinology. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2021.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 1 jan. 2015.

BLOOM, D. E. et al. Antimicrobial resistance and the role of vaccines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. National Academy of Sciences, 18 dez. 2018.

BUI, H. H. et al. Development of an epitope conservancy analysis tool to facilitate the design of epitope-based diagnostics and vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 361, 26 dez. 2007.

BUSH, K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 19, n. 4, p. 549–559, 2013.

CAI, J. C. et al. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolates Possessing the Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC-2 in Intensive Care Units of a Chinese Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2014–2018, jun. 2008.

CHAUDHURI, D. et al. In silico designing of peptide-based vaccine for Hepatitis viruses using reverse vaccinology approach. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 84, p. 104388, 2020.

CHEN, J. et al. An RND-type multidrug efflux pump SdeXY from *Serratia marcescens*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 176–179, 2003.

CHEN, Z. et al. Design of a new multi-epitope vaccine against brucella based on T and B cell epitopes. **Epidemiology and Infection**, 2021.

CHUKWUDOZIE, O. S. et al. Immuno-informatics design of a multimeric epitope peptide-based vaccine targeting SARS-CoV-2 spike glycoprotein. **PLoS ONE**, v. 16, n. 3, p. 1–25, mar. 2021.

CIOFU, O. *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal beta-lactamase in patients with cystic fibrosis and chronic lung infection. Mechanism of antibiotic resistance and target of the humoral immune response. **APMIS. Supplementum**, n. 116, p. 1–47, 2003.

CIOFU, O.; BAGGE, N.; HOIBY, N. Antibodies against beta-lactamase can improve ceftazidime treatment of lung infection with beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model of chronic lung infection. **APMIS**, v. 110, n. 12, p. 881–891, dez. 2002.

CRISTINA, M. L.; SARTINI, M.; SPAGNOLO, A. M. *Serratia marcescens* infections in neonatal intensive care units (NICUs). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 4, 2019.

CUI, Z. et al. Rv3091, An Extracellular Patatin-Like Phospholipase in *Mycobacterium tuberculosis*, Prolongs Intracellular Survival of Recombinant *Mycobacterium smegmatis* by Mediating Phagosomal Escape. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. set. 2020.

D'COSTA, V. M. et al. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 457–461, 31 set. 2011.

DE GROOT, A. S. et al. Making vaccines “on demand.” **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 9, n. 9, p. 1877–1884, 19 set. 2013.

DE GROOT, A. S. et al. Better Epitope Discovery, Precision Immune Engineering, and Accelerated Vaccine Design Using Immunoinformatics Tools. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 7 abr. 2020.

DEDIEU, L. et al. Mycobacterial lipolytic enzymes: A gold mine for tuberculosis research. **Biochimie**, v. 95, n. 1, p. 66–73, 2013.

DELANY, I.; RAPPUOLI, R.; SEIB, K. L. Vaccines, reverse vaccinology, and bacterial pathogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 5, 2013.

EBRAHIMI, S.; MOHABATKAR, H.; BEHBAHANI, M. Predicting Promiscuous T Cell Epitopes for Designing a Vaccine Against *Streptococcus pyogenes*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 1, p. 90–100, 11 jan. 2019.

ENGEL, H. J. et al. *Serratia* sp. bacteremia in Canberra, Australia: A population-based study over 10 years. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, n. 7, p. 821–824, 2009.

EVANS, B. A.; AMYES, S. G. B. OXA β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 241–263, abr. 2014.

FEDRIGO, G. V. et al. *Serratia marcescens* Is Able to Survive and Proliferate in Autophagic-Like Vacuoles inside Non-Phagocytic Cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e24054, 25 ago. 2011.

FERREIRA, R. L. et al. Characterization of KPC-Producing *Serratia marcescens* in an Intensive Care Unit of a Brazilian Tertiary Hospital. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1–14, maio 2020.

FIELD, C.; ALLEN, J. L.; FRIEDMAN, H. The immune response of mice to *Serratia marcescens* LPS or intact bacteria. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 105, n. 1, p. 193–203, jul. 1970.

FROST, L. S. et al. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 722–732, set. 2005.

GALANIS, K. A. et al. Linear B-Cell Epitope Prediction for In Silico Vaccine Design: A Performance Review of Methods Available via Command-Line Interface. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3210, 22 mar. 2021.

GASPAR, A. H.; MACHNER, M. P. VipD is a Rab5-activated phospholipase a1 that protects *Legionella pneumophila* from endosomal fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 12, p. 4560–4565, 2014.

GASTMEIER, P. et al. Outbreaks in neonatal intensive care units – they are not like others. **Am. J. Infect. Control**, v. 35, n. 3, p. 172-6, 2007.

GHAFFARI-NAZARI, H. et al. Improving multi-epitope long peptide vaccine potency by using a strategy that enhances CD4⁺ T Help in BALB/c mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–12, 2015.

GIACOBBE, D. R. et al. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: results from a multicenter case-control-control study. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 21, n. 12, p. 1106.e1-8, 2015.

GOLLOP, R.; INOUYE, M.; INOUYE, S. Protein U, a late-developmental spore coat protein of *Myxococcus xanthus*, is a secretory protein. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 11, p. 3597–3600, 1991.

GÓMEZ-SANTOS, N. et al. A TonB-dependent transporter is required for secretion of protease PopC across the bacterial outer membrane. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.-R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v. 361, n. 9356, p. 512–519, fev. 2003.

HAIJIGHAHRAMANI, N. et al. Immunoinformatics analysis and in silico designing of a novel multi-epitope peptide vaccine against *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 48, p. 83–94, 2017.

HE, Y.; XIANG, Z.; MOBLEY, H. L. T. Vaxign: The first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010.

HERTLE, R.; SCHWARZ, H. *Serratia marcescens* internalization and replication in human bladder epithelial cells. **BMC Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 16, 9 dez. 2004.

HILDEBRAND, P. W.; ROSE, A. S.; TIEMANN, J. K. S. Bringing Molecular Dynamics Simulation Data into View. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 44, n. 11, p. 902–913, nov. 2019.

HUANG, X. et al. First Report of blaIMP-4 and blaSRT-2 Coproducing *Serratia marcescens* Clinical Isolate in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 1 out. 2021.

HUEMER, M. et al. Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives. **EMBO reports**, v. 21, n. 12, p. e51034, 2020.

IGUCHI, A. et al. Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 8, p. 2096–2110, 2014.

JACOBY, G. A. AmpC β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161–182, jan. 2009.

JALAL, K. et al. Pan-Genome Reverse Vaccinology Approach for the Design of Multi-Epitope Vaccine Construct against *Escherichia albertii*. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 23, 26 nov. 2021.

JANSEN, K. U.; ANDERSON, A. S. **The role of vaccines in fighting antimicrobial resistance (AMR)**. **Human Vaccines and Immunotherapeutics** Taylor and Francis Inc., 2 set. 2018.

JESPERSEN, M. C. et al. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W24–W29, 3 jul. 2017.

JOICE, R.; LIPSITCH, M. Targeting Imperfect Vaccines against Drug-Resistance Determinants: A Strategy for Countering the Rise of Drug Resistance. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e68940, 25 jul. 2013.

KANELLOPOULOS, J. M.; OJCIUS, D. M. Development of humoral immunity. **Biomedical journal**, v. 42, n. 4, p. 207–208, 2019.

KATHWATE, G. H. In silico Design and Characterization of Multi-epitopes Vaccine for SARS-CoV2 from Its Spike Protein. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 28, n. 1, 1 jan. 2022.

KAUFMANN, S. H. E. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. **Trends in Immunology**, v. 26, n. 12, p. 660–667, dez. 2005.

KHAN, M. T. et al. Immunoinformatics and molecular dynamics approaches: Next generation vaccine design against West Nile virus. **PLoS ONE**, v. 16, n. 6 June, p. 1–27, 2021.

KHANNA, A.; KHANNA, M.; AGGARWAL, A. *Serratia marcescens*- a rare opportunistic nosocomial pathogen and measures to limit its spread in hospitalized patients. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 2, p. 243–246, 2013.

KIM, B. et al. Risk factors for mortality in patients with *serratia marcescens* bacteremia. **Yonsei Medical Journal**, v. 56, n. 2, p. 348–354, 2015.

KOEBNIK, R.; LOCHER, K. P.; VAN GELDER, P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 239–253, jul. 2000.

KOZLOWSKI, L. P. IPC – Isoelectric Point Calculator. **Biology Direct**, v. 11, n. 1, p. 55, 21 dez. 2016.

KREGER, A. S. et al. Immunization against experimental *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* keratitis. Vaccination with lipopolysaccharide endotoxins and proteases. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 27, n. 6, p. 932–9, jun. 1986.

KRÖNKE, M. et al. T-T cell interactions during in vitro cytotoxic T lymphocyte responses. V. Precursor frequencies and specificity of alloreactive helper T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 156, n. 1, p. 41–54, 1 jul. 1982.

KUMAGAI, Y.; OKADA, K.; SAWAE, Y. The effect of humoral and cell-mediated immunity in resistance to systemic *Serratia* infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 245–249, 1 abr. 1992.

LATA, K. S. et al. Exploring Leptospiral proteomes to identify potential candidates for vaccine design against Leptospirosis using an immunoinformatics approach. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018.

LEITÃO, J. H. Microbial Virulence Factors. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 15, 27 jul. 2020.

LI, W. et al. TonB-Dependent Receptors Affect the Spontaneous Oxytetracycline Resistance Evolution in *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Proteome Research**, v. 20, n. 1, p. 154–163, 2021.

LÓPEZ-SILES, M.; CORRAL-LUGO, A.; MCCONNELL, M. J. Vaccines for multidrug resistant Gram negative bacteria: lessons from the past for guiding future success. **FEMS Microbiology Reviews**, 1 maio 2021.

MAHLEN, S. D. *Serratia* infections: From military experiments to current practice. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 755–791, 2011.

MAJID, M.; ANDLEEB, S. Designing a multi-epitopic vaccine against the enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* based on immunoinformatics approach. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019.

MICHAEL, C. A.; DOMINEY-HOWES, D.; LABBATE, M. The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management. **Frontiers in Public Health**, v. 2, 16 set. 2014.

MICOLI, F. et al. **The role of vaccines in combatting antimicrobial resistance.** **Nature Reviews Microbiology** Nature Research, 1 maio 2021.

MONTEERRUBIO-LÓPEZ, G. P.; DELGADILLO-GUTIÉRREZ, K. [Reverse vaccinology: strategy against emerging pathogens]. **Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 59, n. 3, p. 233–241, 13 ago. 2021.

MONTEERRUBIO-LÓPEZ, G. P.; GONZÁLEZ-Y-MERCHAND, J. A.; RIBAS-APARICIO, R. M. Identification of novel potential vaccine candidates against tuberculosis based on reverse vaccinology. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 11–14, 2015.

MORADIGARAVAND, D. et al. Recent independent emergence of multiple multidrug-resistant *Serratia marcescens* clones within the United Kingdom and Ireland. **Genome Research**, v. 26, n. 8, p. 1101–1109, ago. 2016.

MOXON, R.; RECHE, P. A.; RAPPUOLI, R. Editorial: Reverse Vaccinology. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1–2, dez. 2019.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, 25 mar. 2016.

MURRAY, C. J. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, jan. 2022.

MURUATO, L. A. et al. Use of Reverse Vaccinology in the Design and Construction of Nanoglycoconjugate Vaccines against *Burkholderia pseudomallei*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 24, n. 11, nov. 2017.

NAZ, A. et al. **Reverse vaccinology and drug target identification through pan-genomics**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020.

NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 593–656, dez. 2003.

OBAIDULLAH, A. J. et al. Immunoinformatics-guided design of a multi-epitope vaccine based on the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. **RSC Advances**, v. 11, n. 29, p. 18103–18121, 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Antimicrobial Resistance. 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>, acessado em: 22/08/2022.

OZAWA, Y. et al. Mucosal Vaccine Using CTL Epitope-Pulsed Dendritic Cell Confers Protection for Intracellular Pathogen. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 41, n. 4, p. 440–448, out. 2009.

PAGÈS, J.-M.; JAMES, C. E.; WINTERHALTER, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 893–903, 10 dez. 2008.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SOARES, I. DA S.; ROSA, D. S. Editorial: Epitope discovery and synthetic vaccine design. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. APR, p. 9–11, 2018.

PARENTE, T. M. A. L. et al. *Serratia marcescens* resistance profile and its susceptibility to photodynamic antimicrobial chemotherapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 14, p. 185–190, 2016.

PIZZA, M. et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, v. 287, n. 5459, p. 1816–1820, 2000.

PLOTKIN, S. History of vaccination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 34, p. 12283–7, 26 ago. 2014.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 20–51, 1 jul. 2005.

QIN, Y. et al. Identification of Novel T-Cell Epitopes on Infectious Bronchitis Virus N Protein and Development of a Multi-epitope Vaccine. **Journal of Virology**, v. 95, n. 17, 10 ago. 2021.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, jul. 2007.

RAHMAN, M. S. et al. Epitope-based chimeric peptide vaccine design against S, M and e proteins of SARS-CoV-2, the etiologic agent of COVID-19 pandemic: An in silico approach. **PeerJ**, v. 8, 2020.

RANKIN, D. J.; ROCHA, E. P. C.; BROWN, S. P. What traits are carried on mobile genetic elements, and why? **Heredity**, v. 106, n. 1, p. 1–10, jan. 2011.

RASHID, M. I. et al. Fishing for vaccines against *Vibrio cholerae* using in silico pan-proteomic reverse vaccinology approach. **PeerJ**, v. 7, p. e6223, 19 jun. 2019.

RIOSERAS, B. et al. Characterization of SCO4439, a D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase involved in spore cell wall maturation, resistance, and germination in *Streptomyces coelicolor*. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–15, 2016.

RODRIGUES, T. C. V. et al. Reverse vaccinology and subtractive genomics reveal new therapeutic targets against *Mycoplasma pneumoniae*: A causative agent of pneumonia. **Royal Society Open Science**, v. 6, n. 7, 2019.

RUIZ, N. et al. The role of *Serratia marcescens* porins in antibiotic resistance. **Microbial Drug Resistance**, v. 9, n. 3, p. 257–264, 2003a.

RUIZ, N. et al. The Role of *Serratia marcescens* Porins in Antibiotic Resistance. **Microbial Drug Resistance**, v. 9, n. 3, p. 257–264, ago. 2003b.

SANDNER-MIRANDA, L. et al. The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–16, 2018.

SCHALK, I. J.; MISLIN, G. L. A.; BRILLET, K. **Structure, Function and Binding Selectivity and Stereoselectivity of Siderophore-Iron Outer Membrane Transporters**. [s.l.] Elsevier, 2012. v. 69

SCHMIEL, D. H.; MILLER, V. L. Bacterial phospholipases and pathogenesis. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 13, p. 1103–1112, 1999.

SEIB, K. L.; ZHAO, X.; RAPPUOLI, R. Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 109–116, out. 2012.

SHEY, R. A. et al. In-silico design of a multi-epitope vaccine candidate against onchocerciasis and related filarial diseases. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2019.

SHEY, R. A. et al. Computational Design and Preliminary Serological Analysis of a Novel Multi-Epitope Vaccine Candidate Against Onchocerciasis and Related Filarial Diseases. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 99, 21 jan. 2021.

SHIMUTA, K. et al. The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhIA) depend on lysophospholipid production by PhIA. **BMC microbiology**, v. 9, p. 261, 16 dez. 2009.

SHIRSHIKOVA, T. V et al. The ABC-Type Efflux Pump MacAB Is Involved in Protection of *Serratia marcescens* against Aminoglycoside Antibiotics, Polymyxins, and Oxidative Stress. **mSphere**, v. 6, n. 2, 2021.

SIROT, D. et al. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 20, n. 3, p. 323–334, 1987.

SOLANKI, V.; TIWARI, M.; TIWARI, V. Prioritization of potential vaccine targets using comparative proteomics and designing of the chimeric multi-epitope vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–19, 2019.

SOLANKI, V.; TIWARI, V. Subtractive proteomics to identify novel drug targets and reverse vaccinology for the development of chimeric vaccine against *Acinetobacter baumannii*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–19, 2018.

TOBA, S. et al. Comprehensive analysis of resistance-nodulation-cell division superfamily (RND) efflux pumps from *Serratia marcescens*, Db10. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 4854, 2019.

TOMARAS, A. P. et al. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. **Microbiology**, v. 149, n. 12, p. 3473–3484, 2003.

TREANOR, B. B-cell receptor: from resting state to activate. **Immunology**, v. 136, n. 1, p. 21–27, maio 2012.

TRECARICHI, E. M.; TUMBARELLO, M. Therapeutic options for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. **Virulence**, v. 8, n. 4, p. 470-484, 2017.

TZOUVELEKIS, L. S. et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 4, p. 682–707, out. 2012.

WASSENAAR, T. M.; GAASTRA, W. Bacterial virulence: Can we draw the line? **FEMS Microbiology Letters**, v. 201, n. 1, p. 1–7, 2001.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server, p. W407–W410, 8 maio 2007.

XIONG, Q. et al. Bacteria Exploit Autophagy For Their Own Benefit. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 12, p. 3205–3215, out. 2019.

YANG, A. et al. Influence of Physical Effects on the Swarming Motility of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biophysical Journal**, v. 112, n. 7, p. 1462–1471, abr. 2017.

ZHANG, Z. et al. Identification of ireA, 0007, 0008, and 2235 as TonB-dependent receptors in the avian pathogenic *Escherichia coli* strain DE205B. **Veterinary Research**, v. 51, n. 1, p. 1–10, 2020.

ZHOU, A. Q.; O'HERN, C. S.; REGAN, L. Revisiting the Ramachandran plot from a new angle. **Protein Science**, v. 20, n. 7, p. 1166–1171, jul. 2011.

