همتم بدرقه ی راه کن ای طایر قدس که دراز است ره مقصد و من نوسفرم

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته زیست‌شناسی– میکروبیولوژی

عنوان:

مطالعه بیوانفورماتیکی ویژگی های ایمونوژنیک پروتئین سطحی جاذب آهن در اسینتوباکتر بومانی

استاد راهنما:

پروفسور ایرج رسولی

استاد مشاور:

دکتر ایثار نصیری

دانشجو:

فاطمه سفید

آبان ۱۳۹۱

خدای را بسی شاکرم که از روی کرم، اساتیدی فداکار نصیبم ساخته تا در سایه درخت پربار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و از لطف حضورشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم.

اساتیدی که وجودشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بالیدنم...

به مصداق "من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق" بسی شایسته است از اساتید فرهیخته و فرزانه،

جناب آقای پروفسور ایرج رسولی و دکتر ایثار نصیری

که با کرامتی چون خورشید سرزمین دل را روشنی بخشیدند و سرای علم و دانش را با راهنمایی های کارساز و سازنده بارور ساختند تقدیر و تشکر نمایم.

پدر و مادر عزیزم:

ذره ذره آب شدن را برگزیدید تا بالیدن امروزم را به نظاره بنشینید

اولین دستر نجم را تقدیم قدومتان میکنم.

شاید که نشانی باشد از سپاس...

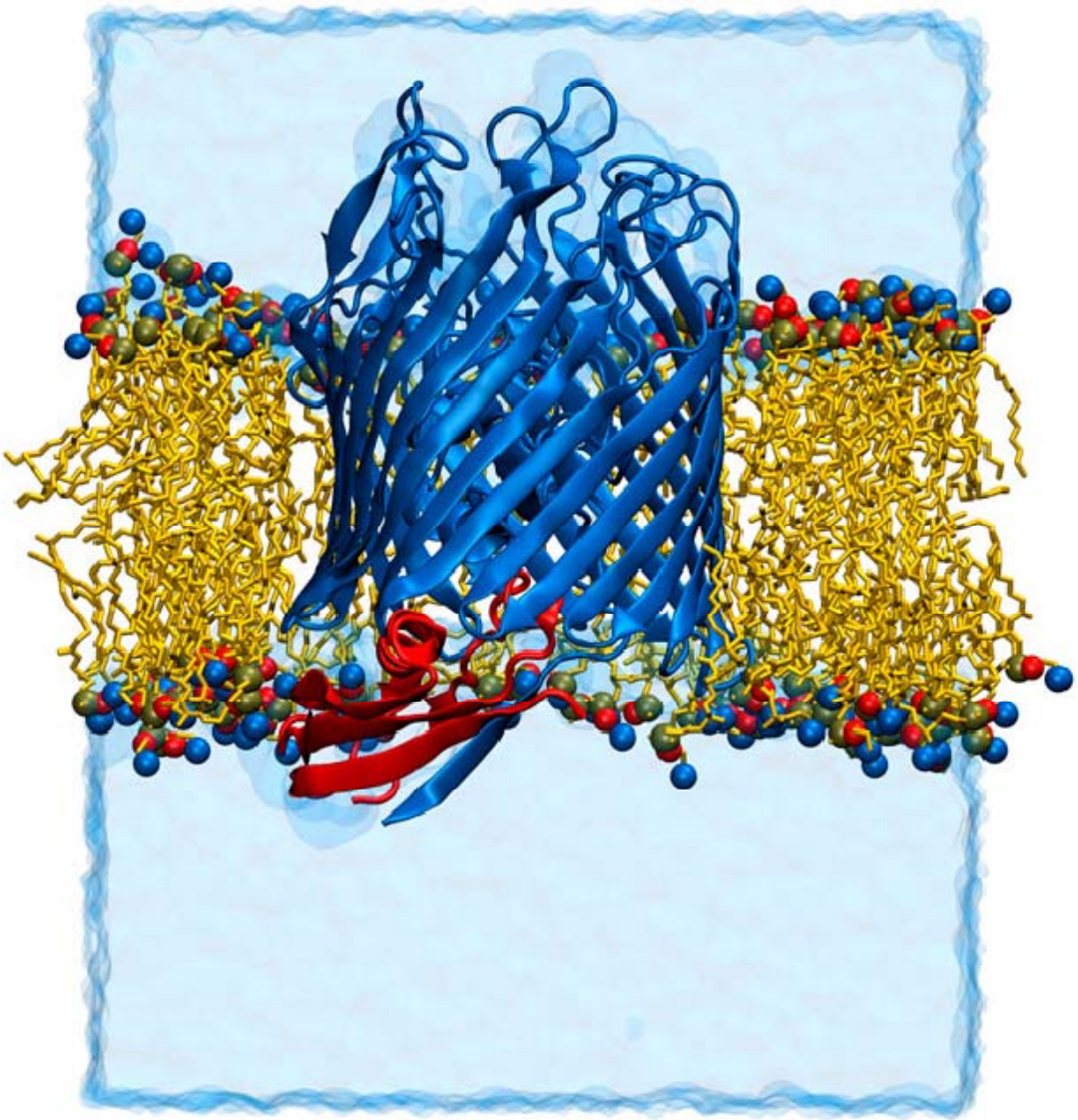
حمد و سپاس:

حمد و سپاس خدای را، آن نخستین بی‌پیشین را و آن آخرین بی‌پسین را، خداوندی را که دیده بینایان از دیدارش قاصر آید و اندیشه واصفان از نعت او فرومانده. آفریدگان را به قدرت خود ابداع کرد و به مقتضای مشیت خویش جامه هستی پوشید و به همان راه که ارادت او بود روان داشت و رهسپار طریق محبت خویش گردانید. چون ایشان را به پیش راند، کس را یارای واپس گرایيدن نبود، و چون واپس دارد، کس را یارای پیش تاختن نباشد. هر زنده جانی را از رزق مقسوم خویش توشه‌ای معلوم نهاد؛ آن‌سان که کس نتواند از آن که افزونش داده، اندکی بکاهد و بر آن که اندکش عنایت کرده، چیزی بیفزاید. منزه و پاک است نام‌های او و ناگسستنی است نعمت‌های او. کس را نرسد که او را در برابر اعمالش باز خواست کند و اوست که همگان را به باز خواست کشد. حمد و سپاس خداوندی را که خود را به ما شناسانید و شیوه سپاسگزاری اش را به ما الهام کرد و ابواب علم ربوبیت خویش را به روی ما بگشاد و ما را به اخلاص در توحید او راه نمود و از الحاد و تردید در امروی به دور داشت.

