مقاله اصیل

رونمایی یک پروتئین ایمنی‌زای اختصاصی در اسینتوباکتر بومانی

کبری احمدی زانوس[1]، ایرج رسولی[2*]، ابوالفضل جهانگیری[3]، محمدرضا رهبر[4]، شکیبا درویش علیپور آستانه[5]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳- دانشجوی دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات میکربیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران
۴- کارشناس ارشد، آزمایشگاه دکتر سعادتی، شیراز، ایران
۵- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۳۳۱۹۱۱۸۶۵۱، بزرگراه تهران- قم روبروی حرم مطهر امام خمینی (ره)، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی
Email: rasooli@shahed.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۲/۰۹/۱۰ پذیرش مقاله: ۹۲/۱۱/۰۲

چکیده

هدف: اسینتوباکتر بومانی یک باکتری گرم منفی، غیر متحرک و هوازی اجباری است که به عنوان بیماری زای بیمارستانی شناخته شده و غالباً مقاوم به انواع آنتی‌بیوتیک‌هاست. این باکتری همچنین به عنوان یک عامل مهم شیوع و مرگ و میر در بیمارستان‌ها مخصوصاً در میان بیماران دارای نقص ایمنی شناسایی شده است. کنترل و درمان عفونت ناشی از آن به دلیل توانایی بیماری زا برای مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و زنده ماندن در شرایط محیطی مختلف و استفاده از طیف وسیعی از منابع غذایی، سخت است. تشخیص اولیه عفونت ایجاد شده به وسیله اسینتوباکتر بومانی استراتژی مهمی برای کنترل کردن عفونت بیمارستانی ناشی از این باکتری بیماری زا است. روش‌های رایج شناسایی این باکتری به وسیله روش‌های کشت معمول و آزمون‌های بیوشیمیایی است که به‌دست آوردن نتایج آن‌ها بین ۲ تا ۵ روز طول می‌کشد. بنابراین یک آزمون جدید، سریع، حساس، اختصاصی و اقتصادی که مدیریت سریع عفونت‌های اسینتوباکتر بومانی را فراهم می‌کند، مورد نیاز است.

ایجاد یک آزمون تشخیصی اختصاصی و حساس به نشانگر زیستی نیاز دارد که واکنش تقاطعی با باکتری‌های دیگر نداشته و تنها برای اسینتوباکتر بومانی اختصاصی باشد.

مواد و روش‌ها: بر این اساس، هدف از این مطالعه شناسایی و توالی‌یابی یک پروتئین غشای خارجی ۳٤/٤ کیلودالتون معرفی شده توسط اسلام و همکارانش از بین پروتئین‌های غشای خارجی اسینتوباکتر بومانی ATCC 19606 است. در مطالعه حاضر از نرم‌افزارهای مختلف بیوانفورماتیکی برای غربالگری کل پروتئوم باکتری استفاده شد. غربالگری پروتئین‌ها با توجه به ویژگی‌هایی از جمله وزن مولکولی، موقعیت‌یابی، توپولوژی، همولوژی، آنتی‌ژنی و آلرژی‌زایی صورت گرفته است.

نتایج: سه پروتئین در وزن مولکولی بین ۳۳-۳٦ کیلودالتون به عنوان پروتئین غشای خارجی شناسایی شدند. براساس تجزیه و تحلیل های انجام شده و پیش‌بینی‌های آنتی‌ژنی و دیگر بررسی‌های صورت گرفته تنها یکی از ۳ پروتئین به عنوان آنتی‌ژن اختصاصی اسینتوباکتر بومانی شناخته شد.

نتیجه‌گیری: بهترین نامزد پروتئینی با شماره دستیابی ZP_05827218.1 توسط بررسی‌های بیوانفورماتیکی تعیین شد.

کلیدواژگان: اسینتوباکتر بومانی، بیوانفورماتیک، ایمنی‌زا، پروتئین غشای خارجی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، صفحات: ۱-۱۶

مقدمه

اسینتوباکتر بومانی (*Acinetobacter baumannii*) یک باکتری گرم منفی (Gram-negative)، غیرمتحرک (Non-Movable) و کوکوباسیل هوازی اجباری (Obligatory Aerobic) است که به طور معمول در خاک، آب و فاضلاب یافت می‌شود [۱-۳]. این باکتری به عنوان یک بیماری‌زای انسانی مهم شناخته می‌شود که عامل انواع عفونت‌ها از جمله پنومونی (Pneumonia)، مننژیت (Meningitis)، سپتی‌سمی (Septicemia) و عفونت دستگاه ادراری (Urinary Tract Infection) است. اخیراً یک اسینتوباکتر بومانی مقاوم دارویی (Drug-resistant) مسئول شیوع باکتریمی (Bacteremia) در بیشتر از ۲٤۰ دسته سرباز در عراق [٤، ٥] شناخته شد که سبب نگرانی مهمی از ایجاد یک اپیدمی بزرگ توسط این میکروارگانیسم شد. این میکروارگانیسم می‌تواند از منابع کربنی متنوعی استفاده کند و قادر است در یک طیف وسیعی از دما (۲۸- ۵۳ درجه سانتی‌گراد) و pH به رشد خود ادامه دهد [٦].

این بیماری‌زا بعد از سودوموناس آئروجینوزا (*P. aeruginusa*)، در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی [۷] رتبهٔ دوم را داراست به طوری که میزان مرگ و میر بیماران آلوده را به ٤۳ درصد می‌رساند [۸] و حتی در برخی از کشورها این میزان به ۷۵ درصد می‌رسد [۳] و این مسئله اهمیت توجه و مطالعهٔ اسینتوباکتر بومانی را گوشزد می‌کند. با این حال اطلاعات در مورد عوامل بیماری‌زا، استراتژی‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی (Antibiotic Resistance) یا مزمن شدن این باکتری بسیار کم است.

در دو دهه اخیر افزایش شدید عفونت اسینتوباکتر بومانی خصوصاً در بیماران بخش مراقبت‌های ویژه (Intensive Care Unit: ICU) و ظهور بیشتر این میکروارگانیسم در بیماران آسیب دیده باعث نگرانی و در نتیجه اهمیت عفونت ناشی از اسینتوباکتر بومانی شده است. بقای این میکروارگانیسم روی تجهیزات بیمارستانی و مقاومت آن به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها سبب شده که این باکتری یک بیماری‌زای بسیار قدرتمند شود.

شیوع عفونت‌های خونی ناشی از اسینتوباکتر بومانی به صورت رایج یک مشکل سلامت عمومی (Public Health Problem) در بسیاری از کشورها است و حدود ۲ تا ۱۰ درصد تمامی عفونت‌های باکتری‌های گرم منفی در اروپا [۹] و در حدود ۲/۵ درصد در آمریکا را شامل می‌شود [۱۰].

در مطالعه‌ای در کشورمان، در مجموع میزان شیوع عفونت بیمارستانی (Nosocomial Infections) با مقاومت دارویی چندگانه (Multidrug Resistance: MDR) نسبت به سودوموناس آئروجینوزا و اسینتوباکتر ۳/۱ درصد بود که بیشترین میزان مربوط به بخش ICU می‌شد. از مجموع ۲۷۸ جدایه MDR جدا شده با مقاومت چند دارویی ۹۳ (٤/۳۳ درصد) مورد شامل ۳۵ مورد (٦/۱۲ درصد) اسینتوباکتر و ۵۸ مورد سودوموناس آئروجینوزا (۸/۲۰ درصد) بود. همچنین بیشترین موارد مربوط به این دو گونه باکتری از نمونه‌های پنومونی (۵۰ مورد،۸/۵۳ درصد) و زخم (۱۸ مورد، ۳/۱۹ درصد) جدا شد [۱۱].