7 ARTIGO EM PRELO



A Systematic Immuno-Informatic Approach to Design a Multiepitope-Based Vaccine Against Emerging Multiple Drug Resistant *Serratia marcescens*

Marcelo Silva Folhas Damas^{1†}, Fernando Gabriel Mazur^{1†}, Caio Cesar de Melo Freire¹, Anderson Ferreira da Cunha¹ and Maria-Cristina da Silva Pranchevicius^{1,2*}

¹ Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil, ² Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Biodiversidade Tropical – BIOTROP, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:
Shisong Jiang,
University of Oxford, United Kingdom

Reviewed by:
Wayne Robert Thomas,
University of Western Australia,
Australia
Rupert Laurenz Mayer,
VB-UGent Center for Medical
Biotechnology, Belgium

***Correspondence:**
Maria-Cristina da Silva Pranchevicius
mcspranc@gmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:
This article was submitted to
Vaccines and Molecular Therapeutics,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 31 August 2021

Accepted: 14 February 2022

Published: 14 March 2022

Citation:
Damas MSF, Mazur FG, Freire CCM,
Cunha AF and Pranchevicius MC
(2022) A Systematic Immuno-
Informatic Approach to Design a
Multiepitope-Based Vaccine Against
Emerging Multiple Drug Resistant
Serratia marcescens.
Front. Immunol. 13:768569.
doi: 10.3389/fimmu.2022.768569

Serratia marcescens is now an important opportunistic pathogen that can cause serious infections in hospitalized or immunocompromised patients. Here, we used extensive bioinformatic analyses based on reverse vaccinology and subtractive proteomics-based approach to predict potential vaccine candidates against *S. marcescens*. We analyzed the complete proteome sequence of 49 isolate of *Serratia marcescens* and identified 5 that were conserved proteins, non-homologous from human and gut flora, extracellular or exported to the outer membrane, and antigenic. The identified proteins were used to select 5 CTL, 12 HTL, and 12 BCL epitopes antigenic, non-allergenic, conserved, hydrophilic, and non-toxic. In addition, HTL epitopes were able to induce interferon-gamma immune response. The selected peptides were used to design 4 multi-epitope vaccines constructs (SMV1, SMV2, SMV3 and SMV4) with immune-modulating adjuvants, PADRE sequence, and linkers. Peptide cleavage analysis showed that antigen vaccines are processed and presented via of MHC class molecule. Several physiochemical and immunological analyses revealed that all multiepitope vaccines were non-allergenic, stable, hydrophilic, and soluble and induced the immunity with high antigenicity. The secondary structure analysis revealed the designed vaccines contain mainly coil structure and alpha helix structures. 3D analyses showed high-quality structure. Molecular docking analyses revealed SMV4 as the best vaccine construct among the four constructed vaccines, demonstrating high affinity with the immune receptor. Molecular dynamics simulation confirmed the low deformability and stability of the vaccine candidate. Discontinuous epitope residues analyses of SMV4 revealed that they are flexible and can interact with antibodies. In silico immune simulation indicated that the designed SMV4 vaccine triggers an effective immune response. In silico codon optimization and cloning in expression vector indicate that SMV4 vaccine can be efficiently expressed in *E. coli* system. Overall, we showed that SMV4 multi-epitope vaccine successfully elicited antigen-specific humoral and cellular immune responses and

may be a potential vaccine candidate against *S. marcescens*. Further experimental validations could confirm its exact efficacy, the safety and immunogenicity profile. Our findings bring a valuable addition to the development of new strategies to prevent and control the spread of multidrug-resistant Gram-negative bacteria with high clinical relevance.

Keywords: *Serratia marcescens*, reverse vaccinology, multidrug resistance, computational approaches, subtractive proteomics

INTRODUCTION

The spread of antimicrobial resistance (AMR) is urgent, especially regarding bacteria (1). Once resistant strains emerge, the options for effective antibiotic therapy become limited and their alarming spread around the globe has not been followed by the development of novel antibiotics (2, 3). AMR produces significant impacts on human health around the world, causing troublesome levels of morbidity and mortality leading to dramatic economic consequences (4). It has been estimated that 10 million lives a year will be lost to AMR by 2050, and cumulative loss of world economies might be as high as \$100 trillion (2, 5). AMR is a serious issue that demands an organized global action plan (4, 6, 7). Developing novel and integrated strategies are paramount to effectively fight AMR; these strategies include the development of monoclonal antibodies, new antibiotics, new diagnostics, new vaccines that target antibiotic-resistant bacteria, and increasing coverage of existing vaccines (3, 4, 8).

Serratia spp. is within the World Health Organization (9) global priority list of multidrug-resistant (MDR) bacteria that poses a major threat to human health around the world. Hence, there is an urgent need to development new and effective treatments and prevention strategies. *Serratia marcescens* is a Gram-negative *Enterobacteriaceae* species that has emerged as a neglected opportunistic human pathogen (10). This species can cause a variety of infections, including respiratory, bloodstream, skin, ocular, urinary, and catheter-related infections, as well as meningitis and sepsis in immunocompromised or critically ill patients, especially those in intensive care units (ICUs) and neonatal intensive care units (NICU). Studies have reported an increase in the number, and it of multidrug-resistant *S. marcescens* strains worldwide (11) and this increase has been related to severe outcomes (12) and a high mortality rate (13, 14).

Several studies and medical experiments have supported that *S. marcescens* may be promising for vaccine development. For instance, Field et al. (15) immunized adult mice with lipopolysaccharide (LPS) somatic antigen, or a heat-killed vaccine of *Serratia marcescens* and observed a rapid presence of specific antibody-forming cells in the spleen, in the mesenteric nodes, and in the thymus. Kreger et al. (16) showed that the severity of experimentally induced corneal disease by *S. marcescens* is considerably reduced by immunization against either the lipopolysaccharide endotoxins or the proteases of the bacteria. Kumagai et al. (17) showed that the protection against an experimental *Serratia marcescens* infection in mice was

enhanced by prior injection of formalin-killed or viable bacteria of the same strain. They suggested that the humoral immunity and T-cell-mediated immunity were associated with protection against systemic *Serratia* infection. Shi et al. (18) reported that *S. marcescens* vaccine was effective for malignant pleural effusion and presented tolerable toxic effects. In the late 19th century, William Coley developed a formulation containing *Streptococcus pyogenes* and *S. marcescens* called by various names, such as Coley's fluid, Coley's vaccine, mixed bacterial vaccine (MBV), Coley's toxins, and Vaccineurin. This formulation was used to treat sarcoma in many countries until 1990 (19–21). In the 1970s, Coley's mixture (MBV) was further investigated, and it has been used in clinical trials against different types of cancer presenting variable results (22–27). The recent interest in MBV is motivated by humoral and cellular immunity to cancer antigens, which has the ability to spontaneously induce antibody responses. The stimulation of the innate immune system produces a complex cascade of cytokines that contribute to the immune recognition of cancer, possibly inducing apoptosis (22).

Vaccination is one of the most effective means to efficiently, rapidly and affordably improve public health; it is also the most feasible way to eradicate a variety of infectious diseases (28). Current vaccine research has mostly focused on peptide and subunit vaccines instead of whole organism vaccines. This is because subunit vaccines contain specific immunogenic components of the pathogens responsible for the infection rather than the whole pathogen. Traditional approaches for vaccine production have also been considered less efficient than computational approaches for a variety of reasons, including inaccuracy, safety, stability, high cost, hypersensitivity, and specificity.

Reverse vaccinology (RV), subtractive proteomics (SP), and genomics studies have emerged as powerful computational tools that have revolutionized the identification of drug targets and potential vaccine candidates (29). These methodologies are able to identify *in silico* the complete repertoire of immunogenic antigens and druggable targets that an organism is capable of expressing without the need of culturing the microorganism (30). In addition, it reduces the dependence on conventional animal testing based screening for getting a potentially suitable candidate, minimizing the time consuming and cost of the vaccine and drug development processes (31). Since the first application of reverse vaccinology that was used to development of a vaccine against serogroup B *Neisseria meningitidis* (MenB) (32), this tool has been used in the identification of numerous promising vaccine candidates against many bacterial pathogens, including *Mycoplasma pneumoniae* (33),

Pseudomonas aeruginosa (34), *Mycobacterium tuberculosis* (30), *Acinetobacter baumannii* (35), and *Neisseria meningitidis* (36).

In this study, we have applied RV and SP based computational strategies and selected a new multi epitope-based vaccine candidate against *Serratia marcescens*, which can be used in further experiments to validate its efficacy, safety, and immunogenic profile.

MATERIAL AND METHODS

Subtractive proteomics and reverse vaccinology approaches were used to identify potential vaccine candidates against the *S. marcescens* strain. A flowchart summarizing the methodology is shown in **Figure 1**.

Data Collection of Proteome and Selection of Core Proteins

The proteome sequences of 49 *S. marcescens* were downloaded from the Genome Project database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Out of these proteomic sequences, one corresponded to the representative proteome of *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* Db11 and 48 sequences were from *S. marcescens* associated with human infections. Bacterial Pan Genome Analysis (BPGA) tool (37) version 1.3 was used to

identify core (conserved) protein families (**Supplementary Data Sheet 2**). BPGA uses USEARCH as a default protein clustering tool with an identity cut off = 50%. Strain names, source of isolation, country, RefSeq assembly accession numbers, assembly levels, and references are shown in **Supplementary File Table S1**.

Screening of Essential Proteins, Virulence Factors and Resistance Proteins

The identified core protein families related to 49 bacteria species were subjected to BLASTp searches against the Database of Essential Genes (DEG 10) providing the essential information of the proteins (35, 38–42). DEG is a database for essential genes that is frequently updated (43, 44). The parameters of the analysis were E-value $\leq 10^{-4}$ and bitscore ≥ 100 (**Supplementary Data Sheet 3**). The core proteins of *S. marcescens* were also subjected to BLASTp search against Virulence Factor database (VFdb) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) (45) and Microbial virulence DataBase (MvirDB) (<http://mvirdb.lnl.gov/>) (**Supplementary Data Sheet 4**) (46). In both databases, the E-value cut-off was set to $\leq 10^{-4}$ and bitscore ≥ 100 . The resistance associated proteins were found through a BLASTp against two databases, ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation), which provides protein sequences associated with antibiotic (47), and CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database), a database of peer-reviewed antibiotic resistance determinants (**Supplementary Data Sheet 5**) (48). The E-value cut-off for both antibiotic resistance analyses was $\leq 10^{-4}$.

Subtracting Gut-Human Homologous and Human Non-Homology Proteins

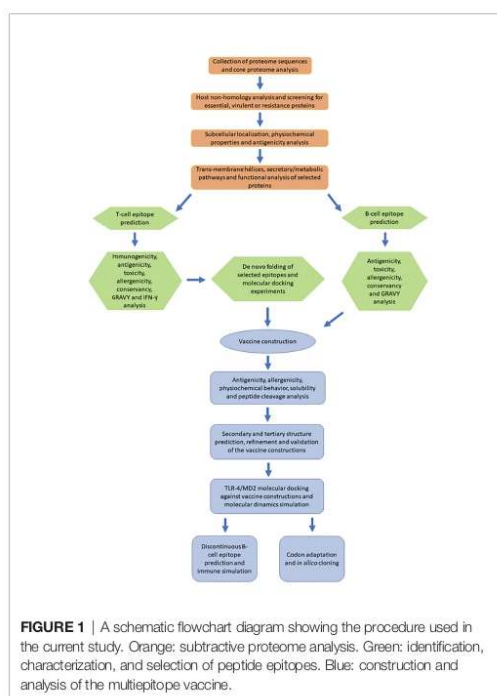
The identified essential, virulent or resistance associated proteins were filtered against the proteome of host *Homo sapiens* (taxid:9606), using BLASTp with E-value of $\leq 10^{-4}$ (**Supplementary Data Sheet 6**). The host non-homologue proteins were filtered against a custom protein database containing 79 human gut floral species [see supplementary Text 1 from (44, 49)]. For subtraction of homologous sequence between gut microbiota and *S. marcescens*, we carried out BLASTp analysis. The obtained hits with an E-value of $\leq 10^{-4}$ and similarity $\geq 50\%$ were considered as gut-flora homologous proteins and excluded from further analyses (**Supplementary Data Sheet 7**).

Prediction of Subcellular Localization

Prediction of selected proteins subcellular localization was done by using two different web servers: PSORTb v3.0.2 (50) algorithm (<https://www.psорт.org/psорт/>) that determines different subcellular localization like cytoplasmic membrane, outer membrane, periplasm, extracellular, cytoplasmic, and unknown; and CELLO v2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) (51), a web-based system which is also used for predicting protein subcellular localization.

Physicochemical Property and Antigenicity Analysis of Proteins

Physicochemical properties such as number of amino acids and molecular weight were examined on the online servers ExPASy



ProtParam (52) (<https://web.expasy.org/protparam/>) and UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Antigenicity of proteins was predicted using two online servers: Vaxijen v2.0 (53), (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/Vaxijen/Vaxijen.html>) which predicts whether a protein could be a protective antigen based on physicochemical properties of amino acid sequence and has a threshold value ≥ 0.5 ; and AntigenPRO (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>), an alignment-free, sequence-based and pathogen-independent predictor of protein antigenicity with 79% accuracy and an area under curve (AUC) of 0.89 (54).

Identification of Trans-Membrane Alpha-Helices and Secretory Pathway Analysis

To assess the proteins getting embedded in the plasma membrane and to subtract those being exported, we submitted the amino acid sequences from the outer membrane, periplasm and extracellular proteins of *S. marcescens* to the TMHMM v.2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) server, which predicted the topology of these proteins by the Markov method (55). Secretory pathway was analyzed using SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>), a server based on deep neural network method that predicts signal peptide (SP) sequences and discriminates among three main types of SPs (56).

Pathogen-Specific Pathways and Functionality Analysis of Selected Proteins

The comparison between metabolic pathways of *S. marcescens* and human pathways was done manually, using KEGG (Kyoto encyclopedia of gene and genome) pathway database. Proteins that play a role in unique and shared pathways in both pathogen and host were enlisted (Table S2) (35). Protein function prediction was made by three different servers: UniProt, KEGG Genes Database, and InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), a server that provides family classification, biological process and molecular function of the protein (57).

Prediction of T Cell and B Cell Epitope

The prediction of MHC-I epitopes was performed by three servers: IEDB Tepitool prediction (<http://tools.iedb.org/tepitool/>) server (58), NetMHCpan 4.1 BA (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCpan-4.1>), and NetCTLpan 1.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetCTLpan-1.1>). In the IEDB server, 27 different alleles that cover more than 97% of the global population were selected for MHC class I predictions (59). Identified T-cell epitopes having alleles with IC50 value ≤ 50 nM were considered of high binding affinity. The default prediction method was set as the IEDB recommended that uses the Consensus method consisting of ANN (Artificial neural network, also called as NetMHC, version 3.4), SMM (Stabilized matrix method), CombLib (Scoring Matrices derived from Combinatorial Peptide Libraries), and NetMHCpan (version 2.8). NetMHCpan 4.1 server predicts binding of peptides to any MHC molecule of a known sequence using artificial neural networks (ANNs). We used a threshold value IC50 ≤ 50 nM and a percentile rank ≤ 0.20 (34).

NetCTLpan 1.1 server performs integrate prediction of peptide MHC class I binding, proteasomal C terminal cleavage, and TAP transport efficiency. In this analysis, the threshold value was set as 0.75 (35).

Predictions of MHC class II epitopes or HTL epitopes were made by Tepitool, using the IEDB recommended method. A set of the 26 most frequent human class II alleles from DP, DQ, and DR loci was used. Selection criteria was peptides with binding affinity ≤ 50 nM for IC50. Prediction of linear B-cell epitopes or BCL epitopes for proteins was achieved by using IEDB server, ABCpred, and Bcepred. IEDB server predicted epitopes based on antigenicity (60), accessibility (61), linear epitope (Bepipred-1.0) (62) and sequential/conformational epitope (BepiPred-2.0) (63). ABCpred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/>) uses Artificial Neural Network (ANN) machine-learning to predict B-cell epitopes and has an accuracy of 65.93%. In this server, parameters were set to default. Bcepred (https://webs.iitd.edu.in/raghava/bcepred/bcepred_instructions.html) predicted B-cell epitopes based on four amino acid properties (hydrophilicity, flexibility, polarity and exposed surface). We used a threshold of 2.38 that predicts epitopes with 58.7% accuracy

MHC Class I Immunogenicity Determination

The MHC I immunogenicity prediction were assessed by the IEDB server (64) (<http://tools.immuneepitope.org/immunogenicity/>). A high score suggests a higher probability of stimulating an immune response. The epitopes with positive immunogenicity value were selected for further studies.

Antigenicity, Toxicity, Allergenicity of Selected Epitopes

The epitopes of MHC Class I, MHC Class II and LB were screened for their antigenic properties by Vaxijen2.0. The threshold for MHC class I and MHC class II epitopes was set to ≥ 0.5 , and to ≥ 0.70 for the B-cell epitopes (53). The antigenic B-Cell epitopes obtained, with 9 or more amino acids in length and those that overlapped with the amino acids sequences found in IEDB, ABCpred and Bcepred tools were selected for toxicity and allergenicity analyses. The toxicity prediction was carried out using ToxinPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/toxinpred/index.html>), keeping all the parameters to default. This tool predicts the antigenic behavior of epitopes through their physicochemical properties and confirms that the specific immune responses in the host cell will only target the bacteria rather and not host tissue (65). Allergenicity analysis was conducted with AllerTOP v2.0 server (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/feedback.py>). This is a server based on the main physicochemical properties of proteins (66), presenting an accuracy of 88.7% (67).

Conservancy, Hydrophobicity and IFN-Inducing Validation of Selected Epitopes

The conservancy of MHC Class I and MHC Class II selected epitopes within protein sequences were predicted using IEDB web server (68). For calculating the conservancy score, the

sequence identity threshold was kept at 100%. Grand average of hydropathicity of MHC Class I, MHC Class II and LB epitopes were done using ProtParam (52) server. The GRAVY value is described by the sum of hydropathy values of all amino acids divided by the protein's length (34). A negative value implies that protein contains hydrophilic properties whereas a positive GRAVY value indicates that the protein is hydrophobic (35). For further refinements, we investigated whether Helper T cell (HTL) epitope can induce IFN gamma immune response using the IFN epitope server (69) (<http://crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/>), an online tool with 82.10% accuracy. The server constructs overlapping sequences from which the IFN- γ epitopes are predicted. The default prediction method was set as "Motif and Support Vector Machine (SVM) hybrid" and "IFN-gamma vs. Non-IFN-gamma" model to predict IFN- γ -inducing peptides based on score. The higher the score, the higher the chance of inducing IFN- γ (70). Although the IFN epitope server has limitations regarding the number of residues that can be used for prediction (71), it is a common online prediction server used for vaccine design (70, 72–74). Therefore, the epitopes with positive results for the IFN- γ response were selected for further prediction.

