



Identification of Genetic and Protein Markers in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by Bioinformatic Analyses for the Purpose of Diagnosis and Treatment

Mojdeh Amandadi, Hadi Ravan, Mehdi Hassanshahian

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2016/05/08
Accepted: 2016/08/15
Available online: 2017/09/12

Article Subject:

Molecular Microbiology

IJMM 2017; 11(4): 21-34

Corresponding author:

Dr. Hadi Ravan

Department of Biology,
Faculty of Science, Shahid
Bahonar University of
Kerman, Kerman, Iran

Tel: 0983433257432

Email:

Ravan@uk.ac.ir

Abstract

Background and Aims: *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* is one of the common causes of food poisoning in human. Since the selection of appropriate markers is one of the main challenges for the detection of this pathogen, in the current study, genetic markers of this serovar were screened using bioinformatical tools. In the second phase, structure and function of proteins encoded by these markers, were determined.

Materials and Methods: This study was conducted between 2016 and 2017. In order to find the genetic markers of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, 45 complete genomes belonging to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and the other genera of *Enterobacteriaceae* family were compared using Mauve software. To determine the structure and function of proteins encoded by these sequences, I-TASSER and Phyre2 software beside CDD, Inter Pro Scan, DALI, and Pro Func databases were used for structural and functional modeling, respectively.

Results: Special regions of *STM4491-STM4496* genes were determined as specific markers for *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. The function of proteins encoded by these markers were proposed to be classified in five groups, including Lon protease, nucleotide binding proteins, nucleotide three phosphatases (NTP), proteins involved in the DNA repair, and DNA methylase.

Conclusions: Specific regions of *STM4491-STM4496* genes can be used as effective diagnostic targets for the detection of pathogenic *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. Moreover, proteins encoded by these genes can be suggested as suitable targets for the design of new therapeutic agents to prevent and treat the infections caused by this pathogen.

KeyWords: *Salmonella typhimurium*, Specific markers, Protein structure modeling

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Amandadi M, Ravan H, Hassanshahian M. Identification of Genetic and Protein Markers in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by Bioinformatic Analyses for the Purpose of Diagnosis and Treatment. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (4): 21-34



شناسایی مارکرهای ژنتیکی و پروتئینی سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی با رویکرد تشخیص و درمان مژده اماندادی، هادی روان، مهدی حسن شاهیان

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم یکی از علل شایع مسمومیت‌های غذایی در انسان می‌باشد. با توجه به این‌که انتخاب مارکرهای مناسب یکی از چالش‌های اصلی روش‌های تشخیصی ارائه‌شده برای این پاتوژن می‌باشد، در مطالعه حاضر، با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی، مارکرهای ژنتیکی این سرووار به‌عنوان اهداف تشخیصی مناسب غربال گردید. در فاز دوم کار، ساختار و عملکرد پروتئین‌های کد شده به‌وسیله این مارکرها تعیین شد.

مواد و روش کار: این مطالعه در سال ۹۶-۱۳۹۵ اجرا گردید. به‌منظور یافتن مارکرهای ژنی سالمونلا تیفی موریوم، ۴۵ ژنوم کامل سرووار سالمونلا تیفی موریوم و سایر جنس‌های خانواده/انتروباکتریاسه با استفاده از نرم‌افزار Mauve مورد مقایسه قرار گرفتند. به‌منظور تعیین ساختار و عملکرد پروتئین‌های مربوط به این توالی‌ها به ترتیب از نرم‌افزارهای I-TASSER و Phyre2 برای مدل‌سازی ساختاری و از پایگاه‌ها و نرم‌افزارهای CDD، InterProScan، DALI و ProFunc برای تعیین عملکرد استفاده شد.

یافته‌ها: نواحی خاصی از ژن‌های *STM4491-STM4496* به‌عنوان مارکرهای اختصاصی سالمونلا تیفی موریوم تعیین شدند. عملکرد پروتئین‌های مربوط به این ژن‌ها در ۵ گروه شامل *Lon* پروتئازها، پروتئین‌های متصل‌شونده به نوکلئوتید، *NTPase* ها، پروتئین‌های درگیر در مسیر ترمیم *DNA* و *DNA* متیلازها پیش‌بینی شد.

نتیجه‌گیری: نواحی اختصاصی از ژن‌های *STM4491-STM4496* می‌توانند به‌عنوان اهداف تشخیصی کارآمد برای شناسایی سرووار بیماری‌زای سالمونلا تیفی موریوم مورد استفاده قرار گیرند. علاوه بر این، پروتئین‌های کد شده به‌وسیله این مارکرها می‌توانند به‌عنوان اهدافی مناسب در طراحی عوامل درمانی جدید در پیشگیری و درمان عفونت‌های ناشی از این پاتوژن پیشنهاد شوند.

کلمات کلیدی: سالمونلا تیفی موریوم، مارکرهای اختصاصی، مدل‌سازی ساختار پروتئین

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۸
پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۴
انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۶/۲۱
موضوع:
میکروبی شناسی مولکولی
IJMM 1396; 11(4): 21-34
نویسنده مسئول:

دکتر هادی روان

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم،
دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان،
ایران

تلفن: ۰۹۸۳۴۳۲۲۵۷۴۳۲

پست الکترونیک:

Ravan@uk.ac.ir

مقدمه

اطلاعات به‌دست‌آمده از این طریق می‌تواند در تهیه محیط کشت‌های اختصاصی، شناسایی مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک و بیماری‌زایی، کشف اهداف دارویی و فهم میان‌کنش بین عوامل بیماری‌زا و میزبان مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این، دسترسی به توالی‌های ژنومی متعدد، به ما توانایی شناسایی شباهت‌ها و تفاوت‌ها در سطوح مختلف ارگانیسم‌ها را می‌دهد که این امر می‌تواند منجر به شناسایی مارکرهای ژنی اختصاصی، به‌عنوان اهداف تشخیصی برای روش‌های مولکولی شود (۱).

تاکنون بیش از ۱۰۰۰ ژنوم باکتریایی و ۳۰۰۰ ژنوم ویروسی به‌عنوان پاتوژن‌های انسانی تعیین توالی شده‌اند. دسترسی به این توالی‌های ژنومی و پیشرفت‌های صورت گرفته در روش‌ها و ابزارهای بیوانفورماتیکی موجود برای آنالیز آن‌ها انقلاب عظیمی را در زمینه میکروبیولوژی و تشخیص و درمان بیماری‌های عفونی ایجاد کرده است. به‌عنوان مثال، امروزه با استفاده از روش‌ها و ابزارهای بیوانفورماتیکی و بر اساس ژنوتیپ می‌توان ویژگی‌های فنوتیپی خاص یک پاتوژن را استنباط نمود.

پروتئینی تعیین ساختار شده، ضرورت تعیین ساختار سه بعدی پروتئین‌ها بیش از پیش آشکار شده است. تعیین ساختار سه بعدی پروتئین‌ها با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی، به دلیل نرخ بالای شکست در این فرایند، مراحل طاقت‌فرسای خالص‌سازی و تهیه بلور و گران‌قیمت و وقت‌گیر بودن این روش‌ها یک چالش بزرگ می‌باشد. امروزه توسعه و به‌کارگیری مجموعه‌ای از روش‌های محاسباتی جدید و قابل‌اعتماد یک جنبه مهم برای حل چالش تفسیر عملکردی پروتئین‌ها می‌باشد (۱۸). از این رو تاکنون روش‌های محاسباتی بسیاری مبتنی بر *Comparative modeling* (برای توالی‌های دارای الگوی هومولوگ نزدیک)، *Threading* (برای توالی‌های دارای الگوی هومولوگ دور) و *Ab initio* (برای توالی‌های فاقد الگوی هومولوگ) به‌منظور پیش‌بینی ساختار سه بعدی توالی‌های پروتئینی ارائه شده است که در واقع روش‌های دوم و سوم، مکمل روش کلاسیک تعیین ساختار بر اساس هومولوژی می‌باشند. تفسیر عملکردی پروتئین‌ها بر اساس ساختار سه بعدی نسبت به روش‌های مبتنی بر توالی آمینواسیدی قابل‌اعتمادتر است و برای تعیین عملکرد آنزیمی یا بیوشیمیایی آن‌ها کاربرد بیشتری دارد (۱۸). از این رو در مطالعه حاضر ما ساختار سه بعدی پروتئین‌های کد شده به وسیله مارکرهای ژنی باکتری *Salmonella typhimurium* تیفی موریوم را با استفاده از مجموعه قدرتمندی از ابزارهای بیوانفورماتیکی مدل‌سازی کرده و با استفاده از توالی و ساختار سه بعدی این پروتئین‌ها، عملکرد احتمالی آن‌ها را تفسیر نمودیم. برای این منظور، ابتدا جستجوی توالی‌های هومولوگ، دومن‌ها و موتیف‌های پروتئینی مربوط به این توالی‌ها انجام گرفت. سپس با استفاده از ابزارهای قدرتمندی از جمله *Phy2* و *I-TASSER* ساختار احتمالی پروتئین‌های موردنظر مدل‌سازی گردید و از بین ساختارهای مدل‌سازی شده بهترین ساختار انتخاب گردید (۱۹،۲۰). در نهایت عملکرد این پروتئین‌ها با استفاده از سرورهای *ProFunc* و *DALI* مورد پیش‌بینی قرار گرفت (۲۱،۲۲).

