نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره سیزدهم، شماره اول، ۱۳۹۶، پیاپی ۳۴: ۸۸-۷۷

کنکاش زیست سامانه‌ای شبکه متابولیکی باکتری *اشرشیاکولی* به روش Insilico و کاربرد آن در ورم پستان گاو شیری

سیده لیلا هاشمی [۱]، مصطفی قادری زفره‌یی [۲*]، رضا نقی‌ها [۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، ایران

۲- استادیار زیست سامانه‌های محاسباتی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، ایران

۳- استادیار میکروب شناسی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۱۸

چکیده

ورم پستان از بیماری‌های مهمی است که می‌تواند در دوران شیردهی و خشکی در گاو شیری ظاهر گردد. با توجه به اهمیت باکتری اشرشیاکولی در ایجاد ورم پستان میکربی، این پژوهش به منظور بررسی تولید زیست ماده، سم و شناسایی ژن‌های مؤثر بر تولید زیست توده‌ی باکتری اشرشیاکولی در شرایط حبابچه‌های پستان گاو شیری مبتلا به ورم پستان در شرایط هوازی و بی هوازی و به روش Insilico انجام شد. نرخ تولید بهینه‌ی زیست توده‌ی باکتری اشرشیاکولی در شرایط هوازی، ۲/۰۱۵۵ و در شرایط بی‌هوازی ۱/۰۱۵۲ میلی مول بر گرم وزن خشک بر ساعت (mmol/gDW/h) محاسبه شد. بیشترین توان باکتری اشرشیاکولی برای تولید سم در شرایط هوازی، ۱/۶۷۰۱ (mmol/gDW/h) محاسبه شد. تولید بالای زیست توده، می‌تواند توجیه مناسبی برای بیماری‌زایی سریع باکتری اشرشیاکولی در محیط پستان گاو شیری باشد. نتایج نشان داد که حذف همزمان ژن‌های ompF،ompN PhoE و ompC موجب توقف تولید زیست توده گردید. همچنین، بررسی واکنش‌های تولید سم در باکتری اشرشیاکولی نشان داد که ژن‌های solA، lpxM،ZnuA و ZnuB، که در تولید سم دخالت دارند، توانند کاندیدهای مناسبی برای اهداف دارویی، جهت کاهش و یا توقف تولید سم باشند

کلمات کلیدی: اشرشیاکولی، زیست توده، حذف ژن، ورم پستان، سم

**نویسنده مسئول: مصطفی قادری زفره‌یی*

آدرس: بخش ژنتیک، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، خیابان پاسداران، یاسوج، ایران. تلفن: ۰۷۴۱۲۲۲۴۸۴۰

پست الکترونیک: mghaderi@yu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بررسی‌ها نشان داده است که بیش از ۲۵ درصد از کل زیان‌های اقتصادی ناشی از بیماری‌های گاو، می‌تواند به طور مستقیم مرتبط با بیماری ورم پستان باشد (۴). طبق گزارش بلورچی و همکاران در سال ۲۰۰۸، در آمریکا کاهش تولید ناشی از ورم پستان تحت بالینی، سالیانه در حدود یک میلیارد دلار (۱۱۰ دلار به ازای هر گاو) به صنعت تولید شیر این کشور زیان وارد می‌کند و ۷۰ درصد از موارد کاهش تولید شیر در گله، مربوط به ورم پستان تحت بالینی است. بررسی منابع قویی در این زمینه را می توان در (۱و۲و۵و۹) مشاهده کرد. تاکنون بیش از ۲۰۰ ریزسازواره متفاوت در منابع علمی به عنوان سازه‌های ایجاد کننده ورم پستان گاو شیری گزارش شده‌اند، اما در این میان باکتری *اشرشیاکولی* به عنوان مهمترین سازه بیماری-زای محیطی برای بیماری ورم‌پستان در گاو شیری به شمار رفته و می‌رود (۸). این باکتری به جهات گوناگونی اهمیت فراوان دارد از جمله می‌توان به توانایی آن در تخمیر قند لاکتوز و مدل سازواره (Model organism) بودن آن نام برد. به طوریکه از اولین ریز سازواره‌هایی است که تعیین توالی کامل ژنوم آن قبل از سال ۲۰۰۰ انجام شد (۳). امروزه، داده‌های بسیار گسترده‌ای از محتوای ژنی، محصولات رونویسی، آنزیم‌های درگیر در واکنش‌ها و به طور کلی مسیرهای بیوشیمیایی و سوخت و ساز باکتری *اشرشیاکولی* در دسترس پژوهشگران قرار دارد (۶). تحلیل موازنه‌ی شار متابولیکی (Metabolic flux balance analysis) ساده‌ترین روش کنکاش شبکه‌های متابولیکی به شمار می‌رود که با در دست داشتن ماتریس استوکیومتری (Stoichiometric matrix) یک زیست سامانه متابولیکی می‌تواند به سوال‌های مختلف زیستی پاسخ دهد. تحلیل موازنه شار متابولیکی معمولا با به کارگیری برنامه نویسی خطی (Linear programming) سعی می‌کند تابع هدف خاصی، که معمولا کمینه کردن یا بیشینه کردن یک شار متابولیکی است، را نسبت به محدودیت‌های ترمودینامیکی و زیستی سامانه مورد نظر، بهنیه کند (۱۰). شبکه‌ی متابولیسم *اشرشیاکولی* توسط شمار زیادی از پژوهشگران مورد بررسی قرار گرفته است و پس از انتشار نخستین مدل شبکه‌ی متابولیکی در سال ۲۰۰۰، به طور پیوسته در حال به روز شدن و کامل شدن است (۱۶). تحلیل تعادل شارمتابولیکی توسط پژوهشگران زیادی با اهداف مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. ساور و همکاران در سال ۱۹۹۹ با تحلیل نرخ شارهای متابولیکی در سامانه سوخت و ساز مرکزی کربن باکتری *اشرشیاکولی*، اثر تغییرات عملکرد آنزیم‌ها در واکنش‌ها و اثر حذف ژن بر تولید زیست توده را بررسی کردند (۱۷). استلینگ و همکاران با استفاده از تحلیل تعادل شارمتابولیکی، به بررسی بخش بزرگی از شبکه‌ی متابولیکی باکتری *اشرشیاکولی* پرداختند (۱۸). در پژوهش پژوهشگران مختلف، منابع کربنی متفاوت در دسترس باکتری *اشرشیاکولی* قرار گرفت و واکنش‌ها و متابولیت‌های فعال در حضور هر منبع کربن شناسایی شدند. نتایج آن‌ها سبب غنی سازی شبکه‌ی متابولیکی باکتری *اشرشیاکولی* گردید. همچنین ماجوسکی و دوماچ (۱۲) با استفاده از تحلیل تعادل شارمتابولیکی، به بررسی مسیرهای تولید زیست توده پرداختند. همچنین نوگالس و پالسون در سال ۲۰۰۸ مدل متابولیکیiJN۷۴۶ را برای جلبک *سودوموناس پوتیدا* (*Pseudomonas putida*) ایجاد کردند (۱۵). در این مدل واکنش‌های مربوط به تولید زیست توده