Predicting Three Dimensional (3D) Epitope Structure and Molecular Docking of the Selected Epitopes

The best-selected MHC class I and MHC class II epitopes were submitted to PEP-FOLD3 server (<http://bioserv.rpbs.univ-parisdiderot.fr/services/PEP-FOLD3/>), an online tool for generating *de novo* peptide 3D structure (75). The docking experiments were made using PatchDock (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/php.php>) tool. The obtained models were refined and re-scored by FireDock server (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/>), that ranks the docked models by their global energy, and the lowest global energy represented the best prediction (76). The MHC class I epitopes were docked with HLA-A*0101 (PDB: 6AT9), HLA-A*0201 (PDB: 3UTQ), HLA-B*1501 (PDB: 1XR8), HLA-B*3501 (PDB: 1ZSD), HLA-B*3901 (PDB: 4O2E), HLA-B*5301 (PDB: 1A1M), HLA-B*5801 (PDB: 5IM7), HLA-B*4403 (PDB: 1SYS) alleles. The alleles used to MHC Class II epitopes were: HLA-DRB1*0101 (PDB: 2FSE), HLA-DRB1*0301 (PDB: 1A6A), HLA-DRB1*0401 (PDB: 2SEB), HLA-DRB1*1501 (PDB: 1BX2), HLA-DRB3*0101 (PDB: 2Q6W), HLA-DRB3*0202 (PDB: 3C5J) and HLA-DRB5*0101 (PDB: 1H15). The docked structures were visualized using PyMol tool (<https://pymol.org/pymol.html>) (67). The epitopes that showed the best binding affinity were selected for vaccine construction.

Vaccine Construction

Best binding peptides were selected for potential vaccine candidate. To construct the vaccine, CTL, HTL and BCL epitopes were linked together by GGGs, GPGPG and KK linkers. GGGs linkers were used to conjugate the Universal Pan HLA DR sequence (PADRE) sequence with CTL epitopes and the CTL epitopes among themselves. GPGPG linkers were used to conjugate the CTL epitopes with HTL epitopes and also

the HTL epitopes with the other HTL. KK linkers were used to attach the HTL and BCL epitopes as well as the BCL epitopes among themselves (67). Adjuvants sequences were linked with the help of EAAAK linkers at both N- and C-terminus, and EAAAK linkers were also used to conjugate the PADRE sequence (AKFVAAWTLKAAA) (35). Five different adjuvant sequences were used to attach the PADRE sequence: 50s ribosomal L7/L12 protein (77), beta-defensin (78), HBHA protein (*M. tuberculosis*, accession number: AGV15514.1), and HBHA conserved sequence (79).

Antigenicity and Allergenicity of Vaccine Constructs

Vaxijen 2.0 and ANTIGENpro server were used to determine the antigenicity of the vaccine constructs. AllerTOP and AlgPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/algpred/>) servers were used to evaluate the allergen potential of the multi-epitope vaccine construct. Allergen prediction is based on similarity of known epitope of any of the known region of the protein. It uses MAST to search MEME/MAST allergen motifs and predict the allergen if it has a motif. AlgPred is an SVM module based program which uses amino acid or dipeptide composition for the prediction of allergen. The parameters (IgE epitope + MAST + SVM + ARPs BLAST) were combined to predict the allergenicity of vaccine constructs (35, 80).

Solubility Prediction and Physicochemical Behavior Analysis of Vaccine Constructs

SOLpro of Scratch Protein predictor was used for vaccine solubility estimation. SOLpro performs a two-stage SVM architecture method based on multiple representations of the primary sequence (81). The overall accuracy of SOLpro is estimated in over 74% using multiple runs of ten-fold cross-validation (81). Vaccine constructs physicochemical properties were analyzed using ExPASy ProtParam server, which determined the number of amino acids, molecular weight, theoretical isoelectric point (PI), instability and aliphatic index, and hydropathicity GRAVY values.

Peptide Cleavage Analysis

Proteasomal cleavage is important for T Cell epitope presentation. This was analyzed by NetChop 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/>), a neural network-based method trained on MHC class I ligands produced by the human proteasomes (Supplementary Data Sheet 8) (82). Since cathepsins cleavage sites may play a vital role in the immune antigen presentation, cathepsin specific peptidase activity was analyzed with the SitePrediction (<http://www.dnabr.ugent.be/prx/bioit2-public/SitePrediction/index.php>) server for MHC class II epitopes (83).

Secondary and Tertiary Structure Prediction of the Vaccine Constructs

The secondary structures of the multi-epitope vaccine constructs were generated using online tool PSIPRED 4.0 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), a web-based freely accessible online server that also predicts the transmembrane topology, transmembrane helix, fold and domain recognition (74). PSIPRED 4.0 has a Q3

secondary structure prediction precision of 84.2% (84). The 3D structures of multi-epitope vaccine constructs were predicted using the I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) server (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). I-TASSER is an integrated platform for automated protein structure and function prediction based on the sequence-to-structure-to-function paradigm. I-TASSER initial creates three-dimensional (3D) atomic models from several threading alignments and iterative structural assembly simulations starting from an amino acid sequence. In five community wide CASP (Critical Assessment of techniques for Structure Prediction) experiments, I-TASSER has been ranked best server for protein 3D structure prediction (70). Pymol program was used to visualize the modeled 3D structures.

Refinement and Validation of Vaccines Constructs

The 3D structures of the constructed vaccines were refined using 3Drefine server (<http://sysbio.rnet.missouri.edu/3Drefine/>). 3Drefine server is based in optimization of the hydrogen bonding network and composite physics and knowledge-based force fields to give atomic-level energy minimization using the MESHI molecular modeling framework (85, 86). The validation process was performed using the PROCHECK's Ramachandran plot analysis (<https://services.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>) (87) that analyzes the geometry of the refined vaccine construct and predict the best stereochemical quality of the construct (88); ProSA (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) (89) that computes the overall quality score (Z score) for a specific 3D structure (90); and ERRAT server (<http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) (91) that analyzes the statistics of non-bonded interactions between different atom types (92).

Protein-Protein Docking

Each vaccine construct was docked against TLR4-MD2 complex (PDB:3FXI). The docking experiments were made using ClusPro 2.0 (<https://cluspro.bu.edu/login.php>) and PatchDock (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/php.php>). ClusPro 2.0 ranks the cluster of docked complexes based on their center and lowest energy scores (93). PatchDock algorithm divides the Connolly dot surface representation of the molecules into concave, convex, and flat patches (94). ClusPro 2.0 and PatchDock were further analyzed by the PRODIGY tool of HADDOCK server (<https://haddock.science.uu.nl/>) and FireDock server (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/php.php>), respectively. The PRODIGY server produces binding affinity score (95) and the FireDock server accesses the global energy of the docked complexes.

Molecular Dynamic Simulation

After performing the protein-protein molecular docking, the best-scored vaccine construction (SMV4) complexed with TLR4-MD2 was subjected to molecular dynamic simulation by the online server iMODS (<http://imods.chaconlab.org/>) (96), using the parameters as default. This server predicts the dynamics simulation of the protein complex in terms of atomic B-factors, eigenvalue variance, deformability, elastic network, and covariance map. The

deformability of a given protein mostly relies on the capability of each of its residues to deform. The eigenvalue is related with the energy that is required to deform the given structure; the lower the eigenvalue value, the easier the deformability of the complex (67, 97). Moreover, the eigenvalue of the given protein complex provides its motion stiffness (79).

Discontinuous B Cell Epitopes

SMV4 vaccine construction selected was submitted to ElliPro server (<http://tools.iedb.org/ellipro/>) that predicts epitopes based upon solvent-accessibility and flexibility (98). The algorithms implemented in this analysis were approximation of the protein shape as an ellipsoid (99), protrusion index (PI) of residue (100), and neighboring residues clustering based on their PI values. The conformational B-cell epitopes with minimum score value set at 0.70 while the maximum distance was set as default.

Immune Simulation of the Vaccine Construct

C-ImmSim server (<http://150.146.2.1/C-IMMSIM/index.php?page=1>) was used for the immune simulation study. It uses position-specific scoring matrix for immune epitope forecast and machine learning techniques to estimate immune interactions (101). The three mammalian anatomical regions to get simulated by the server were thymus (T cell), bone marrow (lymphoid and myeloid cell), and a lymphatic organ to exhibit immune response (102). All parameters were kept as default at the time of vaccine introduction, and three injections were administered with the recommended intervals of 30 days. The time steps followed for three injections were 1, 90 and 180. The volume of simulation and the steps of the simulation were set at 10 and 600, respectively (103).

Codon Adaptation and *In Silico* Cloning

Reverse translation and codon optimization were performed using Java Codon Adaptation Tool (JCat) server (<http://www.prodoric.de/JCat>) (104). The JCat output includes the codon adaptation index (CAI) and percentage GC content, which can be used to assess protein expression levels. CAI provides information on codon usage biases; CAI score >0.8 is considered a good score (105). The ideal GC content of a sequence should range between 30–70% (80). The *E. coli* strain K12 was chosen as host for cloning our vaccine construct. We avoided rho-independent transcription termination, prokaryote ribosome binding site, and restriction enzymes cleavage sites. Vaccine construct was cloned in pET28a (+) plasmid vector by adding XhoI and NdeI restriction sites at C and N terminus, respectively. The optimized sequence of the vaccine was inserted into the expression vector [pET-28a (+)] using Benchling webserver (<https://www.benchling.com/>).

RESULTS

Pre-Screening of Primary Data

Primarily, we selected representative proteomes of 48 *S. marcescens* associated with human infections, and a *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* Db11 as a reference strain for our vaccine prediction.

The proteomes of all *S. marcescens* strains were retrieved from Genome Project database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). With the help of Bacterial Pan Genome Analysis (BPGA) tool the number of core proteins found from analyzing of the 49 proteomes was 2832 proteins.

Screening of Essential, Virulence, Resistance and Non-Homology Against Human and Gut Flora Proteins

All the 2832 proteins were subsequently analyzed for essential, virulent and resistance functions. The analyses of the non-redundant proteins resulted in 1815 proteins. Of these proteins, we have found 879 essential proteins, 155 proteins contained virulence property, 98 were resistant proteins, 370 proteins were found to be virulence and essential, 70 were resistant and essential, 42 resistant and virulence, and 201 proteins were related with essential, virulence and resistance functions, 1106 were non-homologous with human proteins. Of these 1106 proteins, 20 were gut flora non-homologous proteins, and were used for subsequent analysis

Subcellular Localization, Identification of Essential Proteins, Virulence Factors and Resistant Determinants

Next, the subcellular localization of 20 gut flora non-homologous proteins revealed that 2 proteins were outer membrane proteins, 6 periplasmic, and 2 extracellular (Table 1). Of these 10 proteins, 4 protein were essential (D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase, 51.35 kDa; patatin-like phospholipase, 35.68 kDa; lipoprotein 11.82 kDa; helix-turn-helix domain-containing protein, 10.66 kDa), 4 virulence (phospholipase C, 79.68 kDa; spore coat U domain-containing protein, 33.28 kDa; protein of avirulence locus ImpE, 29.48 kDa; NADPH-dependent FMN reductase, 19.24 kDa; 1 was related to resistance (TonB-dependent receptor, 76.90 kDa), and 1 protein presented essential and virulent functions (MoaF domain-containing protein, 16.27 kDa) (Table 1).

Peptide Signal, Trans-Membrane, and Antigenicity Prediction

Of these 10 proteins selected, analyses of presence of signal peptide/anchor resulted into 3 proteins with secretory signal peptides that are transported by the Sec translocon and cleaved by Signal Peptidase I (Sec/SPI), 2 proteins having lipoprotein signal peptides transported by the Sec translocon and cleaved by Signal Peptidase II (Sec/SPII), and 1 protein with Tat signal peptides transported by the Tat translocon and cleaved by Signal Peptidase I (Tat/SPI). Only 1 protein (MoaF domain-containing protein) contained 1 transmembrane helix (Table 1). Vaxijen v2.0 and AntigenPRO tools revealed 7 and 8 proteins with a good antigenic nature (>0.50) (Table 1), respectively. Of these, 2 essential proteins (D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase, patatin-like phospholipase family protein), 2 virulent proteins (Phospholipase C, phosphocholine specific; spore coat U domain-containing protein), and 1 resistant protein (TonB-dependent receptor) presented antigenicity profile, had extracellular domain or were proteins located in the outer

membrane. Therefore, these 5 protein were considered for further prediction of vaccine targets (Table 1).

MHC Class-I Epitopes Prediction and Immunogenicity, Antigenicity, Toxicity, Hydrophobicity and Conservancy Analysis of Selected Epitopes

The prediction of T-cell epitopes of MHC class-I of the 5 proteins (D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase, patatin-like phospholipase family protein, Phospholipase C phosphocholine specific, spore coat U domain-containing protein, TonB-dependent receptor) had the sequence length 9 residues. Among the 284 predicted epitopes, the 123 common epitopes found in three servers were selected for immunogenicity analysis and resulted in 59 epitopes. From these, 31 epitopes were found to be antigenic and we found no epitopes with toxicity. Out of 31, 17 epitopes were non-allergenic. Epitope conservancy analysis found 14 peptides with a score of more than 50%. GRAVY analysis resulted in 7 peptides with negative value score, which suggests hydrophilic nature of peptides. For further analysis, we selected 7 MHC class-I epitopes (TPFGAGWSW, LEDRLVETL, SSNVNFPLY, FTIPLPGDR, QTYGAKIAR, SEYVWNYEL, YQFLKGWEL) that were found to be immunogenic, antigenic, non-allergenic, non-toxic, conserved, and with negative hydrophobicity (Table 2). We excluded the patatin-like phospholipase family protein because its prediction analysis did not reach all the recommended parameters (Table 2).

MHC-II Epitopes and Antigenicity, Toxicity, Conservancy, Hydrophobicity, IFN- γ Analysis

The MHC-II binding prediction of the 5 proteins (D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase, patatin-like phospholipase family protein, Phospholipase C phosphocholine specific, spore coat U domain-containing protein, TonB-dependent receptor) resulted in 415 MHC-II epitopes with higher affinity. From these, 196 were antigenic, and all were subjected to toxicity and allergenicity prediction. According with results, all selected epitopes were non-toxic and 114 had non-allergic nature. Conservancy analysis showed that 93 epitopes had score more than 50%, and GRAVY analysis revealed that 70 epitopes had a hydrophilic nature. Additionally, the 31 the best resultant epitopes of all analyses conducted were analyzed for their IFN- γ inducing. A total of 16 epitopes (4 from D-alanyl-D-alanine, 1 from patatin-like phospholipase family protein, 2 from Phospholipase C phosphocholine specific, 2 from spore coat U domain-containing protein and 7 from TonB-dependent receptor) had a IFN- γ inducing profile and were selected for molecular docking analysis (Table 3).

B-Cell Epitope Prediction and Antigenicity, Toxicity, Allergenicity and Hydrophobicity Analysis

The prediction of linear B-cell epitopes for D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase, patatin-like phospholipase family protein, Phospholipase C, TonB-dependent receptor and spore coat U

TABLE 1 | Predicted subcellular localization, physicochemical, antigenicity, trans-membrane alpha-helices and peptide signal analysis.

Ref. Sequence ⁽¹⁾	Protein name ⁽²⁾	Length (amino acid) ⁽³⁾	Mol. Wt kDa ⁽⁴⁾	Signal peptide ⁽⁵⁾	Localization ⁽⁶⁾	Functional Description ^(7,8,9)	TMHMM ⁽¹⁰⁾	Antigenicity ^(11,12)
Essential proteins								
WP_041033700.1	* D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase/D-alanyl-D-alanine-endopeptidase	489	51.35	Sec/SPIICleavage site (17 and 18, LAG-CS)	Outer membrane/ Periplasm	Penicillin-binding protein/ Serine endopeptidase activity	0	0.5856, 0.5066
WP_084827239.1	* Patatin-like phospholipase Family protein	323	35.68	Not identified	Outer membrane	Hydrolase activity/lipid catabolic process	0	0.6024, 0.8235
WP_004939944.1	Lipoprotein	108	11.82	Sec/SPIICleavage site (16 and 17, LSA-CA)	Periplasm	Lipoprotein with MofA domain	0	0.5595, 0.4857
WP_047571040.1	Helix-turn-helix domain-containing protein	92	10.66	No identified	Periplasm	Uncharacterized conserved protein with HTH_43 domain	0	0.2089, 0.2900
Virulent proteins								
WP_141960268.1	* Phospholipase C, phosphocholine-specific	715	79.68	Tat/SPIICleavage site (31 and 32, (ALA-IP)	Extracellular	Membrane damaging toxin, phosphoric-diester hydrolase	0	0.4097, 0.6277
WP_048321499.1	* Spore coat U domain-containing protein	311	33.28	Sec/SPIICleavage site (23 and 24, AFA-DC)	Extracellular	Involved in motility and biofilm formation	0	0.6887, 0.8719
WP_148123533.1	Protein of avirulence locus ImpE	273	29.48	Not identified	Periplasm	Signaling, type VI secretion system component	0	0.5895, 0.7594
WP_004940045.1	NADPH-dependent FMN reductase	183	19.24	Not identified	Periplasm	Electron transfer activity/ FMN binding	0	0.4056, 0.7386
Resistance protein								
WP_033636744.1	* TonB-dependent receptor	697	76.90	Sec/SPIICleavage site (44 and 45, VNA-AE)	Outer membrane	Iron complex receptor protein, channel transporter of siderophores	0	0.6847, 0.7910
Essential and virulent protein								
WP_099783007.1	MofA domain-containing protein	150	16.27	Sec/SPIICleavage site (26 and 27, ATA-AQ)	Periplasm	Exported protein with MofA domain	1	0.5896, 0.9631

All data were analyzed using various server; 1, 2, 3 = NCBI/UniProt; 4 = ExPasy; 5 = SignalPS.0; 6 = PSORTb/CELLO; 7, 8, 9 = Uniprot/KEGG/InterPro; 10 = TMHMM; 11 = Vaxijen, 12 = AntigenPRO. * proteins considered for further analysis.

domain-containing protein is showed in **Figure S1**. Antigenicity scale, and the most potent regions in epitopes found is showed in yellow (**Figure S1**). A total of 503 B cell epitopes were predicted by three servers, of which 236 epitopes were found to be antigenic. From these antigenic epitopes, we manually selected 23 epitopes that had regions overlapping with the amino acids sequences found in IEDB, ABCpred and Bcepred tools. These epitopes were subsequently tested to toxicity, allergenicity, conservancy and hydrophobicity. This analysis resulted in 12 epitopes (TGEQRGDTL, SGDPTLHPDDL, GRKTQKGD, QREVYSHRTTPRM, SSQRINRTRLGLRLDS, MAVANTDGS, TTVVDSTNKQSGAGT, QPEVRLRPTG, FAAQRHESVGN, AETKSNETYQD, DRQRRSEADL, RLEREHRRRDG) non-allergen, non-toxic, conserved and having hydrophilic nature. All 12 epitopes were selected for further analysis and vaccine construction (**Table 4**).