مواد و روش‌ها

ژنوم سویه LT2 از سرور *Salmonella typhimurium* با شماره دسترسی AE006468 به‌عنوان ژنوم مرجع انتخاب شد و با استفاده از نرم‌افزار *Mauve*، ژنوم این سویه در مقابل ۴۵ ژنوم باکتریایی متعلق به جنس‌های *E. coli*، *Citrobacter*، *Enterobacter*، *Klebsiella*، *Shigella* و سرورهای مختلف *Salmonella* موجود در پایگاه داده‌های NCBI (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Bacteria) الاینمنت

سرور بیماری‌زای *Salmonella typhimurium* تیفی موریوم یکی از پاتوژن‌های مهم و از علل شایع مسمومیت‌های غذایی در انسان می‌باشد. این پاتوژن، شایع‌ترین علت سالمونلوزیس یا عفونت‌های *Salmonella* می‌باشد که در موارد حاد می‌تواند منجر به عفونت خون و یا حتی مرگ شود (۲). با توجه به شیوع بالا و میزان خطر این پاتوژن در سرتاسر جهان و خصوصاً در کشورهای توسعه‌یافته، مطالعات گسترده‌ای بر روی این پاتوژن صورت گرفته است و بیومارکرهای متعددی برای شناسایی این پاتوژن شناسایی شده است (۱۰-۳). متأسفانه بسیاری از بیومارکرهای مورد استفاده جهت تشخیص این پاتوژن علاوه بر سرور *Salmonella typhimurium* تیفی موریوم با سایر سرورهای باکتریایی نیز هم‌پوشانی دارند و به دلیل عدم اختصاصیت کافی دچار چالش جدی شده‌اند. با توجه به محدودیت مذکور می‌توان گفت که انتخاب اهداف و یا مارکرهای مناسب جهت تشخیص پاتوژن‌ها یکی از چالش‌های اصلی روش‌های تشخیصی می‌باشد. امروزه با پیشرفت‌های صورت گرفته در روش‌های بیوانفورماتیکی، از جمله ظهور روش‌های قدرتمند مقایسه‌های ژنومی، آنالیز توالی‌های نوکلئوتیدی و ایجاد پایگاه داده‌های ژنتیکی جامع تا حدود بسیار زیادی چالش انتخاب مارکرهای ژنتیکی حل شده است (۱۱،۱۲). از جمله مطالعات بیوانفورماتیکی انجام شده بر روی این پاتوژن می‌توان به شناسایی ژن‌های بیماری‌زایی، ژن‌های مقاومت و جزایر بیماری‌زایی این سرور، تعیین نقش آن در بیماری التهاب روده و سرطان و شناسایی مارکرهای ژنتیکی جهت تشخیص آزمایشگاهی این پاتوژن اشاره نمود (۱۶-۱۳). همسو با این مطالعات، در مطالعه حاضر، ما سیستم ژنتیکی این سرور بیماری‌زا را با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی و مقایسه‌های ژنومی به‌طور کامل و دقیق مورد بررسی قرار داده و مارکرهای ژنتیکی اختصاصی مربوط به این سرور را غربال نمودیم. مطالعات اخیر بر روی پروتئین‌های کد شده به وسیله این مارکرهای ژنی بیان اختصاصی این پروتئین‌ها را در سویه‌های *Salmonella typhimurium* تیفی موریوم اثبات کرده است، اما در مورد ساختار و عملکرد این پروتئین‌ها تاکنون مطالعاتی صورت نگرفته است. تفسیر عملکردی توالی‌های پروتئینی موجود در ارگانسیم‌ها به‌منظور درک بهتر مکانیسم‌های بیماری‌زایی و مقاومت دارویی، طراحی دارو و کشف و غربال عوامل درمانی جدید در برابر پاتوژن‌ها امری ضروری می‌باشد (۱۷). علاوه بر این، تغییر و مهندسی پروتئین‌ها وابسته به فهم ساختار سه بعدی آن‌ها می‌باشد. امروزه با افزایش تعداد بسیار زیاد توالی‌های پروتئینی شناخته شده در برابر تعداد ناچیز توالی‌های

ارزیابی ساختاری

کیفیت شیمی فضایی ساختارهای مدل‌سازی شده پروتئین‌های موردنظر با استفاده از سرورهای آنالیز ساختاری WHATCHECK و VERIFY 3D مورد ارزیابی قرار گرفت و مدل نهایی برای هر پروتئین بر اساس به ترتیب، بالاترین میزان ERRAT، کمترین میزان خطا در WHATCHECK و بالاترین درصد VERIFY 3D انتخاب گردید (۲۶-۲۹). علاوه بر این، به منظور ارزیابی بیشتر، مدل‌های نهایی با استفاده از نرم‌افزار PROCHECK (انستیتو بیوانفورماتیک اروپا، انگلستان) مورد ارزیابی قرار گرفتند (۳۰).

آنالیز ساختاری

از آنجایی که در طی تکامل ساختار پروتئین‌های هومولوگ نسبت به توالی آن‌ها محافظت شده‌تر است، تفسیر عملکردی پروتئین‌ها بر اساس ساختار نسبت به تعیین عملکرد بر اساس توالی قابل‌اعتمادتر می‌باشد. از این رو در مطالعه حاضر به منظور آنالیز ساختاری پروتئین‌های مدل‌سازی شده و پیش‌بینی عملکرد احتمالی آن‌ها از سرورهای آنالیز ساختاری ProFunc و DALI استفاده گردید.

یافته‌ها

آنالیز مارکرهای ژنی سالمونلا تیفی موریوم

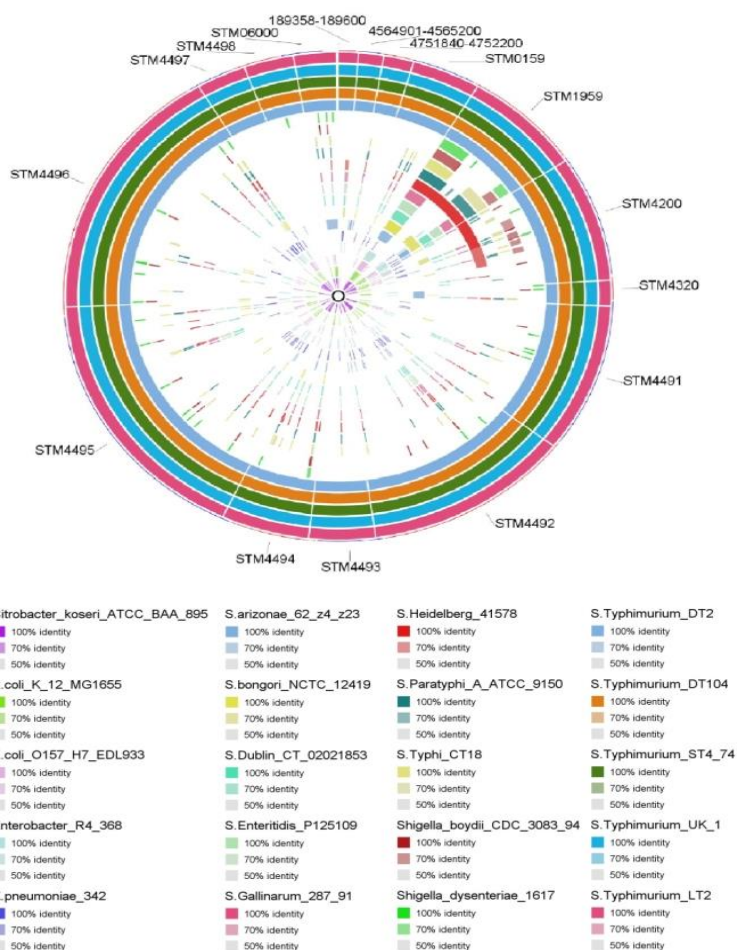
به منظور شناسایی مارکرهای ژنتیکی اختصاصی سرورار بیماری‌زای سالمونلا تیفی موریوم، ژنوم این باکتری در مقابل ۴۵ ژنوم باکتریایی متعلق به جنس‌های *E. coli*، *Citrobacter*، *Enterobacter*، *Klebsiella*، *Shigella* و سرورارهای مختلف *Salmonella* الاینمنت گردید. نتایج حاصل از این آنالیز اولیه وجود ۱۶ ناحیه اختصاصی را در ژنوم این باکتری نشان داد (شکل ۱ و جدول ۱). آنالیزهای بیشتر و دقیق‌تر ما بر روی این نواحی (جدول ۱) در پایگاه داده‌های WGS (Whole Genome Shotgun) نشان داد که ژن‌های *STM4497* و *STM4498* با نواحی ژنی از ژنوم‌های *Headelberg* (با شماره دسترسی LIK01000018 و LIKS01000142)، *Paratyphi B* (با شماره دسترسی LIKQ01000023 و *Saintpoul* (با شماره دسترسی ABAN01000009)، ژن *STM1959* با نواحی ژنی از ژنوم‌های *Kentucky* (با شماره دسترسی DQ838251) و *LHLR01000003*، ژن *STM4200* با نواحی ژنی از ژنوم‌های