Archive of SID

www.SID.ir

درشرایط هوازی و بی‌هوازی در محیط کشت حاوی حداقل گلوکز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پیش بینی مصرف گلوکز در مدل مزبوز بسیار سریع‌تر از نتایج آزمایشگاهی بود. در این راستا، نتایج مشابه‌ایی نیز برای باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* گزارش شده است.

با توجه به توانمندی تحلیل تعادل شار متابولیکی (۱۱و ۱۳و۱۴و۱۹و۲۱)، در این پژوهش سعی گردید عملکرد زیستی باکتری *اشرشیاکولی* در شرایط حاکم بر فضای گویچه پستان گاو شیری مبتلا به ورم پستان بررسی گردد. در این شرایط، فرض بر این بود که اگر رشد باکتری افزایش یابد، حدت ورم پستان نیز افزایش پیدا می‌کند. در این راستا اهداف پژوهش حاضر عبارت بودند از: بررسی میزان تولید زیست توده، تولید سم در فضای گویچه پستان، شناسایی ژن‌های موثر بر تولید زیست توده و همچنین شناسایی مسیرهای ضروری در تولید زیست توده باکتری *اشرشیاکولی* در شرایط حاکم بر فضای گویچه پستان گاو شیری مبتلا به ورم پستان.

مواد و روش‌ها

تاکنون مدل‌های زیادی در رابطه با بازسازی شبکه متابولیکی باکتری *اشرشیاکولی* ارایه شده است که مدلiJO۱۳۶۶ از کامل‌ترین آن‌ها – تا زمان انجام این پژوهش – به شمار می‌رود (کامل‌ترین به این معنی که در ساخت این مدل متابولیکی از آخرین اطلاعات حاشیه نویسی ژنوم (Genome annotation) باکتری *اشرشیاکولی* استفاده شده است). در ساخت این مدل ۱۳۶۶ ژن متابولیکی، ۲۵۸۱ واکنش و ۱۸۰۴ متابولیت استفاده شده است (۱۶). معمولاً پیش از آنکه مدل‌هایی از این دست بتوانند در عمل مورد استفاده قرار گیرند بایستی میزان اعتبار نتایج حاصل از آن‌ها اعتبارسنجی شود. از آن‌جایی که داده‌ی آزمایشگاهی مربوط به تولید زیست توده باکتری *اشرشیاکولی* در محیط کشت لاکتوز در شرایط هوازی و بی‌هوازی وجود نداشت، در این پژوهش برای اعتبارسنجی محاسبات مدل یاد شده، از نتایج اورث (۱۶) با لحاظ کردن شرایط مشابه استفاده شد. در گویچه پستان گاو شیری مبتلا به ورم پستان، قند لاکتوز تنها کربوهیدرات قابل دسترس بوده (۷) و شرایط هوازی در آن حکم فرما است (۲۰). جهت کنکاش عملکرد زیستی باکتری *اشرشیاکولی* در شرایط یاد شده، میزان تولید زیست توده در شرایط هوازی و بی‌هوازی در محیط کشت لاکتوز و گلوکز بررسی شد. پس از بهینه سازی تولید زیست توده در شرایط هوازی، واکنش-های مسیر سوخت و ساز لاکتوز تا تبدیل آن به گلوکز مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی اهمیت واکنش‌های موثر بر تولید زیست توده، حذف واکنش و حذف ژن بصورت تکی انجام شد و پس از حذف هر واکنش و هر ژن، مقدار تابع هدف (تولید زیست توده)، به طور جداگانه محاسبه گردید. در این پژوهش ساختار تابع هدف مانند ساختار تابع هدف در پژوهش (۱۶) بود (جدول ۲). وجود ارتباط واکنش ژن –پروتئین Gene Protein Reaction association بین بسیاری از ژن‌ها، این امکان را می-دهد که حذف چندتایی ژن در مدل انجام گیرد و در اغلب موارد، ژن‌های متابولیکی مورد انتخاب قرار می‌گیرند. در این پژوهش جهت بررسی میزان مانایی باکتری *اشرشیاکولی*، حذف چندتایی ژن برای تمام مجموعه‌های چندتایی دارای GPR (مجموعه‌های سه تایی و چهارتایی)، دخیل در سوخت و ساز لاکتوز صورت گرفت. محاسبات پایه در این پژوهش با استفاده از نرم افزار MATLAB انجام شد. در این

Archive of SID

www.SID.ir

راستا از جعبه ابزار COBRA و نرم افزارهای SBML و libSBML استفاده گردید.