Peptide Modeling and Molecular Docking Analysis

All the 7 MHC class I and 16 MHC class II T-cell epitopes were subjected to 3D structure generation by the PEP-FOLD3 server, and the predicted 3D structures found were docked with 8 MHC class I alleles and 7 MHC class II alleles, respectively. Among the epitopes,

5 MHC class I and 12 class II epitopes showed the best result with the lowest global energy of -34.89 and -70.54, respectively (**Table 5**) and were used in multi-peptide vaccine construction.

Construction of Multi-Epitope Peptide Vaccine, Physicochemical Properties and Antigenicity, Allergenicity, Solubility Analysis of Different Vaccine Constructs

We combined an adjuvant, PADRE sequence, CTL epitopes (MHC-I epitopes), HTL epitopes (MHC-II epitopes) and BCL epitopes (B-cell epitopes) in a sequential manner, and constructed four vaccine candidates, named SMV1, SMV2, SMV3 and SMV4. All designed vaccine proteins contained 5 CTL epitopes, 12 HTL, and 12 BCL epitopes. The vaccines differed each other only by adjuvant sequence, and the adjuvants used were 50s ribosomal L7/L12 protein, beta defensin, HBHA conserved sequence and HBHA protein (*M. tuberculosis*, accession number: AGV15514.1) (**Table 6**). For vaccine construction, the adjuvant sequence was linked with PADRE sequence by EAAAK linker, GGGG linkers were used to join the PADRE sequence with the CTL epitopes and the CTL epitopes with the other CTL epitopes, GPGPG were used to linked the CTL epitopes with the HTL epitopes and also the HTL

TABLE 2 | Predicted MHC class I epitopes and immunogenicity, antigenicity, toxicity, allergenicity, conservancy and hydrophobicity analysis.

No.	Protein ID (1)	name (2)	Start (3,4,5)	End (3,4,5)	Epitope (3,4,5)	Teptool Alleles (3)	NetMHCpan Alleles (4)	NetCTLpan Alleles (5)	Immunogenicity (6)	Antigenicity (7)	Toxicity (8)	Allergenicity (9)	Conservancy (10)	Hydrophobicity (11)
1	WP_041033700.1	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase/ endopeptidase	156	164	TPEGAGNSW	HLA-B*53:01	HLA-B*53:01	HLA-B*35:01, HLA-B*53:01	0.23238	0.5798	Non-toxin	Non-allergen	100%	-0.12
			471	479	LEDRLVEL	HLA-B*40:01	HLA-B*40:01	HLA-B*40:01	0.19452	0.7321	Non-toxin	Non-allergen	100%	-0.01
3	WP_141960268.1	Phosphatase C	74	82	FTIPLPGDR	HLA-A*68:01	HLA-A*68:01	HLA-A*68:01	0.05236	0.739	Non-toxic	Non-allergen	97.96%	-0.13
4	WP_048321499.1	phosphocholine-specific coat U domain-containing protein	127	135	SSNWNPLY	HLA-A*30:02	HLA-A*30:02	HLA-A*01:01, HLA-A*11:01, HLA-A*30:02	0.1275	0.963	Non-toxin	Non-allergen	63.27%	-0.08
5	WP_033636744.1	TonB-dependent receptor	469	477	QTYGAKIAR	HLA-A*68:01	HLA-A*31:01, HLA-A*68:01	HLA-A*68:01	0.00318	1.2908	Non-toxin	Non-allergen	100%	-0.69
			499	507	SEYWNVEL	HLA-B*40:01	HLA-B*40:01	HLA-B*40:01, HLA-B*44:03	0.30533	1.4052	Non-toxin	Non-allergen	100%	-0.76
			608	616	YQFLKGMEL	HLA-A*02:01, HLA-A*02:06	HLA-A*02:01, HLA-A*02:06	HLA-A*02:01, HLA-A*02:06	0.09418	0.561	Non-toxin	Non-allergen	100%	-0.34

All data were analyzed using various server: 1, 2 = NCBI/UniProt; 3 = IEDB Teptool; 4 = NetMHCpan 4.1; 5 = NetCTLpan 1.1; 6 = IEDB server; 7 = VaxJen 2.0; 8 = AllerPred; 9 = AllerTOP v2.0; 10 = IEDB; 11 = GRAVY ProfParam.

epitopes among themselves, and KK linkers were used to conjugate HTL with the BCL epitopes, the BCL with the other BCL epitopes, and BCL with the PADRE sequence. Each vaccine construct was finished by an additional GGGG linker.

Each designed vaccine construct contained 668 (SMV1), 659 (SMV2), 554 (SMV3) and 639 (SMV4) residues long, while the molecular weight of each construction was found to be 70.335, 69.217, 57.867 and 66.147 kDa respectively. The theoretical pI of each construct ranged from 9.85 to 10.36, suggesting that the constructions have a negative charge if the pH is above the isoelectric point and vice versa. The computed instability index of constructions varied from 28.01 to 35.66 representing the stable nature of the vaccine proteins. The high aliphatic index range (66.68 to 74.19) of all vaccine constructs suggest the protein stability in several temperatures. The negative GRAVY value of the vaccine constructs revealed that all of them has a hydrophilic in nature. All four vaccine constructs showed good solubility (>0.873) during its heterologous expression in the *E. coli*. Therefore, all of the vaccine constructs showed be antigenic, non-allergenic, hydrophilic, stable and soluble. The sequence of vaccine constructs and their physicochemical properties are showed in **Table 6**.

Peptide Cleavage Analysis

We investigated both proteasomal and cathepsin specific peptidase activity on the vaccine constructs. NetChop 3.1 server detected 17 proteasomal sites, which majority of them were close to the linkers. SitePrediction server provided 1 peptidase and 14 peptidase links with 99.9% and 99% specificity for cathepsin B, respectively; 1 peptidase and 2 peptidase links with 99.9% and 99% specificity for cathepsin D, respectively; 8 and 3 peptidase links with 99% specificity for cathepsins E and G, respectively; 2 peptidase links with 99.9% and 4 peptidase links with 99% specificity for cathepsin K, and 1 peptidase link with 99% specificity for cathepsin L. Our results indicates that these multi-epitope vaccine constructs might be processed and presented in context of MHC class molecule.

Secondary Structure Prediction of the Constructed Vaccines

The analyze of the secondary structure of vaccine constructs showed that SMV1 had 48.35% of amino acids in coil structure, 40.12% of amino acids in alpha helix, and the lowest percentage of the amino acids in beta sheet formation (11.23%). SMV2 had 49.75% of amino acids in coil structure, 38.56% in alpha helix region, and 11.69% of the amino acids in the beta sheet formation. SMV3 had the highest percentage of coil structure (55.05%), 27.62% of the amino acids in alpha helix region, and the highest percentage of the amino acids in the beta sheet formation (17.33%). SMV4 presented coil structure in 54.23%, 30.05% of alpha helix region, and 15.72% of the amino acids in the in beta sheet formation (**Figure 2**).

3D Structure Prediction of the Constructed *S. marcescens*

The 3D structure was obtained by threading using I-TASSER web server. For each vaccine sequence was predicted five 3D models, and the first model of each construction was selected. All

TABLE 3 | Identification of MHC-II epitopes and antigenicity, toxicity, conservancy, hydrophaticity and IFN- γ inducing profile prediction.

No.	Protein ID (1)	name (2)	Start (3)	End (3)	Epitope (3)	Aleles (3)	Antigenicity (4)	Toxicity (5)	Allergenicity (6)	Conservancy (7)	Hydrophaticity (8)	IFN- γ inducing (9)
1	WP_041033700.1; D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase/ endopeptidase		7	21	WLLPAILALAGCSSS	HLA-DRB1*01:01	10.376	Non-toxin	Non-allergen	83.67%	-0.93	0.476
			170	184	AFAAPISALNYAFTP	HLA-DRB1*01:01	0.6842	Non-toxin	Non-allergen	75.51%	-0.89	0.228
			197	211	PGARAGAPGRVSYFP	HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	10.191	Non-toxin	Non-allergen	61.22%	-0.1	0.329
			451	465	PLAFALISNNVLPVG	HLA-DRB1*04:05/HLA-DRB1*04:01/HLA-DRB1*15:01/HLA-DRB1*07:01/HLA-DRB1*01:01/HLA-DRB1*13:02/HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	0.5594	Non-toxin	Non-allergen	100%	-0.92	0.069
2	WP_084827239.1; patatin-like phospholipase family protein		40	54	SGASAGIAALLVGL	HLA-DRB1*01:01	0.8684	Non-toxin	Non-allergen	100%	-0.71	0.416
3	WP_141960268.1; Phospholipase C, phosphocholine-specific		243	257	ROYRAASIQVGNPAR	HLA-DRB1*01:01	0.5796	Non-toxin	Non-allergen	97.96%	-0.93	0.131
			452	466	EKFFQVHEPNISAWR	HLA-DRB1*01:01	0.8644	Non-toxin	Non-allergen	100%	-1.34	0.673
4	WP_048321499.1; spore coat U domain-containing protein		117	131	SLNLLSJLISNWN	HLA-DRB1*01:01	0.6343	Non-toxin	Non-allergen	97.96%	-0.82	0.041
			121	135	LSULISSWNPFLY	HLA-DRB1*13:02/HLA-DRB1*01:01	0.5934	Non-toxin	Non-allergen	63.27%	-1.05	0.41
5	WP_033636744.1; TonB-dependent receptor		125	139	NVGANAFSLGTRPRL	HLA-DRB5*01:01	0.7968	Non-toxin	Non-allergen	87.76%	-0.11	0.314
			129	143	NAFLSSTRPRLNLSL	HLA-DRB5*01:01, HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*11:01	0.8159	Non-toxin	Non-allergen	87.76%	-0.03	0.136
			339	353	TDFNINRPTAYNQY	HLA-DRE3*02:02, HLA-DRB1*13:02	0.6574	Non-toxin	Non-allergen	87.76%	-0.93	0.154
			372	386	ADSRHLHGLAGLRVYFH	HLA-DRB1*01:01	0.5227	Non-toxin	Non-allergen	100%	-0.27	0.494
			565	579	RWDFELFGNLGLLKT	HLA-DRB1*01:01	0.5005	Non-toxin	Non-allergen	87.76%	-0.03	0.108
			595	609	ARAPAYTANMGAKYQ	HLA-DRE3*02:02	0.9467	Non-toxin	Non-allergen	87.76%	-0.65	0.04
			606	620	AKYQFLKQWELSSNV	HLA-DRB1*01:01	0.7445	Non-toxin	Non-allergen	87.76%	-0.41	0.63

All data were analyzed using various server: 1 = NCBI/UniProt; 2 = IEDB Teptool; 3 = VaxiJen 2.0; 4 = ToxinPred; 5 = AllerTop v2.0; 6 = IEDB; 7 = GRAVY ProctParam; 8 = GRAVY ProctParam; 9 = IFN epitope.

TABLE 4 | Identification of B-cell epitopes and antigenicity, toxicity, allergenicity and hydrophobicity prediction of selected epitopes.

No.	Protein ID (1); name (2)	Start	End	Length	Epitopes (3,4,5)	Antigenicity (6)	Toxicity (7)	Allergenicity (8)	Hydrophobicity (9)	Conservancy (10)
1	WP_041033700.1; D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase/ endopeptidase	100	108	9	TGEQRGDTL	1.4316	Non-toxin	Non-allergen	1.49	51.02%
		117	127	11	SGDPTLHPDDL	0.7116	Non-toxin	Non-allergen	-1.02	100%
		331	339	9	GRKTQGGKD	2.7203	Non-toxin	Non-allergen	2.36	89.80%
2	WP_084827239.1; patatin-like phospholipase family protein	147	159	13	QREVYSHRTTPRM	0.7944	Non-toxin	Non-allergen	-2.05	100%
		214	229	16	SSQRINRTRLGLRLDS	17.872	Non-toxin	Non-allergen	-0.77	71.43%
3	WP_141960268.1; Phospholipase C, phosphocholine-specific	620	629	10	QPEVRLRPTG	1.3449	Non-toxin	Non-allergen	-1.23	93.88%
4	WP_048321499.1; spore coat U domain-containing protein	81	91	11	MAVANTDQSGD	1.8801	Non-toxin	Non-allergen	-0.28	63.27%
		263	277	15	TTVWDSTNKQSGAGT	1.023	Non-toxin	Non-allergen	-0.97	61.22%
5	WP_033636744.1; TonB-dependent receptor	5	15	11	FAAQRHESVGN	0.8087	Non-toxin	Non-allergen	-0.80	97.96%
		45	55	11	AETKSNETYQD	1.6267	Non-toxin	Non-allergen	-2.10	100%
		233	243	11	DRQRRRSEADL	1.2989	Non-toxin	Non-allergen	-2.47	87.86%
		429	439	11	RLERBHRRRDG	1.6679	Non-toxin	Non-allergen	-2.98	87.86%

All data were analyzed using various online server: 1, 2 = NCBI/UniProt; 3, 4, 5 = ABCPred, Bcepred, IEDB; 6 = Vaxijen 2.0; 7 = ToxinPred; 8 = AllerTOP v2.0; 9 = GRAVY ProtParam; 10 = IEDB.

the model was ranked on their C-scores values, which measure similarity between the query and template based on the significance of threading template alignment and the query coverage parameters. C-score values ranges between -5 and 2, and a higher value represents a model with a higher confidence and correct topology. SMV1 presented a Z-Score ranging from 0.64 to 2.42 and a C-Score of -2.41. SMV2 showed a Z-Score ranging from 0.65 to 2.39 and a C-Score of -2.41. SMV3 had a C-Score of -1.92 and a Z-Score ranging from 1.08 to 3.43. SMV4 exhibited a Z-Score of 1.06 to 5.61 and the highest C-Score, -1.34 (Figure 3A). In addition to C and Z score, I-TASSER predicted the TM-score, a metric for measuring the similarity of two protein structures, and the root mean square deviation (RMSD) of atomic positions. TM-score obtained in vaccines constructs ranged from 0.43 ± 0.14 to 0.55 ± 0.15 . SMV4 had a TM-score more than 0.5, indicating a higher accuracy in topology. For all vaccines tested the RMSD ranged from $11.1 \pm 4.6 \text{ \AA}$ to $14.0 \pm 3.9 \text{ \AA}$ (Figures 3A, B).

3D Structure Refinement and Validation

The 4 vaccine constructs 3D model were refined using the 3Drefine server. 3Drefine server provided five refined models with different parameters, including the 3D refined score, GDT-TS, GDTHA, RMSD, MolProbity, and RWPlus. Higher GDT-TS, GDT-HA, and RMSD values, and lower 3D refine Score, RWplus, and MolProbity values indicate a higher quality for the models. The models number 1 in all 4 vaccine constructs presented lowest MolProbity score, which ranged from 3.454 to 3.565 (Figure 4A). Therefore, these were validated by PROCHECK's Ramachandran plot, ERRAT and ProSA

webservice. ERRAT score for 3D models of four vaccines were calculated as 88.601, 85.162, 79.607, and 84.751, respectively (Figure 4A). The ProSA Z-Score for SMV1, SMV2, SMV3 and SMV4 were -4.60, -4.42, -2.02 and -5.16 respectively, indicating models were within the range of scores typically found for the native proteins of similar size (Figures 4A, B). Ramachandran plot analysis showed 97.1%, 97.4%, and 97.6% residues in allowed region for vaccine SMV1, SMV3 and SMV4, respectively. The SMV2 vaccine had 98.1% of residues in the allowed regions (Figure 4C). These analyses authenticated the reliability and stability of the predicted structures.

Protein-Protein Docking

Docking analysis was performed between SMV1, SMV2, SMV3 and SMV4 vaccine constructs and TLR4-MD2 complex (PDB:3FXI), in order to find out the best constructed *S. marcescens* vaccine. SMV4 showed binding affinity -28.3 kcal/mol, a K_d of $1.1E-20$ at 37°C , a global energy of -55.38, and an HB energy of -12.81 (Figure 5A). Since SMV4 showed superior results in the protein-protein docking study, it was considered as the best vaccine construct among the four constructed vaccines (Figure 5B).

Molecular Dynamics Simulation

The molecular dynamics simulation and normal mode analysis (NMA) of SMV-4-TLR4 docked complex is showed in Figure 6A. Deformability graphs of the complex illustrates the peaks in the graphs, having regions of the proteins with high deformability (Figure 6B). The B-Factor graphs of the complexes provide easy understanding and visualization of the comparison

TABLE 5 | Molecular docking of epitopes with HLA.