حمد و سپاس خداوندی را که بر ما منت نهاد و پیامبر خود محمد صلی الله علیه و آله را به رسالت بر ما فرستاد. این همه برآمده از قدرت اوست که ناتوان نبود در هر کار هر چند ستر ک بود و فرو نگذارد هیچ کاری را هر چند خرد بود. بار خدایا، بر محمد که امین وحی توست، برگزیده از میان آفریدگان توست، دوست مخلص از میان همه بندگان توست، آن امام رحمت و پیشوای خیر و کلید برکات، درود بفرست، آن‌سان که او جان خویش در فرمان تو نهاد و جسم خویش به راه تو هدف تیر بلا گردانید و در دعوت به دین تو با خویشاوندان خود آشکارا خصومت ورزید و برای خشنودی تو با خاندان خویش به پیکار برخاست و تا دین تو را زنده دارد، پیوند از خویش ببرید.

(برگرفته از صحیفه سجادیه با اندکی دخل و تصرف)

مطالعه بیوانفورماتیکی ویژگی های ایمونوژنیک پروتئین سطحی جاذب آهن در اسینتوباکتر بومانی



چکیده:

اسینتوباکتر بومانی یک باکتری گرم منفی غیرمتحرک است که سبب عفونت های شدید در افراد مستعد می گردد. به علاوه ایزوله های کلینیکی اسینتوباکتر بومانی افزایش مقاومت قابل توجهی را نسبت به درمان های آنتی بیوتیکی موجود نشان می دهند که درمان عفونت های این باکتری را با مشکل رو به رو ساخته است. به عنوان یک مکانیسم دفاعی دسترسی آهن برای باکتری ها در میزبان محدود شده است. اولین مرحله در جذب اختصاصی آهن از طریق سیدروفور در باکتری های گرم منفی، شناسایی و اتصال کمپلکس فریک- سیدروفور به گیرنده های غشای خارجی می باشد. این دسته از پروتئین ها در شرایط فقر آهن بیان می گردند. نقش پروتئین های غشای خارجی جاذب آهن در باکتری های دیگر از جمله سودوموناس آئروژینوزا، اشیرشیاکلی و نایسریا گنوره نیز گزارش شده است. آنتی بادی های تولید شده بر علیه این دسته از پروتین ها با بلوکه کردن مسیر جذب آهن خاصیت باکتریوساید و یا باکتریواستاتیک اعمال می کنند. چندین پروتئین انتقال دهنده وابسته به TonB کریستالوگرافی و ساختار محافظت شده آن ها معرفی شده است. ما با استفاده از این ساختار ها به عنوان الگو توانستیم ساختار پروتئین BauA را پیش گویی نماییم. ساختار سه بعدی این پروتئین در بردارنده یک بشکه بتای ۲۲ رشته ای بین غشایی که منفذی را در غشای خارجی تشکیل می هد و یک دمین کرک در انتهای آمینی که بشکه بتا را مسدود نموده است. رشته های آنتی پارالل تشکیل دهنده بشکه بتا از طریق لوپ های خارج سلولی بلند و نیز پیچ های پریپلاسمی کوتاه به یکدیگر متصل شده اند. ما تلاش های خود برای تولید واکسن موثر را روی نواحی سطحی از BauA که احتمالا در اتصال به لیگاند دخیل بوه و در معرض فاکتور های ایمنی میباشد، متمرکز نموده ایم. این مناطق با ترکیبی از آنالیز های کامپیوتری شناسایی شدند. در مدل توپولوژی پیش گویی شده لوپ خارجی شماره پنج به عنوان طویل ترین لوپ معرفی گردید چنانکه زنجیره جانبی تمام اسید آمینه های آن در معرض محیط خارج سلول بوده و بیانگر اهمیت این لوپ در وقایع اولیه اتصال کمپلکس آهن-سیدروفور به گیرنده می باشد. این منطقه در بردارنده اپی توپ سلول های B بوده که برای آنتی بادی های تولید شده بر علیه پروتئین جذاب می باشد. ما به منظور شناخت بهتر ماهیت پروتئین BauA و نیز انتخاب نواحی آنتی ژنیک مناسب به عنوان یک واکسن موثر از ابزار های بیوانفورماتیک بهره گرفتیم. با توجه به نتایج نرم افزار های موجود پیشنهاد میکنیم، ناحیه ای از دمین بشکه بتا که در بردارنده لوپ های خارج سلولی مهم باشد میتواند خصوصیات ایمونوژنیک پروتئین را تقلید نماید. علاوه بر این، از آن جاییکه نرم افزار های پیشگویی جایگاه اتصال لیگاند دمین کرک را به عنوان محل اتصال لیگاند معرفی نمودند، احتمالا این دمین میتواند به عنوان نماینده ای از کل پروتئین در واکنش های ایمنی زایی به کار گرفته شود. طراحی، انتخاب و تولید واکسن های زیرواحدی نوترکیب، پایه و اساس واکسینولوژی جدید، ممکن است یک گزینه بجا و مطبوع در مواجهه با مشکل رو به رشد عفونت اسینتوباکتر بومانی باشد.

واژه های کلیدی: اسینتوباکتربومانی، پروتئین غشای خارجی، BauA، بیوانفورماتیک

فهرست:

فصل اول

مقدمه ۱
۱-۱ معرفی جنس اسینتوباکتر ۲
۱-۲ اسینتوباکتر بومانی ۳
۱-۳ عفونتهای بیمارستانی ۳
۱-۴ مقاومت به آنتیبیوتیکها ۴
۱-۵ سازوکارهای بیماریزایی اسینتوباکتربومانی ۴
۱-۶ ارتباط بین پروتئین های غشایی با یکدیگر ۵
۱-۷ اهمیت آهن ۶
۱-۸ میکروارگانیسم های بی نیاز از آهن ۷
۱-۹ آهن و اسینتو باکتر بومانی ۸
۱-۱۰ رشد اسینتوباکتربومانی در غلظت های متفاوت آهن ۱۰
۱-۱۱ تغییرات رونویسی ژن های اسینتوباکتر بومانی مشاهده شده در فقر اهن ۱۰
۱-۱۲ تاثیر موتاسیون ژن های دخیل در جذب آهن A. baumannii بر روی رشد باکتری ۱۱
۱-۱۳ تشابه سیستم جاذب آهن در اسینتوباکتر بومانی و ویبریوآنگوئیلاروم ۱۲
۱-۱۴ ژن های درگیر در انتقال سیدروفور ۱۴
۱-۱۵ میزان جذب کمپلکس آهن- اسینتوباکتین توسط پروتئین های غشای خارجی ۱۵
۱-۱۶ سیدروفورها ۱۷
۱-۱۷ مراحل عمومی در مسیر بیوسنتز سیدروفور ۱۸
۱-۱۸ ترشح سیدروفور ۱۹
۱-۱۹ گیرندههای کمپلکس فریک– سیدروفور ۲۰
۱-۲۰ بخش حاوی بشکهی بتا (β-Burrel) در ساختار پروتئین های گیرنده سیدروفور ۲۱
۱-۲۱ دمین کُرک (plug domain) ۲۳
۱-۲۲ انتقال کمپلکس فریک-سیدروفور از گیرندههای غشاءخارجی ۲۴
۱-۲۳ پروتئین های پری پلاسمی متصل شونده به سیدروفور ۲۵
۱-۲۴ عبور کمپلکس فریک سیدروفور از غشای سیتوپلاسمی با واسطه ABC transporters ۲۶
۱-۲۵ مدلهای انتقال انرژی وابسته به کمپلکس TonB ۲۸
۱-۲۵-۱ مدل پروانهای ۲۸
۱-۲۵-۲ مدل رفت و برگشتی ۲۸
۱-۲۶ چگونگی ارتباط پروتئین های غشای خارجی با کمپلکس TonB ۲۹

۱-۲۷ سرنوشت کمپلکس و تغییرات به وجود آمده در پروتئین پس از اتصال لیگاند ۳۲
۱-۲۸ اکتساب آهن بهوسیلهی باکتریهای پاتوژن ۳۴
۱-۲۹ ترانسفرین و لاکتوفرین ۳۵
۱-۳۰ هم به عنوان یک منبع آهن ۳۶
۱-۳۱ جذب هِم توسط باکتریهای پاتوژن ۳۷
۱-۳۲ هم ترازی پروتئین های غشای خارجی دخیل در جذب آهن ۳۸
۱-۳۳ درخت فیلوژنیک پروتئین های وابسته به TonB ۴۱
۱-۳۴ بررسی ساختار کریستالوگرافی چند گیرنده همولوگ با پروتئین BauA ۴۲
۱-۳۴-۱ FepA ۴۲
۱-۳۴-۲ FhuA ۴۵
۱-۳۴-۳ FecA ۴۹
۱-۳۴-۴ FptA ۵۱
۱-۳۴-۵ Fpv ۵۵
۱-۳۴-۶ TbpA ۵۹
۱-۳۴-۷ HasR ۶۰
۱-۳۴-۸ BtuB ۶۲
۱-۳۴-۹ CirA ۶۴
۱-۳۵ ترکیبات طبیعی و سنتتیک برای کنترل پاتوژن های وابسته به حضور آهن ۶۷
۱-۳۶ پروتئین های انتقال آهن به عنوان نوید دهنده آنتی ژن واکسن ۷۰
۱-۳۷ مقدمهای بر بیوانفورماتیک ۷۲
۱-۳۸ ایمونوانفورماتیک ۷۳
۱-۳۹ شناسایی آنتی ژن های مناسب برای پاسخ ایمنی ۷۴
۱-۴۰ آنتیژنها و ایمونوژنها ۷۴
۱-۴۱ واکنش متقاطع آنتیژنیک ۷۶
۱-۴۲ اپیتوپها ویژگی ذاتی پروتئینها نیستند ۷۶
۱-۴۳ پیشگویی اپی توپ ۷۷
۱-۴۴ پیش گویی اپی توپ های سلولB ۷۷
۱-۴۵ واکسینولوژی معکوس ۷۹
۱-۴۶ اهداف پیش گویی اپی توپ ۷۹
۱-۴۷ انواع اپیتوپهای سلول B ۸۰
۱-۴۷-۱ اپیتوپهای پیوسته ۸۱
۱-۴۷-۲ اپیتوپهای ناپیوسته ۸۱
۱-۴۸ هدف از این پژوهش ۸۲

فصل دوم

روش ها ۸۳
۲-۱ جستجو در بانک های اطلاعاتی و توالی های در دسترس ۸۴
۲-۲ بلست و بررسی توالی های همولوگ ۸۴
۲-۳ جست و جوی الگوی ساختاری ۸۴
۲-۴ هم ردیفی ها ۸۵
۲-۵ تجزیه و تحلیل توالیهای اولیه ۸۶
۲-۶ شناسایی پپتید نشانه ۸۶
۲-۷ پیش بینی توپولوژی پروتئین BauA ۸۷
۲-۸ پیش بینی و بررسی ساختار دوم پروتئین ۸۷
۲-۹ پیشبینی ساختارهای سوم محتمل ۸۸
۲-۹-۱ پیش بینی ساختار پروتئین بر اساس روش های همولوژی مودلینگ ۸۸
۲-۹-۲ پیش بینی ساختار پروتئین بر اساس روش های Threading و نیز سایر روش های ترکیبی ۹۰
۲-۱۰ تعیین کیفیت ساختار های سوم پیش گویی شده ۹۱
۲-۱۱ گزینش بهترین ساختارها ۹۱
۲-۱۲ تصحیح و بهبود ساختارهای سه بعدی ۹۱
۲-۱۳ تعیین کیفیت ساختارهای تصحیح شده ۹۲
۲-۱۴ انتخاب مدل نهایی ومقایسه کیفیت مدل های تصحیح شده با مدل اولیه ۹۲
۲-۱۵ ارزیابی و تجزیه و تحلیل ساختار نهایی ۹۲
۲-۱۶ انطباق توالی پروتئین با ساختار دوم و سوم و توپولوژی پروتئین ۹۲
۲-۱۷ هم ترازی ساختارهای دوم و سوم پروتئین BauA با سایر پروتئین های جاذب آهن ۹۲
۲-۱۸ تعیین موتیف های پروتئین ۹۳
۲-۱۹ بررسی جایگاه اتصال لیگاند ۹۳
۲-۲۰ بررسی شکاف های سطحی پروتئین ۹۴
۲-۲۱ بررسی اسیدآمینه های عملکردی در سطح بر اساس ساختار سه بعدی پروتئین ۹۴
۲-۲۲ شناسایی اسیدهای آمینهی ساختاری و عملکردی بر اساس توالی پروتئین ۹۴
۲-۲۳ بررسی های ایمونوانفورماتیکی و مشخصات فردی آمینواسیدها ۹۴
۲-۲۴ پیش گویی مناطق ایمونوژنیک در پروتئین ۹۵
۲-۲۵ پیش گویی اپی توپ های خطی ۹۵
۲-۲۵-۱ پیش گویی اپی توپ های خطی مبنی بر توالی پروتئین ۹۵
۲-۲۵-۲ پیش گویی اپی توپ های خطی مبنی بر ساختار سه بعدی پروتئین ۹۶
۲-۲۶ پیش گویی اپی توپ های کونفورماسیونی ۹۶