نتایج

جهت اعتبارسنجی نتایج محاسبات در مدلiJO۱۳۶۶، میزان تولید زیست ماده حاصل از ۱۲ پیش‌ماده‌ی متفاوت با نتایج بدست آمده توسط اورث (۱۶) مقایسه گردید. فهرست متابولیت‌های مورد استفاده جهت معرفی به مدلiJO۱۳۶۶ در جدول ۱ آورده شده است. پس از مصرف ۱۲پیش ماده به طور جداگانه توسط مدل مدلiJO۱۳۶۶ ، مشاهده شد که تولید زیست توده حاصل از مصرف پیش‌ماده‌ی گلوتامین در این پژوهش و (۱۶) تفاوت بالایی داشتند. معمولاً وقتی صحبت از تفاوت یا اختلاف پیش می‌آید، اولین سوال منطقی که مطرح می شود بحث درجه معنی‌داری در اختلاف نتیجه‌هاست. باید توضیح داده شود که پژوهش‌هایی از قبیل پژوهش حاضر، متکی به روش‌های دقیق ریاضی هستند (معادلات دیفرانسیل) و متکی به روش‌های آماری نیستند. در روش‌های آماری، چون معمولا مقایسه نتایج تحت فرض‌های مختلف می‌پردازند، معنی داری اختلاف نتایج تحت فرض‌های مختلف باید سنجیده شوند. تولید زیست توده‌ی باکتری در شرایط هوازی محاسبه شد. میزان زیست توده‌ی تولید شده برابر با ۲/۰۱۵۵ (mmol/gDW/h) بود و اغلب واکنش‌های بدون شارمربوط به زیر سامانه‌های تبادلی مواد از محیط بیرون به داخل باکتری *اشرشیاکولی* بودند. کنکاش شارهای متابولیکی داخلی (Internal metabolic fluxes) باکتری *اشرشیاکولی* نشان داد که مهمترین شارهای بهینه‌ی سوخت و ساز، تبدیل لاکتوز به گلوکز بود. فهرست دیگر شارهای متابولیکی داخلی بهینه در جدول ۳ نشان‌داده شده است. بر اساس جدول شماره ۳ و با استفاده از پایگاه داده KEGG (www.genome.jp/kegg) مسیر متابولیکی لاکتوز رسم گردید. با مشخص شدن شارهای بهینه، واکنش‌های دارای شاردرگیر در سوخت و ساز لاکتوز، بصورت تکی حذف شدند. پس از حذف هر واکنش، مقدار تابع هدف (تولید زیست توده) جهت بررسی اهمیت واکنش‌ها، محاسبه شد. نتایج محاسبات در جدول ۴ آورده شده است.

محاسبات مربوط به حذف واکنش نشان داد که حذف مسیر تبدیل قند لاکتوز به گلوکز و گالاکتوز، که با استفاده از آنزیم بتاگالاکتوزیداز انجام می‌شود، و همچنین حذف مسیر انتقال قند لاکتوز از فضای پری پلاسمی به فضای سیتوپلاسمی، تغییری در میزان تولید زیست توده ایجاد نکرد. مهم‌ترین واکنش در مسیر سوخت و ساز قند لاکتوز، واکنش انتقال قند لاکتوز از فضای خارج سلولی به فضای پری پلاسمی و یا به عبارت دیگر ورود قند لاکتوز به درون باکتری *اشرشیاکولی* است. در این پژوهش مشاهده شد که با حذف این مسیر، ورود قند لاکتوز متوقف گردید و تولید زیست توده باکتری *اشرشیاکولی* برابر با صفر شد. نتایج حاصل از مدل‌سازی نشان داد که نرخ تولید زیست توده باکتری *اشرشیاکولی* در شرایط بی-هوازی کمتر از مقدار محاسبه شده در شرایط هوازی و برابر با ۱/۰۱۵۲ mmol/gDW/h بود. در مقایسه با تولید زیست توده در شرایط هوازی، در شرایط بی-هوازی، شار ورودی مربوط به ورود دی اکسید کربن به باکتری *اشرشیاکولی* افزایش یافت. این مسیر توسط ژن‌های کنترل کننده‌ی انتقال مواد از خارج به داخل باکتری *اشرشیاکولی* کنترل می‌شوند. همچنین در شرایط بی‌هوازی، سایر شارهای ورودی و تولید استات کاهش پیدا کرد اما تولید اتانول افزایش یافت