(هم‌ردیف) گردید (۲۳). پس از غربال نواحی اختصاصی ژنوم سویه‌های سالمونلا تیفی موریوم، به منظور آنالیزهای بیشتر، توالی‌های DNA انتخابی با استفاده از نرم‌افزار Nucleotide BLAST (واقع در لینک http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=blastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasth) در مقابل دو پایگاه داده شامل Whole Genome Shotgun reads (WGS) (nr) و (ome) در مقابل دو پایگاه داده‌ها شامل Basic Local Alignment Search (BLAST) (Tool) با مقدار E. value $10e-30$ انجام گرفت و توالی‌هایی که با این مقدار E. value در تمامی ژنوم‌های سالمونلا تیفی موریوم مطابق و مشابه بودند به عنوان مارکرهای اختصاصی انتخاب شدند. در نهایت به منظور تعیین بهترین کاندید از بین توالی‌های به دست آمده از غربال دوم، آنالیز دقیق نواحی مختلف هر یک از این ژن‌ها در پایگاه داده‌های مختلف انجام شد.

به منظور آنالیز پروتئین‌های کد شده به وسیله مارکرهای ژنی سالمونلا تیفی موریوم، توالی‌های آمینواسیدی موردنظر از پایگاه داده‌های UniProt (<http://www.uniprot.org/>) دریافت شد و آنالیزهای BLAST و PSI-BLAST به منظور شناسایی توالی‌های هومولوگ انجام گردید. به منظور تشخیص موتیف‌ها و دومن‌های محافظت شده در این توالی‌های پروتئینی از پایگاه داده‌های InterProScan و CDD واقع در لینک <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml> استفاده گردید (۲۴). ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های موردنظر با استفاده از سرورهای Phyre2 (دانشگاه سلطنتی لندن، انگلستان) و I-TASSER (دانشگاه میشیگان، آمریکا) مدل‌سازی گردید. از بین ساختارهای مدل‌سازی شده، بر اساس بالاترین میزان C-score و TM-score که به ترتیب نشانگر میزان اطمینان و میزان شباهت مدل نهایی نسبت به الگوی اولیه می‌باشند یک ساختار از هر نرم‌افزار به عنوان مدل برتر انتخاب گردید. با توجه به اینکه مدل‌های پیش‌بینی شده به وسیله نرم‌افزار Phyre 2 (دانشگاه سلطنتی لندن، انگلستان) از لحاظ انرژی مینیمایز نشده‌اند، بنابراین ضروری است که میزان انرژی ساختارهای به دست آمده از این سرور از لحاظ انرژی مینیمایز شوند که برای این منظور از نرم‌افزار CHARMM-22 (دانشگاه مریلند، آمریکا) استفاده گردید (۲۵).

JREM01000003 دارای شباهت ۱۰۰ درصدی می باشند و بنابراین نمی توانند به عنوان مارکرهای اختصاصی برای سرووار سالمونلا تیفی موریوم در نظر گرفته شوند (جدول ۱).

Paratyphi B (با شماره دسترسی AOYG01000031) و *Derby* (با شماره دسترسی LHNPO1000054) و ژن *STM0159* با نواحی ژنی از ژنوم های *Saintpoul* (با شماره دسترسی LHJS01000003) و *Bareilly* (با شماره دسترسی



شکل ۱: الایمنت ژنوم های مختلف از جنس های مختلف *Citrobacter* و *Enterobacter Shigella Klebsiella E. coli Salmonella*. به منظور نشان دادن نتایج حاصل از مقایسه ژنومها (نتایج حاصل از نرم افزار Mauve) از BLAST Ring Image Generator استفاده شد. هر حلقه نشان دهنده یک ژنوم باکتریایی است. توزیع ژن های مختلف حاصل از غربال اولیه در تعدادی از ژنوم های خانواده *انترباکتریاسه* نشان داده شده است. به دلیل عدم وجود فضای کافی تنها هم ردیفی تعدادی از سویه ها نشان داده شده است

متعلق به خانواده *انترباکتریاسه* مورد بررسی قرار گرفت. به منظور یافتن بهترین ناحیه ژنی جهت شناسایی سویه های سالمونلا تیفی موریوم، نواحی مختلف این ژن ها با استفاده از پایگاه داده های مختلفی آنالیز گردید و نواحی که دارای کمترین شباهت با ژنوم های غیر از سالمونلا تیفی موریوم بودند به عنوان بهترین اهداف تشخیصی انتخاب شدند (شکل ۲). آنالیز دقیق توالی نوکلئوتیدی این ژن ها نشان داد که نوکلئوتیدهای ۹۵۴-۵۹۹ از

نتایج این غربال ژنتیکی نشان داد که تنها ژن های *STM4491-STM4496* (مطابق با سیستم نام گذاری ژنی ژنوم سالمونلا تیفی موریوم سویه LT2) برای این سویه اختصاصی می باشند. علاوه بر این، به منظور آنالیزهای بیشتر، توالی نوکلئوتیدی هر یک از ژن های *STM4491-STM4496* به طور دقیق آنالیز گردید و توزیع این ژن ها در ۵۰۰ ژنوم سالمونلا تیفی موریوم شامل ۲۱ ژنوم کامل و ۴۷۹ ژنوم WGS و سایر ژنوم های

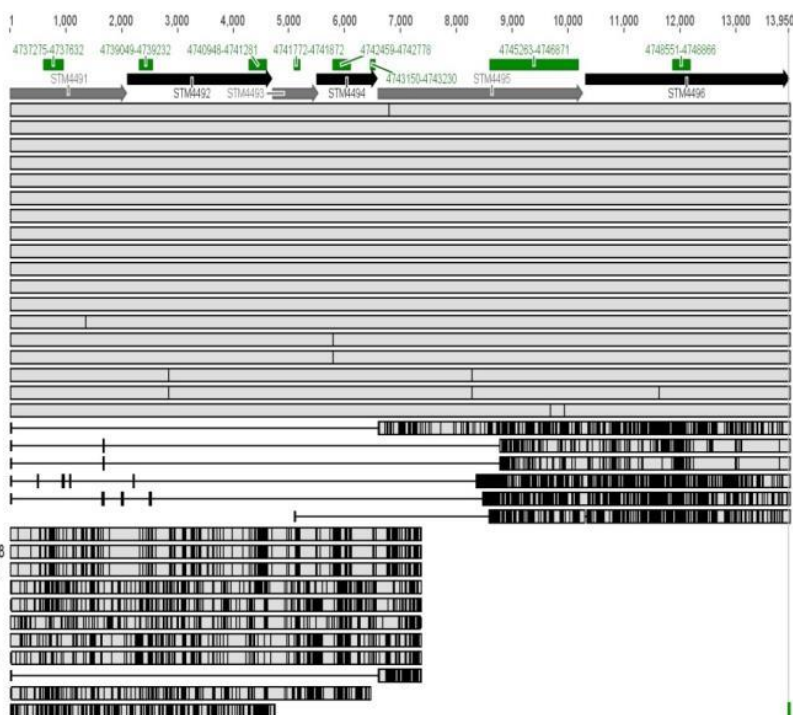
سالمونلا تیفی موریوم مشخص گردیدند (شکل ۲). با توجه به میزان تفاوت نوکلئوتیدی مارکرهای مذکور نسبت به توالی‌های ژنومی سویه‌های غیر از سالمونلا تیفی موریوم، ناحیه نوکلئوتیدی ۲۰۰۰-۳۶۰۹ مربوط به ژن STM4495 به‌عنوان بهترین مارکر از بین مارکرهای شناخته‌شده انتخاب گردید که این بیومارکر می‌تواند به‌عنوان یک هدف تشخیصی کارآمد برای شناسایی سروروی بیماری‌زای سالمونلا تیفی موریوم در روش‌های تشخیص مولکولی مورد استفاده قرار گیرد.