MHC Class I			Global Energy								Average
No.	Protein ID, name	Epitope	HLA-A*0101 (PDB: 6AT9)	HLA-A*0201 (PDB: 3UTQ)	HLA-B*1501 (PDB: 1XR8)	HLA-B*3501 (PDB: 1ZSD)	HLA-B*3901 (PDB: 4O2E)	HLA-B*4403 (PDB: 1SYS)	HLA-B*5301 (PDB: 1A1M)	HLA-B*5801 (PDB: 5IM7)	
1	WP_041033700.1 D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase/ endopeptidase	TPFGAGWSW	-54.89	-18.06	-34.65	-42.60	-13.15	-43.74	-38.83	-33.18	-34.89
		LEDRLVETL	-41.35	-22.48	-43.79	-24.36	-35.34	-16.97	-38.40	-23.62	-30.79
2	WP_141960268.1 Phospholipase C, phosphocholine-specific	FTIPLGDR	-46.08	-24.55	-15.99	-24.14	-6.21	-15.41	-33.75	-23.74	-23.73
3	WP_048321499.1 spore coat U domain-containing protein	SSNNWFPLY	-56.28	-23.22	-32.65	-9.88	-19.00	-36.62	-37.51	-30.24	-30.68
4	WP_033636744.1 TonB-dependent receptor	QTYGAKIAR	-43.86	-4.69	-22.38	-19.26	-15.90	-25.60	-18.49	-26.75	-22.13
		SEYWNVEL	-40.96	-17.05	-33.96	-25.68	-8.14	-15.25	-42.89	-39.22	-27.89
		YQFLKGWEL	-49.03	-18.24	-15.98	-8.29	-15.5	-25.71	-47.98	-35.74	-27.06
MHC Class II			Global Energy								Average
No.	Protein ID, name	Epitope	HLA-DRB1*0101 (PDB: 2FSE)	HLA-DRB1*0301 (PDB: 1A6A)	HLA-DRB1*0401 (PDB: 2SEB)	HLA-DRB1*1501 (PDB: 1BX2)	HLA-DRB3*0101 (PDB: 2Q6W)	HLA-DRB3*0202 (PDB: 3C5J)	HLA-DRB5*0101 (PDB: 1H15)		
1	WP_041033700.1 D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase/ endopeptidase	WLLPAILLAGCSSS	-89.74	-79.65	-74.83	-68.61	-65.01	-43.20	-72.52	-70.54	
		PQARAGAPCRVSYFP	-74.58	-62.83	-62.02	-62.94	-41.19	-30.71	-64.83	-57.01	
		LAVTFLKYSNNGYGE	-65.12	-73.03	-51.81	-54.69	-36.28	-30.34	-61.55	-53.40	
2	WP_084827239.1 patatin-like phospholipase family protein	PLAFAIISNNYLVPG	-72.3	-57.61	-55.05	-62.76	-58.5	-47.77	-89.92	-63.42	
		SGASAGIAIALLVGL	-58.55	-72.12	-64.58	-75.20	-59.65	-41.55	-64.48	-62.30	
3	WP_141960268.1 Phospholipase C, phosphocholine-specific	RQYRAASIQVGNPAR	-61.17	-55.80	-47.44	-47.05	-13.96	-30.96	-60.12	-46.50	
4	WP_048321499.1 spore coat U domain-containing protein	EKRFGVHEPNISAWR	-38.13	-38.77	-45.12	-8.34	-16.93	-24.41	-27.34	-28.43	
		SLNLLSLIUSNVN	-88.21	-56.66	-52.15	-68.53	-29.65	-50.10	-89.29	-62.08	
5	WP_033636744.1 TonB-dependent receptor	LSLIISSNWFPLY	-93.62	-65.33	-50.97	-82.72	-16.16	-46.28	-45.35	-57.20	
		NVGANAFSGTRPRL	-65.95	-82.33	-55.04	-61.88	-20.95	-31.18	-58.32	-49.38	
		NAFLSGTRPRLNLSL	-74.06	-48.43	-59.42	-37.86	-35.10	-31.70	-35.66	-46.03	
		TDFNINRPTAYNIQY	-42.87	-44.67	-49.32	-32.67	-13.94	-34.32	-43.83	-37.37	
		ADSRHLGGLAGLRYFH	-62.54	-47.66	-53.30	-61.08	-24.56	-25.95	-58.13	-47.60	
		RWDFELFGNLLGKLT	-45.56	-55.26	-56.56	-51.49	-16.14	-32.27	-63.07	-45.76	
		ARAPAYTANMGAKYQ	-45.59	-44.37	-51.96	-44.44	-22.36	-29.58	-34.58	-38.98	
		AKYQFLKGWELSSNV	-54.33	-61.70	-39.90	-59.14	-18.93	-25.68	-38.05	-42.53	

3D structures were generated by the PEP-FOLD3 server. The docking was performed using PatchDock online tool and the results were refined by FireDock online server.

TABLE 6 | Characteristics of the constructed vaccines against *S. marcescens* strains.

Vaccine name/adjuvant	Sequence	Antigenicity (1, 2)	Allergenicity (3, 4)	Amino acids length (5)	Mol. weight kDa (6)	pI (6)	Instability index (6)	Aliphatic index (6)	GRAVY (6)	SOLpro (6)
SMV1/(HBHA)	EAAAKI MAENFNIDDLPAFLAALGAADLALATVNDLIANLREERAEE TRAEITRIVIEERRARILTKFQEDLPEQFELPDKFTTEELRKAAGY LEAATIRYNEIIVERGEALQFLRSQTAREFASRAEGYVDDAVELT QFALQTVASQITRAVSEFAAKLVGIEL EAAAK AKFVAAWTLKAAAG GGST FPFGAGWS GGGS EDRLVETL GGSS SNNFPLY GGSS EYWNVEL GGGS YQFLKGWEL GP PGPWLLPALALAGCSSS GGPG PG FAFAPISALNYAFT PG PGPGARAGAPGRVSPY PG PGPLA FAISNNYLV PG PGPGSGASAGAAIALLV GL PGPGROYRAASIQ VGN PAR PGPGSLNLLSILISSNV NG PGGLSILISSNVNFPLY G PG PGVNGANAFSGTRPRL PG PGVNAFLSGTRPRLNLS GL PGP GADSRILHGLAGLRYFH GP PGPWDFELFQNLGLLTK TK TGEOR GDTL KK SGDPTLHPD DL KKGRKTOGK GD KKQREYVSHRTTPRM KK SSORINTRTLGLRLDS KK MAVANTDGS GD KKTTWDS TK Q SGAG TK QPEVRLP TK KAQRHESVGN KK AETKSNETYQD KK QRFRSEADL KK FLEREHRRFD GG KKAKFVAAWTLKAA /GGGS	Vaxijent: 1.0377 ANTIGENpro: 0.835	Non-allergen	668	70.335	9.91	33.33	72.46	-0.525	0.967
SMV2/(HBHA Conserved Sequence)	EAAAKI MAENSNDDIKAPLLAALGAADLALATVNEITLNRERAEE TRFSRVEESRAFLTKLEDLPEQLTELPEKFTAEELRKAEGYLEA ATSELVERGEAALERLRSQSFVEVSARAEVYDQAVELTQEALG TVASQVEGRAAKLVGIEL EAAAK AKFVAAWTLKAAAG GGST FPFG AGWS GGGS EDRLVETL GGSS SNNFPLY GGGS SEYWNVY EL GGGS YQFLKGWEL GP PGPWLLPALALAGCSSS GGPG FAF APISALNYAFT PG PGPGARAGAPGRVSPY PG PGPLAFAISN NYLV PG PGPGSGASAGAAIALLV GL PGPGROYRAASIQVGNP AP PG PGSLNLLSILISSNV NG PGGLSILISSNVNFPLY GP PG GNVGANAFSGTRPRL PG PGVNAFLSGTRPRLNLS GL PGPGAD RLHGLAGLRYFH GP PGPWDFELFQNLGLLTK TK TGEORGDTL KK SGDPTLHPD DL KKGRKTOGK GD KKQREYVSHRTTPRM KK S SORINTRTLGLRLDS KK MAVANTDGS GD KKTTWDS TK QSGSA GT KK QPEVRLP TK KAQRHESVGN KK AETKSNETYQD KK D RQRFRSEADL KK FLEREHRRFD GG KKAKFVAAWTLKAAAG GG S	Vaxijent: 1.0449 ANTIGENpro: 0.851	Non-allergen	669	69.217	9.86	35.66	73.87	-0.510	0.974
SMV3/(β-Defensin)	EAAAKI INLTKYVCRVGRRCALVSCLPKEEGKCSRGRKCK CRFK EAAAK AKFVAAWTLKAAAG GGST FPFGAGWS GGGS ED DLVETL GGSS SNNFPLY GGGS SEYWNVYEL GGGS YQFLKGW EL GP PGWLLPALALAGCSSS GP PGPWLLPALALAGCSSS GGPG PG FAFAPISALNYAFT PG PGPGARAGAPGRVSPY PG PGPLAFAISN NYLV PG PGPGSGASAGAAIALLV GL PGPGROYRAASIQVGNP AP PG PGSLNLLSILISSNV NG PGGLSILISSNVNFPLY GP PG GNVGANAFSGTRPRL PG PGVNAFLSGTRPRLNLS GL PGPGAD SRILHGLAGLRYFH GP PGPWDFELFQNLGLLTK TK TGEORGDTL KK SGDPTLHPD DL KKGRKTOGK GD KKQREYVSHRTTPRM KK S SORINTRTLGLRLDS KK MAVANTDGS GD KKTTWDS TK QSGSA GT KK QPEVRLP TK KAQRHESVGN KK AETKSNETYQD KK D RQRFRSEADL KK FLEREHRRFD GG KKAKFVAAWTLKAAAG GG S	Vaxijent: 1.1417 ANTIGENpro: 0.827	Non-allergen	554	57.867	10.36	31.21	66.68	-0.547	0.873
SMV4/(50s ribosomal L7/L12 protein)	EAAAKI MAKLSDELDAKEMTLLELSDFKKFEETFEVTAAPVA VAAAGAAPAGAEEAESEDFVLEAAGDKKGVKVRVRSGLG LKEAKLDVGGAPKPLLEKVAKEAEDAQKALEAAGATV VEAAAK	Vaxijent: 1.0210	Non-allergen	639	66.147	9.85	28.01	74.19	-0.389	0.957

(Continued)

TABLE 6 | Continued

Vaccine name/adjuvant	Sequence	Antigenicity (1, 2)	Allergenicity (3, 4)	Amino acids length (5)	Mol. weight kDa (6)	pI (6)	Instability index (6)	Aliphatic index (6)	GRAVY (6)	SOLpro (6)
	AKFVAIIVTLKAAAGGGSTPFGAGWSN GGGS EDRLVETLGGG SSNNNFLYGGGSSEYWNVELGGGSYGLKGMWEL GP GPVW LLPAILALAGCSSSSYFAAPISALNVAFT PG PGPGARAG APGRNSFY PG PGPLAFAINSNVLY PG PG PG SGASAGAAALL VGL GP PGPGVRAASICQGNIPAR PG PG PG SUNLLSLLSSNV NG PG PLSLLSSNVNPLY GP PGVGNANARLSGTRPR PG PGN AFLSGTRFRNLISL GP PGADSRHLGLAFLRY GP PGVWDF ELFNLGLL KK KGQGGD TL HPDD KK GRKTOGK GD KK REYVSHRTTFR KK SSORINFTLGLRLD SK MAVANT DGSDD KK TTWIDSTNKQSGAG TK QPEVRLRPT GG FAQGRH ESYGN KK AETHKSNETYQD KK DRRPRRSEAD LL KKRLRERHRRRD GKK AKFVAIIVTLKAAAGGGGS	ANTIGENpro: 0.818								

The bolded sequence represent the linker sequences. The italic regions characterize PALPE sequences. 1, 2: VaxJen 2.0, ANTIGENpro; 3, 4: AllgPred, AllerTOP v2.0; 5, 6: ProtParam, ExPASy; 6: SOLPro, SMV, *Serratia marcescens* vaccine.

between NMA and the PDB field of the docked complex (Figure 6C). The SMV4-TLR4 docked complex suggested that docked complex should be quite stable and should have relatively less chance of deformability (Figures 6B, D). In the variance graph (Figure 6E), red colored bars shows the individual variance and green colored bars represent the cumulative variance. Co-variance map of the complex showed a good amount of amino acid pairs in the correlated motion (Figure 6F). The elastic map (Figure 6G) of the complex describes the connection between atoms and darker gray regions shows stiffer regions.

Discontinuous B Cell Epitopes

Eight discontinuous B-cell epitopes with scores ranging from 0.713 to 0.872 were predicted by Ellipro online tool at IEDB. Shortest and longest discontinuous B cell epitope ranged from 3 to 63 residues long respectively (Figure 7A). The amino acid residues present in conformational epitopes, the number of residues, their scores, and the 3D representation of conformational B-cell epitopes are shown in Figure 7A, B.

Immune Simulation for Vaccine Efficacy

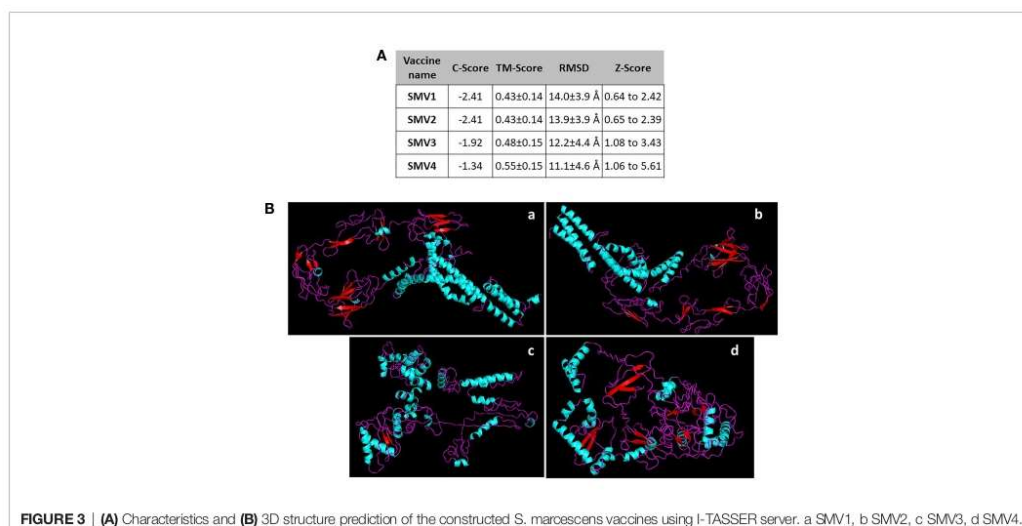
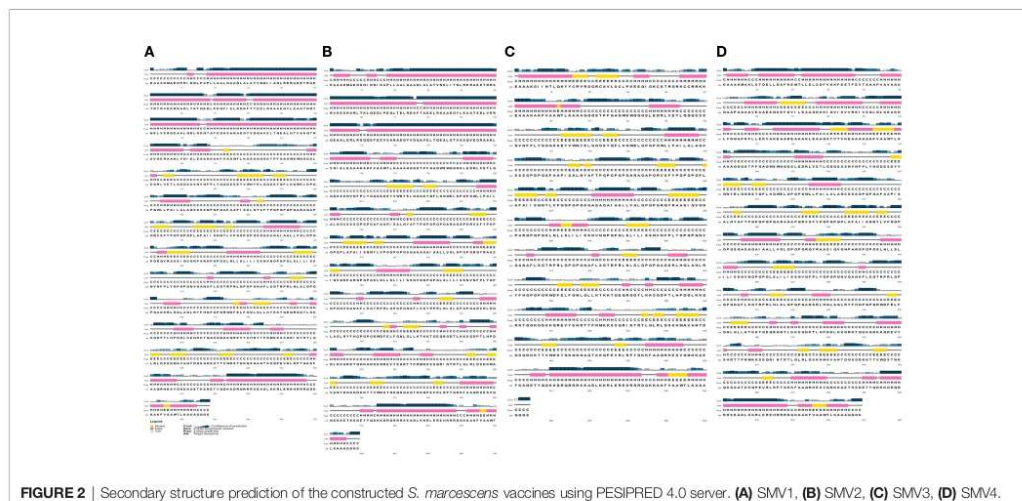
The vaccine primary response was characterized by high levels of IgM, while the secondary and tertiary responses were higher than the primary reaction and distinguished by greater IgM + IgG, IgG1 + IgG2, IgG1 antibodies level, and a rapid clearance in antigen concentration (Figure 8A). B cell activation were found high, particularly B isotype IgM and IgG1, with prominent memory cell development (Figure 8B). The cell population of TH (helper) and TC (cytotoxic) cells were also found high along with memory development (Figures 8C, D). A significant levels of T regulatory (Treg cells) cells was found in the exposure to the SMV4, and a Treg cell reduction few days after antigen exposure (Figure 8E). The vaccine can induce both IFN- γ and IL-2 with a suitable Simpson Index (D) (Figure 8F), which is a measure of diversity.

Codon Adaptation of the Final Vaccine Construct

Codons of SMV4 construct were adapted as per codon utilization of *E. coli* expression system, and JCAT server was used to optimize the SMV4 codons according to *E. coli* K12. The optimized SMV4 construct had a length of 1917 pb; an ideal range of GC content 54.17% (30–70%), showing good probable expression of the vaccine candidate in the *E. coli* K12; and CAI value 0.958 (0.8–1.0), indicating a high gene expression potential. In the next step, the SMV4 sequence was cloned between XhoI and NdeI restriction sites at the multiple cloning-site of the pET28a(+) vector. The clone had a total length of 7212 bp (Figure 9).

