

Role of Two-Partner Secretion System dependent FhaB1 and FhaB2 Proteins in Adhesion of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 to Human Epithelial Cells

Shakiba Darvish Alipour Astaneh¹, Iraj Rasooli^{2,3*}, Seyed Latif Mousavi Gargari²

1- Ph.D Candidate, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

3- Professor, Molecular Microbiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 3319118651, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran-Qom Express Way, Opposite Imam Khomeini's shrine, Tehran, Iran
Email: rasooli@shahed.ac.ir

Received: 18/Feb/2014, Accepted: 22/Apr/2014

Abstract

Objective: *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) has a good potential to colonize on various surfaces. As a virulence factor, adhesion to surfaces is the first step in colonization. The Two-Partner Secretion System (TPS) proteins are key factors for bacterial attachment. The purpose of this study is to identify and study the role of this family of proteins in adhesion of *A. baumannii* to human epithelial cells.

Methods: Gene homologues that encoded the TPS were analyzed by bioinformatics tools and the primers were designed accordingly. The constructs synthesized in the pET22b vector were transferred to BL21(DE3). The transformed cells were named FhaB1 and FhaB2. The protein expression on the cell membrane was studied in addition to bacterial adhesion and biofilm formation by recombinant strains, *A. baumannii* and *E.coli* BL21(DE3).

Results: Bioinformatic studies showed the bacterial potential of producing two exoproteins (FhaB1 and FhaB2). Expression of the recombinant proteins on the outer membrane was confirmed by Western Blot Analysis and whole cell ELISA. The results revealed an association between the recombinant cells and bacterial adhesion and biofilm formation. FhaB1, FhaB2 and *A. baumannii* exhibited enhanced adherence to human lung epithelial cells compared to *E.coli* BL21(DE3)

Conclusion: TPS in *A.baumannii* is of adherence and colonization factors and is one of the bacterial virulence factors.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Two-Partner Secretion System, Adhesion

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 17, No 1, Spring 2014, Pages: 51-62

نقش دو پروتئین FhaB1 و FhaB2 وابسته به سیستم ترش‌چی دو جزئی در چسبندگی اسیتوباکتر بومانی ATCC19606 به سلول اپیتلیال انسانی

شکیبا درویش علیپور آستانه^۱، ایرج رسولی^{۲*}، سید لطیف موسوی گرگری^۲

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳- استاد، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۳۳۱۹۱۱۸۶۵۱، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مولکولی

Email: rasooli@shahed.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۲/۰۲

دریافت مقاله: ۹۲/۱۱/۲۹

چکیده

هدف: اسیتوباکتر بومانی توانایی عجیبی برای کلونیزاسیون بر سطوح مختلف را داراست و چسبندگی روی سطوح به‌عنوان یک عامل بیماری‌زایی و اولین گام در انجام فرآیند کلونیزاسیون مطرح است. پروتئین‌های وابسته به خانواده سیستم ترش‌چی دو جزئی می‌تواند در چسبندگی باکتری نقش داشته باشد. هدف از انجام این تحقیق، شناسایی، مطالعه و بررسی نقش پروتئین‌های این خانواده در چسبندگی اسیتوباکتر بومانی به سلول اپیتلیال انسانی است.

مواد و روش‌ها: هومولوگ ژن‌های کدکننده پروتئین فیلامنت-هماگلوترین وابسته به سیستم ترش‌چی دو جزئی در ژنوم اسیتوباکتر بومانی با کمک نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک در بانک ژنی تجزیه و تحلیل و سپس آغازگرها طراحی شد. بنابراین سازه‌های مورد نظر در ناقل pET22b سنتز و به سلول BL21(DE3) ترانسفورم و سلول‌های تراریخت شده FhaB1، FhaB2 نامگذاری شدند. میزان بیان پروتئین‌های نوترکیب بر سطح غشای سلول مطالعه و در نهایت میزان چسبندگی توانایی برای تشکیل بیوفیلم در سلول‌های نوترکیب، اسیتوباکتر بومانی و سلول اشریشیا کلی BL21(DE3) مقایسه شد.