این بیماری‌زای فرصت‌طلب تعداد زیادی از عوامل را بیان می‌کند که می‌تواند در بیماری‌زایی انسان نقش بازی کند. ساز و کارهای دقیق بیماری‌زایی اسینتوباکتر بومانی مشخص نیست؛ عوامل بیماری‌زای اندکی در این باکتری شناخته شده و سم یا سیتولیزین در آن معرفی نشده است [۱۲].

عامل مهم و مؤثر در بقای این جاندار در محیط زنده و غیر زنده تشکیل بیوفیلم (Biofilm) است؛ اسینتوباکتر بومانی به آسانی به سطوح زنده یا غیر زنده متصل می‌شود و روی آن‌ها بیوفیلم تشکیل می‌دهد [۱۳-۱٦]. بیوفیلم از عوامل مهم در بیماری‌زایی اکثر باکتری‌ها است؛ این اتفاق به این دلیل است که سلول‌های رشد کرده در بیوفیلم به اجزای سیستم ایمنی انسان و به انواع زیادی از عوامل ضد میکروبی بسیار مقاوم هستند.

اسینتوباکتر همچنین می‌تواند باعث ایجاد گاستروانتریت (Gastroenteritis) شدید و تحریک آزادسازی سایتوکاین به وسیله بیان عوامل بیماری‌زا شود [۱۷].

درمان عفونت‌های ناشی از این بیماری‌زا به دلیل مقاومت قابل توجه آن به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها، بسیار دشوار

است [۸]. مطابق با پیشنهاد انجمن بیماری‌های عفونی آمریکا (Infectious Diseases Society of America: IDSA)، اسینتوباکتر بومانی به عنوان یکی از بیماری‌زاهای گرم منفی بسیار مشکل‌ساز مورد توجه است [۱۸]. درمان عفونت اسینتوباکتر به دنبال افزایش مقاومت ناشی از آنزیم‌های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها، کارباپنم‌ها (Carbapenem) یا تغییر در پروتئین‌های غشای خارجی (Outer Membrane Proteins: OMPs) و PBPs (Penicillin-binding proteins) بسیار مشکل شده است [۱۹]. با وجود اهمیت تشخیص سریع این بیماری‌زای بیمارستانی، این میکروارگانیسم هنوز با استفاده از روش‌های کشت مرسوم و با کمک آزمون‌های بیوشیمیایی تشخیص داده می‌شود [۲۰]. این روش‌های مرسوم زمان‌بر بوده و حتی ممکن است بین ۲- ۵ روز به طول بیانجامد [۲۰]. استفاده از آنتی‌ژن‌های اختصاصی در روش‌های تشخیصی بر پایهٔ میانکنش‌های آنتی‌ژن- آنتی‌بادی مزیت‌های بسیاری را نسبت به روش‌های مرسوم و رایج برای تشخیص عفونت بیمارستانی ایجاد شده به وسیله اسینتوباکتر بومانی دارند.

برای رسیدن به چنین پروتئین اختصاصی از میان انبوه پروتئین‌های پروتئوم باکتری، می‌توان از ابزارهای بیوانفورماتیکی مدد جست.

در دو دهه اخیر دامنه کاربرد بیوانفورماتیک وسعت یافته و به سمت شناسایی و تجزیه و تحلیل اجزای سلول و درشت مولکول‌های زیستی پیش رفته است؛ از آن جمله می‌توان به تعیین نواحی اختصاصی پروتئین‌ها [۲۱، ۲۲] طراحی واکسن [۲۳، ۲٤] و مدل‌سازی و پیش‌بینی ساختار دو بعدی و سه بعدی پروتئین‌ها [۲۵] اشاره کرد.

امروزه ابزارهای بیوانفورماتیکی دارای مزایای بسیاری در کنار آزمایش‌های عملی هستند. انجام آزمایش‌های عملی گاهاً بسیار پرهزینه و زمان‌بر است. همچنین جنبه‌های اخلاقی در اجرای این آزمایش‌ها می‌تواند از محدودیت‌های آن به شمار آید. بنابراین طراحی و بررسی آزمایش‌های عملی و نتایج حاصل از آن‌ها در فضای مجازی پیش از انجام کار آزمایشگاهی، امری کاملاً معقول و منطقی به نظر می‌رسد. شناسایی و معرفی پروتئین‌های خاصی از بیماری‌زاها می‌تواند محققان را به فهم درست بیماری‌زایی ارگانیسم برای طراحی دارو، واکسن و کیت‌های تشخیصی هدایت کند. از طرفی یافتن پروتئینی اختصاصی از میان انبوه پروتئین‌های موجود در باکتری که واکنش تقاطعی با باکتری‌های دیگر نداشته باشد کاری مشکل خواهد بود. مطالعهٔ پیش رو بر مبنای معرفی پروتئینی ایمنی‌زا و اختصاصی توسط اسلام و همکارانش [۲۰] صورت گرفته است. بر این اساس هدف از این مطالعه شناسایی و بررسی پروتئین مذبور به عنوان نشان‌گر زیستی آنتی‌ژنی و اختصاصی برای اسینتوباکتر بومانی از پروتئین‌های غشای خارجی (OMPs) با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی است.

مواد و روش‌ها

طراحی مطالعه

همان طور که در مقدمه ذکر شده بود این مطالعه بر اساس مشاهدات اسلام و همکارانش [۲۰]، طراحی شده است. در مطالعه حاضر از سرورها و نرم‌افزارهای آنلاین برای شناسایی و بررسی پروتئین ناشناخته‌ای که توسط اسلام و همکارانش در سال ۲۰۱۱ معرفی شده است، استفاده شد. در اولین قدم غربالگری تمام ژنوم اسینتوباکتر بومانی ATCC19606 برای یافتن بهترین گزینه‌ها در راستای رسیدن به هدف مورد بحث با استفاده از ویژگی‌هایی چون وزن مولکولی و جایگاه پروتئین‌ها صورت گرفت. در مرحله بعد روی پروتئین‌های انتخاب شده آنالیزهای بیشتر بیوانفورماتیکی انجام شد.

توالی‌های پروتئینی

کلیه توالی‌ها از وب‌گاه www.ncbi.nlm.nih.gov گرفته شده است. همهٔ توالی با فرمت FASTA ذخیره‌سازی شد. فرمت FASTA ساده‌ترین فرم نمایش توالی‌ها بود و تقریباً در

تمام نرم‌افزارها قابل پذیرش است.

تجزیه و تحلیل اولیه پروتئوم

غربالگری پروتئوم بر اساس وزن مولکولی

در این مرحله پروتئین‌های کد شونده توسط ژنوم اسینتوباکتر بومانی ATCC19606 به‌دست آمده از سایت NCBI به آدرس:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/proteins/403?genome_assembly_id=165875&gi=260558184.

به فرمت FASTA ذخیره شد. سپس وزن مولکولی پروتئین‌های محدوده وزنی ۳۳-۳۶ کیلودالتون با استفاده از نرم‌افزار ProtParam به آدرس http://web.expasy.org/protparam/ محاسبه و این پروتئین‌ها به عنوان داده‌هایی برای تجزیه و تحلیل جایگاهی استفاده شد.