ژن STM4491 و نواحی نوکلئوتیدی ۲۷۷-۴۶۰ و ۲۱۷۷-۲۵۱۰ از ژن STM4492، اختصاصی‌ترین نواحی این ژن‌ها برای سالمونلا تیفی موریوم می‌باشند. آنالیزهای ما نشان داد که ۳۰۸ نوکلئوتید ابتدای ژن STM4493 با نواحی ژنی از یک ژنوم سالمونلا تیفی با شماره دسترسی LIKS01000181 دارای شباهت ۱۰۰ درصدی می‌باشد و ناحیه نوکلئوتیدی ۴۰۰-۵۰۰ اختصاصی‌ترین ناحیه این ژن برای سالمونلا تیفی موریوم می‌باشد. در آنالیز ژن‌های STM4494، STM4495 و STM4496 به ترتیب نواحی نوکلئوتیدی ۲۸۹-۶۰۷ و ۹۸۰-۱۰۶۰، ناحیه ۲۰۰۰-۳۶۰۹ و ناحیه ۱۵۶۶-۱۸۸۱ از این ژن‌ها به‌عنوان مارکرهای اختصاصی

جدول ۱: ژن‌های غربال شده اولیه سالمونلا تیفی موریوم در بین ۴۵ ژنوم از خانواده انتروباکتریاسه با استفاده از نرم‌افزار Mauve

نتایج حاصل از غربالگری ثانویه با استفاده از پایگاه داده‌های NCBI (ژنوم‌هایی که دارای این ژن‌ها می‌باشند)	موقعیت ژن‌ها در ژنوم سالمونلا تیفی موریوم سویه LT2	ژن
<i>S. typhimurium</i> , <i>S. saintpaul</i> , <i>S. bareilly</i>	۱۸۹۳۵۷-۱۸۸۵۰۱	STM0159
<i>S. typhimurium</i> , <i>S. saintpaul</i> , <i>S. bareilly</i>	۱۸۹۳۵۸-۱۸۹۶۰۰	Intergenic between STM0159, STM0160
<i>S. typhimurium</i> , <i>S. kentucky</i>	۲۰۴۸۳۰۱-۲۰۴۸۶۰۰	STM1959
<i>S. typhimurium</i> , <i>S. Derby</i> , <i>S. Paratyphi B</i>	۴۴۲۰۵۰۱-۴۴۲۱۰۰۰	STM4200
<i>S. typhimurium</i> , <i>S. saintpaul</i> , <i>S. Derby</i>	۴۵۶۴۹۰۱-۴۵۶۵۲۰۰	Intergenic between STM4319, STM06000
<i>S. typhimurium</i> , <i>S. Derby</i>	۴۵۶۵۴۰۱-۴۵۶۵۹۲۷	STM06000
<i>S. typhimurium</i> , <i>S. Derby</i>	۴۵۶۵۹۲۸-۴۵۶۶۴۰۰	STM4320
<i>S. typhimurium</i>	۴۷۳۶۶۰۱-۴۷۳۸۷۷۱	STM4491
<i>S. typhimurium</i>	۴۷۳۸۷۷۲-۴۷۴۱۳۷۱	STM4492
<i>S. typhimurium</i>	۴۷۴۱۳۷۲-۴۷۴۲۱۹۳	STM4493
<i>S. typhimurium</i>	۴۷۴۲۱۷۱-۴۷۴۳۲۶۲	STM4494
<i>S. typhimurium</i>	۴۷۴۳۲۶۲-۴۷۴۶۹۳۹	STM4495
<i>S. typhimurium</i>	۴۷۴۶۹۴۰-۴۷۵۰۶۲۶	STM4496
<i>S. typhimurium</i> , <i>S. Headelberg</i> , <i>S. Paratyphi B</i> , <i>S. Saintpoul</i>	۴۷۵۰۶۲۷-۴۷۵۱۲۴۰	STM4497
<i>S. typhimurium</i> , <i>S. Headelberg</i> , <i>S. Paratyphi B</i> , <i>S. Saintpoul</i>	۴۷۵۱۲۳۷-۴۷۵۱۸۳۹	STM4498
<i>S. typhimurium</i> , <i>S. Headelberg</i> , <i>S. Paratyphi B</i> , <i>S. Saintpoul</i>	۴۷۵۱۸۴۰-۴۷۵۲۲۰۰	Intergenic between STM4498, STM4499

AE006468-S. typhimurium str. LT2
 CP014356-S. typhimurium str. SO2
 CP003836-S. typhimurium str. U288
 CP007804-S. typhimurium str. VNP20009
 CP006602-S. typhimurium str. 08-1736
 CP007523-S. typhimurium str. CDC 2011K-0870
 CP014536-S. typhimurium str. SO3
 CP002614-S. typhimurium str. UK-1
 HG326213-S. typhimurium str. DT2
 CP009102-S. typhimurium str. ATCC 13311
 CP001363-S. typhimurium str. 14028S
 CP006048-S. typhimurium str. CFSAN001921
 AP014565-S. typhimurium str. L-3553
 CP012681-S. typhimurium str. 33676
 CP011428-S. typhimurium str. YU39
 FQ312003-S. typhimurium str. SL1344
 CP003386-S. typhimurium str. 798
 CP007235-S. typhimurium str. USDA-1899
 LFBG01000005-K. pneumoniae str. UCi70 aeusf-supercont1.2.C5
 ABAN01000009-S. Saintpaul str. SARA29 gcontig_1104776683873
 LKJK01000020-S. Paratyphi B str. 2012CEB4337SA
 CP011132-Citrobacter amalonaticus Y19
 CP013711-Klebsiella pneumoniae str. J1
 CP009208-K. pneumoniae str. ATCC 43816 KPPR1
 LHFRO1000015-S. Ohio str. CVM N44711 N44711 contig_15
 LKPO1000018-S. enterica str. FSNAN236CA SRR2088757.ctg000018
 LKQ01000023-S. enterica str. FCUN156CA SRR2088763.ctg00002
 AFY01000007-S. Infantis str. SARB27 SEENINDB Contig0.7
 AOYO01000084-S. Minnesota str. ATCC 49284 SEEM9284_1
 LHSX01000005-S. Hillingdon str. S01-0588 Hillingdon_mira454_c5
 JWRG01000008-S. enterica str. CFSAN024716_contig0007
 LHGD01000014-S. Livingstone str. CVM N45399 N45399 contig_14
 CP012266-Cronobacter dublinensis str. LMG 23823
 AFCQ01002435-S. Minnesota str. A4-603 Contig2435
 CP011636-Klebsiella oxytoca str. CAV1374



شکل ۲: هم‌ردیفی توالی نوکلئوتیدی ژن‌های *STM4491-STM4496* از ژنوم *سالمونلا تیفی* موربوم در مقابل سایر انواع ژنوم‌های متعلق به خانواده *انتروباکتریاسه*. هر پیکان نشان‌دهنده یک ژن می‌باشد. نواحی مشابه ژن‌ها در ژنوم‌های مختلف بارتنگ خاکستری نشان داده شده است. خطوط سیاه عمودی و افقی به ترتیب نشان‌دهنده نواحی متفاوت و وجود شکاف می‌باشد. بهترین نواحی هدف از هر ژن برای شناسایی *سالمونلا تیفی* موربوم بارتنگ سبز در بالای ژن‌ها نشان داده شده است و شماره‌های مشخص شده بر روی آن‌ها نشان‌دهنده موقعیت این توالی‌ها در ژنوم مرجع می‌باشد. به دلیل عدم وجود فضای کافی تنها هم‌ردیفی تعدادی از سویه‌ها نشان داده شده است.

که ۸۶/۶ درصد از آمینواسیدهای این ساختار در ناحیه مجاز از نمودار رامچاندرا قرار گرفته‌اند (جدول ۲) که این نتیجه بر کیفیت بالای ساختار به دست آمده تأکید می‌نماید. میزان RMSD این مدل نسبت به ساختار الگوی آن (pdb: 3M6A) که مربوط به دومن C-ترمینال پروتئاز Lon است، نشانگر شباهت عملکردی این دو ساختار می‌باشد (جدول ۲). علاوه بر این، آنالیز این ساختار با استفاده از سرورهای ProFunc و DALI نیز نقش Lon پروتئازی وابسته به ATP را برای این پروتئین پیش‌بینی کرد. این پروتئاز متعلق به خانواده پروتئاز S16 می‌باشد و یک سرین-پروتئاز وابسته به ATP است که پروتئین‌های جهش‌یافته یا غیر نرمال را تجزیه می‌نماید (۳۱).