DISCUSSION

Vaccine development is one of greatest advances to prevent global morbidity and mortality; not only does it halt the onset of

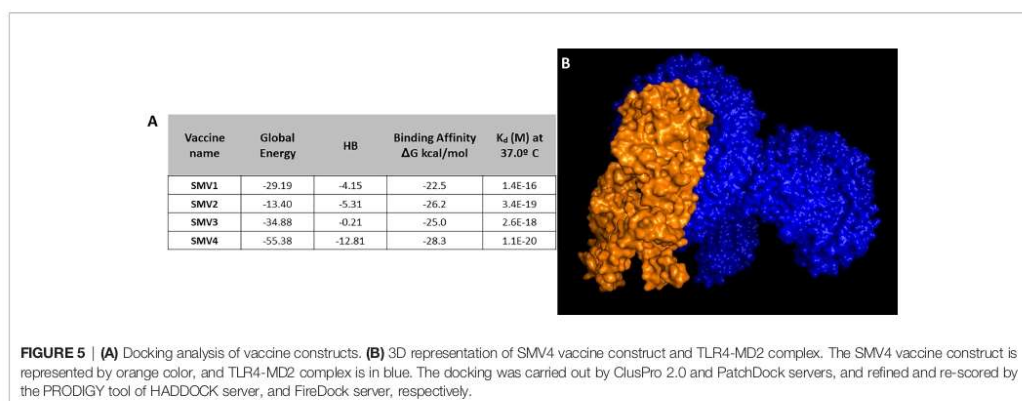
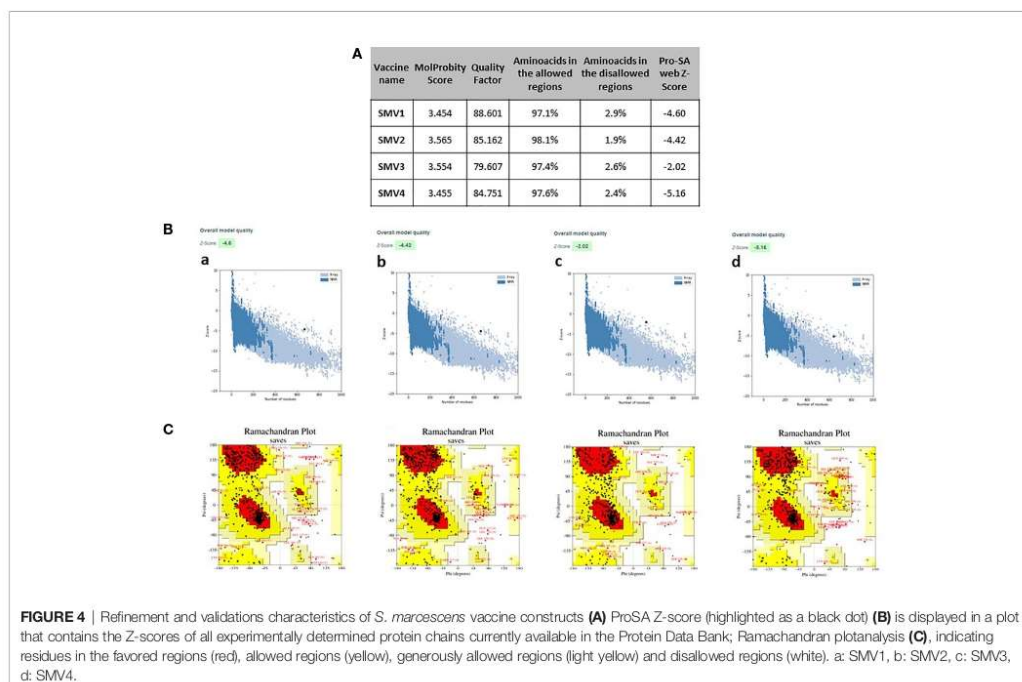


different diseases, but it also labels a gateway for its elimination while reducing toxicity (74). Vaccines that prevent infections caused by MDR bacterial species have a number of potential benefits. They can be used prophylactically reducing antibiotic use, emergence and spread of AMR, incidence of sensitive and resistant infections, severity life-threatening diseases, sequelae remaining after infection resolution, and health care costs (3, 4, 8).

The main strategy in the present study was to design and construct a multipeptide-based vaccine against *S. marcescens*, a gram-negative

rod frequently involved in diverse nosocomial infections and with systemic mortality rate in immunocompromised and intensive care patients (11, 13).

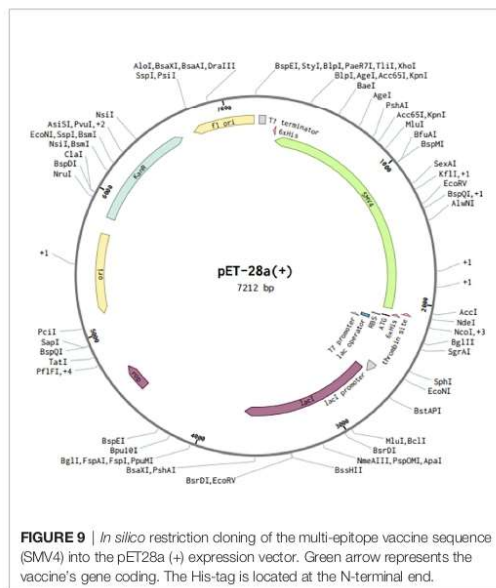
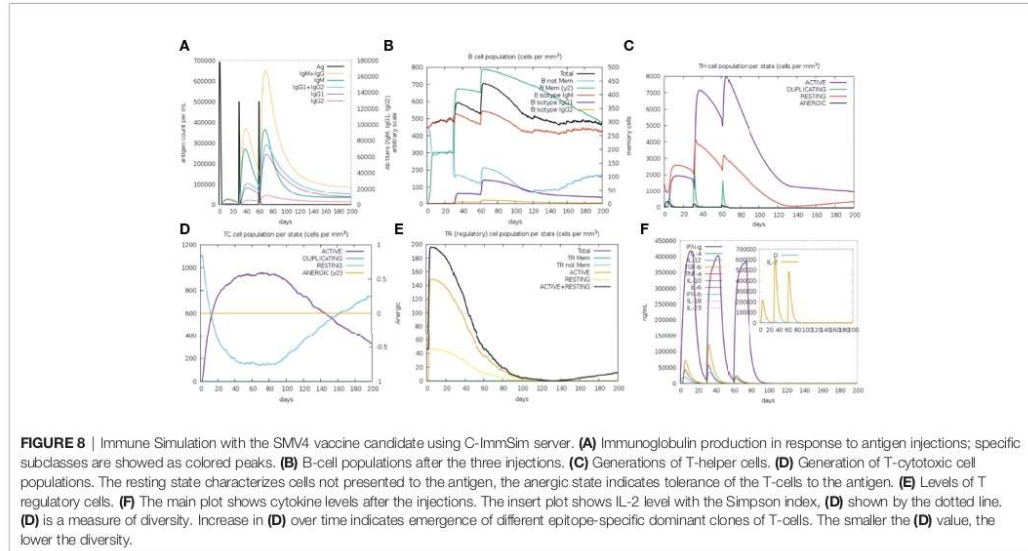
Using computational subtractive analysis, we enrolled non-redundant proteome of *S. marcescens* to find proteins which had essential, virulent, and resistance profile and, at the same time, were non-homologous from human and gut flora, antigenic, had extracellular domain and/or were secreted. The antigens used in vaccines do not need to be virulence factors, although virulence gene products are often immunogenic and responsible for



acquired immunity that protects against the disease (106, 107). The exclusion of human and gut flora homologs is necessary to prevent autoimmunity in the host and to protect the symbiotic environment of the gut flora (44). Antigenicity of a protein means the potential to generate immune response against the organism to which the protein belongs, an essential factor to use the protein as a vaccine (82). Bacterial cell surface and secreted proteins are of interest for their potential as vaccine candidates

because they are easily accessible and can significantly improve therapeutic target identification (39, 108).

After shortlisting, we identified five novel antigenic proteins of *S. marcescens* that were taken as suitable vaccine candidates. The first filtered antigenic protein was D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase/endopeptidase, an essential membrane-associated protein and member of the penicillin binding proteins (PBPs), a family of proteins inhibited by β -lactam



antibiotics involved in peptidoglycan synthesis and remodeling (109). The second identified protein was patatin-like phospholipase family protein, an essential protein that has been associated with infection in host cells and phagosome escape of various pathogenic bacteria (110, 111). The third

selected protein was phospholipase C, phosphocholine-specific (PLC-PC). PLCs are considered an important virulence factor that can be exported out of the cytoplasm to their functional locality through Tat or Sec pathway (112). In bacteria, PLCs have been related in a wide variety of cellular function during infection, including membrane lysis, intracellular signaling, lipid metabolism and/or pathogenicity-associated activity (113, 114). The fourth protein was also antigenic and identified like spore coat U domain-containing protein, a domain found in a bacterial family of the secreted pili proteins involved in motility and biofilm formation (115, 116). The fifth and last selected protein was TonB-dependent receptor, a family of beta barrel proteins located in the outer membrane that is associated to progressive antibiotic resistance, transport ferric-siderophore complexes, vitamins, nickel complexes, and carbohydrates (117–121).

Prado et al. (122) introduced seven proteins that can be considered as vaccine candidates against *S. marcescens* using reverse vaccinology and subtractive genomic approaches. Prediction of these proteins was based on non-host homologous proteins, subcellular localization (putative surface exposed, secreted; membrane), transmembrane helix, Signal IP, MHC-I and MHC-II adhesion probability, and essentiality. Some features are required to select a potential vaccine candidate, such as subcellular localization; presence of a signal peptide; transmembrane domain; and antigenic epitopes. In addition to recognizing antigenic and virulence factors, one of the main strategies behind identifying potential vaccine candidates is predicting epitopes that are likely to bind to major histocompatibility complex molecules on the antigen presenting cells within the host (123). Therefore, mapping of T-cell derived B-cell epitopes for antigenic proteins is a critical step for designing vaccines (39).

In addition to selecting five novel proteins as potential vaccine candidates against *S. marcescens*, we used the sequence these proteins to predict MHC-class-I, MHC class-II allele and B cell epitopes that would be capable of inducing effective cellular and humoral immunity. All selected antigenic epitopes were antigenic, so they could induce antigenic response; non-allergenic in nature, thus not be able to induce any allergic reaction; conserved epitopes, which is an important feature for designing a broad spectrum vaccine; hydrophilic in nature, hence able to interact with water molecules; and non-toxic. We selected the IFN- γ inducing Helper T cell (HTL) epitopes since this cytokine plays a significant role in innate and adaptive immune responses, stimulates macrophages and natural killer cells, and provides an enhanced response to MHC antigens (124).

In addition to *S. marcescens* having extracellular proliferation, this bacterium is able to invade nonphagocytic cells, such as epithelial cells (125–127). After internalization, *S. marcescens* can control the autophagic traffic, generating an appropriate niche for survival and replication inside the host cell (126, 128). Efficient protection against intracellular pathogens is dependent on the induction of cellular immunity, including pathogen-specific cytotoxic T cell responses (129, 130). CTL epitopes are essential for coherent vaccine design (131, 132). Thus, we analyzed the immunogenicity of CD8+ T cell epitopes to ensure that the epitope vaccine could effectively activate CD8 T cell-mediated immune response. In humans, MHC molecules are known as human leukocyte antigens (HLAs), as they are highly polymorphic; the frequency of expression of diverse HLA alleles varies in ethnically different populations (28). Thus, the HLA specificity of T-cell epitopes must be an important criterion for epitopes selection (133). We used the molecular docking simulation to delineate the interactions between the targeted T cell epitopes and their respective HLA alleles. In the docking results, five MHC class-I and twelve MHC class-II epitopes produced global energies. This means they had the capacity to bind specifically with their targets.

A total of 4 multi-epitope vaccines (SMV1, SMV2, SMV3, SMV4) were constructed using five MHC class-I, twelve MHC class-II and twelve B cell epitopes; four different adjuvants HBHA protein (*M. tuberculosis*), HBHA conserved sequence, beta-defensin, L7/L12 ribosomal protein (13) along with PADRE; and four different linkers EAAAK, GGGG, GPVPG and KK, which were used to bind the adjuvant, CTL, HTL and B-cell epitopes, respectively. Adjuvant HBHA and L7/L12 ribosomal protein are agonists to the TLR4/MD2 complex while beta-defensin adjuvant can act as an agonist to TLR1, TLR2, and TLR4 (134). The PADRE peptide induces CD4+ T-cells that increase efficacy and potency of peptide vaccine (135). It also overcomes the problems caused by highly polymorphic HLA alleles (88). Linkers ensure effective separation of individual epitopes *in vivo* (136). After that, several predicted physicochemical and immunological properties showed that all the vaccine constructions were safe with no possible allergenicity, had the capability to induce immunity with high antigenicity, were hydrophilic and soluble during its heterologous expression in *E. coli*, which is important to many biochemical and functional

studies (137), and had negative charge. Neutral or negatively charged molecules are preferred and a balance between its hydrophobicity and hydrophilicity is important in designing vaccine candidates (138). The molecular weight range (57.867 to 70.335) and the high pI value range (9.85 to 10.36) indicated the efficacy and stability of the vaccine constructs (138). In addition to evaluating the vaccine efficacy, the epitopes separated by linker were sensitive to both degradation proteasomal and cathepsin specific peptidase activity. Hence, our data showed that the chosen linkers and their distribution were suitable, and the epitope produced could be presented in the host immune system, processed, and induced in the host humoral and cellular immune pathway (139).

Secondary and tertiary structures are necessary for designing a vaccine candidate (140). Analyses of the secondary structure of all vaccine constructs showed that all the proteins mainly contained amino acids in coil, and in alpha helix structure. Natively unfolded protein regions and α -helical coiled-coils peptides have been identified as important “structural antigen” forms (70). After 3D modeling, the structure of the vaccine was refined, displaying suitable characteristics and high-quality structure.

Molecular docking is a widely used computer simulation approach to explore the binding affinity with a protein, a strategic tool in vaccine design (141). Our findings showed stable interaction and high affinity between the vaccine construct SMV4 and the TLR4/MD2 complex. The interaction between the TLR4 and adjuvant enhance the immune response, while TLR3, TLR4 and TLR9 agonists have been used to improve vaccines against HBV, influenza, malaria and anthrax (142). Furthermore, the physical movement and stabilization of the docked complex were assessed by molecular dynamics simulation, which confirmed that SMV4-TLR4/MD2 complex has low deformability and remains stable in a biological environment.

Various discontinuous epitope residues were predicted from SMV4 vaccine sequence and revealed that they can interact with antibodies. The most B-cell epitopes are discontinuous epitopes composed of amino acid residues located on separate regions of the protein, joined together by the folding of the chain (143). Thus, analysis of discontinuous epitope in the final vaccine construct is essential (88).

Immune simulation through repeated exposure to the antigen showed a consistent increase in the generated immune responses. There was a notable generation of T- cells as well as memory B cells, which is required for immunity, supporting a humoral response (124). The levels of IFN- γ and IL-2 increased after the first injection and got induced following repeated exposures to the antigen, which also contribute to the subsequent immune response after vaccination (144). Interleukin induction is needed for any kind of cellular immunity and the vaccine satisfies this criterion having good induction potentiality (82). Considering the designed vaccine is constituted of sufficient B- and T-cell epitopes, the Simpson index (D) value suggests that the vaccine can stimulate a large and diverse immune response.

When designing a multi-epitope vaccine candidate, the efficacious cloning and expression in a suitable vector is a critical stage (145). Codon optimization is essential because the

genetic code's degeneracy allows most of the amino acids to be encoded by multiple codons (70). In this context, codon optimization and in silico cloning were performed, and our data showed expression and translation efficiency of the SMV4 vaccine using pET-28a (+).

In conclusion, our study identified a potential SMV4 vaccine candidate against *S. marcescens* with the ability to stimulate both cellular and humoral immunity. The epitopes used in the vaccine construct are antigenic, non-toxic, and non-allergic. The SMV4 vaccine candidate were highly immunogenic, safe, non-toxic, stable, and had high affinity and stability of binding to TLR4 innate immune receptor, which is vital in recognition and processing by the host immune system. Altogether, our findings have the potential to provide a novel strategy for the protection against multidrug resistant Gram negative infection. Future experimental validation of the proposed vaccine candidate is required to establish its potency as well efficacy and safety.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M-CP, MD, and FM conceived this project. M-CP, MD, FM, CF, and AC aided with edition of the manuscript and analyzed data.

REFERENCES

- Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial Resistance: A Global Multifaceted Phenomenon. *Pathog Global Health* (2015) 109:309–18. doi: 10.1179/2047773215Y.0000000030
- Jansen KU, Anderson AS. The Role of Vaccines in Fighting Antimicrobial Resistance (AMR). *Hum Vaccines Immunother* (2018) 14:2142–9. doi: 10.1080/21645515.2018.1476814
- Micoli F, Bagnoli F, Rappuoli R, Serruto D. The Role of Vaccines in Combatting Antimicrobial Resistance. *Nat Rev Microbiol* (2021) 19:287–302. doi: 10.1038/s41579-020-00506-3
- Bloom DE, Black S, Salisbury D, Rappuoli R. Antimicrobial Resistance and the Role of Vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA* (2018) 115:12868–71. doi: 10.1073/pnas.1717157115
- AMR Review. *Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations* (2014). Available at: https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf (Accessed February 6, 2022).
- Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *Lancet* (2022) 399:629–55. doi: 10.1016/s0140-6736(21)02724-0
- World Health Organization (WHO). *Antimicrobial Resistance* (2021). Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (Accessed February 6, 2022).
- López-Siles M, Corral-Lugo A, McConnell MJ. Vaccines for Multidrug Resistant Gram Negative Bacteria: Lessons From the Past for Guiding

M-CP and MD wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-Brazil (FAPESP grants 2020/11964-4 and 2022/01316-0 to M-CP, and FAPESP grants 2018/20697-0 to AC). This study was partially financed by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-Brazil (FAPESP) as a fellowship to MD (FAPESP fellowship 2018/24213-7).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.768569/full#supplementary-material>

Supplementary Data Sheet S2 | Core protein sequences.

Supplementary Data Sheet S3 | Essential protein sequences.

Supplementary Data Sheet S4 | Virulence protein sequences.

Supplementary Data Sheet S5 | Resistance protein sequences.

Supplementary Data Sheet S6 | Human non-homologue protein sequences.

Supplementary Data Sheet S7 | Gut flora non-homologue protein sequences.

Supplementary Data Sheet S8 | Cleavage sites predicted by NetChop 3.1.