جایگاه پروتئین‌ها

جایگاه تمامی پروتئین‌های موجود در محدوده وزنی ۳۳-۳۶ کیلودالتون با استفاده از نرم‌افزار psortb به آدرس http://www.psort.org/psortb/ تعیین شد و در نهایت داده‌های به‌دست آمده با نرم‌افزارهای CELLO و PSLpred به ترتیب به آدرس‌های http://cello.life.nctu.edu.tw/ و http://www.imtech.res.in/raghava/pslpred/submit.html تأیید شد. در این بخش از کار دو پروتئین غشای خارجی شناخته شده اسینتوباکتر بومانی و سالمونلا تیفی (*Salmonella typhi*) به ترتیب OmpA با شماره دستیابی ZP_05829399.1 و OmpC با شماره دسترسی NP_804453.1 به منظور تأیید اعتبار نتایج و تعیین درستی داده‌های حاصل از این سرورها استفاده شد. انتخاب این دو پروتئین به این منظور است که به صورت کاملی توسط دانشمندان دیگری مورد تحقیق عملی و بیوانفورماتیکی قرار گرفته‌است و اطلاعات وسیعی از آن‌ها در اختیار است [۲۶-۲۸].

تجزیه و تحلیل‌های ثانویه پروتئین‌ها

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها

به منظور بررسی اولیه توالی پروتئین‌ها و تعیین خصوصیات مختلفی نظیر نقطهٔ ایزوالکتریک کل اسیدهای آمینهٔ دارای بار منفی و مثبت، شاخص ناپایداری و شاخص آلیفاتیک، (Aliphatic Index) ترکیب اسیدهای آمینه، نیمه عمر پروتئین در برخی از میزبان‌ها و خصوصاً وزن مولکولی از نرم‌افزار ProtParam که قبلاً نیز ذکر شده بود، استفاده شد.

پایگاه داده‌ها

به منظور بررسی حضور و عدم حضور پروتئین‌های غشای خارجی مورد نظر در بین گونه‌های دیگر، از پایگاه داده STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/ Proteins) به آدرس http://string-db.org/ استفاده شد. این پایگاه داده همچنین می‌تواند مقاله‌های چاپ شده در مورد پروتئین‌های مورد بحث را که در Pubmed نمایه شده‌است، معرفی کند.

بررسی همولوژی پروتئین‌ها

توالی پروتئین‌های به‌دست آمده به عنوان داده‌هایی برای BLAST علیه پایگاه داده پروتئین‌های بدون حشو (Non Redundant Protein) به آدرس www.ncbi.nlm.nih.org/BLAST استفاده شد. همچنین از این توالی برای بررسی‌های دیگر نیز استفاده شد. BLAST مستقل برای تمامی پروتئین‌های به‌دست آمده در مرحله قبل انجام شد. انتخاب پروتئین هدف بر اساس بیشترین پوشش با توالی مورد نظر و کمترین E-value در میان پروتئین‌های اختصاصی اسینتوباکتر بومانی صورت گرفت. همچنین برای یافتن توالی‌هایی اورتولوگ BLASTO با استفاده از پایگاه داده‌های NCBI COG، NCBI KOG، OrthoMCL DB و MultiParanoid به آدرس http://oxytricha.princeton.edu/BlastO/ انجام شد. این گروه‌های اورتولوگ به دلیل روش مورد استفاده در این برنامه احتمالاً حفاظت شده‌تر است.

تجزیه و تحلیل‌های ایمونوانفورماتیکی

احتمال آنتی‌ژنی با استفاده از نرم‌افزار VaxiJen در وب‌گاه http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html تخمین زده شد. حد آستانهٔ پیش‌فرض برای این نرم‌افزار ۰/٤ است. Vaxijen اولین سرور برای پیش‌بینی مستقل از هم ردیفی برای آنتی‌ژن‌های محافظتی است. این برنامه برای این‌که آنتی‌ژن‌ها را بر اساس خواص فیزیکوشیمیایی آن و بدون توجه به هم ردیفی آن با دیگر پروتئین‌ها دسته‌بندی کند، ایجاد شده است [۲۹]. این سرور حاوی مدل‌های به‌دست آمده از طریق تغییر شکل کوواریانس متقاطع خودکار (Auto Cross Covariance: ACC) پیش‌پردازشی توالی‌های پروتئین به درون مسیرهای یک شکلی از ویژگی‌های آمینو اسیدهای اصلی است. همچنین نرم‌افزار ANTIGENpro به آدرس http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/ برای تعیین احتمال آنتی‌ژنی پروتئین‌ها استفاده شد؛ این نرم‌افزار قطع نظر از نوع منبع پروتئین و بدون استفاده از هم ردیفی، تنها بر اساس توالی پروتئین عمل می‌کند.

خصوصیات مختلفی که در پیش‌بینی موقعیت اپی‌توپ‌های سلول B نقش دارد با استفاده از روش‌های موجود در سرور www.immunepitope.org تعیین شد. این سرور از روش‌های زیر بهره می‌برد: روش Chou و Fasman به منظور پیش‌بینی پیچ‌های بتا، روش Karplus و Schuls برای پیش‌بینی انعطاف‌پذیری، روش Emini برای پیش‌بینی سطوح در دسترس پروتئین و در نهایت از روش Parker برای ارزیابی آب‌دوستی پروتئین.

توپولوژی پروتئین‌ها

برای این منظور از اجماعی از ۵ الگوریتم مختلف پیش‌بینی کننده موقعیت پروتئین شامل SCAMPI (روش توالی منفرد)، SCAMPI (روش توالی چندگانه)، PRODIV-TMHMM، PRO-TMHMM و OCTOPUS که به نام کلی نرم‌افزار TOPCONS به آدرس http://topcons.cbr.su.se/ شناخته می‌شود، برای ارزیابی مشخصات قطعات غشایی از پروتئین مانند قطعه سیگنال پپتید و قطعاتی که به سمت درون یا بیرون غشای پروتئین بهره‌گیری می‌کند، استفاده می‌شود. برای پیش‌بینی ناحیه یا نواحی عرض غشایی موجود در پروتئین‌ها از نرم‌افزارهایی مانند TMHMM به آدرس http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/، DAS به آدرس http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/، MemBrain به آدرس http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/MemBrain/، MemType به آدرس http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/MemType/ و SOSUI به آدرس http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html استفاده شد. پنج بخش ساختاری محتمل پروتئین (مارپیچ غشایی، دم مارپیچی داخلی و خارجی، لوپ داخلی و خارجی) برای پروتئین‌ها با استفاده از روش مدل مخفی مارکف (Hidden Markov Model: HMM) و به‌کارگیری نرم‌افزار HMMTOP در آدرس اینترنتی http://www.enzim.hu/hmmtop/html/submit.html پیش‌بینی شد.

نتایج

تجزیه و تحلیل‌های اولیه

غربالگری وزن مولکولی

در ابتدا از سایت NCBI از بین ۳٦۰۷ پروتئین مربوط به پروتئوم اسینتوباکتر بومانی ATCC 19606، توالی‌هایی که در محدوده وزنی ۳۳-۳٦ کیلودالتون بود از جدول انتخاب شد. بدین صورت که کل پروتئین‌ها را به نرم‌افزار protparam داده و وزن مولکولی (MW) آن‌ها محاسبه شد. بر اساس غربالگری اولیه، ۲۰۱ پروتئین کد شده در محدوده وزنی ۳۳-۳٦ کیلودالتون در ژنوم اسینتوباکتر بومانی ATCC 19606 یافت شد.