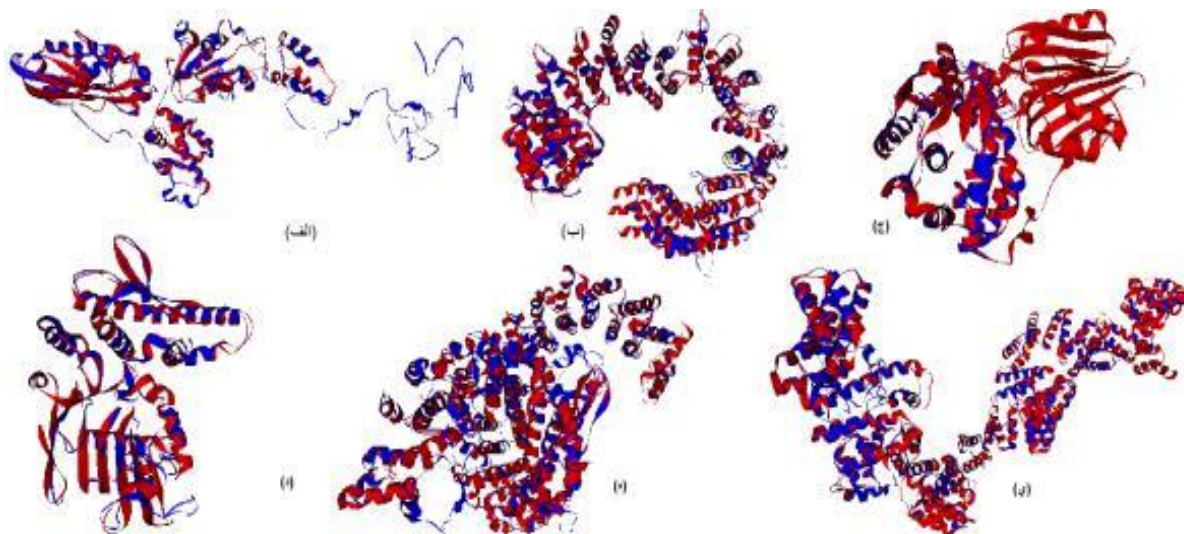
آنالیز توالی‌های پروتئینی مربوط به مارکرهای اختصاصی *سالمونلا تیفی* موربوم

پروتئین Q8ZK16

آنالیز توالی آمینواسیدی پروتئین Q8ZK16 با استفاده از پایگاه داده‌های CDD و InterProScan نشان داد که این پروتئین دارای یک دومن C-ترمینال پروتئولیتیک مربوط به پروتئاز Lon وابسته به ATP می‌باشد. آنالیز و ارزیابی ساختارهای مدل‌سازی شده به وسیله نرم‌افزارهای I-TASSER و Phyre2 با استفاده از سرورهای آنالیز ساختاری WHATCHECK, ERRAT, VERIFY 3D نشان داد که ساختارهای مدل‌سازی شده به وسیله I-TASSER برای Q8ZK16 و سایر توالی‌های پروتئینی به عنوان بهترین مدل می‌باشد (جدول ۲). ارزیابی ساختار نهایی پروتئین Q8ZK16 (شکل ۳- الف) با استفاده از PROCHECK نشان داد

جدول ۲: نتایج ارزیابی مدل‌های پیش‌بینی شده

ژن	شناسه UniProt	امتیاز ابزارهای ارزیابی ساختاری	ابزار مورد استفاده		ساختار انتخابی	الگو (PDB)	میزان RMSD با الگو	امتیاز PROCHECK
			Phyre2	I-TASSER				
STM4491	Q8ZK16	ERRAT	۶۴/۴۲	۷۶/۰۲۳	I-TASSER	3M6A	۱	۸۶/۶
		VERIFY 3D	۴۳/۲۳	۴۵/۳۹				
		WHATCHECK	47 PASS 32 warning 12 error	46 PASS 31 warning 13 error				
STM4492	Q8ZK15	ERRAT	۷۷/۹۶	۸۳/۸۹	I-TASSER	4C00	۱/۴۱	۹۲/۳
		VERIFY 3D	۳۶/۱۸	۴۰/۸۱				
		WHATCHECK	46 PASS 33 warning 12 error	48 PASS 33 warning 9 error				
STM4493	Q8ZK14	ERRAT	۸۹/۴۳	۹۷/۳۵	I-TASSER	1CT9	۰/۹۹	۹۱/۶
		VERIFY 3D	۱۵/۰۲	۴۲/۴۹				
		WHATCHECK	55 PASS 28 warning 8 error	54 PASS 26 warning 10 error				
STM4494	Q8ZK13	ERRAT	۶۸/۰۱	۸۳/۰۹	I-TASSER	3QKT	۲/۱۱	۸۵/۱
		VERIFY 3D	۵۶/۷۵	۷۱/۹۰				
		WHATCHECK	50 PASS 28 warning 13 error	49 PASS 30 warning 11 error				
STM4495	Q8ZK12	ERRAT	error	۷۹/۵۴	I-TASSER	3W3T	۱/۶۵	۸۶/۴
		VERIFY 3D	۲۲/۳۷	۲۳/۱۰				
		WHATCHECK	47 PASS 32 warning 12 error	45 PASS 33 warning 12 error				
STM4496	Q8ZK11	ERRAT	۷۶/۰۸	۹۱/۸۶	I-TASSER	4BUJ	۱/۴۶	۹۳/۲
		VERIFY 3D	۳۰/۸۳	۲۶/۹۶				
		WHATCHECK	49 PASS 31 warning 11 error	50 PASS 29 warning 11 error				



شکل ۳: الاینمنت ساختاری ساختارهای مدل‌سازی شده پروتئین‌های Q8ZK11-Q8ZK16 با پروتئین‌های الگوی آن‌ها در PDB. ساختارهای مدل‌سازی شده بارنگ آبی و ساختار الگوی PDB آن‌ها بارنگ قرمز نشان داده شده‌اند. الف- هم‌ردیفی ساختاری ساختار مدل‌سازی شده پروتئین Q8ZK16 با پروتئین الگوی "pdb: 3M6A". ب- هم‌ردیفی ساختاری ساختار مدل‌سازی شده پروتئین Q8ZK15 با پروتئین الگوی "pdb: 4C00". ج- هم‌ردیفی ساختاری ساختار مدل‌سازی شده پروتئین Q8ZK14 با پروتئین الگوی "pdb: 1CT9". د- هم‌ردیفی ساختاری ساختار مدل‌سازی شده پروتئین Q8ZK13 با پروتئین الگوی "pdb: 3QKT". ه- هم‌ردیفی ساختاری ساختار مدل‌سازی شده پروتئین Q8ZK12 با پروتئین الگوی "pdb: 3W3T". ی- هم‌ردیفی ساختاری ساختار مدل‌سازی شده پروتئین Q8ZK15 با پروتئین الگوی "pdb: 4BUJ".

پروتئین Q8ZK14

مدل‌سازی پروتئین Q8ZK14 بر اساس پروتئین الگوی "pdb: 1CT9"، که یک آسپاراژین سنتتاز می‌باشد، انجام شد (شکل ۳-ج). RMSD این مدل نسبت به ساختار الگوی آن برابر با ۰/۹۹ می‌باشد که نشان‌دهنده شباهت بالای ساختاری این دو پروتئین می‌باشد (جدول ۲). آنالیز این ساختار با استفاده از سرور DALI همچنین تأیید کننده این نتایج بود. آنالیز توالی آمینواسیدی این پروتئین با استفاده از پایگاه داده‌های CDD و InterProScan نشان داد که این پروتئین دارای یک دومن ناشناخته به نام IPR029492 می‌باشد. این دومن وابسته به خانواده دومن AAA می‌باشد که مربوط به سوپر فامیلی P-loop ATPase است. نتایج ProFunc نیز نشان داد که این پروتئین می‌تواند یک نوکلئوتید تری فسفات هیدرولاز باشد. به‌طور کلی با توجه به اینکه آسپاراژین سنتتاز آنزیمی است که به‌واسطه هیدرولیز ATP آسپارات را به آسپاراژین تبدیل می‌کند و با توجه به نتایج حاصل از CDD، InterProScan و ProFunc می‌توان نتیجه گرفت که این پروتئین می‌تواند یک نوکلئوتید تری فسفات هیدرولاز (ATPase) باشد (۳۳).

پروتئین Q8ZK15

آنالیز توالی آمینواسیدی پروتئین Q8ZK15 با استفاده از پایگاه داده‌های CDD و InterProScan نشان داد که این پروتئین دومن PglZ، که مربوط به خانواده آلکالین فسفاتازهاست، را دارا می‌باشد. مدل‌سازی ساختاری این پروتئین با استفاده از الگوی "pdb: 4C00" که مربوط به پروتئین ترانسپورتین می‌باشد، انجام شد (شکل ۳-ب). ارزیابی ساختار پیش‌بینی شده این پروتئین با استفاده از PROCHECK نشان داد که ۹۲/۳ درصد از آمینواسیدهای این ساختار در ناحیه مجاز از نمودار رامچاندوران قرار گرفته‌اند (جدول ۲). آنالیز ساختاری این پروتئین با استفاده از سرور DALI شباهت ساختاری این پروتئین را با یک پروتئین متصل شونده به GTP (pdb: 4O10) با $Z\text{-Score} = 41/7$ نشان داد. نتایج ProFunc حاکی از نقش آلکالین فسفاتازی این پروتئین می‌باشد که این آنزیم مسئول حذف گروه فسفات از انواع مولکول‌ها از جمله نوکلئوتیدها می‌باشد (۳۲). به‌طور کلی با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین Q8ZK15 می‌تواند یک پروتئین متصل شونده به نوکلئوتید باشد.