نتایج: بررسی‌های بیوانفورماتیک نشان داد که این باکتری توانایی تولید دو نوع اگزوپروتئین FhaB1، FhaB2 را داراست. بیان پروتئین‌های نوترکیب بر سطح خارجی سلول‌های تراریخت شده، با آزمایش‌های وسترن بلات و الیزای سلول کامل تأیید شد. آزمایش‌ها نشان داد که این سلول‌های نوترکیب و اسیتوباکتر بومانی نسبت به سلول اشریشیا کلی BL21(DE3) توانایی بالاتری برای تشکیل بیوفیلم دارد. همچنین سلول‌های FhaB1، FhaB2 و اسیتوباکتر بومانی نسبت به اشریشیا کلی BL21(DE3) به میزان بیشتری به سطح سلول‌های اپیتلیال ریه انسانی اتصال می‌یابند.

نتیجه‌گیری: سیستم ترش‌چی دو جزئی در اسیتوباکتر بومانی یکی از عوامل چسبندگی و کلونیزاسیون بوده و از جمله عوامل بیماری‌زایی باکتری است.

کلیدواژگان: اسیتوباکتر بومانی، سیستم ترش‌چی دو جزئی، چسبندگی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، صفحات: ۵۱-۶۲

مقدمه

کلونیزاسیون، گسترش در بین بیماران بستری شده در بیمارستان و توانایی ایجاد بیماری است. این باکتری، عفونت‌های شدیدی

اسیتوباکتر بومانی (*Acinetobacter baumannii*)، یک باکتری گرم منفی، غیر متحرک با پتانسیل بالا برای

بدون هیچ واسطه‌ای پروتئین را به خارج از سلول ترشح می‌کنند [۱۰]. در پروتئین‌های خود انتقالی دو جزئی دومین‌های آگزوپروتئین و کانال به‌صورت جدا از هم است ولی توسط ژن‌های ساختاری کد می‌شود که در یک پروموتور قرار گرفته است [۱۱]. دومین آگزوپروتئین از طریق کانال‌هایی که با کمک نواحی بشکه بتا (β -barrel) دومین‌های کانال در عرض غشای خارجی ایجاد می‌شود، به بیرون از سلول می‌رود [۱۲]. این عوامل چسبندگی سبب می‌شود که ارگانسیم بتواند در چندین ناحیه مختلف از سلول‌های اپی‌تلیالی کلونیزه شده و به بیماری‌زایی باکتری کمک می‌کند. بنابراین سیستم ترشحي دو جزئی، به‌طور شاخص شامل یک بخش کانال در غشای خارجی باکتری است که به انتقال آگزوپروتئین به خارج از سلول کمک می‌کند. سه نوع پروتئین در این خانواده قرار گرفته‌است از جمله فیلامنت -هماگلوتینین (Filamentous hemagglutinin: FHA) در *Bordetella pertussis* (HMW1/HMW2)، هموفیلوس آنفولانزا (*Haemophilus influenzae*) و MHA (*Moraxella catarrhalis* Filamentous Haemagglutinin) در مورکسلا کاتارالیس (*Moraxella catarrhalis*) به‌خوبی مطالعه شده [۱۳] ولی تاکنون روی پروتئین‌های ترشحي دو جزئی در اسنیتوباکتر بومانی هیچ‌گونه مطالعه‌ای انجام نشده است.

با توجه به این‌که در عصر حاضر اسنیتوباکتر بومانی به دلیل توانایی برای زنده ماندن در محیط بیمارستان، کلونیزه شدن روی بدن بیماران و فنوتیپ‌های مقاوم دارویی، یکی از عوامل عمده بیماری‌زاهای بیمارستانی است. بنابراین این پروتئین در اسنیتوباکتر بومانی می‌تواند کاندیدای مناسبی برای تولید واکسن باشد؛ به‌طوری که آنتی‌بادی‌های که علیه این عوامل چسبندگی تولید می‌شود، می‌تواند کلونیزاسیون باکتری را در بافت میزبان متوقف کرده و مانع آلودگی شود.