تجزیه و تحلیل جایگاه پروتئین‌ها

جایگاه پروتئین‌های حاصل از مرحله قبل با استفاده از سه نرم‌افزار psortb، CELLO و PSLpred بررسی شد. در میان

توالی‌های مربوط به ۲۰۱ پروتئین، ۱۱ پروتئین که حداقل توسط یکی از نرم‌افزارهای آنلاین استفاده شده بود، به عنوان پروتئین غشای خارجی پیش‌بینی شد. از این میان، تنها ۳ پروتئین توسط حداقل دو نرم‌افزار به عنوان پروتئین غشای خارجی انتخاب شد. هر ۳ نرم‌افزار جایگاه پروتئین‌های کنترل را غشای خارجی پیش‌بینی کردند (جدول ۱).

جدول ۱ داده نرم‌افزارهای تعیین جایگاه مربوط به پروتئین‌های انتخاب شده به همراه OmpA و OmpC

نام پروتئین	شماره دستیابی	PSORTb	Cello	PSLpred
پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی	ZP_05830277.1	غشای خارجی	غشای خارجی	خارج سلولی/ فیمبریه
پپتیداز	ZP_05827218.1	غشای خارجی	غشای خارجی	پری‌پلاسمیک
لیپوپروتئین سطحی	ZP_05828247.1	غشای خارجی	غشای خارجی (پری‌پلاسمیک)	خارج سلولی
OmpC (سالمونلا تیفی)	NP_804453.1	غشای خارجی	غشای خارجی	غشای خارجی
OmpA (اسینتوباکتر بومانی)	ZP_05829399.1	غشای خارجی	غشای خارجی	غشای خارجی

جدول ۲ برخی از ویژگی‌های مربوط به پروتئین‌های انتخاب شده

نام پروتئین	شماره دستیابی	وزن مولکولی (کیلودالتون) و pI محاسبه شده توسط Protparam	طول	فراوان‌ترین اسیدهای آمینه	تعداد اسیدهای آمینه با بار منفی/ مثبت
پپتیداز	ZP_05830277.1	۳۵/۹۱ ٦/۲	۳۰۵	(٤۰) Leu (۳۵) Gln	(Asp + Glu) :۳۷ (Arg + Lys) :۳٤
پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی	ZP_05827218.1	۳۵/۸۷ ٤/۹٤	۳۲٤	(۳۳) Ser (۳۰)Asn	(Asp + Glu) :۳۳ (Arg + Lys) :۲۵
لیپوپروتئین سطحی	ZP_05828247.1	۳۳/٤ ٤/۹۲	۲۹۹	(۳٤) Leu (۲۷) Asp	(Asp + Glu) :٤۳ (Arg + Lys) :۳۲

تجزیه و تحلیل‌های ثانویه

تمامی تجزیه و تحلیل‌های بعدی روی ۳ پروتئینی که در مرحله قبل انتخاب شده بود، انجام شد.

بررسی‌های اولیه توالی

ویژگی‌های به‌دست آمده از این نرم‌افزار از قبیل نقطهٔ ایزوالکتریک، طول پروتئین، کل اسیدهای آمینهٔ دارای بار منفی و مثبت، فراوان‌ترین اسیدهای آمینه در جدول ۲ آمده است.

اطلاعات پایگاه داده

ارتباط بین پروتئین‌ها در ژنوم اسینتوباکتر بومانی توسط پایگاه داده STRING نشان داده شده است (شکل ۱). علاوه بر این هیچ دادهٔ انتشار یافته‌ای درباره پروتئین‌ها در Pubmed یافت نشد.

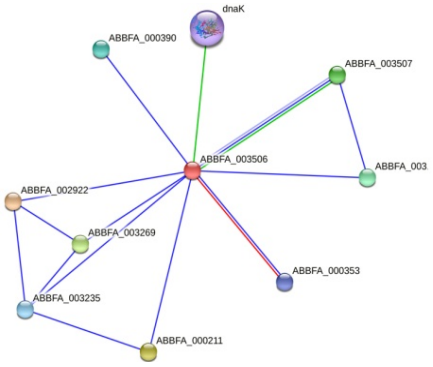
نتایج BLAST

بعد از انجام BLASTp مستقل روی هر یک از پروتئین‌ها به صورت جداگانه، مشخص شد که توالی‌های مورد قبول که دارای بیشترین امتیاز و کمترین E-value بود، متعلق به اسینتوباکتر بومانی است. بر اساس این نتایج، پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی با شماره دستیابی ZP_05827218.1 تنها در این بیماری‌زا وجود دارد. این توالی در بیش از ۲۰ سویهٔ این باکتری یافت شد که در میان آن‌ها سویه‌های بیمارستانی نیز بودند اما پپتیداز و لیپوپروتئین سطحی همولوگ‌هایی در دیگر پاتوژن‌ها داشتند.

هیچ دومین حفاظت شده‌ای در پروتئین حفاظت شدهٔ

فرضی یافت نشد اما پپتیداز یک دومین حفاظت شده متعلق بـه خانواده بزرگ متالوپروتئاز وابسته بـه روی (ZnMc) داشـت و یک دومین حفاظت شده متعلق به خانواده بـزرگ VacJ درون لیپوپروتئین سطحی شناسایی شد (شکل ۲).

الف-۱



الف-۲

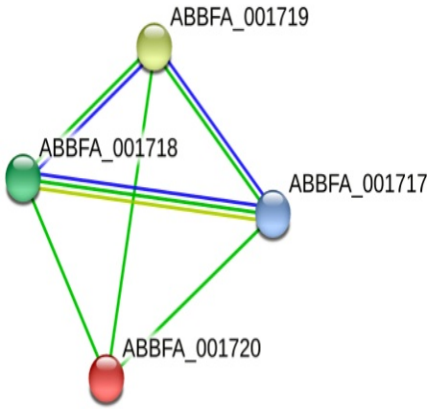
Your Input:

ABBFA_003506 Matrixin family protein (305 aa) *(Acinetobacter baumannii AB307)*

Predicted Functional Partners:

		Neighborhood	Gene Fusion	Cooccurrence	Coexpression	Experiments	Databases	Textmining	[Homology]	Score
ABBFA_002922	hypothetical protein (418 aa)			●						0.687
ABBFA_000211	hypothetical protein (230 aa)			●						0.542
ABBFA_003269	hypothetical protein (279 aa)			●						0.540
ABBFA_003507	Matrixin family protein (301 aa)		●	●					●	0.525
ABBFA_003109	hypothetical protein (420 aa)			●						0.511
ABBFA_000390	hypothetical protein (355 aa)			●						0.456
ABBFA_003235	hypothetical protein (252 aa)			●						0.438
ABBFA_000353	lipase chaperone (343 aa)			●						0.423
dnaK	molecular chaperone DnaK; Acts as a chaperone (By similarity) (646 aa)	●								0.420

ب-۱



ب-۲

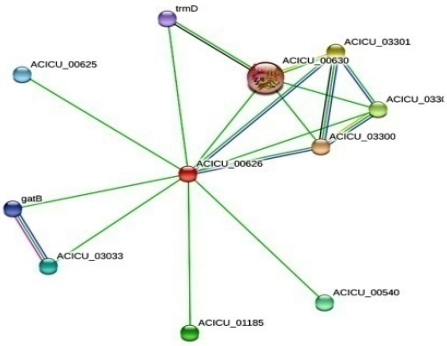
Your Input:

ABBFA_001720 hypothetical protein (325 aa) *(Acinetobacter baumannii AB307)*

Predicted Functional Partners:

		Neighborhood	Gene Fusion	Cooccurrence	Coexpression	Experiments	Databases	Textmining	[Homology]	Score
ABBFA_001719	Fimbrial family protein (336 aa)	●								0.566
ABBFA_001718	Outer membrane usher protein mrkC precursor (852 aa)	●								0.566
ABBFA_001717	Chaperone protein mrkB precursor (244 aa)	●								0.449

ج-۱



ج-۲

Your Input:

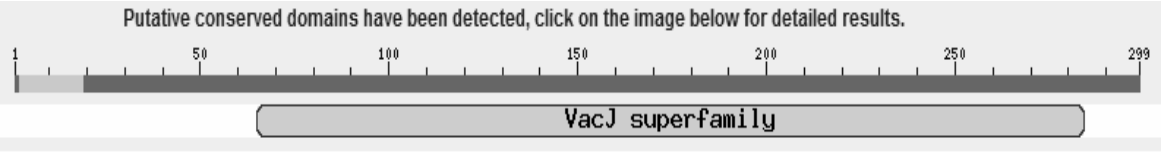
ACICU_00626 surface lipoprotein (299 aa) *(Acinetobacter baumannii ACICU)*

Predicted Functional Partners:

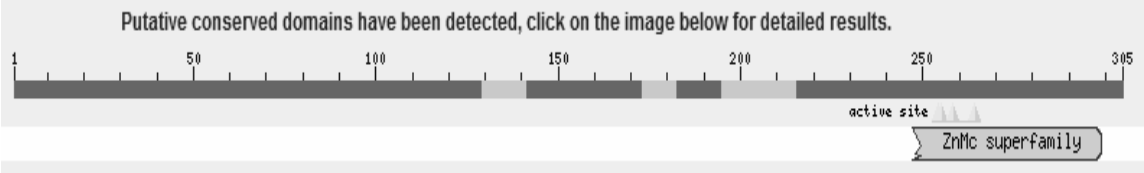
		Neighborhood	Gene Fusion	Cooccurrence	Coexpression	Experiments	Databases	Textmining	[Homology]	Score
ACICU_03300	ABC-type transport system (213 aa)	●	●							0.922
ACICU_03301	ABC-type transport system (226 aa)	●	●							0.888
ACICU_03302	ABC-type transport system (258 aa)	●								0.764
ACICU_01185	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III (368 aa)	●								0.609
ACICU_00540	GTPase (352 aa)	●								0.590
ACICU_03033	Asp-tRNAAsn/Glu-tRNAGln amidotransferase C subunit; Allows the formation of correctly charged A [...] (104 aa)	●								0.572
ACICU_00625	Serine phosphatase RsbU, regulator of sigma subunit (322 aa)	●								0.562
gatB	aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B (489 aa)	●								0.561
trmD	tRNA-(guanine-N1)-methyltransferase; Specifically methylates guanosine-37 in various tRNAs (By [...] (246 aa)	●								0.547
ACICU_00630	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase (418 aa)	●								0.528

شکل ۱ نتایج مربوط به پایگاه داده STRING، (الف ۱ و ۲) ارتباطات بین ژن مربوط به پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی و ژن‌های اطراف آن در ژنوم اسینتوباکتر بومـانی، (ب ۱ و ۲) ارتباطات بین ژن مربوط به پروتئین پپتیداز و ژن‌های اطراف آن در ژنوم اسینتوباکتر بومانی، (ج ۱ و ۲) ارتباطات بین ژن مربوط بـه لیپـوپروتئین سـطحی و ژن‌های اطراف آن در ژنوم اسینتوباکتر بومانی

الف



ب



شکل۲ نتایج مربوط به دومین‌های حفاظت شده (Conserved Domains)؛ (الف) دومین متعلق به خانواده VacJ در لیپوپروتئین سطحی، (ب) دومین متعلق به خانواده ZnMc در پپتیداز

همچنین جستجوی به‌دست آمده از اورتولوگ‌ها نشان داد که هیچ توالی مشابهی برای پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی یافت نشد در حالی که پپتیداز و لیپوپروتئین سطحی اورتولوگ‌هایی را در ارگانیسم‌های دیگر دارند.

جدول ۳ تعیین احتمال آنتی‌ژنی پروتئین‌های به وسیله VaxiJen

نام پروتئین	Vaxijen	ANTIGENpro
پپتیداز	۰/٤٧	۰/٨٤١
پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی	۰/٧١	۰/٩٥٢
لیپوپروتئین سطحی	۰/٥٥	۰/٦٩٢

تجزیه و تحلیل‌های ایمونوانفورماتیک

عوامل آنتی‌ژنیک پروتئین‌های در حال بررسی

بیشترین امتیاز احتمال آنتی‌ژنی مربوط به پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی با شماره دستیابی ZP_05827218.1 است. جدول ۳ نتایج مربوط به VaxiJen و ANTIGENpro را نشان می‌دهد.

بررسی خصوصیات تعیین کننده در اپی‌توپ‌ها

خصوصیات مختلفی که در پیش‌بینی موقعیت اپی‌توپ‌های سلول B نقش دارد از جمله مقایسه پیچ‌های بتا، مقایسه انعطاف‌پذیری، بررسی آب‌دوستی و ... تعیین شد که به شرح زیر است.

مقایسهٔ پیچش‌های بتا

جزئیات مقایسهٔ پیچش‌های بتا در ۳ پروتئین مورد نظر در جدول ٤ آمده است. با توجه به مقایسهٔ میانگین محتوای پیچش بتای این ۳ پروتئین، کمترین میانگین مربوط به پروتئین پپتیداز و بیشترین میانگین مربوط به پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی است.

جدول ٤ مقایسه پیچش‌های بتا در ۳ پروتئین مورد بحث

نام پروتئین	میانگین	مقدار بیشینه	مقدار کمینه
پپتیداز	۰/٩٦٩	۱/٣٥٠	۰/٦٦٤
پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی	۰/۰٣٦	۱/٣٦٦	۰/٥٩٣
لیپوپروتئین سطحی	۱/۰۰٥	۱/٣١٩	۰/٧٢٩

مقایسه انعطاف‌پذیری

در جدول ٥ انعطاف‌پذیری ۳ پروتئین مقایسه شده است. مقایسهٔ میانگین انعطاف‌پذیری این پروتئین‌ها نشان می‌دهد که کمترین میانگین مربوط به لیپوپروتئین سطحی و بیشترین میانگین متعلق به پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی است.

جدول ۵ مقایسه انعطاف‌پذیری در ۳ پروتئین مورد بحث

نام پروتئین	میانگین	مقدار بیشینه	مقدار کمینه
پپتیداز	۱/۰۰۹	۱/۱۲۷	۰/۹۰۶
پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی	۱/۰۱۰	۱/۱۲۷	۰/۸۷۵
لیپوپروتئین سطحی	۱/۰۰۶	۱/۰۹۷	۰/۹۰۹

بررسی آب‌دوستی

مقایسه میانگین آب‌دوستی این پروتئین‌ها در جدول ٦ نشان می‌دهد که کمترین میانگین مربوط به پپتیداز و بیشترین میانگین متعلق به پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی است.

جدول ٦ مقایسه آب‌دوستی ۳ پروتئین مورد نظر

نام پروتئین	میانگین	مقدار بیشینه	مقدار کمینه
پپتیداز	۱/٤٥۳	٦/٥۸٦	-٤/۷۰۰
پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی	۱/۸۸۳	٦/۷٥۷	-٤/۹٤۳
لیپوپروتئین سطحی	۱/۸۸۲	۸/۸۷۱	-٦/۸۷۱

بررسی نواحی مختلف ۳ پروتئین مورد بحث از نظر در دسترس بودن سطحی

جدول ۷ نشان دهندهٔ قسمت‌های در دسترس سطحی ۳ پروتئین است. با مقایسهٔ میانگین این شاخص در ۳ پروتئین مورد نظر، هیچ یک از پروتئین‌ها در این مورد نسبت به دیگری ارجحیتی ندارد.