پروتئین Q8ZK13

می‌تواند به‌عنوان یک پروتئین انتقال‌دهنده و یا یک آنزیم DNA متیلاز ایفای نقش نماید.

پروتئین Q8ZK11

آنالیز توالی آمینواسیدی پروتئین Q8ZK11 با استفاده از پایگاه داده InterProScan نشان داد که این پروتئین دارای یک دومن با خصلت نوکلئوتید تری فسفات-هیدرولازها باشد. آنالیز این توالی پروتئینی با استفاده از CDD، وجود هیچ دومن شناخته‌شده‌ای را برای این پروتئین نشان نداد. مدل‌سازی ساختاری این پروتئین با استفاده از پروتئین الگوی "pdb: 4BUJ"؛ که مربوط به یک مولتی پروتئین به نام کمپلکس Ski2-3-8 می‌باشد، انجام شد (شکل ۳-۳). کمپلکس Ski2-3-8 برای عملکردهای سیتوپلاسمی آگزوزوم‌ها در ساکارومیسز سرویزیه موردنیاز می‌باشد. مطالعات ساختاری نشان داده است که این پروتئین دارای نواحی متصل شونده به RNA و یک ناحیه با خاصیت ATPase ی می‌باشد (۳۷). RMSD ساختار مدل‌سازی شده برای پروتئین Q8ZK11 نسبت به الگوی 4BUJ برابر با ۱/۴۶ می‌باشد (جدول ۲) که نشان‌دهنده شباهت بالای ساختاری این دو پروتئین می‌باشد. ارزیابی این ساختار مدل‌سازی شده با استفاده از PROCHECK نشان داد که ۹۳/۲ درصد از آمینواسیدهای این ساختار در ناحیه مجاز از نمودار رامچاندوران قرار گرفته‌اند (جدول ۲). آنالیز ساختاری این پروتئین به‌وسیله سرور ProFunc نقش نوکلئوتید تری فسفات-هیدرولازی را برای این پروتئین پیشنهاد کرد اما آنالیز این ساختار به‌وسیله DALI نتایج متفاوتی از آنالیزهای قبل، یعنی شباهت ساختاری این پروتئین با پروتئین MamA که یک پروتئین حاوی موتیف TPR وابسته به مگنتوزوم می‌باشد را نشان داد. باین‌وجود، از آنجایی که شواهد حاصل از آنالیز دومن‌های پروتئینی و آنالیز ساختاری با استفاده از ProFunc در یک راستا می‌باشند می‌توان احتمال بیشتری داد که این پروتئین می‌تواند یک نوکلئوتید تری فسفات-هیدرولاز (NTPase) باشد.

بحث

تاکنون در کشور ما و سایر کشورها روش‌های زیادی برای تشخیص آزمایشگاهی سرووار بیماری‌زای سالمونلا تیفی موریوم صورت گرفته است که مارکرهای ژنتیکی متعددی از جمله *fliC*، *STM4497*، *STM2235*، *STM2755*، *rflB*، *invA*، *FliJ* را هدف قرار داده‌اند (۱۰-۳). متأسفانه ژن‌های مذکور از اختصاصیت کافی برخوردار نمی‌باشند. به‌عنوان مثال، ژن *invA* به‌عنوان یک مارکر

آنالیز توالی آمینواسیدی پروتئین Q8ZK13 با استفاده از CDD و InterProScan به ترتیب وجود دومن پروتئینی AAA⁺ و ATPase و دومن ناشناخته‌ای متعلق به خانواده سیستم TA (Toxin-Antitoxin) نوع IV را در این پروتئین نشان داد. سیستم TA نوع IV مربوط به سوپر فامیلی نوکلئوتیدیل ترانسفراز می‌باشد که پروتئین‌های مربوط به این سوپر فامیلی یکی از اجزای سیستم ترمیمی DNA می‌باشند. مطالعات نشان داده است که این پروتئین همچنین می‌تواند باکتری را از گسترش آلودگی فازی محافظت نماید (۳۴). مدل‌سازی ساختار پروتئین Q8ZK13 با استفاده از پروتئین الگوی "pdb: 3qkt" با RMSD= ۲/۱۱ انجام شد (شکل ۳-۳ و جدول ۲) که مربوط به پروتئین Rad50 ABC-ATPase می‌باشد. این پروتئین یک پروتئین ضروری برای ترمیم شکست دو رشته‌ای DNA به‌واسطه نوترکیبی هومولوگ می‌باشد (۳۵). آنالیز این ساختار با استفاده از DALI همچنین تأیید کننده این شباهت ساختاری می‌باشد. آنالیز ساختاری این پروتئین با استفاده از ProFunc نقش احتمالی ABC ترانسپورتری و نقش اتصال به ATP را برای این پروتئین نشان داد. با توجه به اینکه دسته‌ای از ABC ترانسپورترها در ترمیم DNA درگیر می‌شوند و با توجه به نتایج حاصل از نرم‌افزارهای مورداستفاده، می‌توان نتیجه گرفت که این پروتئین یکی از پروتئین‌های درگیر در مسیر ترمیم DNA می‌باشد (۳۶).

پروتئین Q8ZK12

مدل‌سازی پروتئین Q8ZK12 بر اساس پروتئین الگوی "pdb: 3W3T"؛ که مربوط به یک پروتئین انتقال‌دهنده هسته‌ای در یوکاریوت‌ها می‌باشد، انجام شد (شکل ۳-۵). نتایج آنالیز ساختاری به‌وسیله DALI همچنین تأیید کننده این شباهت ساختاری بود اما آنالیز این پروتئین به‌وسیله پایگاه داده‌های CDD و InterProScan نتایج متفاوتی را نشان داد. پایگاه داده‌های CDD و InterProScan به ترتیب دومن‌های مربوط به زیر واحد YeeADNA متیلاز و N₆-Adenine specific DNA methylase را برای این پروتئین پیش‌بینی کردند. آنالیز ساختار مدل‌سازی شده با استفاده از ProFunc نشان داد که این پروتئین می‌تواند به‌عنوان یک آنزیم محدودکننده عمل کند. با توجه به این نتایج تنها می‌توان گفت که احتمالاً این پروتئین

ژنتیکی عمومی برای شناسایی سرووارهای سالمونلا انتریکا مورد استفاده قرار می‌گیرد و تنها مختص سرووار سالمونلا تیفی موریوم نمی‌باشد (۶). همچنین ژن‌های *STM2235* و *STM2755* علاوه بر سویه‌های تیفی موریوم به ترتیب در سایر سرووارهای سالمونلا از جمله *Paratyphi B* و *Heidelberg* یافت می‌شوند. به‌طور مشابه ژن‌های *fliC*، *FljB* و *rfbJ* که به ترتیب مربوط به واریانت‌های H1 و H2 آنتی‌ژن H و آنتی‌ژن O4 می‌باشند، علاوه بر اینکه در تعداد زیادی از سویه‌های سالمونلا تیفی موریوم وجود دارند، به ترتیب در سویه‌های متعلق به سرووارهای سالمونلا *Abony*، *Heidelberg*، *Kentucky* نیز یافت می‌شوند و برای شناسایی سالمونلا تیفی موریوم باید به‌طور هم‌زمان مورد هدف قرار گیرند. علاوه بر این، ژن *STM4497* که توسط *Kim* و همکاران به‌عنوان یک مارکر اختصاصی برای سالمونلا تیفی موریوم معرفی شده است، به دلیل همپوشانی با سایر ژنوم‌ها از جمله *Paratyphi B* و *Heidelberg* نمی‌تواند برای شناسایی سویه‌های سالمونلا تیفی موریوم مورد استفاده قرار گیرد (۹). از این‌رو در پژوهش حاضر با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی، مارکرهای ژنتیکی این سرووار بیماری‌زا به‌عنوان اهداف تشخیصی مناسب غربال گردید و در ادامه ساختار و عملکرد پروتئین‌های کد شده به‌وسیله این بیومارکرها به‌منظور کشف بیومارکرها مناسب در اهداف دارویی و طراحی واکسن علیه این پاتوژن تعیین شد. نتایج غربال ژنتیکی در پژوهش حاضر نشان داد که تنها نواحی خاصی از ژن‌های *STM4491-STM4496* (مطابق با سیستم نام‌گذاری ژنی ژنوم سالمونلا تیفی موریوم سویه *LT2*) برای این سویه اختصاصی می‌باشند. این ژن‌ها متعلق به لوکوس مجاور *LeuXtRNA* در ژنوم سالمونلا تیفی موریوم می‌باشد. آزمایش‌های *Haneda* و همکاران نشان دادند موتانت‌هایی که دارای حذف در این ناحیه ژنی هستند، قدرت بیماری‌زایی پایینی در موش دارند (۳۸). این ناحیه ژنی در سالمونلا تیفی موریوم هم از لحاظ محتوای ژنی و هم از لحاظ توالی نوکلئوتیدی با سایر سرووارهای سالمونلا متفاوت می‌باشد. مطالعات بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی انجام‌شده بر روی این ناحیه، وجود همولوژی را بین ژن‌های *STM4491*، *STM4492*، *STM4495*، *STM4496*، *STM4497* و *STM4498* و قطعات ژنی موجود در عنصر شبه ترانسپوزونی *SXT* و *ویبریولرا* (با شماره دسترسی *AYO55428*) و جزیره کانژوگه شونده *R391* موجود در *Providenciaretti* (با شماره دسترسی *AY090559*) نشان می‌دهد (۳۹). وجود این همولوژی پیشنهاد می‌کند که این ژن‌ها ممکن است از عناصر