۲-۲۶-۱ پیش گویی اپی توپ های کونفورماسیونی مبنی بر توالی پروتئین ۹۶
۲-۲۶-۲ پیش گویی اپی توپ های کونفورماسیونی مبنی بر ساختار سه بعدی پروتئین..... ۹۶
۲-۲۷ ارزیابی اپی توپ های پیش گویی شده در مقایسه با پروتئین الگو 3QLB..... ۹۷
۲-۲۷-۱ بررسی جایگاه اتصال لیگاند در پروتئین 3QLB ۹۷
۲-۲۷-۲ پیش گویی اپی توپ های خطی و کونفورماسیونی پروتئین 3QLB مبنی بر ساختار سه بعدی پروتئین ۹۷
۲-۲۸ انتخاب بهترین نواحی ایمنی زا ۹۸
۲-۲۹ بررسی مشخصات فیزیکوشیمیایی، ساختاری و ایمنی زایی نواحی انتخاب شده..... ۹۸
۲-۳۰ طراحی پرایمر ۹۹

فصل سوم

نتایج ۱۰۰
۳-۱ توالی های دردسترس و جستجو در بانک های اطلاعاتی..... ۱۰۱
۳-۲ بلست و بررسی توالی های هومولوگ ۱۰۲
۳-۳ جست و جوی الگوی ساختاری ۱۰۴
۳-۴ هم ردیفی ها ۱۰۶
۳-۴-۱ هم ردیفی هم توالی پروتئین BauA با پروتئین های جاذب آهن در باکتری های دیگر..... ۱۰۶
۳-۴-۲ هم ترازی توالی پروتئین های جاذب آهن BauA در گونه های مختلف اسینتوباکتر ۱۳۵
۳-۴-۳ هم ترازی توالی پروتئین BauA با پروتئین الگوی FptA با کد دسترسی 3QLB..... ۱۵۵
۳-۵ تجزیه و تحلیل توالیهای اولیه..... ۱۶۰
۳-۶ شناسایی پپتید نشانه..... ۱۶۰
۳-۷ پیش بینی توپولوژی پروتئین BauA..... ۱۶۲
۳-۸ پیش بینی و بررسی ساختار دوم پروتئین..... ۱۶۷
۳-۹ پیشبینی ساختارهای سوم محتمل..... ۱۷۸
۳-۹-۱ پیش بینی ساختار پروتئین بر اساس روش های همولوژی مودلینگ..... ۱۷۸
۳-۹-۲ پیش بینی ساختار پروتئین بر اساس روش های Threading و نیز سایر روش های ترکیبی ۱۸۵
۳-۱۰ تعیین کیفیت ساختار های سوم پیش گویی شده ۱۹۹
۳-۱۰-۱ تعیین کیفیت توسط نرم افزار PROSA..... ۱۹۹
۳-۱۰-۲ تعیین کیفیت توسط نرم افزار Qmean ۲۰۰
۳-۱۰-۳ تعیین کیفیت توسط نرم افزار PROSESS..... ۲۰۰
۳-۱۰-۴ تعیین کیفیت توسط نرم افزار RAMPAGE ۲۰۱
۳-۱۰-۵ نمودار های تعیین کیفیت ساختار های پیش گویی شده ۲۰۱

۳-۱۰-۵-۱ ارزیابی کیفی ساختار 3QLB ۲۰۲
۳-۱۰-۵-۲ ارزیابی کیفی ساختار Ps^2 ..... ۲۰۴
۳-۱۰-۵-۳ ارزیابی کیفی ساختار Ps2v2 ..... ۲۰۶
۳-۱۰-۵-۴ ارزیابی کیفی ساختار MODELLER ۲۰۸
۳-۱۰-۵-۵ ارزیابی کیفی ساختار Esypred (انتخاب الگوی اتوماتیک) ۲۱۰
۳-۱۰-۵-۶ ارزیابی کیفی ساختار ESYPRED با انتخاب الگوی دستی 3QLB ۲۱۲
۳-۱۰-۵-۷ ارزیابی کیفی ساختار 3Djigsaw ۲۱۴
۳-۱۰-۵-۸ ارزیابی کیفی ساختار Geno3D-1 ..... ۲۱۶
۳-۱۰-۵-۹ ارزیابی کیفی ساختار Geno3D-2 ..... ۲۱۸
۳-۱۰-۵-۱۰ ارزیابی کیفی ساختار Geno3D-3 ..... ۲۲۰
۳-۱۰-۵-۱۱ ارزیابی کیفی ساختار Geno3D-4 ..... ۲۲۲
۳-۱۰-۵-۱۲ ارزیابی کیفی ساختار Geno3D-5 ..... ۲۲۴
۳-۱۰-۵-۱۳ ارزیابی کیفی ساختار LOOPP-1 ..... ۲۲۶
۳-۱۰-۵-۱۴ ارزیابی کیفی ساختار LOOPP-2 ..... ۲۲۸
۳-۱۰-۵-۱۵ ارزیابی کیفی ساختار LOOPP-3 ..... ۲۳۰
۳-۱۰-۵-۱۶ ارزیابی کیفی ساختار LOOPP-4 ..... ۲۳۲
۳-۱۰-۵-۱۷ ارزیابی کیفی ساختار LOOPP-5 ..... ۲۳۴
۳-۱۰-۵-۱۸ ارزیابی کیفی ساختار Phyre 2 ..... ۲۳۶
۳-۱۰-۵-۱۹ ارزیابی کیفی ساختار I tasser ۲۳۸
۳-۱۰-۵-۲۰ ارزیابی کیفی ساختار SPARKS X-1 ..... ۲۴۰
۳-۱۰-۵-۲۱ ارزیابی کیفی ساختار SPARKS X-2 ..... ۲۴۲
۳-۱۰-۵-۲۲ ارزیابی کیفی ساختار SPARKS X-3 ..... ۲۴۴
۳-۱۰-۵-۲۳ ارزیابی کیفی ساختار SPARKS X-4 ..... ۲۴۶
۳-۱۰-۵-۲۴ ارزیابی کیفی ساختار SPARKS X-5 ..... ۲۴۸
۳-۱۰-۵-۲۵ ارزیابی کیفی ساختار SPARKS X-6 ..... ۲۵۰
۳-۱۰-۵-۲۶ ارزیابی کیفی ساختار SPARKS X-7 ..... ۲۵۲
۳-۱۰-۵-۲۷ ارزیابی کیفی ساختار SPARKS X-8 ..... ۲۵۴
۳-۱۰-۵-۲۸ ارزیابی کیفی ساختار SPARKS X-9 ..... ۲۵۶
۳-۱۰-۵-۲۹ ارزیابی کیفی ساختار SPARKS X-10 ..... ۲۵۸
۳-۱۰-۵-۳۰ ارزیابی کیفی ساختار LOMETS-1 ..... ۲۶۰
۳-۱۰-۵-۳۱ ارزیابی کیفی ساختار LOMETS-2 ..... ۲۶۲
۳-۱۰-۵-۳۲ ارزیابی کیفی ساختار LOMETS-3 ..... ۲۶۴
۳-۱۰-۵-۳۳ ارزیابی کیفی ساختار LOMETS-4 ..... ۲۶۶