Archive of SID

www.SID.ir

که این می‌تواند محصول تخمیر بی‌هوازی قند مصرفی در نبود اکسیژن باشد (۲۰). بررسی شارهای خروجی نشان داد که باکتری *اشرشیاکولی* برخلاف شرایط هوازی، در شرایط بی‌هوازی از سوکسینات و متانول نیز مصرف می‌کند. بررسی شارهای متابولیکی داخلی نشان داد که در محیط کشت حاوی گلوکز و در شرایط بی‌هوازی، فعالیت مسیرهای گلیکولیز و تری کربوکسلیک اسید بیشتر شده و فعالیت مسیر پنتوز فسفات کمتر شده است. تولید زیست توده در محیط حاوی استات و در شرایط هوازی با محدودیت چرخه‌ی تری کربوکسلیک اسید مواجه بود. جهت بررسی میزان انرژی در دسترس باکتری در محیط ورم پستان، بیشینه‌ی تولید کوفاکتورهای NADPH، NADH و ATP از قند لاکتوز در شرایط هوازی و بی‌هوازی محاسبه شدند. محاسبات نشان داد که بیشینه‌ی تولید ATP برابر با ۱۷ مول به ازای مصرف یک مول پیروات حاصل از قند لاکتوز بود. این مقدار برای یک مول گلوکز تولید شده از لاکتوز، در محیط ورم پستان ۳۶/۷۵ مول محاسبه شد. جهت بررسی انرژی‌زایی لاکتوز، میزان انرژی تولید شده برای باکتری در محیط گلوکز و لاکتوز، در شرایط هوازی و بی‌هوازی محاسبه شد. بیشینه‌ی تولید - NADH و NADPH در جدول ۵ نشان داده شده است. با استفاده از تحلیل حساسیت شبکه (Network sensitivity analysis)، میزان حساسیت تابع هدف (تولید زیست توده) نسبت به تغییرات میزان پیش ماده‌ی مورد استفاده (لاکتوز) جهت رشد باکتری بررسی شد. جهت مقایسه و بررسی عملکرد باکتری، تولید زیست توده در دو محیط قند گلوکز و لاکتوز محاسبه گردید. نتایج نشان داد که میزان تولید زیست توده باکتری در حضور قند لاکتوز دو برابر تولید زیست توده در محیط گلوکز بود (نگاره‌ی۱). باکتری *اشرشیاکولی* دارای چهار نوع سم در دیواره‌ی سلولی خود بوده و بیماری زایی باکتری به دلیل آزادسازی همزمان چهار نوع سم داخلی از جنس لیپوپلی ساکارید مشتق شده از دیواره‌ی سلولی باکتریایی می-باشد. میزان تولید هر چهار نوع سم از یک مول قند لاکتوز به طور جداگانه مورد محاسبه قرار گرفت تا بیشترین توان باکتری در تولید سم مورد بررسی قرار بگیرد. میزان سم تولید شده در شرایط هوازی بیشتر از شرایط بی‌هوازی بوده و میزان تولید اندوتوکسین ۱ و ۲ در هر دو شرایط هوازی و بی‌هوازی بیشتر از نوع ۳ و ۴ است. با توجه به میزان سم تولید شده، ژن‌های کنترل کننده‌ی مسیرهای تولید سم از اهمیت بالایی جهت کاندید شدن برای اهداف دارویی برخوردارند. پس از شناسایی ژن‌های مربوط به واکنش‌های تولید سم، توالی ژن‌ها در پایگاه داده‌ی مرکز ملی اطلاعات زیست فنآوری NCBI جست و جو شد. با مراجعه به بانک دارو مشخص شد که برای ژن‌های LpxM, solAZnuA و ZnuB هیچ گونه دارویی طراحی نشده است (جدول ۶). این ژن‌ها می‌توانند در پژوهش‌های دارویی مورد کنکاش بیشتری قرار گیرند. با توجه به اطلاعات ژنی موجود در مدل مدلiJO۱۳۶۶، مجموعه‌های ژنی چندتایی موثر در متابولیسم لاکتوز شناسایی شدند. مجموعه-های چند ژنی، اغلب در واکنش‌های بسیار زیادی درگیر هستند. جهت تعیین اثر مجموعه‌های ژنی، حذف چندتایی ژن انجام شد. مشخص شد که حذف همزمان ژن‌های ompF، ompN، PhoE و ompC در شرایط هوازی و در محیط کشت حاوی قند لاکتوز، روی تولید زیست توده اثرگذار بوده و نرخ تولید زیست توده باکتری *اشرشیای کلی* را صفر می‌کند.

Archive of SID

www.SID.ir

ژن‌های حذف شده یعنی ompF، ompN، PhoE و ompC در زیر سامانه‌های انتقال مواد از خارج باکتری *اشرشیاکولی* به داخل آن و در بازیابی نوکلئوتیدها دخالت دارند. نتایج نشان داد که با حذف چندتایی چهار ژن ompF ,ompN, PhoE و ompC امکان متوقف کردن تولید زیست توده باکتری *اشرشیاکولی* وجود دارد. پس از شناسایی ژن‌های موثر بر تولید زیست توده و نقش زیستی مهم آن‌ها، با مراجعه به پایگاه داده NCBA توالی هر کدام از ژن‌ها استخراج شد. سپس با مراجعه به بانک دارو (https://www.drugbank.ca/) توالی‌های مورد نظر برای وجود دارو جستجو گردید. نتایج نشان داد هیچ دارویی در ارتباط با ژن‌های PhoE, galK و wcaK ثبت نشده است. همچنین هیچ دارویی نیز جهت اثر همزمان بر چهار ژن موثر بر تولید زیست توده ثبت نشده است.

جدول۱- فهرست پیش ماده‌های معرفی شده به مدل IJO1366 جهت اعتبار سنجی محاسبات

متابولیت	واکنش تبادلی	متابولیت	واکنش تبادلی
استات	EX_ac(e)	اتانول	EX_etoh(e)
استالدئید	EX_acald(e)	فروکتوز	EX_fru(e)
آلفا کتو گلوتارات	EX_akg(e)	فومارات	EX_fum(e)
گلوتامین	EX_gln-L(e)	مالات	EX_mal-L(e)
گلوتامات	EX_glu-L(e)	پیروات	EX_pyr(e)
لاکتات	EX_lacD(e)	سوکسینات	EX_succ(e)

جدول ۲- اجزاء تابع هدف به کار رفته جهت تولید زیست‌توده، با واحد (MMOL GDW-1)