جدول ۷ مقایسه عامل بروز در سطح در ۳ پروتئین

نام پروتئین	میانگین	مقدار بیشینه	مقدار کمینه
پپتیداز	۱/۰۰۰	٤/۹۷٥	۰/۱۳۲
پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی	۱/۰۰۰	٤/۷٦۲	۰/۰٥٦
لیپوپروتئین سطحی	۱/۰۰۰	٤/۸۱۹	۰/۰۸۲

توپولوژی پروتئین‌ها

نتایج حاصل از پیش‌بینی توپولوژی سه پروتئین مربوطه با نرم‌افزارهای مختلف در جدول ۸ نشان داده شده است. مطابق با داده‌های حاصل از نرم‌افزارهای توپولوژی، پروتئین شماره ۱ توسط ۲ نرم‌افزار، پروتئین ۲ توسط ۱ نرم‌افزار و پروتئین ۳ توسط ۳ نرم‌افزار به عنوان یک پروتئین عرض غشایی شناخته شده‌است.

جدول ۸ پیش‌بینی توپولوژی پروتئین‌ها

نام پروتئین	TOPCONS	MemBrain	DAS	HMMTOP	SOSUI	MemType	TMHMM
پپتیداز	ناحیهٔ عرض غشایی یافت نشد	ندارد	ندارد	۱ ناحیه: (۹-۳۲)	پروتئین محلول	غشای محیطی	ندارد
پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی	ناحیهٔ عرض غشایی یافت نشد	ندارد	۲ ناحیه: (۷-۱٦) (۹-۱٤)	ندارد	پروتئین محلول	پروتئین غیر غشایی	ندارد
لیپوپروتئین سطحی	ناحیهٔ عرض غشایی یافت نشد	۱ ناحیهٔ عرض غشایی (۱٤۹-۱٦۲)	۲ ناحیه: (۷-۱۷) (۹-۱٥)	ندارد	پروتئین محلول	عرض غشایی چندگانه	ندارد

بحث

با این‌که اسینتوباکتر بومانی به عنوان یک بیماری‌زای بیمارستانی طبقه‌بندی شده و به انواع زیادی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است، حضور این میکروارگانیسم هنوز با استفاده از روش‌های کشت مرسوم تعیین می‌شود و با کمک آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی می‌شود [۲۰]. این روش‌های مرسوم زمان زیادی را می‌طلبد و حتی ممکن است بین ۲-۵ روز برای جواب وقت نیاز باشد [۲۰]. استفاده از آنتی‌ژن‌های اختصاصی

به عنوان یک روش تشخیص مزیت‌های بسیاری نسبت به روش‌های مرسوم که به طور رایج برای تشخیص عفونت بیمارستانی ایجاد شده به وسیله اسینتوباکتر بومانی به‌کار می‌رود، دارد.

یک پروتئین غشای خارجی آنتی‌ژنیک ۳٤/٤ کیلودالتون اختصاصی در اسینتوباکتر بومانی معرفی شده که به طور منحصربه‌فردی به وسیله آنتی‌بادی‌های IgA، IgM، IgG بیماران مبتلا به عفونت‌های ناشی از این باکتری تشخیص داده می‌شود و نکته اینجاست که این پروتئین با سرم افرادی که به انواع دیگری از عفونت‌ها مبتلا هستند واکنش تقاطعی ندارد [۲۰].

از این نشانگر زیستی می‌توان برای ساخت یک آزمون جدید EIA (Immuno Assay Enzyme) یا یک آزمون ایمونوکروماتوگرافی (Immunochromatography Test: ICT) یا یک آزمون PCR (Polymerase Chain Reaction Test) که می‌توانند برای تشخیص سریع عفونت ناشی از اسینتوباکتر بومانی بسیار مفید باشند، استفاده کرد [۲۰].

ابزارهای بیوانفورماتیکی در تجزیه و تحلیل‌های ساختاری و عملکردی پروتئین‌ها [۲۱، ۲٤، ۳۰]، طراحی واکسن [۲۳]، شناسایی اپی‌توپ‌های اختصاصی [۲۲، ۲۳] و غیره کاربرد دارد. اخیراً آقای رهبر و همکارانش [۲٤] پروتئین Bap از این باکتری را به وسیله روش‌های بیوانفورماتیکی تجزیه و تحلیل کردند و داده‌های به‌دست آمده از بررسی‌های ایشان توسط آقای فتاحیان و همکارانش [۳۱] آزمایش شد و با به‌دست آمدن نتایج عملی مشابه با پیش‌بینی‌های ایشان، نتایج نرم افزارهای بیوانفورماتیکی اعتبار بخشی شده است. در این پژوهش با توجه به اهمیت پروتئین ایمنی‌زا اختصاصی اشاره شده توسط اسلام و همکارانش [۲۰] تلاش شد تا توالی آن با به‌کارگیری ابزارهای بیوانفورماتیکی کشف شود. پروتئوم اسینتوباکتر بومانی (ATCC19606) دارای ۳٦۰۷ پروتئین است که از سایت NCBI به‌دست آمده است. تعداد زیادی از پروتئین‌های این باکتری به منظور پیدا کردن پروتئین ناشناخته‌ای که در مقاله اسلام [۲۰] به آن اشاره شده بود، بررسی شد.

تنها داده در دسترس از این پروتئین غشای خارجی ایمنی‌زا، وزن مولکولی ۳٤/٤ کیلودالتونی آن است. بنابراین غربالگری اولیه در بررسی حاضر بر اساس وزن مولکولی صورت گرفته است. از آن‌جایی که وزن مولکولی تخمین زده شده با نرم‌افزارها متفاوت از وزنی است که در آزمایشگاه به کمک SDS-PAGE به‌دست می‌آید [۳۱، ۳۲]، یک محدوده‌ای از وزن مولکولی بین ۳۳-۳٦ کیلودالتون برای این هدف انتخاب شد.

ویژگی دیگر این پروتئین بر اساس یافته‌های اسلام و همکارانش [۲۰] موقعیت پروتئین در بخش غشای خارجی است. تجزیه و تحلیل اولیه مربوط به موقعیت پروتئین‌ها با استفاده از نرم‌افزار قوی psortb انجام شد. تعداد زیادی از محققان نیز از این نرم‌افزار برای پیش‌بینی موقعیت بسیاری از پروتئین‌ها استفاده کردند [۳۳-۳۵]. طی بررسی انجام شده روی ۲۰۱ پروتئین به‌دست آمده از مرحله قبل، برخی از پروتئین‌ها به عنوان پروتئین ناشناخته شناخته شده‌است. پروتئین‌های پیش‌بینی شده به عنوان ناشناخته ممکن است مطابق با پیش‌بینی نرم‌افزار فوق، بیشتر از یک موقعیت در سلول باکتری داشته باشد. بنابراین نرم‌افزارهای دیگری به نام‌های CELLO و PSLpred برای تأیید نتایج نرم‌افزار قبلی استفاده شد. همچنین برای تأیید نتایج حاصل از psortb، CELLO و PSLpred از پروتئین‌های غشای خارجی شناخته شدهٔ اسینتوباکتر بومانی و سالمونلا تیفی استفاده شد که هر دو نرم‌افزار وجود این دو پروتئین را در موقعیت غشای خارجی تأیید کردند.