۳-۱۰-۵-۳۴ ارزیابی کیفی ساختار LOMETS-5 ..... ۲۶۸
۳-۱۰-۵-۳۵ ارزیابی کیفی ساختار LOMETS-6 ..... ۲۷۰
۳-۱۰-۵-۳۶ ارزیابی کیفی ساختار LOMETS-7 ..... ۲۷۲
۳-۱۰-۵-۳۷ ارزیابی کیفی ساختار LOMETS-8 ..... ۲۷۴
۳-۱۰-۵-۳۸ ارزیابی کیفی ساختار LOMETS-9 ..... ۲۷۶
۳-۱۰-۵-۳۹ ارزیابی کیفی ساختار LOMETS-10 ..... ۲۷۸
۳-۱۰-۵-۴۰ ارزیابی کیفی ساختار MUSTER ۲۸۰
۳-۱۱ گزینش بهترین ساختارها ۲۸۲
۳-۱۲ تصحیح و بهبود ساختارهای سه بعدی ۲۸۳
۳-۱۳ تعیین کیفیت ساختارهای تصحیح شده ۲۸۶
۳-۱۳-۱ نمودار های تعیین کیفیت ساختار های تصحیح شده ۲۸۶
۳-۱۳-۱-۱ ارزیابی کیفی ساختار Refine Esypred ۲۸۶
۳-۱۳-۱-۲ ارزیابی کیفی ساختار Refine LOMETS-1 ..... ۲۸۸
۳-۱۳-۱-۳ ارزیابی کیفی ساختار Refine LOMETS-4 ..... ۲۹۰
۳-۱۳-۱-۴ ارزیابی کیفی ساختار Refine LOMETS-6 ..... ۲۹۲
۳-۱۳-۱-۵ ارزیابی کیفی ساختار Refine LOMETS-7 ..... ۲۹۴
۳-۱۳-۱-۶ ارزیابی کیفی ساختار Refine LOMETS-8 ..... ۲۹۶
۳-۱۳-۱-۷ ارزیابی کیفی ساختار Refine LOMETS-9 ..... ۲۹۸
۳-۱۳-۱-۸ ارزیابی کیفی ساختار Refine MUSTER ۳۰۰
۳-۱۴ انتخاب مدل نهایی و مقایسه کیفیت مدل های تصحیح شده با مدل اولیه ۳۰۲
۳-۱۵ ارزیابی و تجزیه و تحلیل ساختار نهایی ۳۰۴
۳-۱۶ انطباق توالی پروتئین با ساختار دوم و سوم و توپولوژی پروتئین ۳۰۵
۳-۱۷ هم ترازی ساختارهای دوم و سوم پروتئین BauA با سایر پروتئین های جاذب آهن ۳۰۶
۳-۱۸ تعیین موتیف های پروتئین: ۳۱۰
۳-۱۹ بررسی جایگاه اتصال لیگاند ۳۱۱
۳-۲۰ بررسی شکاف های سطحی پروتئین ۳۱۳
۳-۲۱ بررسی اسیدآمینه های عملکردی در سطح پروتئین ۳۱۵
۳-۲۲ شناسایی اسیدهای آمینهی ساختاری و عملکردی ۳۱۷
۳-۲۳ بررسی های ایمونوانفورماتیکی و مشخصات فردی آمینواسیدها ۳۱۹
۳-۲۴ پیش گویی مناطق ایمونوژنیک در پروتئین ۳۳۲
۳-۲۵ پیش گویی اپی توپ های خطی ۳۳۵
۳-۲۵-۱ پیش گویی اپی توپ های خطی مبنی بر توالی پروتئین ۳۳۵
۳-۲۵-۲ پیش گویی اپی توپ های خطی مبنی بر ساختار سوم پروتئین ۳۴۱