0.000223 10fthf[c] + 2.6e-005 2fe2s[c] + 0.000223 2ohph[c] + 0.00026 4fe4s[c] + 0.51369 ala-L[c] + 0.000223 amet[c] + 0.29579 arg-L[c] + 0.24105 asn-L[c]+ 0.24105 asp-L[c] + 54.1248 atp[c] + 0.000122 bmocogdp[c] + 2e-006 btn[c] + 0.005205 ca2[c] + 0.005205 cl[c] + 0.000576 coa[c] + 2.5e-005 cobalt2[c] + 0.13351 ctp[c] + 0.000709 cu2[c] + 0.09158 cys-L[c] + 0.026166 datp[c]+ 0.027017 dctp[c] + 0.027017 dgtp[c] + 0.026166 dttp[c] + 0.000223 fad[c] + 0.006715 fe2[c] + 0.007808 fe3[c] + 0.26316 gln-L[c] + 0.26316 glu-L[c]+ 0.61264 gly[c] + 0.2151 gtp[c] + 48.6015 h2o[c] + 0.094738 his-L[c]+ 0.29053 ile-L[c] + 0.19519 k[c] + 0.45053 leu-L[c] + 0.34316 lys-L[c]+ 0.15369 met-L[c] + 0.008675 mg2[c] + 0.000223 mlthf[c] + 0.000691 mn2[c] + 7e-006 mobd[c] + 0.001831 nad[c] + 0.000447 nadp[c] + 0.013013 nh4[c]+ 0.000323 ni2[c] + 0.017868 pe160[c] + 0.054154 pe161[c] + 0.18527 phe-L[c] + 0.000223 pheme[c] + 0.22106 pro-L[c] + 0.000223 pydx5p[c] + 0.000223 ribflv[c] + 0.21579 ser-L[c] + 0.000223 sheme[c]+ 0.004338 so4[c] + 0.000223 thf[c] + 0.000223 thmpp[c] + 0.25369 thr-L[c] + 0.056843 trp-L[c] + 0.1379 tyr-L[c] + 5.5e-005 udcpdp[c] + 0.1441 utp[c]+ 0.42316 val-L[c] + 0.000341 zn2[c] + 0.019456 kdo2lipid4[e]+ 0.013894 murein5px4p[p] + 0.045946 pe160[p] + 0.02106 pe161[p] -> 53.95 adp[c] + 53.95 h[c] + 53.9457 pi[c] + 0.7739 ppi[c]

جدول-۳ مهمترین واکنش‌های داخلی بهینه در شرایط هوازی

نام واکنش	اسم بیوشیمیایی واکنش
UDPG4E	یوریدیل دی فسفوگالاکتوز اپی‌مراز
GALKr	گالاکتوکیناز
LACZ	بتا-گالاکتوکیناز
LCTStex	انتقال لاکتوز از خارج سلولی به فضای پری‌پلاسمی
LCTStpp	انتقال لاکتوز از فضای پری‌پلاسمی به سیتوپلاسمی
PGMT	فسفوگلوکوموتاز
UGLT	یوریدیل دی فسفوگلوکز-هگزوز-۱ فسفات یوریدیل ترانسفراز

جدول-۴ مقدار تولید زیست توده پس از حذف هر واکنش داخلی بهینه- محیط لاکتوز، شرایط هوازی

نام واکنش	اسم بیوشیمیایی واکنش	تولید زیست توده
LACZ	بتاگالاکتوزیداز	۲/۰۱۵۵
LCTStpp	انتقال لاکتوز از فضای پری پلاسمی به سیتوپلاسمی	۲/۰۱۵۵
PGMT	فسفوگلوکوموتاز	۱/۷۹۸۳
GALKr	گالاکتوکیناز	۱/۴۵۵۴
UDPG4E	یوریدیل دی فسفوگلوکز- اپی مراز	۱/۴۵۵۴
UGLT	یوریدیل دی فسفو-گلوکز- فسفات یوریدیل ترانسفراز	۱/۴۵۵۴
LCTStex	انتقال لاکتوز از فضای خارج سلولی به پری پلاسم	۰/۰۰

جدول-۵ بیشینه‌ی تولید NADH و NADPH از گلوکز و لاکتوز در شرایط هوازی و بی‌هوازی (MMOL/GDW/H)

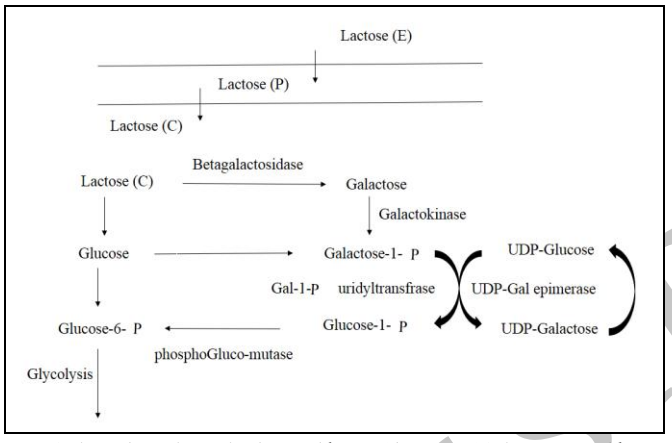
محدودیت‌ها	گلوکز		لاکتوز		کوفاکتور
	بی‌هوازی	هوازی	بی‌هوازی	هوازی	
انرژی، استوکیومتری	۶	۱۰	۱۱/۷۵	۲۰/۵	NADH
انرژی، استوکیومتری	۴	۹/۳۶	۷/۶۶	۱۸/۷۲	NADPH