هدف از انجام این تحقیق، مطالعه روی عملکرد عوامل چسبندگی خود انتقالی دو جزئی در اسنیتوباکتر بومانی است که می‌تواند در بیماری‌زایی باکتری نقش مهمی را ایفا کند. به‌همین منظور، بخش اول این تحقیق در ارتباط با تولید دو نوع

همچون پنومونیا (*pneumonia*) و باکتریما (*bacteremia*) را در بیماران ایجاد می‌کند. سویه‌های اسنیتوباکتر بومانی مقاوم به آنتی‌بیوتیک عامل عمده گسترش عفونت‌های بیمارستانی است [۱]. طی سه دهه اخیر، پزشکان به‌طور فزاینده، با عفونت‌هایی از سویه‌های اسنیتوباکتر روبرو شده‌اند که تقریباً به‌بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های درمانی مقاوم هستند [۲]. در اواخر ۱۹۹۰ کارباپنم (Carbapenem) و پلی‌میکسین (Polymyxin) علیه عفونت‌های شدید این میکروارگانسیم‌ها در بیمارستان‌ها استفاده می‌شد [۳]. امروز سویه‌های مقاوم به کارباپنم‌ها در سراسر دنیا گسترده شده است بنابراین توسعه اندک عوامل درمان جایگزین، نگران‌کننده است [۴]. از دیگر عوامل مؤثر در گسترش اسنیتوباکتر بومانی توانایی آن برای چسبیدن به سطوح در مرحله ابتدایی کلونیزاسیون به انواع زیستگاه‌ها است. اسنیتوباکتر بومانی به سطوح غیر زنده همچون شیشه و پلاستیک می‌چسبد. بنابراین میکروارگانسیم توانایی گسترش روی ابزارهای پزشکی و محیط‌های بیمارستانی را داراست [۵]. علاوه بر آن اسنیتوباکتر توانایی کلونیزاسیون روی سطوح زنده همانند پوست، بافت مخاطی [۶] را نیز داراست. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که سویه‌های اسنیتوباکتر به سلول‌های اپی‌تلیال انسانی در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) می‌چسبند [۷]. عوامل اختصاصی همچون ادهسین‌ها (*Adhesins*) و عوامل غیراختصاصی مانند سطوح آب‌گریز نقش مهمی را در چسبندگی باکتری ایفا می‌کنند [۸]. نتایج مطالعات نشان داده که ادهسین‌ها در اسنیتوباکتر بومانی به دو دسته تقسیم می‌شود: فیمبریه (*Fimbriae*) و ادهسین‌های غیر فیمبریه [۹]. اخیراً چسبندگی غیر فیمبریه، از نوع چسبنده‌های خود انتقالی (*Autotransporter Adhesions: ATADs*) در اسنیتوباکتر بومانی شناسایی شده که به‌عنوان عامل بیماری‌زا در این باکتری است. این نوع پیلی‌ها، مویی شکل، کوتاه، پلیمریزه به نام خود انتقالی به مکانیسم انتقال سیستم ترشحي نوع ۵ وابسته است. این سیستم ترشحي در بین باکتری‌های گرم منفی به‌طور وسیعی گسترده شده است. در این سیستم باکتری‌ها

سلول‌های اپی‌تلیال انسانی A549، HeLa از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی خریداری شد. این رده‌های سلولی در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) با غلظت ۲۰ درصد سرم جنین گاوی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۷ درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده می‌شوند. آغازگرها (Primers)، آنزیم‌های محدود کننده *Nde1* *Xho1* از شرکت ژن فن‌آوران (ایران)، کیت تخلیص پلاسمید و کیت تخلیص زنجیره‌ای پلیمرز از شرکت سیناکلون (ایران) خریداری شد.

شناسایی ژن‌های کد کننده پروتئین چسبندگی

سیستم ترشحي دو جزئی در ژنوم اسیتوباکتر بومانی

هومولوگ ژن‌های کد کننده پروتئین چسبندگی وابسته به سیستم ترشحي دو جزئی در ژنوم اسیتوباکتر بومانی با کمک نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک در بانک ژنی NCBI (National Center for Biotechnology Information) و EXPASY بررسی شد. نرم‌افزار SignalIP4، Psipred نیز برای پیشگویی ساختار دوم پروتئین و شناسایی محل پپتید نشانه استفاده شد.