۳-۲۶ پیش گویی اپی توپ های کونفورماسیونی ۳۴۷
۳-۲۶-۱ پیش گویی اپی توپ های کونفورماسیونی مبنی بر توالی پروتئین ۳۴۷
۳-۲۶-۲ پیش گویی اپی توپ های کونفورماسیونی مبنی بر ساختار سوم پروتئین..... ۳۴۸
۳-۲۷ ارزیابی اپی توپ های پیش گویی شده در مقایسه با پروتئین الگو 3QLB..... ۳۶۵
۳-۲۷-۱ بررسی جایگاه اتصال لیگاند در پروتئین 3QLB ۳۶۵
۳-۲۷-۲ پیش گویی اپی توپ های خطی پروتئین 3QLB مبنی بر ساختار سوم آن..... ۳۶۶
۳-۲۷-۳ پیش گویی اپی توپ های کونفورماسیونی پروتئین 3QLB مبنی بر ساختار سوم آن ۳۷۴
۳-۲۸ انتخاب بهترین نواحی ایمنی زا ۳۷۶
۳-۲۹ بررسی مشخصات ساختاری و ایمنی زایی نواحی انتخاب شده ۳۷۷
۳-۲۹-۱ بررسی مشخصات ساختاری و ایمنی زایی اسید آمینه های ۲۶ الی ۱۹۱ (دربردارنده دمین کرک) ۳۷۷
۳-۲۹-۱-۱ تجزیه وتحلیل توالی و بررسی خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین ۳۷۷
۳-۲۹-۱-۲ میزان آنتی ژنسیته پروتئین ۳۷۷
۳-۲۹-۱-۳ احتمال حلالیت پروتئین..... ۳۷۷
۳-۲۹-۱-۴ پیش بینی خصوصیات فردی آمینو اسیدها در طول توالی پروتئین ۳۷۷
۳-۲۹-۱-۵ بررسی ساختار سوم پروتئین ۳۷۸
۳-۲۹-۲ بررسی مشخصات ساختاری و ایمنی زایی اسید آمینه های شماره ۳۲۱ الی ۶۳۵ (دربردارنده مهمترین رشته های بتا و لوپ های خارج سلولی از دمین بشکه بتا)..... ۳۷۸
۳-۲۹-۲-۱ تجزیه وتحلیل توالی و بررسی خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین ۳۷۸
۳-۲۹-۲-۲ میزان آنتی ژنسیته پروتئین ۳۷۹
۳-۲۹-۲-۳ احتمال حلالیت پروتئین..... ۳۷۹
۳-۲۹-۲-۴ پیش بینی خصوصیات فردی آمینو اسیدها در طول توالی پروتئین :..... ۳۷۹
۳-۲۹-۲-۵ بررسی ساختار سوم پروتئین: ۳۸۰
۳-۳۰ طراحی پرایمر ۳۸۰
۳-۳۰-۱ قطعه کرک..... ۳۸۰
۳-۳۰-۱-۱ ترادف قطعه کرک از ژن پروتئین BauA و طراحی پرایمر ۳۸۰
۳-۳۰-۱-۲ آنالیز نرم افزاری پرایمرها ۳۸۱
۳-۳۰-۲ قطعه بتا ۳۸۲
۳-۳۰-۲-۱ ترادف قطعه لوپ از ژن پروتئین BauA و طراحی پرایمر..... ۳۸۲
۳-۳۰-۲-۲ آنالیز نرم افزاری پرایمرها: ۳۸۳

فصل چهارم

بحث ۳۸۴
۴-۱ مروری بر مشخصات BauA..... ۳۸۵
۴-۲ پیش گویی ساختار سوم پروتئین..... ۳۸۶
۴-۳ بررسی جایگاه اتصال لیگاند و شکاف های موجود در سطح پروتئین ۳۸۹
۴-۴ بررسی اسید آمینه های عملکردی در طول توالی و نیز ساختار سه بعدی پروتئین ۳۹۰
۴-۵ بررسی مقیاس های منفرد آمینو اسید ها در طول توالی پروتئین ۳۹۱
۴-۶ پیش گویی مناطق ایمونوژنیک در پروتئین ۳۹۳
۴-۷ پیش گویی اپی توپ سلول های B ۳۹۳
۴-۷-۱ روش های پیش گویی بر اساس توالی پروتئین ۳۹۴
۴-۷-۲ روش های پیش گویی بر پایه ساختار پروتئین ۳۹۴
۴-۷-۳ روش های هیبرید (ترکیبی از آنالیز های توالی و ساختار) ۳۹۵
۴-۸ ارزیابی اپی توپ های پیش گویی شده ۳۹۶

فصل پنجم

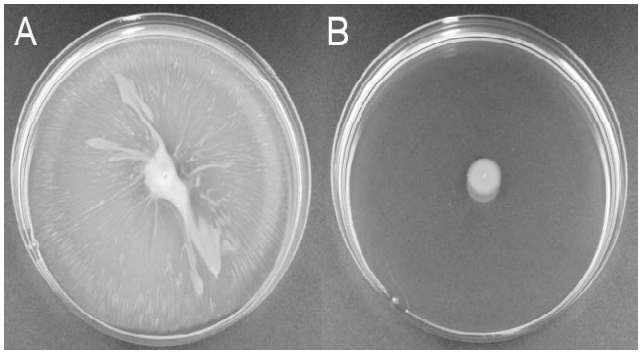
منابع ۳۹۹

فصل اول

مقدمه

۱-۱ معرفی جنس اسینتوباکتر

جنس اسینتوباکتر شامل باکتری های کوکوباسیل گرم منفی، شدیدا آئروبیک، غیر متحرک، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی می باشد که در دمای ۲۰-۳۰ درجه سانتیگراد در محیط های معمول آزمایشگاهی قابل کشت است[۱,۲]. روش های متعدد (هیبریداسیون DNA-DNA[۳]، بیوتایپینگ[۴]، آنالیز های DNAی ریبوزومی[۵]، RFLP[۶]) در حال حاضر این جنس را به ۳۲ گونه مختلف تقسیم کرده که ۱۷ تای آن ها به صورت رسمی نام گذاری شده اند. از نظر مورفولوژی[1]، اسینتوباکترها، باکتری‌های میله‌ای گرم منفی ضخیم هستندکه در فاز سکون[2] بیشتر به ریخت کوکوباسیل در می‌آیند، سلول‌ها معمولا جفت هستند اما گاهی به صورت زنجیره‌ای در می‌آیند. بسیاری از گونه‌ها کپسول دارند. هرچند به‌طور کلی این باکتری‌ها بدون رنگ‌دانه و غیر متحرک و هستند، با این حال، گزارش حرکت لغزشی[3] و سر خوردن[4] (شکل۱-۱) در برخی گونه‌ها مورد توجه است[۷].