کنژوگه شونده *R391* و *SXT* مشتق شده باشند. همچنین عدم وجود ژن‌های *STM4493* و *STM4494* در این عناصر نشان می‌دهد که احتمالاً سالمونلا تیفی موریوم این ژن‌ها را به‌طور مجزا از سایر ژن‌های مجاور به دست آورده است. وجود ژن *STM4489* در ابتدای این لوکوس که کد کننده یک اینتگرز می‌باشد و همچنین وجود بسیاری از ژن‌های وابسته به فاژ T4 و پلاسمید در مجاورت این لوکوس این نظریه را تقویت می‌کند که این ناحیه ممکن است از یک منبع خارجی به ژنوم سالمونلا تیفی موریوم وارد شده باشد (۳۸). از آنجایی که بروز یک فنوتیپ تحت تأثیر یک یا تعدادی ژن در یک کلاستر ژنی می‌باشد، وجود یا عدم وجود یک ژن و یا وجود پلی مورفیسم در آن می‌تواند باعث بروز یک فنوتیپ جدید شود. وجود این امر در طی تکامل این امکان را به ما داده است تا بتوانیم یک ارگانیسم باکتریایی را از سایر سویه‌های باکتریایی تمایز دهیم (۱۱،۴۰). مطالعات بیوانفورماتیکی ما بر روی ناحیه *LeuXtRNA* در سویه‌های مختلف سرووارهای سالمونلا نشان داد که توزیع ژن‌های *STM4491-STM4496* از این ناحیه ژنی در ژنوم‌های سالمونلا تیفی موریوم منحصر به فرد می‌باشد. آنالیزهای دقیق ما بر روی توالی نوکلئوتیدی این ژن‌ها نشان داد که علی‌رغم وجود ژن‌های مذکور در سایر سویه‌های باکتریایی، به دلیل وجود پلی مورفیسم بالا این ژن‌ها می‌توانند به‌عنوان مارکرهای ژنتیکی برای شناسایی این سرووار بیماری‌زا مورد استفاده قرار گیرند. با توجه به مقایسه میزان تفاوت نوکلئوتیدی مارکرهای مذکور نسبت به توالی‌های ژنومی سویه‌های غیر از سالمونلا تیفی موریوم می‌توان نتیجه گرفت که ناحیه نوکلئوتیدی ۳۶۰۹-۲۰۰۰ مربوط به ژن *STM4495* به‌عنوان بهترین مارکر از بین مارکرهای شناخته‌شده می‌باشد که این بیومارکر می‌تواند به‌عنوان یک هدف تشخیصی کارآمد برای شناسایی سرووار بیماری‌زای سالمونلا تیفی موریوم در روش‌های تشخیص مولکولی مورد استفاده قرار گیرد.

با توجه به نتایج حاصل از آنالیزهای پروتئینی انجام‌شده، به‌طور کلی می‌توان پروتئین‌های کد شده به‌وسیله مارکرهای ژنی سالمونلا تیفی موریوم را در ۵ دسته شامل، *Lon* پروتئازها، پروتئین‌های متصل شونده به نوکلئوتید، *NTPase* ها، پروتئین‌های درگیر در مسیر ترمیم DNA و DNA متیل ترانسفرازها (DNA متیلازها) طبقه‌بندی نمود. این پروتئین‌ها هرکدام به‌نوعی می‌توانند در بیماری‌زایی و بقای باکتری نقش داشته باشند و از این‌رو به‌عنوان اهداف دارویی یا در تهیه واکسن مورد استفاده قرار گیرند. به‌عنوان مثال پروتئاز *Lon* در

متیلاز در باکتری سالمونلا تیفی موریوم با تنظیم بیان ژن‌های درگیر در بیماری‌زایی باعث ایجاد قدرت بیماری‌زایی در این باکتری می‌شود. نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که سویه‌هایی از سالمونلا تیفی موریوم که دارای موتاسیون در ژن کد کننده این آنزیم هستند به‌طور کامل قدرت بیماری‌زایی خود را از دست داده‌اند (۴۵). این شواهد پیشنهاد می‌کند که با بکار بردن مهارکننده‌های این آنزیم می‌توان از باکتری سالمونلا تیفی موریوم به‌عنوان واکسن زنده ضعیف شده در مقابل تب تیفوئیدی موشی استفاده نمود.

به‌طور کلی، در مطالعه حاضر علاوه بر ارائه مارکرهای ژنتیکی سرورار بیماری‌زای سالمونلا تیفی موریوم به‌عنوان اهداف تشخیصی مناسب و تعیین ساختار و عملکرد پروتئین‌های کد شده به‌وسیله این مارکرها، هدف ما ارائه یک چارچوب بیوانفورماتیکی جامع برای دستیابی به‌توالی‌های ژنی و پروتئینی است که می‌توانند به‌عنوان اهداف تشخیصی و دارویی مناسب جهت تشخیص و درمان عفونت‌های ناشی از پاتوژن‌ها مورد استفاده قرار گیرند. در پایان ذکر این نکته ضروری است که اگرچه با ظهور روش‌های بیوانفورماتیکی قدرتمند امروزه چالش تفسیر عملکردی پروتئین‌ها رو به حل می‌باشد و این روش‌ها می‌توانند با حذف احتمالات نادرست در مورد تعیین ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها مسیر تعیین ساختار با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی را هموارتر نمایند، اما به‌منظور تفسیر دقیق ساختار و عملکرد پروتئین‌ها اطلاعات تائیدی به‌دست آمده از روش‌های ارزیابی آزمایشگاهی ضروری می‌باشد (۲۰).

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از همکاری موثر اعضای محترم هیئت علمی گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان در این مطالعه تشکر و قدردانی می‌گردد. هزینه انجام این پژوهش توسط معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان تأمین گردیده است.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

هومئوستازی سلولی و حفاظت سلول از تخریب DNA و تغییرات ایجاد شده ناشی از استرس‌ها نقش دارد. این پروتئین در باکتری‌های پاتوژن جهت بیان ژن‌های بیماری‌زایی و افزایش عفونت سلولی مورد نیاز می‌باشد (۴۱). مطالعات نشان داده است که پروتئین Lon در سالمونلا تیفی موریوم با تنظیم بیان ژن‌های بیماری‌زایی در جزایر SPI-1 و SPI-2 به افزایش قدرت بیماری‌زایی این باکتری و حفاظت از آن در برابر ماکروفاژها کمک می‌نماید (۳۱). از آنجایی که Lon باکتریایی در ایجاد عفونت و بیماری‌زایی گونه‌های خاصی از جمله سالمونلا تیفی موریوم مورد نیاز می‌باشد، ترکیباتی که به‌طور خاص این پروتئین و نه Lon انسانی را بلوکه می‌کنند می‌توانند نویددهنده کلاس جدیدی از عوامل ضد میکروبی در درمان عفونت‌های ناشی از سالمونلا باشند. علاوه بر این، مطالعات نشان داده است که پروتئین‌های متصل شونده به نوکلئوتیدها (NTPase ها) می‌توانند نقش مهمی را در بیماری‌زایی باکتری‌ها ایفا کنند. به‌عنوان مثال باکتری هلیکوباکتر پیلوری، عامل زخم‌های گوارشی، برای ایجاد بیماری‌زایی به دو آنزیم کلیدی به نام اوره آز و Ni-Fe-هیدروژناز وابسته می‌باشد که سنتز و بلوغ این آنزیم‌ها در این باکتری خود وابسته به وجود یکسری پروتئین‌های کمکی از جمله HypB و UreG می‌باشد. مطالعات ساختاری این پروتئین‌ها نشان داده است که آن‌ها دارای یک دومن حفاظت‌شده اتصالی به نوکلئوتید می‌باشند و موتاسیون در ژن‌های کد کننده این پروتئین‌ها باعث از بین رفتن فعالیت آنزیم‌های اوره آز و دهیدروژناز و از بین رفتن قدرت بیماری‌زایی این باکتری می‌شود (۴۲). همچنین بسیاری از پروتئین‌های متصل شونده به نوکلئوتیدها از جمله ABC-ترانسپورترها در انتقال مواد غذایی به درون سلول، ترشح سموم و مقاومت دارویی باکتری‌ها نقش دارند (۴۳). به‌طور کلی با توجه به نقش این پروتئین‌ها در بقاء سلول باکتری و بیماری‌زایی آن، این پروتئین‌ها می‌توانند به‌عنوان اهدافی در طراحی و کشف داروهای آنتی‌باکتریال در نظر گرفته شوند. DNA متیل ترانسفرازها دسته‌ای دیگر از آنزیم‌ها هستند که می‌توانند در سیستم Restriction-modification (این سیستم به‌منظور حفاظت از باکتری در برابر حمله DNA خارجی فعال می‌شود)، ترمیم DNA و رونویسی از ژن‌های خاص درگیر باشند (۴۴). مطالعات متعددی نشان داده است که آنزیم DNA-آدنین