اگزوپروتئین نوترکیب اسیتوباکتر بومانی ATCC19606 با ساختار کامل است تا با کمک آن نقش اگزوپروتئین‌های سیستم ترشحي دو جزئی در چسبندگی به سلول اپی‌تلیال و تشکیل بیوفیلم (Biofilm) بررسی شود. بخش دوم تحقیق در ارتباط با سنتز ژن کایمری است که از قسمت حفاظت شده و ایمنی‌زا ژن‌های اگزوپروتئین و کانال وابسته به سیستم ترشحي دو جزئی در سویه‌های مختلف اسیتوباکتر بومانی تشکیل شده است. هدف از سنتز این ژن کایمر، تولید پروتئین نوترکیب و تزریق آن به موش سوری برای تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال است که در درجه اول برای شناسایی اگزوپروتئین‌های نوترکیب تولید شده در شرایط آزمایشگاه و در درجه دوم بررسی ایمنی‌زایی پروتئین کایمر کاربرد دارد. این مقاله تولید اگزوپروتئین‌های نوترکیب و نقش آن‌ها در چسبندگی را بررسی کرده است.

مواد و روش‌ها

پلاسمیدها، رده سلولی و سایر مواد واکنش

پلاسمید pET22b به‌عنوان حامل ژنی، انتخاب شد. رده

جدول ۱ مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای قطعات ژنی *fhaB2* *fhaB1*

نام قطعه ژن	مشخصات توالی آغازگر	تعداد بازهای آغازگر (نوکلوتید)	اندازه قطعه تکثیر شده (نوکلوتید)
<i>fhaB1</i>	Fr-CTTA CATATG ATGAACAAGAATAGTTATCGCATTATTT	۳۸	۳۲۱۹
	Rp-CTTA CTCGAG TCAATTTTTTTTCTTTTCTCAAGA	۳۵	
<i>fhaB2</i>	Fr-CTTA CATATG ATGAATAAAAATCTTTATCGAATCATTTT	۳۹	۵۶۹۶
	Rp-CTTACTCGAG TTACATATTCTCAGAAAAGAATTAAC	۳۸	

طراحی آغازگر و تکثیر ژن‌های *fhaB2* *fhaB1*

به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

آغازگرهای مناسب طراحی شد. همچنین در انتهایی ۵' آن‌ها، جایگاه برش آنزیم *Nde1* و کدون آغاز ترجمه و در انتهایی ۳' جایگاه برش *Xho1* اضافه شد. نام، فرمول و تعداد بازهای آغازگر در جدول ۱ آورده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای مناسب و با استفاده از کیت Maxime PCR Pre Mix Kit (i-pfu) با ۱ میکرومولار از هر دو آغازگر

ابتدا توالی ژن‌های مورد نظر در اسیتوباکتر بومانی ATCC19606 به‌صورت ORF (Open Reading Frame) کامل و به‌همراه پپتید نشانه از بانک ژنی NCBI استخراج و سپس با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo و GeneRuner

انجام گرفت [۱۴].

بررسی بیان در سازه‌های ژنی pET22b-B2، pET22b-B1

عمل القای سلول‌های حاوی سازه‌های نو ترکیب با القاگر IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) انجام شد. عمل القا به مدت ۴ ساعت ادامه یافت. پس از اتمام زمان گرماگذاری، رسوب سلولی حاصل در بافر B حاوی اوره ۸ مولار، تریس ۱۰ میلی‌مولار و سدیم دی هیدروژن فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH برابر ۸ همگن و با کمک دستگاه سونیکاتور، سلول‌ها شکسته شدند (قدرت ۷۰ درصد و پالس ۰/۷۵ درصد). پس از اطمینان از شکسته شدن سلول‌ها، نمونه‌ها سانتریفوژ و محلول رویی جمع‌آوری شد. هر دو نمونه روی ژل آکریل آمید ۱۰ درصد الکتروفورز شد. سپس با کمک آزمایش وسترن که در آن از سرم موش‌های تزریق شده با پروتئین کایمر به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده شده است، بیان آگروپروتئین در سلول‌های نو ترکیب تأیید شد. طراحی و سنتز ژن کایمر برای تولید پروتئین، از روی ناحیه حفاظت شده و ایمنی‌زا ژن‌های آگروپروتئین و کانال وابسته به سیستم ترشح دو جزئی از سویه‌های مختلف اسنتیوباکتر بومانی صورت گرفته است.