شکل۱-۱) حرکت سوارمینگ اسینتوباکتر بومانی. کلنی به صورت نقطه ای در وسط محیط Luria-Bertani شامل ۲۵ درصد آگار قرار داده شده است. حرکت سوارمینگ در شکل (A) به صورت یک رشد کانال مانند در اطراف توده متراکم سفید رنگ کلونی قابل مشاهده می باشد. فقدان حرکت سوارمینگ در اطراف کلنی اسینتوباکتر بومانی در شکل(B) نتیجه عدم حضور آهن در محیط می باشد[۷].

گونه‌های مهم اسینتوباکتر به عنوان فلور نرمال پوست انسان از مناطق مرطوب پوست نظیر کشاله ران، زیر بغل و انگشتان پا جدا می‌شوند. گزارش‌های فزاینده‌ای از دخالت این میکروارگانیسم در عفونت‌های مختلف بیمارستانی وجود دارد[۸]، هر چند دست‌کم ۲۵٪ افراد سالم حامل این باکتری هستند[۹]. مخازن دیگر اسینتوباکتر، شامل انواع مناطق مرطوب و خشک بیمارستان، لوازم بیمارستانی، کارکنان بیمارستان و بیماران است، همچنین جنس اسینتوباکتر گسترش فراوانی در خاک، آب و فاضلاب دارد[۸]. باید توجه داشت که تفاوت معنی داری در جمعیت گونه‌های بیمارستانی و محیطی وجود دارد، به این معنا که بیشتر گونه‌های بالینی مشاهده شده شامل ترکیبی از *A. baumannii* و *A.calcoaceticus* است، در حالی که به نظر می‌رسد *A.jansonii* و *A.lwoffii* در مواد غذایی و محیط گسترش بیشتری دارند[۷].

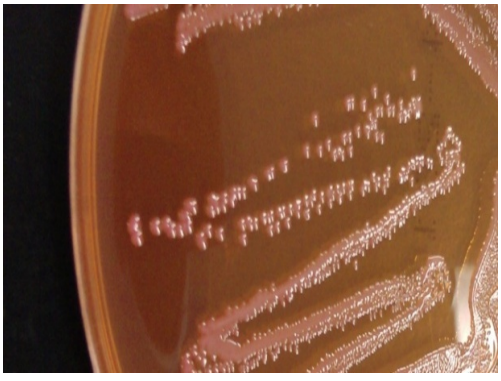
[1] Morphology
[2] Stationary phase
[3] Twitching
[4] Gliding

۱-۲ اسینتوباکتر بومانی

تعدادی از گونه‌های *Acinetobacter* مستقیما در عفونت‌های انسانی دخیلند، که مهم ترین آن ها اسینتوباکتر بومانی می باشد. این باکتری عامل عفونت تنفسی[۱]، باکتریمی[۲]، مننژیت[۳] و عفونت دستگاه ادراری[۴] است[۹-۱۱]. درمان عفونت های ناشی از این پاتوژن به دلیل مقاومت قابل توجه آن به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها، بسیار دشوار است که میزان مرگ ومیر بیماران آلوده را به ۴۳٪ می رساند[۱۲]. در برخی از کشورها این میزان به ۷۵٪ می‌رسد[۱۳,۱۴].

Acinetobacter baumannii بیشتر در محیط‌های بیمارستانی یافت می‌شود و به علت توانایی قابل توجه آن در زنده ماندن در این محیط، امروزه بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. رتبه‌ی اول این پاتوژن در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی[۵] اهمیت توجه و مطالعه‌ی اسینتوباکتر بومانی را گوشزد می‌کند[۱۵]. این میکروارگانیسم ممکن است از پوست[۱۶,۱۷]، سیستم تنفسی[۱۸]، افراد بیمار و نیز تجهیزات بیمارستانی[۱۹,۲۰] جداسازی گردد.

اخیرا شیوع فراوان عفونت های تنفسی توسط اسینتوباکتر بومانی گزارش شده است[۲۱-۲۹] که نگرانی بسیاری را به دلیل گسترش و افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های جداشده به وجود اورده است[۳۰-۳۵]. کشت کلنی های اسینتو باکتر بومانی روی محیط مک کانکی آگار و نیز نمای میکروسکوپ الکترونی نگاره از سلول‌های *A. baumannii* در شکل ۱-۲ نمایش داده شده است.



شکل۱-۲) شکل سمت راست کلنی های اسینتو باکتر بومانی روی محیط مک کانکی آگار و سمت چپ نمای میکروسکوپ الکترونی نگاره از سلول‌های *A. baumannii* را نمایش می دهد[۳۵].

۱-۳ عفونت‌های بیمارستانی

عفونت‌های بیمارستانی ازعلل شایع و مهم مرگ و میر، ناتوانی، افزایش طول مدت بستری، تحمیل و افزایش هزینه‌های بیمارستانی و بروز مشکلات بهداشتی هستند[۱۵]. اگرچه تلاش‌های صورت گرفته در زمینه کنترل

[1] Respiratory infection
[2] Bacteraemia
[3] Meningitis
[4] Urinary tract infection
[5] Nosocomial infections

عفونت‌های بیمارستانی با موفقیت‌هایی همراه بوده است، لیکن پیشرفت‌های اخیر در علوم پزشکی و انجام مداخلات پزشکی مکرر از جمله مصرف وسیع داروهای تضعیف کننده سیستم ایمنی و آنتی بیوتیک‌ها موجب افزایش افراد آسیب پذیر شده، که این امر با ایجاد مقاومت‌های قابل انتقال در عوامل بیماری‌زا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها تشدید شده است. این عفونت ها به‌سختی درمان شده وگاهی منجر به مرگ بیماران گشته و خطری در حال افـــزایش محسوب می‌شوند که تقریباً تمام افراد بستری شده در بیمارستان‌ها را تهدید می‌کنند[۳۶,۳۷].

درمان عفونت‌های بیمارستانی با توجه به مقاومت اغلب سویه‌های میکروبی بسیار مشکل و به علت طولانی شدن زمان بستری بیماران، پرهزینه است[۳۸].