در بین ۳ پروتئین معرفی شده به عنوان پروتئین‌های غشای خارجی، لیپوپروتئین سطحی با شماره دستیابی ZP_05828247.1 توسط نرم‌افزار CELLO در رتبه دوم به عنوان یک پروتئین پری‌پلاسمیک معرفی شده بود، بنابراین ۲ پروتئین دیگر با شماره دستیابی ZP_05830277.1 و ZP_05827218.1 از نظر جایگاه به عنوان نامزدهای اول انتخاب شدند و پروتئین ZP_05828247.1 به عنوان نامزد دوم انتخاب شد. هیچ‌یک از پروتئین‌های ذکر شده توسط نرم‌افزار PSLpred به عنوان پروتئین غشای خارجی شناخته نشد.

همچنین بر اساس داده‌های حاصل از پایگاه داده

STRING هیچ مقاله در دسترسی در Pubmed برای این پروتئین‌ها یافت نشد که این موضوع جدید بودن مطالعه پیش رو را توجیه می‌کند.

اسلام و همکارانش [۲۰] بر اساس جداسازی پروتئین‌ها به وسیلهٔ SDS-PAGE تک بعدی یک پروتئین اختصاصی را معرفی کردند. از آن‌جایی که جداسازی پروتئین‌ها به وسیله SDS-PAGE تک بعدی تنها بر اساس وزن مولکولی پروتئین‌ها است، یک تک باند در SDS-PAGE در یک زمان می‌تواند حاوی بیشتر از یک پروتئین باشد. ولی باید دقت کرد که خواه در باند نشان داده شده توسط اسلام یک پروتئین وجود داشته باشد یا چند پروتئین، هیچ‌کدام نباید با دیگر پروتئین‌های غشای خارجی باکتری واکنش تقاطعی داشته باشند، زیرا در مقاله اشاره شده بیان شده است که این پروتئین با سایر پروتئین‌های غشای خارجی باکتری اسینتوباکتر بومانی و برخی دیگر از باکتری‌ها از جمله اشریشیا کلی (*Escherichis coli*)، سودوموناس آئروجینوزا و کلبسیلا پنومونیه (*K. pneumoniae*) واکنش تقاطعی ندارد که این امر مناسب بودن این پروتئین را برای استفاده از آن در تشخیص این باکتری نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از BLAST زمینه را برای بررسی اختصاصی بودن پروتئین‌های انتخاب شده بر اساس شباهت توالی آن‌ها، فراهم کرد. بررسی شباهت در توالی محققان حاضر را به سمت شباهت در اپی‌توپ‌ها و در نتیجه واکنش تقاطعی در میانکنش آنتی‌ژن- آنتی‌بادی پیش می‌برد [۳۶]. بر اساس نتایج تنها یکی از این سه پروتئین با شماره دستیابی ZP_05827218.1، اختصاصی اسینتوباکتر بومانی بود.

علاوه بر این، هیچ دومین حفاظت شده‌ای در توالی این پروتئین یافت نشد. در نقطه مقابل، در دو پروتئین دیگر انتخاب شده، دومین‌های حفاظت شده متعلق به خانواده‌های بزرگی پیدا شد که می‌تواند اختصاصیت آن‌ها را برای اسینتوباکتر بومانی زیر سؤال ببرد. علاوه بر اختصاصی بودن پروتئین مذکور، نتایج BLAST نشان دهندهٔ این است که این توالی در بین سویه‌های مختلف اسینتوباکتر بومانی حفاظت شده است.

همچنین بر طبق گزارش به‌دست آمده از اسلام [۲۰] پروتئین مورد نظر بسیار ایمنی‌زا است که این امر می‌تواند دلیلی برای بررسی احتمال آنتی‌ژنی پروتئین‌ها به منظور تعیین آنتی‌ژن‌ترین پروتئین باشد. بیشترین احتمال آنتی‌ژن بودن تعیین شده توسط هر دو نرم‌افزار، مربوط به اختصاصی‌ترین پروتئین یا همان پروتئین با شماره دستیابی ZP_05827218.1 است. همچنین ویژگی‌هایی که در تعیین اپی‌توپ‌های سلول B نقش دارد بیشترین میانگین را در مورد پروتئین مورد نظر نشان داد که این امر نیز خود تأیید دیگری بر احتمال آنتی‌ژن قوی بودن این پروتئین است.

داده‌های به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل‌های SDS-PAGE توسط اسلام و همکارانش [۲۰] نه تنها حضور پروتئین مربوط را در بین پروتئین‌های غشای خارجی نشان داد، بلکه وجود پروتئین را در میان پروتئین‌های سطحی نیز تأیید کرد. از طرفی وجود ناحیه درون غشایی (Transmembrane Region) در همه پروتئین‌های غشای خارجی رایج نبود و برخی از پروتئین‌های مربوط به این بخش سطحی (Peripheral) است [۳۷]. از این مشاهدات می‌توان استنباط کرد که پروتئین مورد بحث می‌تواند ناحیه درون غشایی نداشته باشد.

در میان نرم‌افزارهای استفاده شده برای پیش‌بینی توپولوژی، تنها یکی از آن‌ها وجود ناحیه درون غشایی را در پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی با شماره دستیابی ZP_05827218.1 پیش‌بینی کرد. برای پروتئین پپتیداز با شماره دستیابی ZP_05830277.1 دو نرم‌افزار ناحیه درون غشایی را شناسایی کردند، در حالی که سه نرم‌افزار این بخش را درون لیپوپروتئین سطحی با شماره دستیابی ZP_05828247.1 پیش‌بینی کردند. بنابراین از این نظر نیز پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی برای انتخاب در رتبهٔ نخست قرار می‌گیرد.

روی هم رفته، پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی بهترین نامزد برای پروتئین معرفی شده به وسیلهٔ اسلام و همکارانش است. بر اساس تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی، این پروتئین یک پروتئین غشای خارجی با بیشترین احتمال آنتی‌ژنی و کاملاً

اختصاصی اسینتوباکتر بومانی است. این پروتئین هیچ واکنش تقاطعی با سایر پروتئین‌های غشای خارجی نداشته و به عنوان یک پروتئین سطحی طبقه‌بندی شده است.

رسیدن به یک تک پروتئین در میان تعدادی از پروتئین‌های ناشناخته و فرضی با استفاده از بیوانفورماتیک، راه را برای تشخیص سریع و دقیق اسینتوباکتر بومانی فراهم کرده و حتی می‌توان از این طریق به یک پروتئین محافظتی علیه این باکتری کشنده رسید. این یافته‌ها می‌تواند به صورت موفقیت‌آمیزی محققان را در فهم ساختار و دیگر ویژگی‌های عملکردی آن پیش ببرد. پروتئین رونمایی شده در این مطالعه، بسیار کوچک‌تر از Bap و (به دلیل نداشتن همولوگ در دیگر بیماری‌زاها) اختصاصی‌تر از آن نیز هست. همچنین از آن‌جایی که باکتری مورد نظر یک باکتری خارج سلولی است، تولید میزان مناسبی از آنتی‌بادی علیه هریک از پروتئین‌های سطحی آن در بدن میزبان می‌تواند حفاظت‌بخش باشد.