References

1. Fournier P-E, Raoult D. Prospects for the future using genomics and proteomics in clinical microbiology. *Annu Rev Microbiol* 2011; 65(1):169-188.
2. Xia S, Hendriksen RS, Xie Z, Huang L, Zhang J, Guo W, et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from infections in humans in Henan Province, China. *J Clin Microbiol* 2009; 47(2):401-409.
3. Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7, toxigenic *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhimurium* by multiplex PCR. *Arch Clin Infect Dis* 2009; 4(2):97-103.
4. Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G, et al. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. *Lett Appl Microbiol* 1999; 28(2):113-117.
5. Dilmaghani M, Ahmadi M, Zahraei-Salehi T, Talebi A. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from avians using multiplex-PCR. *Vet Res Forum* 2011; 2(3):157-165.
6. Shanmugasundaram M, Radhika M, Murali H, Batra H. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by selective amplification of *fliC*, *fljB*, *iroB*, *invA*, *rflB*, *STM2755*, *STM4497* genes by polymerase chain reaction in a monoplex and multiplex format. *World J Microbiol Biotechnol* 2009; 25(8):1385-1394.
7. Lim Y-H, Hirose K, Izumiya H, Arakawa E, Takahashi H, Terajima J, et al. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Jpn J Infect Dis* 2003; 56(4):151-155.
8. Zahraei Salehi T, Tadjbakhsh H, Atashparvar N, Nadalian M, Mahzounieh M. Detection and identification of *Salmonella* Typhimurium in bovine diarrhoeic fecal samples by immunomagnetic separation and multiplex PCR assay. *Zoonoses Public Health*. 2007; 54(6):231-236.
9. Kim H, Park S, Lee T, Nahm B, Chung Y, Seo K, et al. Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium using specific PCR primers obtained by comparative genomics in *Salmonella* serovars. *J Food Prot* 2006; 69(7):1653-1661
10. Akiba M, Kusumoto M, Iwata T. Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, typhimurium, choleraesuis, infantis, hadar, enteritidis, dublin and gallinarum, by multiplex PCR. *J Microbiol Methods* 2011; 85(1):9-15.
11. Ravan H, Amandadi M. Analysis of yeh Fimbrial Gene Cluster in *Escherichia coli* O157: H7 in Order to Find a Genetic Marker for this Serotype. *Curr Microbiol* 2015; 71(2):274-282.
12. Ravan H, Amandadi M. Molecular detection of pathogenic serovar *Salmonella enteritidis* by LAMP method using a specific marker screened by comparative genomic methods. *Iran J Med Microbiol*. 2017; 11(1):18-29. [In Persian]
13. Cash P. Proteomics in medical microbiology. *Electrophoresis*. 2000; 21(6):1187-1201.
14. Parkhill J, Dougan G, James K, Thomson N, Pickard D, Wain J, et al. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 2001; 413(6858):848-852.
15. Liu X, Lu R, Xia Y, Sun J. Global analysis of the eukaryotic pathways and networks regulated by *Salmonella typhimurium* in mouse intestinal infection in vivo. *BMC genomics* 2010; 11(1):722.
16. Liu B, Zhou X, Zhang L, Liu W, Dan X, Shi C, et al. Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella enterica* Typhimurium and Enteritidis. *Food Control* 2012; 27(1):87-93.
17. Wang Y, Huang K-Y, Huo Y. Proteomic comparison between *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Typhi. *J Microbiol* 2014; 52(1):71.
18. Zhang Y. Protein structure prediction: when is it useful? *Curr Opin Struct Biol* 2009; 19(2):145-155.
19. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 2015; 10(6):845-858.
20. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 2010; 5(4):725-738.
21. Laskowski RA, Watson JD, Thornton JM. ProFunc: a server for predicting protein function from 3D structure. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(2):W89-W93.
22. Holm L, Rosenström P. Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(2):W545-W549.
23. Darling AE, Mau B, Perna NT. progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PloS one* 2010; 5(6):e11147.
24. Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, et al. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(2):W116-W120.

25. Hirashima A, Huang H. Homology modeling, agonist binding site identification, and docking in octopamine receptor of *Periplaneta americana*. *Comput Biol Chem* 2008; 32(3):185-190.
26. Wallner B, Elofsson A. Can correct protein models be identified? *Protein science* 2003; 12(5):1073-86.
27. Wiederschain GY. The Proteomics Protocols Handbook. *Biochemistry (Moscow)* 2006; 71(6):696-700.
28. Rigden DJ. From protein structure to function with bioinformatics. Springer. 2017;91-99.
29. Wang L, Holmes RP, Peng J-B. Molecular modeling of the structural and dynamical changes in calcium channel TRPV5 induced by the African-specific A563T variation. *Biochemistry* 2016; 55(8):1254-1264.
30. Laskowski RA, Chistyakov VV, Thornton JM. PDBsum more: new summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(1): 266-8.
31. Lee I, Suzuki CK. Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease-lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates. *Biochim Biophys Acta, Proteins Proteomics* 2008; 1784(5):727-735.
32. Tamás L, Huttová J, Mistrk I, Kogan G. Effect of carboxymethyl chitin-glucan on the activity of some hydrolytic enzymes in maize plants. *Chem Pap* 2002; 56(5):326-329.
33. Veiga P, Erkelenz M, Bernard E, Courtin P, Kulakauskas S, Chapot-Chartier M-P. Identification of the asparagine synthase responsible for D-Asp amidation in the *Lactococcus lactis* peptidoglycan interpeptide crossbridge. *J. Bacteriol* 2009; 191(11):3752-7.
34. Dy RL, Przybilski R, Semeijn K, Salmond GP, Fineran PC. A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin-antitoxin mechanism. *Nucleic Acids Res* 2014; 42(7):4590-4605.
35. Williams GJ, Williams RS, Williams JS, Moncalian G, Arvai AS, Limbo O, et al. ABC ATPase signature helices in Rad50 link nucleotide state to Mre11 interface for DNA repair. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19(3):364.
36. Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol Biol Rev* 2008; 72(2):317-364.
37. Halbach F, Reichelt P, Rode M, Conti E. The yeast ski complex: crystal structure and RNA channeling to the exosome complex. *Cell* 2013; 154(4):814-826.
38. Haneda T, Ishii Y, Danbara H, Okada N. Genome-wide identification of novel genomic islands that contribute to *Salmonella* virulence in mouse systemic infection. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 297(2):241-249.
39. Bishop AL, Baker S, Jenks S, Fookes M, Gaora PÓ, Pickard D, et al. Analysis of the hypervariable region of the *Salmonella enterica* genome associated with tRNA^{LeuX}. *J Bacteriol* 2005; 187(7):2469-2482.
40. Ravan H, Amandadi M, Sanadgol N. A highly specific and sensitive loop-mediated isothermal amplification method for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Microb Pathog* 2016; 91:161-165.
41. Tsilibaris V, Maenhaut-Michel G, Van Melderen L. Biological roles of the Lon ATP-dependent protease. *Res Microbiol* 2006; 157(8):701-713.
42. Mehta N, Benoit S, Maier RJ. Roles of conserved nucleotide-binding domains in accessory proteins, HypB and UreG, in the maturation of nickel-enzymes required for efficient *Helicobacter pylori* colonization. *Microb Pathog* 2003; 35(5):229-234.
43. Garmory HS, Titball RW. ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. *Infect Immun* 2004; 72(12):6757-6763.
44. Wion D, Casadesús J. N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4(3):183-192.
45. Heusipp G, Fälker S, Schmidt MA. DNA adenine methylation and bacterial pathogenesis. *Int J Med Microbiol* 2007; 297(1):1-7.