۱-۴ مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها

بیشترین تحقیقات در باره‌ی اسینتوباکتر بومانی معطوف به مطالعه مقاومت آن به آنتی بیوتیک‌ها بوده است چرا که این صفت در اسینتوباکتر بومانی عادی و رو به گسترش است. در این راستا، مکانیسم‌های مختلف، متفاوت و بسیار کارآمدی در مقاومت دارویی این باکتری شناخته شده است[۳۹]. بیشترین موارد مربوط به این باکتری از نمونه های پنومونی[1] ۵۰ مورد (۵۳/۸ درصد) و زخم ۱۸مورد (۱۹/۳درصد) جدا گردید[۴۰]. در مطالعه ای مشاهده گرید، تمام ایزوله های اسینتوباکتـر بومانی به آنتی بیوتیک های سفتیزوکسیم، سفوپرازون، سفتازیدیم، تیکارسیلین- کلاولانیک اسید، سفوتاکسیم، ازترونام، مروپنم، سفیکسیم، سفتریاکسون، سفـوتاکسیم، کـاربنی‌سیلین و تیکارسیلین مقاوم و تمـــام ایزولـــه ها به کلسیتین حساس بودند. در مورد ایزوله های غیربومانی، پلی میکسین B تنها آنتی بیوتیکی بود که علیه همه ایزوله ها موثر بود[۹]. آنتی‌بیوتیکهای سفیکسیم، مروپنم، سفوتاکسیم، کاربنی سیلین و سفتریاکسون از جمله آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده علیه ایزوله های غیربومانی بودند[۹].

۱-۵ سازوکارهای بیماری‌زایی اسینتوباکتربومانی

سازوکار(های) دقیق بیماری‌زایی *Ainetobacter baumannii* مشخص نیست؛ عوامل بیماری‌زای اندکی در این باکتری شناخته شده و سم یا سیتولیزین در آن معرفی نشده است[۴۱].

بررسی پروتئین‌های اسینتوباکتر بومانی بیانگر متابولیسمی، بسیار قوی و متنوع است که این باکتری را قادر به استفاده از منابع غذایی بسیار متنوع کرده است[۴۲]. یک عامل مهم در بقای این باکتری در بدن میزبان یا محیط، توانایی آن در استفاده از منابع مختلف از قبیل آهن است. *Acinetobacter baumannii* مولکول‌های مختلفی مانند سیدروفور اسینتوباکتین[2] برای جذب آهن تولید می‌کند، همچنین ارگانیسم، واجد سیستم استفاده از هِمین[3] است[۴۳]. حتی بین سوش‌های جدا شده در یک همه‌گیری، تفاوت قابل ملاحظه‌ای در بیان مولکول‌های دخیل در جذب آهن وجود دارد[۴۴].

---

[1] Pneumonia
[2] siderophore acinetobactin
[3] hemin utilisation system

برهم‌کنش سلول‌های *A. baumannii* با سلول‌های اپی‌تلیال، مورد بررسی قرار گرفته است که نتایج، حاکی از دخالت سازوکارهای متفاوت در اتصال به سلول‌های نایچه نسبت به سطوح غیر زنده است[۴۵,۴۶]. به دنبال اتصال، سلول‌های باکتری قادر به تهاجم و القای آپوپتوز[1] در سلول‌های یوکاریوتی هستند[۴۷]، قابلیتی که به فعالیت پروتئین خارج غشایی A (Omp38) مربوط می‌شود که به میتوکندری‌ها و هسته منتقل شده، مسیرهای آپوپتوز را فعال می‌کند[۴۸]. پروتئین A به وزن ۳۸kDa در غشای خارجی اسینتوباکتر بومانی به خوبی شناخته شده که باعث القای آپوپتوز در سلول‌های یوکاریوتی می‌شود. همچنین موجب تحریک سلول‌های دندرتیک[2] شده و تمایز سلول-های $T\ CD4^+$ را در پی دارد. پروتئین خالص OmpA باعث القای پاسخ ایمنی وابسته به Th_1 [3] می‌شود و به واسطه Toll-like ، بیان نیتریک اکساید سنتاز[4] را افزایش می‌دهد[۴۹-۵۱].

عامل مهم و موثر دیگر در بقای این جان‌دار در محیط زنده و غیر زنده تشکیل بیوفیلم است؛ *A. baumannii* به آسانی به سطوح زنده یا غیر زنده متصل می‌شود و بر روی آن‌ها بیوفیلم تشکیل می‌دهد[۵۲-۵۴].

به طور کلی در باکتری های بیماری زا برخی پروسه ها نقش کلیدی در طول عفونت میزبان بازی می کنند(تشکیل بیوفیلم[۵۵]، جذب آهن[۵۶]، کوئروم سنسینگ[۵۷]، فاکتورهای ویرولانس[۵۸]) که مهمترین انها، سیستم جذب آهن می باشد که در اکثر باکتری های پاتوژن از طریق پروتئین های غشای خارجی صورت می گیرد.

۱-۶ ارتباط بین پروتئین های غشایی با یکدیگر

غشای خارجی باکتری های گرم منفی عمدتا از فسفولیپید، لیپوپلی ساکارید و گروهی از پروتئین های غشای خارجی(OMP[5]) که ۵۰٪ از جرم غشای خارجی را تشکیل می دهند به وجود آمده اند[۵۹]. OMP ها شامل پروتئین های داخل غشایی و لیپوپروتئین ها پروتئین هایی هستند که از طریق لیپید متصل شده به انتهای آمینی خود در غشاء لنگر انداخته اند. OMP های داخل غشایی که به وسیله ساختار بشکه بتایشان شناسایی می شوند برای تمامیت توانایی نفوذ پذیری غشاهای باکتریایی ضروری می باشند[۶۰]. به علاوه تولید OMP ها که معمولا به وسیله عوامل محیطی تنظیم می گردد نقش مهمی در پاتوژنز باکتری ها و توانایی سازگاری آن ها در محیط های مختلف دارد[۶۱,۶۲]. تصور می شود اکثر پروتئین های غشایی از بسته های آلفا هلیکس تشکیل شده اند و پروتئین های دارای ساختار بشکه بتا به غشای خارجی باکتری های گرم منفی محدود می گردند اگر چه بشکه های بتا به طور مشهود در طیف وسیعی از پروتئین های عملکردی غشایی قرار گرفته اند. برای مثال ساختار بشکه بتا در پروتئین هایی از جمله OmpA [۶۳]، منافذ غیر فعال از جمله پورین ها[۶۴] و گلیکوپورین ها و اجزای سیستم های انتقال فعال از جمله FhuA و FepA شناسایی شده است(شکل ۱-۳).

[1] Apoptosis
[2] Dendritic cells
[3] Th_1-mediated immune response
[4] inducible nitric oxide synthase (iNOS)
[5] Outer membrane protein