Future Success. *FEMS Microbiol Rev* (2021) 45:fuaa054. doi: 10.1093/femsre/fuua054

- World Health Organization (WHO). *Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics* (2017). Available at: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1 (Accessed February 6, 2022).
- Cristina ML, Sartini M, Spagnolo AM. *Serratia Marcescens* Infections in Neonatal Intensive Care Units (NICUs). *Int J Environ Res Public Health* (2019) 16:610. doi: 10.3390/ijerph16040610
- Ferreira RL, Rezende GS, Damas MSF, Oliveira-Silva M, Pitondo-Silva A, Brito MCA, et al. Characterization of KPC-Producing *Serratia Marcescens* in an Intensive Care Unit of a Brazilian Tertiary Hospital. *Front Microbiol* (2020) 11:956. doi: 10.3389/fmicb.2020.00956
- Kim B, Jeon YD, Kim JH, Kim JK, Ann HW, Choi H, et al. Risk Factors for Mortality in Patients With *Serratia Marcescens* Bacteremia. *Yonsei Med J* (2015) 56:348–54. doi: 10.3349/ymj.2015.56.2.348
- Khanna A, Khanna M, Aggarwal A. *Serratia Marcescens* - A Rare Opportunistic Nosocomial Pathogen and Measures to Limit Its Spread in Hospitalized Patients. *J Clin Diagn Res* (2013) 7:243–6. doi: 10.7860/JCDR/2013/5010.2737
- Engel HJ, Collignon PJ, Whiting PT, Kennedy KJ. *Serratia Sp. Bacteremia in Canberra, Australia: A Population-Based Study Over 10 Years*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2009) 28:821–4. doi: 10.1007/s10096-009-0707-7
- Field C, Allen JL, Friedman H. The Immune Response of Mice to *Serratia Marcescens* LPS or Intact Bacteria. *J Immunol (Baltimore Md : 1950)* (1970) 105:193–203.
- Kreger AS, Lyerly DM, Hazlett LD, Berk RS. Immunization Against Experimental *Pseudomonas Aeruginosa* and *Serratia Marcescens* Keratitis.

- Vaccination With Lipopolysaccharide Endotoxins and Proteases. *Invest Ophthalmol Visual Sci* (1986) 27:932–9.
17. Kumagai Y, Okada K, Sawae Y. The Effect of Humoral and Cell-Mediated Immunity in Resistance to Systemic *Serratia* Infection. *J Med Microbiol* (1992) 36:245–9. doi: 10.1099/00222615-36-4-245
 18. Shi H, Zhu Y, Xu L, Liu Z, You Y, Meng Q, et al. *Serratia marcescens* Vaccine in the Treatment of Malignant Pleural Effusion. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chin J Oncol]* (2002) 24:188–90.
 19. Woodward H. A Case of Infection in Man by the Bacterium *Prodigiosum*. *Lancet* (1913) 181:314–5. doi: 10.1016/S0140-6736(00)76133-2
 20. Kleef R, Hager ED. Fever, Pyrogens and Cancer. In: *Hyperthermia in Cancer Treatment: A Primer*. Boston, MA: Springer US (2006). p. 276–337. doi: 10.1007/978-0-387-33441-7_21
 21. Mahlen SD. *Serratia* Infections: From Military Experiments to Current Practice. *Clin Microbiol Rev* (2011) 24:755–91. doi: 10.1128/CMR.00017-11
 22. Karbach J, Neumann A, Brand K, Wahle C, Siegel E, Maeurer M, et al. Phase I Clinical Trial of Mixed Bacterial Vaccine (Coley's Toxins) in Patients With NY-ESO-1 Expressing Cancers: Immunological Effects and Clinical Activity. *Clin Cancer Res* (2012) 18:5449–59. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1116
 23. Kempin S, Cirrincione C, Straus DS. Improved Remission Rate and Duration in Nodular Non-Hodgkin Lymphoma (NNHL) With the Use of Mixed Bacterial Vaccine (MBV). *Proc Am Assoc Cancer Res* (1981) 22:514–4.
 24. Kempin S, Cirrincione C, Myers J. Combined Modality Therapy of Advanced Nodular Lymphomas (NL): The Role of Nonspecific Immunotherapy (MBV) as an Important Determinant of Response and Survival. *Proc Am Soc Clin Oncol* (1983) 24:56.
 25. Kölmel KF, Vehmeyer K, Göhring E, Kuhn B, Wieding JU. Treatment of Advanced Malignant Melanoma by a Pyrogenic Bacterial Lysate. A Pilot Study. *Onkologie* (1991) 14:411–7. doi: 10.1159/000217017
 26. Tang ZY, Zhou HY, Zhao G, Chai LM, Zhou M, Lu JZ, et al. Preliminary Result of Mixed Bacterial Vaccine as Adjuvant Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Med Oncol Tumor Pharmacother* (1991) 8:23–8. doi: 10.1007/BF02988567
 27. Vas HFH, Axelrod RS, Burns MM, Murasko D, Goonewardene M. Clinical Results and Immunologic Effects of a Mixed Bacterial Vaccine in Cancer Patients. *Med Oncol Tumor Pharmacother* (1993) 10:145–58. doi: 10.1007/BF02989663
 28. Lata KS, Kumar S, Vagharia V, Sharma P, Bhairappanvar SB, Soni S, et al. Exploring Leptospiral Proteomes to Identify Potential Candidates for Vaccine Design Against Leptospirosis Using an Immunoinformatics Approach. *Sci Rep* (2018) 8:1–15. doi: 10.1038/s41598-018-25281-3
 29. Moxon R, Reche PA, Rappuoli R. Editorial: Reverse Vaccinology. *Front Immunol* (2019) 10:2776. doi: 10.3389/fimmu.2019.02776
 30. Monterrubio-López GP, González-Y-Merchand JA, Ribas-Aparicio RM. Identification of Novel Potential Vaccine Candidates Against Tuberculosis Based on Reverse Vaccinology. *BioMed Res Int* (2015) 2015:11–4. doi: 10.1155/2015/483150
 31. Naz A, Obaid A, Shahid F, Dar HA, Naz K, Ullah N, et al. *Reverse Vaccinology and Drug Target Identification Through Pan-Genomics*. London, GB: Elsevier Inc (2020) p. 317–33. doi: 10.1016/b978-0-12-817076-2.00016-0
 32. Piza M, Scarlato V, Maignani V, Giuliani MM, Aricò B, Comanducci M, et al. Identification of Vaccine Candidates Against Serogroup B Meningococcus by Whole-Genome Sequencing. *Science* (2000) 287:1816–20. doi: 10.1126/science.287.5459.1816
 33. Rodrigues TCV, Jaiswal AK, De Sarom A, Oliveira LDC, Oliveira CJF, Ghosh P, et al. Reverse Vaccinology and Subtractive Genomics Reveal New Therapeutic Targets Against *Mycoplasma pneumoniae*: A Causative Agent of Pneumonia. *R Soc Open Sci* (2019) 6:190907. doi: 10.1098/rsos.190907
 34. Solanki V, Tiwari M, Tiwari V. Prioritization of Potential Vaccine Targets Using Comparative Proteomics and Designing of the Chimeric Multi-Epitope Vaccine Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* (2019) 9:1–19. doi: 10.1038/s41598-019-41496-4
 35. Solanki V, Tiwari V. Subtractive Proteomics to Identify Novel Drug Targets and Reverse Vaccinology for the Development of Chimeric Vaccine Against *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep* (2018) 8:1–19. doi: 10.1038/s41598-018-26689-7
 36. Serruto D, Bottomley MJ, Ram S, Giuliani MM, Rappuoli R. The New Multicomponent Vaccine Against Meningococcal Serogroup B, 4cmenb: Immunological, Functional and Structural Characterization of the Antigens. *Vaccine* (2012) 30:B87–97. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.01.033
 37. Chaudhari NM, Gupta VK, Dutta C. BPGA-An Ultra-Fast Pan-Genome Analysis Pipeline. *Sci Rep* (2016) 6:1–10. doi: 10.1038/srep24373
 38. 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) 42:574–80. doi: 10.1093/nar/gkt1131
 39. Hassan A, Naz A, Obaid A, Paracha RZ, Naz K, Awan FM, et al. Pangenome and Immuno-Proteomics Analysis of *Acinetobacter baumannii* Strains Revealed the Core Peptide Vaccine Targets. *BMC Genomics* (2016) 17:732. doi: 10.1186/s12864-016-2951-4
 40. Rashid MI, Rehman S, Ali A, Andleeb S. Fishing for Vaccines Against *Vibrio cholerae* Using *In Silico* Pan-Proteomic Reverse Vaccinology Approach. *PeerJ* (2019) 7:e6223. doi: 10.7717/peerj.6223
 41. Asad Y, Ahmad S, Rungrotmongkol T, Ranaghan KE, Azam SS. Immunoinformatics Driven Proteome-Wide Investigation Revealed Novel Peptide-Based Vaccine Targets Against Emerging Multiple Drug Resistant *Providencia stuartii*. *J Mol Graphics Modell* (2018) 80:238–50. doi: 10.1016/j.jmgm.2018.01.010
 42. Vilela Rodrigues TC, Jaiswal AK, de Sarom A, de Castro Oliveira L, Freire Oliveira CJ, Ghosh P, et al. Reverse Vaccinology and Subtractive Genomics Reveal New Therapeutic Targets Against *Mycoplasma pneumoniae*: A Causative Agent of Pneumonia. *R Soc Open Sci* (2019) 6:190907. doi: 10.1098/rsos.190907
 43. Peng C, Lin Y, Luo H, Gao F. A Comprehensive Overview of Online Resources to Identify and Predict Bacterial Essential Genes. *Front Microbiol* (2017) 8:2331. doi: 10.3389/fmicb.2017.02331
 44. Naz K, Naz A, Ashraf ST, Rizwan M, Ahmad J, Baumbach J, et al. PanRV: Pangenome-Reverse Vaccinology Approach for Identifications of Potential Vaccine Candidates in Microbial Pangenome. *BMC Bioinf* (2019) 20:1–11. doi: 10.1186/s12859-019-2713-9
 45. Chen L, Xiong Z, Sun L, Yang J, Jin Q. VFDB 2012 Update: Toward the Genetic Diversity and Molecular Evolution of Bacterial Virulence Factors. *Nucleic Acids Res* (2012) 40:641–5. doi: 10.1093/nar/gkr989
 46. Zhou CE, Smith J, Lam M, Zemla A, Dyer MD, Slezak T. MvirDB - A Microbial Database of Protein Toxins, Virulence Factors and Antibiotic Resistance Genes for Bio-Defence Applications. *Nucleic Acids Res* (2007) 35:391–4. doi: 10.1093/nar/gkl791
 47. Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, et al. ARG-Annot, a New Bioinformatic Tool to Discover Antibiotic Resistance Genes in Bacterial Genomes. *Antimicrob Agents Chemother* (2014) 58:212–20. doi: 10.1128/AAC.01310-13
 48. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, et al. CARD 2020: Antibiotic Resistome Surveillance With the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res* (2020) 48:D517–25. doi: 10.1093/nar/gkz935
 49. Jadhav A, Shanmugham B, Rajendiran A, Pan A. Unraveling Novel Broad-Spectrum Antibacterial Targets in Food and Waterborne Pathogens Using Comparative Genomics and Protein Interaction Network Analysis. *Infect Genet Evol* (2014) 27:300–8. doi: 10.1016/j.meegid.2014.08.007
 50. Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R, et al. PSORTb 3.0: Improved Protein Subcellular Localization Prediction With Refined Localization Subcategories and Predictive Capabilities for All Prokaryotes. *Bioinformatics* (2010) 26:1608–15. doi: 10.1093/bioinformatics/btq249
 51. Yu C-S, Lin C-J, Hwang J-K. Predicting Subcellular Localization of Proteins for Gram-Negative Bacteria by Support Vector Machines Based on N-Peptide Compositions. *Protein Sci* (2004) 13:1402–6. doi: 10.1110/ps.03479604
 52. Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, et al. Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server. *Methods Mol Biol (Clifton NJ)* (1999) 112:531–52. doi: 10.1385/1-59259-584-7:531
 53. Doytchinova IA, Flower DR. Vaxijen: A Server for Prediction of Protective Antigens, Tumour Antigens and Subunit Vaccines. *BMC Bioinf* (2007) 8:1–7. doi: 10.1186/1471-2105-8-4

54. Magnan CN, Zeller M, Kayala MA, Vigil A, Randall A, Felgner PL, et al. High-Throughput Prediction of Protein Antigenicity Using Protein Microarray Data. *Bioinformatics* (2010) 26:2936–43. doi: 10.1093/bioinformatics/btq551
55. Krogh A, Larsson B, Von Heijne G, Sonnhammer ELL. Predicting Transmembrane Protein Topology With a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes. *J Mol Biol* (2001) 305:567–80. doi: 10.1006/jmbi.2000.4315
56. Almagro Armenteros JJ, Tsirigos 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) 37:420–3. doi: 10.1038/s41587-019-0036-z
57. Mitchell AL, Attwood TK, Babbitt PC, Blum M, Bork P, Bridge A, et al. InterPro in 2019: Improving Coverage, Classification and Access to Protein Sequence Annotations. *Nucleic Acids Res* (2019) 47:D351–60. doi: 10.1093/nar/gky1100
58. Paul S, Sidney J, Sette A, Peters B. TepiTool: A Pipeline for Computational Prediction of T Cell Epitope Candidates. *Curr Protoc Immunol* (2016) 114:18.19.1–18.19.24. doi: 10.1002/cpim.12
59. Fleri W, Paul S, Dhanda SK, Mahajan S, Xu X, Peters B, et al. The Immune Epitope Database and Analysis Resource in Epitope Discovery and Synthetic Vaccine Design. *Front Immunol* (2017) 8:278. doi: 10.3389/fimmu.2017.00278
60. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A Semi-Empirical Method for Prediction of Antigenic Determinants on Protein Antigens. *FEBS Lett* (1990) 276:172–4. doi: 10.1016/0014-5793(90)80535-Q
61. Emimi EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J. Induction of Hepatitis A Virus-Neutralizing Antibody by a Virus-Specific Synthetic Peptide. *J Virol* (1985) 55:836–9. doi: 10.1128/jvi.55.3.836-839.1985
62. Larsen JEP, Lund O, Nielsen M. Improved Method for Predicting Linear B-Cell Epitopes. *Immunome Res* (2006) 2:2. doi: 10.1186/1745-7580-2-2
63. Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-2.0: Improving Sequence-Based B-Cell Epitope Prediction Using Conformational Epitopes. *Nucleic Acids Res* (2017) 45:W24–9. doi: 10.1093/nar/gkx346
64. Calis JJA, Maybeno M, Greenbaum JA, Weiskopf D, De Silva AD, Sette A, et al. Properties of MHC Class I Presented Peptides That Enhance Immunogenicity. *PLoS Comput Biol* (2013) 9:e1003266. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003266
65. Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, Gautam A, Kumar R, Raghava GPS. In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. *PLoS One* (2013) 8:e73957. doi: 10.1371/journal.pone.0073957
66. Dimitrov I, Bangov I, Flower DR, Doytchinova I. AllerTOP V.2 - A Server for *In Silico* Prediction of Allergens. *J Mol Model* (2014) 20:2278. doi: 10.1007/s00894-014-2278-5
67. Ullah MA, Sarkar B, Islam SS. Exploiting the Reverse Vaccinology Approach to Design Novel Subunit Vaccines Against Ebola Virus. *Immunobiology* (2020) 225:151949. doi: 10.1016/j.imbio.2020.151949
68. Dash R, Das R, Junaid M, Akash MFC, Islam A, Hosen SMZ. *In Silico*-Based Vaccine Design Against Ebola Virus Glycoprotein. *Adv Appl Bioinf Chem* (2017) 10:11–28. doi: 10.2147/AABC.S115859
69. Dhanda SK, Vir P, Raghava GPS. Designing of Interferon-Gamma Inducing MHC Class-II Binders. *Biol Direct* (2013) 8:1–15. doi: 10.1186/1745-6150-8-30
70. Bibi S, Ullah I, Zhu B, Adnan M, Liaqat R, Kong WB, et al. In Silico Analysis of Epitope-Based Vaccine Candidate Against Tuberculosis Using Reverse Vaccinology. *Sci Rep* (2021) 11:1–16. doi: 10.1038/s41598-020-80899-6
71. Shey RA, Ghogomu SM, Shintouo CM, Nkemngbo FN, Nebangwa DN, Esoh K, et al. Computational Design and Preliminary Serological Analysis of a Novel Multi-Epitope Vaccine Candidate Against Onchocerciasis and Related Filarial Diseases. *Pathogens* (2021) 10:99. doi: 10.3390/pathogens10020099
72. Mahmud S, Rafi M, Paul GK, Promi MM, Shimu M, Biswas S, et al. Designing a Multi-Epitope Vaccine Candidate to Combat MERS-CoV by Employing an Immunoinformatics Approach. *Sci Rep* (2021) 11:15431. doi: 10.1038/s41598-021-92176-1
73. Behbahani M. In Silico Design of Novel Multi-Epitope Recombinant Vaccine Based on Coronavirus Surface Glycoprotein. *bioRxiv* (2020). doi: 10.1101/2020.03.10.985499
74. McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED Protein Structure Prediction Server. *Bioinformatics* (2000) 16:404–5. doi: 10.1093/bioinformatics/16.4.404
75. Lamiable A, Thévenet P, Rey J, Vavrusa M, Derreumaux P, Tuffery P. PEP-FOLD3: Faster De Novo Structure Prediction for Linear Peptides in Solution and in Complex. *Nucleic Acids Res* (2016) 44:W449–54. doi: 10.1093/nar/gkw329
76. Sarkar B, Ullah MA, Araf Y, Islam NN, Zohora US. Immunoinformatics-Guided Designing and in Silico Analysis of Epitope-Based Polyvalent Vaccines Against Multiple Strains of Human Coronavirus (HCoV). *Expert Rev Vaccines* (2021) 00:1–21. doi: 10.1080/14760584.2021.1874925
77. Lee SJ, Shin SJ, Lee MH, Lee MG, Kang TH, Park WS, et al. A Potential Protein Adjuvant Derived From Mycobacterium Tuberculosis Rv0652 Enhances Dendritic Cells-Based Tumor Immunotherapy. *PLoS One* (2014) 9:1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0104351
78. Mei H-F, Jin X-B, Zhu J-Y, Zeng A-H, Wu Q, Lu X-M, et al. Defensin 2 as an Adjuvant Promotes Anti-Melanoma Immune Responses and Inhibits the Growth of Implanted Murine Melanoma *In Vivo*. *PLoS One* (2012) 7:e31328. doi: 10.1371/journal.pone.0031328
79. Sarkar B, Ullah M. Designing Novel Subunit Vaccines Against Herpes Simplex Virus-1 Using Reverse Vaccinology Approach. *bioRxiv* (2020). doi: 10.1101/2020.01.10.901678
80. Ali M, Pandey RK, Khatoon N, Narula A, Mishra A, Prajapati VK. Exploring Dengue Genome to Construct a Multi-Epitope Based Subunit Vaccine by Utilizing Immunoinformatics Approach to Battle Against Dengue Infection. *Sci Rep* (2017) 7:1–13. doi: 10.1038/s41598-017-09199-w
81. Magnan CN, Randall A, Baldi P. SOLpro: Accurate Sequence-Based Prediction of Protein Solubility. *Bioinformatics* (2009) 25:2200–7. doi: 10.1093/bioinformatics/btp386
82. Chaudhuri D, Datta J, Majumder S, Giri K. In Silico Designing of Peptide Based Vaccine for Hepatitis Viruses Using Reverse Vaccinology Approach. *Infect Genet Evol* (2020) 84:104388. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104388
83. Verspurten J, Gevaert K, Declercq W, Vandenaabeele P. SitePredicting the Cleavage of Proteinase Substrates. *Trends Biochem Sci* (2009) 34:319–23. doi: 10.1016/j.tibs.2009.04.001
84. Buchan DWA, Jones DT. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 Years on. *Nucleic Acids Res* (2019) 47:W402–7. doi: 10.1093/nar/gkz297
85. Shuid AN, Kempster R, McGuffin LJ. ReFOLD: A Server for the Refinement of 3D Protein Models Guided by Accurate Quality Estimates. *Nucleic Acids Res* (2017) 45:W422–8. doi: 10.1093/nar/gkx249
86. Kalisman N, Levi A, Maximova T, Reshef D, Zafirri-Lynn S, Gleyzer Y, et al. MESHI: A New Library of Java Classes for Molecular Modeling. *Bioinformatics* (2005) 21:3931–2. doi: 10.1093/bioinformatics/bti630
87. Laskowski RA, Hutchinson EG, Michie AD, Wallace AC, Jones ML, Thornton JM. PDBsum: A Web-Based Database of Summaries and Analyses of All PDB Structures. *Trends Biochem Sci* (1997) 22:488–90. doi: 10.1016/S0968-0004(97)01140-7
88. Khan MT, Islam R, Jerin TJ, Mahmud A, Khatun S, Kobir A, et al. Immunoinformatics and Molecular Dynamics Approaches: Next Generation Vaccine Design Against West Nile Virus. *PLoS One* (2021) 16:1–27. doi: 10.1371/journal.pone.0253393
89. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-Web: Interactive Web Service for the Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins. *Nucleic Acids Res* (2007) 35:407–10. doi: 10.1093/nar/gkm290
90. Sanami S, Azadegan-Dehkordi F, Rafeieian-Kopaie M, Salehi M, Ghasemi-Dehnoo M, Mahooti M, et al. Design of a Multi-Epitope Vaccine Against Cervical Cancer Using Immunoinformatics Approaches. *Sci Rep* (2021) 11:1–15. doi: 10.1038/s41598-021-91997-4
91. Colovos C, Yeates TO. Verification of Protein Structures: Patterns of Nonbonded Atomic Interactions. *Protein Sci* (1993) 2:1511–9. doi: 10.1002/pro.5560020916
92. Khatoon N, Pandey RK, Prajapati VK. Exploring Leishmania Secretory Proteins to Design B and T Cell Multi-Epitope Subunit Vaccine Using Immunoinformatics Approach. *Sci Rep* (2017) 7:1–12. doi: 10.1038/s41598-017-08842-w
93. Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Pothorny D, Yueh C, et al. The ClusPro Web Server for Protein-Protein Docking. *Nat Protoc* (2017) 12:255–78. doi: 10.1038/nprot.2016.169