Archive of SID

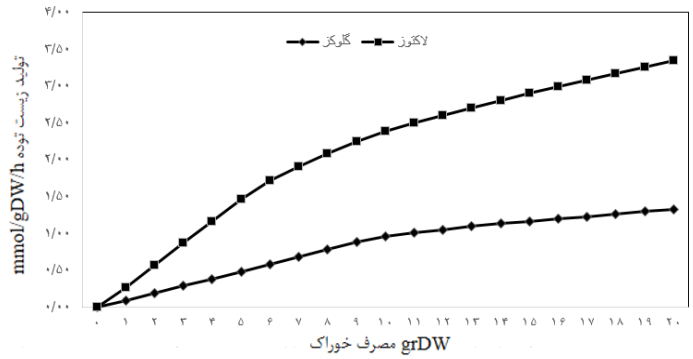
www.SID.ir

جدول-۶ ژن‌های کاندید برای اهداف دارویی-تولید سم در شرایط هوازی و بی‌هوازی

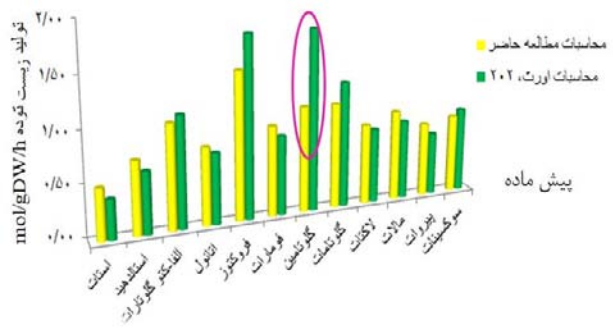
دارو	بی‌هوازی mmol/gDW/h	هوازی mmol/gDW/h	نام واکنش تولید کننده سم	ژن کد کننده
فاقد دارو	۱/۶۱۷۷	۱/۶۷۰۱	EDTX1	solA
فاقد دارو	۱/۶۱۷۷	۱/۶۷۰۱	EDTX2	lpxM
DB02379	۱/۵۶۵۵	۱/۶۱۰۱	EDTX3	glk
فاقد دارو	۱/۵۶۵۵	۱/۶۱۰۱	EDTX4	ZnuA, znuB



نگاره-۱ مسیر متابولیکی تبدیل لاکتوز به گلوکز-۶ فسفات در باکتری اشرشیاکولی



نگاره ۲- مقایسه‌ی تولید زیست توده از قند لاکتوز (در محیط ورم پستان) و گلوکز در شرایط هوازی



نگاره ۳ - تولید زیست توده از ۱۲ پیش‌ماده‌ی متفاوت در شرایط هوازی-گلوکز

بحث و نتیجه گیری

به طور کلی، میزان تولید زیست‌توده‌ی محاسبه شده در پژوهش حاضر با نتایج اورث و همکاران (۱۶) تفاوت زیادی نداشتند. با توجه به متفاوت بودن تولید زیست توده از پیش‌ماده‌ی گلوتامین در این پژوهش با پژوهش اورث و همکاران (۱۶) می‌توان چنین

www.SID.ir

تفسیر کرد که این امر می‌تواند ناشی از تفاوت ضریب این متابولیت در توابع هدف دو پژوهش باشد. به طور کلی ساختن تابع هدف در تحلیل تعادل شارمتابولیکی، بسیار سخت و زمانبر است و نیاز به آزمایش‌های زیاد زیستی دارد. به نظر می‌رسد تفاوت در تولید زیست توده در این دو پژوهش ناشی از تمایل بیشتر تابع هدف مورد استفاده در مدل پژوهش (۱۶) به تولید زیست توده از گلوتامین باشد. حذف مسیر تبدیل قند لاکتوز به گلوکز و گالاکتوز که با استفاده از آنزیم بتاگالاکتوزیداز انجام می‌شود تغییری در تولید زیست توده ایجاد نکرد که دلیل این امر می-تواند ناشی از وجود احتمالی سایر مسیرهای متابولیک با فعالیت مشترک باشد. ساختار متابولیکی باکتری اشرشیاکولی ساز و کار تنظیمی بسیار پیچیده-ای دارد. انتقال پروتون در دو سوی غشای باکتری اشرشیاکولی، بواسطه گرادیانت حاصله، باعث انتقال قند لاکتوز از فضای پری پلاسمی به فضای سیتوپلاسمی می‌شود. در صورتی که این مسیر مسدود شود باکتری اشرشیاکولی جهت تامین انرژی خود، در فضای پری‌پلاسمی قند لاکتوز را شکسته و گلوکز و گالاکتوز حاصل از تجزیه آن را به طور جداگانه به درون فضای سیتوپلاسمی وارد کند. بنابراین، پس از حذف مسیر تولید آنزیم بتا گالاکتوزیداز، باکتری با تولید آنزیم آلفا گالاکتوزیداز قند لاکتوز سیتوپلاسمی را به گلوکز و گالاکتوز تبدیل می‌کند. این امر باعث مسدود شدن آنزیم بتاگالاکتوزیداز می‌شود که می‌تواند تاثیری بر میزان تولید زیست توده باکتری اشرشیاکولی نداشته باشد (۸). همچنین مشاهده شد که با حذف مسیر مسیر انتقال قند لاکتوز از فضای خارج سلولی به فضای پری پلاسمی، تولید زیست توده باکتری برابر با صفر گردید. کنترل این مسیر توسط ژن‌های مربوط به زیر سامانه انتقال پورین‌های خارج غشایی و LACY انجام می‌شود (۸). متوسط تولید شیر یک گاو شیری در طول روز بین ۴۵-۳۵ کیلوگرم است و میزان قند لاکتوز موجود در شیر ۴/۵ درصد است. با توجه به ترکیبات و میزان عناصر معدنی موجود در شیر، نیاز غذایی جهت تولید زیست توده و تکثیر باکتری اشرشیاکولی به خوبی فراهم شده و پیش‌بینی مدل برای میزان تولید زیست توده باکتری اشرشیاکولی قابل توجیه است. باکتری اشرشیاکولی در هر ۲۰ دقیقه یک تقسیم انجام می‌دهد. با توجه به حجم زیست توده‌ی تولید شده، انتظار می‌رود پس از مدت کوتاهی باکتری در حباب‌چه‌ها تکثیر یافته و دام نشانه‌های بیماری را به سرعت نشان دهد (۱۶). تولید این میزان از زیست توده می‌تواند توجیه خوبی برای بیماری‌زایی سریع اشرشیاکولی در محیط پستان گاو شیری باشد. لذا می‌توان با بررسی ژن‌های ایجاد کننده‌ی آنزیم‌های مربوط به مسیر ورود قند لاکتوز، اقدامات مناسبی را جهت کاهش و یا حتی توقف ورم پستان ناشی از اشرشیاکولی انجام داد. جهت مقایسه‌ی عملکرد باکتری اشرشیاکولی در دو شرایط هوازی و بی‌هوازی، بهینه سازی تولید زیست توده باکتری اشرشیاکولی در شرایط بی‌هوازی نیز انجام گرفت. محاسبات نشان داد که نرخ تولید زیست توده باکتری در شرایط بی‌هوازی کمتر از مقدار محاسبه شده در شرایط هوازی و برابر با ۱/۰۱۵۲ mmol/gDW/h بود. توزیع شارها در این حالت نشان داد که واکنش‌های بدون شاردر مدل iJO۱۳۶۶ افزایش پیدا کرده است. شارهای تبادلی بهینه، نشان دهنده‌ی بهترین میزان شار برای بهترین تولید زیست توده باکتری اشرشیاکولی در شرایط بی‌هوازی است. شار ورودی واکنش‌های