پس به عنوان نتیجه می‌توان گفت بهترین توالی که آنتی‌ژن اختصاصی اسینتوباکتر بومانی است پروتئین حفاظت شدهٔ فرضی با شماره دستیابی ZP_05827218.1 است. یافته‌های این پژوهش مقدمه‌ای بر تأثیر ایمنی‌زایی این گونه پروتئین‌ها به منظور پیشگیری از ابتلا و نیز کمک به بیمارانی که از عفونت‌های ناشی از اسینتوباکتر بومانی رنج می‌برند، خواهد بود.

تشکر و قدردانی

کلیه امکانات و حمایت‌های مالی این پروژه توسط دانشگاه شاهد تأمین شده است.

منابع

[1] Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(10): 3471-84.

[2] Huang HI, Shih HY, Lee CM, Yang TC, Lay JJ, Lin YE. In vitro efficacy of copper and silver ions in eradicating *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*: implications for on-site disinfection for hospital infection control. Water Res 2008; 42(1-2): 73-80.

[3] Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol 2007; 5(12): 939-51.

[4] Scott P, Deye G, Srinivasan A, Murray C, Moran K, Hulten E, Fishbain J, Craft D, Riddell S, Lindler L, Mancuso J, Milstrey E, Bautista CT, Patel J, Ewell A, Hamilton T, Gaddy C, Tenney M, Christopher G, Petersen K, Endy T, Petruccelli B. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. Clin Infect Dis 2007; 44(12): 1577-84.

[5] Davis KA, Moran KA, McAllister CK, Gray PJ. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. Emerg Infect Dis 2005; 11(8): 1218-24.

[6] Yavankar SP, Pardesi KR, Chopade BA. Species distribution and physiological characterization of *Acinetobacter* genospecies from healthy human skin of tribal population in India. Indian J Med Microbiol 2007; 25(4): 336-45.

[7] Jeong SH, Bae IK, Park KO, An YJ, Sohn SG,

Jang SJ, Sung KH, Yang KS, Lee K, Young D, Lee SH. Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carba-penemases in Korea. J Microbiol 2006; 44(4): 423-31.

[8] Falagas ME, Bliziotis IA, Siempos II. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. Crit Care 2006; 10(2): R48.

[9] Hanberger H, Garcia-Rodriguez JA, Gobernado M, Goossens H, Nilsson LE, Struelens MJ. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. French and Portuguese ICU Study Groups. JAMA 1999; 281(1): 67-71.

[10] Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis 2004; 39(3): 309-17.

[11] Ghrbanalizadegan M. The Prevalence of Multi-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in Patients Addmited in Baqiyatallah Hospital in 2005. J Ilam University of Medical Sciences 2007; 15(1): 14-18

[12] Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. Int J Antimicrob Agents 2010; 35(3): 219-26.

[13] Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann 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(Pt 12): 3473-84.

[14] Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Kim J. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. Clin Microbiol Infect 2008; 14(1): 49-54.

[15] Cevahir N, Demir M, Kaleli I, Gurbuz M, Tikvesli S. Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose-resistant hemagglutination in *Acinetobacter baumannii* strains. J Microbiol Immunol Infect 2008; 41(6): 513-8.

[16] Vidal R, Dominguez M, Urrutia H, Bello H, Gonzalez G, Garcia A, Zemelman R. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. Microbios 1996; 86(346): 49-58.

[17] Rathinavelu S, Zavros Y, Merchant JL. *Acinetobacter lwoffii* infection and gastritis. Microbes Infect 2003; 5(7): 651-7.

[18] Talbot GH. What is in the pipeline for Gram-negative pathogens? Expert Rev Anti Infect Ther 2008; 6(1): 39-49.

[19] Levin AS. Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. Clin Microbiol Infect 2002; 8(3): 144-53.

[20] Islam AH, Singh KK, Ismail A. Demonstration of an outer membrane protein that is antigenically specific for *Acinetobacter baumannii*. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 69(1): 38-44.

[21] Rahbar MR, Rasooli I, Gargari SL, Sandstrom G, Amani J, Fattahian Y, Jahangiri A, Jalali M. A potential in silico antibody-antigen based diagnostic test for precise identification of *Acinetobacter baumannii*. J Theor Biol 2012; 294: 29-39.

[22] Jahangiri A, Rasooli I, Reza Rahbar M, Khalili S, Amani J, Ahmadi Zanoos K. Precise detection of *L. monocytogenes* hitting its highly conserved region possessing several specific antibody binding sites. J Theor Biol 2012; 305: 15-23.

[23] Jahangiri A, Rasooli I, Gargari SL, Owlia P, Rahbar MR, Amani J, Khalili S. An in silico DNA vaccine against *Listeria monocytogenes*. Vaccine 2011; 29(40): 6948-58.

[24] Rahbar MR, Rasooli I, Mousavi Gargari SL, Amani J, Fattahian Y. In silico analysis of antibody triggering biofilm associated protein in *Acinetobacter baumannii*. J Theor Biol 2010; 266(2): 275-90.

[25] Sefid F, Rasooli I, Jahangiri A. In silico determination and validation of baumannii acinetobactin utilization a structure and ligand binding site. BioMed Res Int 2013; 2013, Article ID 172784, 14 pages, Available at: http://dx.doi.org/10.1155/2013/172784

[26] Sugawara E, Nikaido H. OmpA is the principal nonspecific slow porin of *Acinetobacter baumannii*. J Bacteriol 2012; 194(15): 4089-96.

[27] Toobak H, Rasooli I, Talei D, Jahangiri A, Owlia P, Darvish Alipour Astaneh S. Immune response variations to Salmonella enterica serovar *Typhi* recombinant porin proteins in mice. Biologicals 2013; 41(4): 224-30.

[28] Toobak H, Rasooli I, Mousavi Gargari SL, Jahangiri A, Jalali Nadoushan MR, Owlia P, Darvish Alipour Astaneh S. Characterization of the *Salmonella typhi* outer membrane protein C. Korean J Microbiol Biotechnol 2013; 41(1): 128-34.

[29] Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. BMC Bioinformatics 2007; 8: 4.

[30] Novotny J, Rigoutsos I, Coleman D, Shenk T. In silico structural and functional analysis of the human cytomegalovirus (HHV5) genome. J Mol Biol 2001; 310(5): 1151-66.

[31] Fattahian Y, Rasooli I, Mousavi Gargari SL, Rahbar MR, Darvish Alipour Astaneh S, Amani J. Protection against *Acinetobacter baumannii* infection via its functional deprivation of biofilm associated protein (Bap). Microb Pathog 2011; 51(6): 402-6.

[32] Soares NC, Cabral MP, Parreira JR, Gayoso C, Barba MJ, Bou G. 2-DE analysis indicates that *Acinetobacter baumannii* displays a robust and versatile metabolism. Proteome Sci 2009; 7: 37.

[33] Al-Hasani K, Boyce J, McCarl VP, Bottomley S, Wilkie I, Adler B. Identification of novel immunogens in *Pasteurella multocida*. Microbial Cell Factories 2007; 6: 3.

[34] Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. Nat Protoc 2007; 2(4): 953-71.

[35] Lin XM, Li H, Wang C, Peng XX. Proteomic analysis of nalidixic acid resistance in *Escherichia coli*: identification and functional characterization of OM proteins. J Proteome Res 2008; 7(6): 2399-405.

[36] Van Regenmortel MH. What is a B-cell epitope? Methods Mol Biol 2009; 524: 3-20.
[37] Dashper SG, Hendtlass A, Slakeski N, Jackson C, Cross KJ, Brownfield L, Hamilton R, Barr I, Reynolds EC. Characterization of a novel outer membrane hemin-binding protein of *Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol 2000; 182(22): 6456-62.