94. Sarkar B, Ullah MA, Araf Y. A Systematic and Reverse Vaccinology Approach to Design Novel Subunit Vaccines Against Dengue Virus Type-1 (DENV-1) and Human Papillomavirus-16 (HPV-16). *Inf Med Unlocked* (2020) 19:100343. doi: 10.1016/j.imu.2020.100343
95. Xue LC, Rodrigues JP, Kastiris PL, Bonvin AM, Vangone A. PRODIGY: A Web Server for Predicting the Binding Affinity of Protein-Protein Complexes. *Bioinformatics* (2016) 32:3676–8. doi: 10.1093/bioinformatics/btw514
96. López-Blanco JR, Aliaga JJ, Quintana-Orti ES, Chacón P. IMODS: Internal Coordinates Normal Mode Analysis Server. *Nucleic Acids Res* (2014) 42:271–6. doi: 10.1093/nar/gku339
97. Islam R, Parvez MSA, Anwar S, Hosen MJ. Delineating Blueprint of an Epitope-Based Peptide Vaccine Against the Multiple Serovars of Dengue Virus: A Hierarchical Reverse Vaccinology Approach. *Inf Med Unlocked* (2020) 20:100430. doi: 10.1016/j.imu.2020.100430
98. Ponomarenko J, Bui HH, Li W, Füsseder N, Bourne PE, Sette A, et al. ElliPro: A New Structure-Based Tool for the Prediction of Antibody Epitopes. *BMC Bioinf* (2008) 9:1–8. doi: 10.1186/1471-2105-9-514
99. Taylor WR, Thornton JM, Turnell WG. An Ellipsoidal Approximation of Protein Shape. *J Mol Graphics* (1983) 1:30–8. doi: 10.1016/0263-7855(83)80001-0
100. Thornton JM, Edwards MS, Taylor WR, Barlow DJ. Location of “Continuous” Antigenic Determinants in the Protruding Regions of Proteins. *EMBO J* (1986) 5:409–13. doi: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04226.x
101. Sanches RCO, Tiwari S, Ferreira LCG, Oliveira FM, Lopes MD, Passos MJF, et al. Immunoinformatics Design of Multi-Epitope Peptide-Based Vaccine Against *Schistosoma mansoni* Using Transmembrane Proteins as a Target. *Front Immunol* (2021) 12:621706. doi: 10.3389/fimmu.2021.621706
102. Rapin N, Lund O, Bernaschi M, Castiglione F. Computational Immunology Meets Bioinformatics: The Use of Prediction Tools for Molecular Binding in the Simulation of the Immune System. *PLoS One* (2010) 5:e9862. doi: 10.1371/journal.pone.0009862
103. Qamar MTU, Shokat Z, Muneer I, Ashfaq UA, Javed H, Anwar F, et al. Multi-epitope-Based Subunit Vaccine Design and Evaluation Against Respiratory Syncytial Virus Using Reverse Vaccinology Approach. *Vaccines* (2020) 8:1–27. doi: 10.3390/vaccines8020288
104. Grote A, Hiller K, Scheer M, Münch R, Nörtemann B, Hempel DC, et al. JCat: A Novel Tool to Adapt Codon Usage of a Target Gene to Its Potential Expression Host. *Nucleic Acids Res* (2005) 33:526–31. doi: 10.1093/nar/gki376
105. Morla S, Makhijia A, Kumar S. Synonymous Codon Usage Pattern in Glycoprotein Gene of Rabies Virus. *Gene* (2016) 584:1–6. doi: 10.1016/j.gene.2016.02.047
106. Delany I, Rappuoli R, Seib KL. Vaccines, Reverse Vaccinology, and Bacterial Pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspect Med* (2013) 3:a012476. doi: 10.1101/cshperspect.a012476
107. Wassenaar TM, Gastra W. Bacterial Virulence: Can We Draw the Line? *FEMS Microbiol Lett* (2001) 201:1–7. doi: 10.1016/S0378-1097(01)00241-5
108. Shanmugham B, Pan A. Identification and Characterization of Potential Therapeutic Candidates in Emerging Human Pathogen *Mycobacterium abscessus*: A Novel Hierarchical *In Silico* Approach. *PLoS One* (2013) 8:e59126. doi: 10.1371/journal.pone.0059126
109. Rioseras B, Yagué P, López-García MT, Gonzalez-Quinónez N, Binda E, Marinelli F, et al. Characterization of SCO4439, a D-Alanyl-D-Alanine Carboxypeptidase Involved in Spore Cell Wall Maturation, Resistance, and Germination in *Streptomyces coelicolor*. *Sci Rep* (2016) 6:1–15. doi: 10.1038/srep21659
110. Cui Z, Dang G, Song N, Cui Y, Li Z, Zang X, et al. Rv3091, An Extracellular Patatin-Like Phospholipase in *Mycobacterium tuberculosis* Prolongs Intracellular Survival of Recombinant *Mycobacterium smegmatis* by Mediating Phagosomal Escape. *Front Microbiol* (2020) 11:532371. doi: 10.3389/fmicb.2020.532371
111. Gaspar AH, Machner MP. VipD is a Rab5-Activated Phospholipase A1 That Protects *Legionella pneumophila* From Endosomal Fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* (2014) 111:4560–5. doi: 10.1073/pnas.1316376111
112. Sinha AK, Dutta A, Chandravanshi M, Kanaujia SP. An Insight Into Bacterial Phospholipase C Classification and Their Translocation Through Tat and Sec Pathways: A Data Mining Study. *Meta Gene* (2019) 20:100547. doi: 10.1016/j.mgene.2019.100547
113. Dedieu L, Serreau-Avesque C, Kremer L, Cnaan S. Mycobacterial Lipolytic Enzymes: A Gold Mine for Tuberculosis Research. *Biochimie* (2013) 95:66–73. doi: 10.1016/j.biochi.2012.07.008
114. Schmiel DH, Miller VL. Bacterial Phospholipases and Pathogenesis. *Microbes Infect* (1999) 1:1103–12. doi: 10.1016/S1286-4579(99)00205-1
115. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelman RE, Actis LA. Attachment to and Biofilm Formation on Abiotic Surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a Novel Chaperone-Usher Pili Assembly System. *Microbiology* (2003) 149:3473–84. doi: 10.1099/mic.0.26541-0
116. Gollop R, Inouye M, Inouye S. Protein U, a Late-Developmental Spore Coat Protein of *Myxococcus xanthus*, Is a Secretory Protein. *J Bacteriol* (1991) 173:3597–600. doi: 10.1128/jb.173.11.3597-3600.1991
117. Li W, Zhao Y, Yu J, Lin L, Ramanathan S, Wang G, et al. TonB-Dependent Receptors Affect the Spontaneous Oxytetracycline Resistance Evolution in *Aeromonas hydrophila*. *J Proteome Res* (2021) 20:154–63. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00708
118. Zhang Z, Jiang S, Liu Y, Sun Y, Yu P, Gong Q, et al. Identification of Irea, 0007, 0008, and 2235 as TonB-Dependent Receptors in the Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain DE205B. *Vet Res* (2020) 51:1–10. doi: 10.1186/s13567-020-0734-z
119. Gómez-Santos N, Glatter T, Koebnik R, Świątek-Polatyńska MA, Sogaard-Andersen L. A TonB-Dependent Transporter Is Required for Secretion of Protease PopC Across the Bacterial Outer Membrane. *Nat Commun* (2019) 10:1360. doi: 10.1038/s41467-019-09366-9
120. Schalk IJ, Mislin GLA, Brillet K. Structure, Function and Binding Selectivity and Stereoselectivity of Siderophore-Iron Outer Membrane Transporters. London, GB: Elsevier (2012). p. 37–66. doi: 10.1016/B978-0-12-394390-3.00002-1
121. Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P. Structure and Function of Bacterial Outer Membrane Proteins: Barrels in a Nutshell. *Mol Microbiol* (2000) 37:239–53. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01983.x
122. Prado LC da S, Giacchetto Felice A, Rodrigues TCV, Tiwari S, Andrade BS, Kato RB, et al. New Putative Therapeutic Targets Against *Serratia marcescens* Using Reverse Vaccinology and Subtractive Genomics. *J Biomolec Struct Dynam* (2021) 30:1–16. doi: 10.1080/07391102.2021.1942211
123. Leow CY, Kazi A, Ismail CMKH, 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) 9:15–25. doi: 10.7774/cevr.2020.9.1.15
124. Shey RA, Ghogomu SM, Esoh KK, Nebangwa ND, Shintouo CM, Nongley NF, et al. *In-Silico* Design of a Multi-Epitope Vaccine Candidate Against Onchocerciasis and Related Filarial Diseases. *Sci Rep* (2019) 9:1–18. doi: 10.1038/s41598-019-40833-x
125. Barchiesi J, Castelli ME, di Venanzio G, Colombo MI, García Vescovi E. The PhoP/PhoQ System and Its Role in *Serratia marcescens* Pathogenesis. *J Bacteriol* (2012) 194:2949–61. doi: 10.1128/JB.06820-11
126. Fedrigo G v, Campoy EM, di Venanzio G, Colombo MI, García Vescovi E. *Serratia marcescens* Is Able to Survive and Proliferate in Autophagic-Like Vacuoles Inside Non-Phagocytic Cells. *PLoS One* (2011) 6:e24054. doi: 10.1371/journal.pone.0024054
127. Hertle R, Schwarz H. *Serratia marcescens* Internalization and Replication in Human Bladder Epithelial Cells. *BMC Infect Dis* (2004) 4:16. doi: 10.1186/1471-2334-4-16
128. Xiong Q, Yang M, Li P, Wu C. Bacteria Exploit Autophagy For Their Own Benefit. *Infect Drug Resist* (2019) 12:3205–15. doi: 10.2147/IDR.S220376
129. Ozawa Y, Suda T, Nagata T, Hashimoto D, Nakamura Y, Enomoto N, et al. Mucosal Vaccine Using CTL Epitope-Pulsed Dendritic Cell Confers Protection for Intracellular Pathogen. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2009) 41:440–8. doi: 10.1165/rncmb.2008-0446OC
130. Kaufmann SHE. Recent Findings in Immunology Give Tuberculosis Vaccines a New Boost. *Trends Immunol* (2005) 26:660–7. doi: 10.1016/j.it.2005.09.012
131. Nain Z, Karim MM, Sen MK, Adhikari UK. Structural Basis and Designing of Peptide Vaccine Using PE-PGRS Family Protein of *Mycobacterium*

- Ulcerans—An Integrated Vaccinomics Approach. *Mol Immunol* (2020) 120:146–63. doi: 10.1016/j.molimm.2020.02.009
132. Chaudhri G, Quah BJ, Wang Y, Tan AHY, Zhou J, Karupiah G, et al. T Cell Receptor Sharing by Cytotoxic T Lymphocytes Facilitates Efficient Virus Control. *Proc Natl Acad Sci* (2009) 106:14984–9. doi: 10.1073/pnas.0906554106
133. Shi J, Zhang J, Li S, Sun J, Teng Y, Wu M, et al. Epitope-Based Vaccine Target Screening Against Highly Pathogenic MERS-CoV: An *In Silico* Approach Applied to Emerging Infectious Diseases. *PLoS One* (2015) 10:1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0144475
134. Azim KF, Hasan M, Hossain MN, Somana SR, Hoque SF, Bappy MNI, et al. *Immunoinformatics Approaches for Designing a Novel Multi Epitope Peptide Vaccine Against Human Norovirus (Norwalk Virus)*. Elsevier B.V (2019). p. 103936. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103936
135. Ghaffari-Nazari H, Tavakkol-Afshari J, Jaafari MR, Tahaghoghi-Hajghorbani S, Masoumi E, Jalali SA. Improving Multi-Epitope Long Peptide Vaccine Potency by Using a Strategy That Enhances CD4+ T Help in BALB/c Mice. *PLoS One* (2015) 10:1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0142563
136. Hajjigharamani N, Nezafat N, Eslami M, Negahdaripour M, Rahmatbadi SS, Ghasemi Y. Immunoinformatics Analysis and *In Silico* Designing of a Novel Multi-Epitope Peptide Vaccine Against Staphylococcus Aureus. *Infect Genet Evol* (2017) 48:83–94. doi: 10.1016/j.meegid.2016.12.010
137. Chen Z, Zhu Y, Sha T, Li Z, Li Y, Zhang F, et al. Design of a New Multi-Epitope Vaccine Against Brucella Based on T and B Cell Epitopes. *Epidemiol Infect* (2021) 149:E136. doi: 10.1017/S0950268821001229
138. Chukwudozie OS, Gray CM, Fagbaya TA, Chukwuakwu RC, Oyeboji VO, Bankole TT, et al. Immunoinformatics Design of a Multimeric Epitope Peptide Based Vaccine Targeting SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *PLoS One* (2021) 16:1–25. doi: 10.1371/journal.pone.0248061
139. Couto J, Seixas G, Stutzer C, Olivier NA, Maritz-Olivier C, Antunes S, et al. Probing the Rhipicephalus Bursa Sialomes in Potential Anti-Tick Vaccine Candidates: A Reverse Vaccinology Approach. *Biomedicines* (2021) 9:1–18. doi: 10.3390/biomedicines9040363
140. Majid M, Andleeb S. Designing a Multi-Epitopic Vaccine Against the Enterotoxigenic Bacteroides Fragilis Based on Immunoinformatics Approach. *Sci Rep* (2019) 9:1–15. doi: 10.1038/s41598-019-55613-w
141. Alom MW, Shehab MN, Sujon KM, Akter F. Exploring E, NS3, and NS5 Proteins to Design a Novel Multi-Epitope Vaccine Candidate Against West Nile Virus: An *In-Silico* Approach. *Inf Med Unlocked* (2021) 25:100644. doi: 10.1016/j.imu.2021.100644
142. Toussi DN, Massari P. Immune Adjuvant Effect of Molecularly-Defined Toll-Like Receptor Ligands. *Vaccines* (2014) 2:323–53. doi: 10.3390/vaccines2020323
143. Palatnik-de-Sousa CB, Soares I da S, Rosa DS. Editorial: Epitope Discovery and Synthetic Vaccine Design. *Front Immunol* (2018) 9:826. doi: 10.3389/fimmu.2018.00826
144. Rahman MS, Hoque MN, Islam MR, Akter S, Ul Alam ASMR, Siddique MA, et al. Epitope-Based Chimeric Peptide Vaccine Design Against S, M and E Proteins of SARS-CoV-2, the Etiologic Agent of COVID-19 Pandemic: An *In Silico* Approach. *PeerJ* (2020) 8:e9572. doi: 10.7717/peerj.9572
145. Obaidullah AJ, Alanazi MM, Alsaif NA, Albassam H, Almhizia AA, Alqahtani AM, et al. Immunoinformatics-Guided Design of a Multi-Epitope Vaccine Based on the Structural Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *RSC Adv* (2021) 11:18103–21. doi: 10.1039/d1ra02885e

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Damas, Mazur, Freire, Cunha and Pranchevicius. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.