Archive of SID

www.SID.ir

تبادلی در شرایط بی‌هوازی، در مقایسه با شرایط هوازی کاهش پیدا کرد. این وضعیت در یافته‌های دیگر محققان نیز مورد تاکید قرار گرفته است (۲۰). شارهای کاهش یافته در شرایط بی‌هوازی مربوط به زیر سامانه‌های انتقال مواد، بازیابی اسیدهای نوکلئیک، زیست-ساخت کوفاکتورها و زیست-ساخت لیپید و سایر مسیرها بودند. محاسبات تولید انرژی از قند لاکتوز در محیط هوازی نشان داد میزان کوفاکتورهای تولید شده در حضور قند لاکتوز دو برابر قند گلوکز است. به این ترتیب انتظار می‌رود باکتری در محیط حاوی قند لاکتوز نسبت به محیط حاوی قند گلوکز تولید زیست توده دو برابری داشته باشد. از این جهت انتظار می‌رود تولید زیست توده باکتری در حباب‌چه‌ی پستان گاو شیری بسیار سریع بوده و دام به سرعت نشانه‌های بیماری را نشان خواهد داد. با بررسی میزان حساسیت تابع هدف (تولید زیست توده) نسبت به تغییرات میزان پیش ماده‌ی مورد استفاده (لاکتوز)، نتایج نشان داد که تولید زیست توده با افزایش مقادیر پیش ماده افزایش می‌یابد که با یافته‌های بلاتنر و همکاران (۳) همخوانی دارد. در این شرایط باکتری وارد گامه رشد لگاریتمی می‌شود. در گامه رشد لگاریتمی، تولید زیست توده باکتری اشرشیاکولی سریع است چرا که منابع غذایی مورد نیاز به خوبی از محیط اطراف تامین شده است (۲۰). همچنین تولید سریع زیست توده، می‌تواند ناشی از انرژی زیادی باشد که قند لاکتوز در دسترس باکتری اشرشیاکولی قرار داده است. این میزان رشد باکتری اشرشیاکولی به خوبی بیماری‌زایی سریع باکتری را توجیه می‌کند. با توجه به تقسیم سلولی سریع باکتری اشرشیاکولی و داشتن این میزان تولید زیست توده، باکتری اشرشیاکولی به سرعت می‌تواند نشانه‌های بیماری ورم پستان را ایجاد کند. قند لاکتوز به دلیل دی ساکارید بودن، نسبت به گلوکز و سایر منوساکاریدها انرژی زیادی را برای ریزسازواره‌ها جهت بیماری زایی و رشد باکتری فراهم می‌کند (۱۶). باکتری اشرشیاکولی در شرایط هوازی سم بیشتری را در حضور قند لاکتوز نسبت به شرایط غیرهوازی در فضای داخل گویچه پستان، تولید خواهد کرد. نتایج حاصل از حذف واکنش نشان داد که مهم‌ترین راه جهت جلوگیری از تولید زیست توده باکتری اشرشیاکولی در پستان گاو شیری جلوگیری از ورود قند لاکتوز به درون باکتری است. با توجه به این‌که امکان حذف قند لاکتوز از شیر وجود ندارد، مهم‌ترین راه پیشگیری از بروز بیماری ورم پستان ناشی از اشرشیاکولی، می‌تواند جلوگیری از ورود قند لاکتوز به درون باکتری اشرشیاکولی باشد. لذا داروهایی که بتوانند مسیر انتقال لاکتوز به داخل باکتری اشرشیاکولی را مختل کنند، می‌توانند در کاهش ورم پستان نقش عمده‌ایی ایفا کنند.

منابع

1. J.K. Holland, J.C. Hadrich, C.A. Wolf, and J. Lombard (2015). Economics of Measuring Costs Due to Mastitis-Related Milk Loss. Selected paper prepared for presentation at the 2015 AAEA& WAEA Joint Annual Meeting,San Francisco, California, July 26-28.
2. T. Halasa , K. Huijps , O. Østerås & H. Hogeveen. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review, *Veterinary Quarterly*, **29**:1, 18-31.
3. Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **277**:1453-1462.
4. Blowey, R., Edmondson, P. (1995). Mastitis control in dairy herds. *Farming Press*, **5**:46-76.

Archive of SID

www.SID.ir

selected organic compounds. *Applied microbiology*, **15**: 1332-1338.
15. Millard, P. (2012). Role of the Csr system in carbon nutrition and in the control of central metabolism in *Escherichia coli* K-12 MG1655 and Nissle, Doctoral dissertation, Toulouse, INSA).
16. Nissen, T.L., Schulze, U., Nielsen, J., Villadsen, J. (1997). Flux Distributions in Anaerobic, Glucose-Limited Continuous Cultures of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiology*, **143**:203.
17. Nogales, J., Bernhard, O.P., Thiele, I. (2008). A genome-scale metabolic reconstruction of *Pseudomonas putida* KT2440: iJN746 as a cell factory. *BMC systems biology*, **2**: 79-90
18. Orth, J.D. 2012. Systems biology analysis of *Escherichia coli* for discovery and metabolic engineering. PhD Thesis. UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SAN DIEGO.
19. Sauer, U.W.E., Lasko, D,R,, Fiaux. J, Hochuli, M., Glaser, R. Szyperski, T. Bailey, J.E. (1999). Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of *Escherichia coli* central carbon metabolism. *Journal of bacteriology*, **181**:6679-6688.
20. Stelling, J., Klamt, S., Bettenbrock, K., Schuster, S., Gilles, E.D. (2002). Metabolic network structure determines key aspects of functionality and regulation. *Nature*, **420**: 190-193.
21. Tamiru, F., Alemu, S., Tsega, A. (2013). Aerobic Microorganisms Isolated from Mastitic Bovine Milk and Their Antimicrobial Susceptibility Profiles, Ethiopia. *Agriculture and Environmental Science*, **13**: 920-925.
5. Christel Nielsen. 2009. Economic Impact of Mastitis in Dairy Cows. Doctoral, Doctoral Thesis. Department of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences ,Uppsala.
6. Burgard, A.P., Maranas, C.D. (2001). Probing the performance limits of the *Escherichia coli* metabolic network subject to gene additions or deletions. *Biotechnology and bioengineering*, **74**: 364-375.
7. Boudonck, K.J., M.W. Mitchell., J. Wulff, and J.A. Ryals. (2009). Characterization of the biochemical variability of bovine milk using metabolomics. *Metabolomics*, **5**: 375-386.
8. Elbein, A., & Heath, E. C. (1965). The biosynthesis of cell wall lipopolysaccharide in *Escherichia coli* I. The biochemical properties of a uridine diphosphate galactose 4-epimeraseless mutant. *Journal of Biological Chemistry*, **5**: 1919-1925.
9. H.N. Costa, L.R. Molina, C.F.A. Lage, V.M.R. Malacco , E.J. Facury Filho, A.Ú. Carvalho. (2017). Comparison of two methodologies to estimate losses of milk production in crossbred Holstein x Zebu cows with sub-clinical mastitis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **69**:579-586.
10. Famili, I., Forster, J., Fu, P. (2003). Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Research*, **13**:244–253.
11. Gianchandani, J.E., Lee, J.M. (2006). Papin Flux balance analysis in the era of metabolomics. *Briefings in bioinformatics*, **7**:140-150.
12. Lee, J.H., Oh, K.K., Kim, E.K., Kwack, K., Jung, S., Lee, H.K. (2006). Radiologic and clinical features of idiopathic granulomatous lobular mastitis mimicking advanced breast cancer. *Yonsei medical journal*, **47**:78-84.
13. Majewski, R.A., and Domach, M.M. (1990). Simple constrained optimization metabolism. *Biotechnology Progress*, **21**: 1617–1626.
14. Mayberry, W.R., Prochazka, G.J. Payne, W.J. (1967). Growth yields of bacteria on

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 13, Issue 1, 2017

Insilico Systems Biology Explorations of *Escherichia Coli*'s Metabolic Network and Its Application in Mastitic Dairy Cattle

Hashemi, L.[1], Ghaderi-Zefrehei, M.[2]*, Naghiah, R.[3]

1.MSc Student in Animal Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran
2. Assistance Professor in Systems Biology, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

3. Assistance Professor in Bacteriology, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

Received Date: 2 July 2016 *Accepted Date: 8 June 2017*

Abstract

Mastitis is an important disease that could turn up in both milking and dry off periods in dairy cattle. Considering the importance of Escherichia coli in causing microbial mastitis, this study in an Insilico way was undertaken to investigate the amount of biomass, toxin production and to identify genes affecting on Escherichia coli growth in both aerobic and anaerobic conditions in alveoli of mastitis dairy cow. The optimum rate of Escherichia coli growth or biomass production adopting aerobic condition was 2.0155 millimoles per gram dry weight per hour (mmol/gDW/h) but in anaerobic condition this value was 1.0152 mmol/gDW/h. The most toxin production was obtained in aerobic condition (1.6701 mmol/gDW/h). This substantial amount of biomass production could be a great indicative of rapid growth of Escherichia coli and therefore, inflicting the mastitis in dairy cow. Multiple gene deletion indicated that four genes ompF, ompN, PhoE and ompC brought about of stopping biomass production. Also, it was indicated that solA, LpxM ،ZnuA and znuB genes are suitable drug targets for reducing or stopping toxin production in Escherichia coli.

Keywords: Escherichia Coli, Biomass, Gene deletion, Mastitis, Toxin

**Corresponding author: Ghaderi-Zefrehei, M.*
Address: Genetics and Animal Science Department, Agriculture Faculty, Yasouj University, Pasdaran Ave., Yasouj, Iran.Tel: +98 741 222 4840
Email: mghaderi@yu.ac.ir,

Archive of SID

www.SID.ir