تأیید بیان پروتئین‌های نو ترکیب با کمک الایزای سلول کامل

به‌منظور تأیید بیان پروتئین نو ترکیب و تعیین جایگاه پروتئین‌های بیان شده در سطح غشای خارجی سلول، الایزای (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) سلول کامل انجام شد. در ابتدا بیان و تولید پروتئین‌های نو ترکیب طبق روش ذکر شده در بالا انجام گرفت. سپس محیط‌های کشت حاوی سلول برداشته شد و درون تیوپ‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری و در ۳۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ

بالادست، پایین دست و ۱۰۰ نانوگرم از DNA اسنتیوباکتر بومانی به‌عنوان DNA الگو در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت. برنامه مورد استفاده برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۲ دقیقه مرحله واسرشته شدن اول در دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد برای واسرشته شدن اول، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای اتصال آغازگرها به رشته الگو، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه برای تکثیر ژن *fhaB1* و زمان ۶ دقیقه برای تکثیر قطعه *fhaB2* و در پایان یک مرحله تکثیر نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد است. محصولات زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از نشانگر وزن مولکولی DNA در ژل آگارز ۱ درصد تأیید شد.

همسانه‌سازی و تراریخت نمودن سلول‌های مستعد BL21(DE3)

محصولات زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از کیت تخلیص زنجیره‌ای پلیمرز شرکت Bioneer (کره) خالص‌سازی شد. سپس پلاسمید تخلیص شده pET22b و محصولات زنجیره‌ای پلیمرز با دو آنزیم *Xho1*، *Nde1* به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برش داده شد. محصولات زنجیره‌ای پلیمرز و ناقل ژنی pET22b برش خورده، با کمک کیت تخلیص محصول زنجیره‌ای پلیمرز خالص‌سازی شد. واکنش الحاق به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد انجام و با روش الکتروپوریشن (Electroporation) به میزبان اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) BL21(DE3) انتقال داده شد. برای تأیید همسانه‌سازی از کلون‌های نو ترکیب کشت داده و تخلیص پلاسمید به روش لیز قلیایی [۱۴] انجام گرفت؛ سپس با کمک آغازگرهای اختصاصی و پلاسمیدهای حاوی ژن نو ترکیب به‌عنوان الگو، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام گرفت. برای تأیید بیشتر، پلاسمیدهای حاوی ژن نو ترکیب با استفاده از آنزیم *Xho1*، *Nde1* برش داده شد. تمامی این مراحل با استفاده از روش‌های استاندارد

مقایسه میزان چسبندگی سلول‌های نوترکیب با

اسنتوباکتر بومانی به سلول‌های اپی تلیال انسانی

پس از بیان و تولید پروتئین‌های نوترکیب به روش ذکر شده در بالا، رسوب باکتری با محیط کشت DMEM فاقد آنتی‌بیوتیک و سرم جنین گاو، ۲ تا ۳ بار شستشو و در محیط کشت فوق سوسپانسیون شد تا تعداد باکتری‌های نوترکیب *FhaB1*، *FhaB2*، اسنتوباکتر بومانی ATCC19606 و اشیریشیا کلی BL21(DE3) به 10^7 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر برسد. برای آماده‌سازی سلول، حدوداً 10^6 سلول از رده‌های سلول اپی تلیال انسانی شامل A549، HeLa در هر چاهک پلیت ۶ تایی کشت سلول ریخته و به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری می‌شود. بعد از اتمام گرماگذاری، به هر چاهک حاوی سلول 10^6 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری افزوده و ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس سویه‌های که نچسبیده با کمک بافر فسفات سالین به‌علاوه ۰/۱۵ درصد ژلاتین شستشو داده شد. سلول‌ها با استفاده از محلول تریپسین برداشته و محتوی چاهک‌ها با استفاده از سری رقت در پلیت نوترینت آگار (Nutrient Agar) حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. میزان چسبندگی به کمک درصد تعداد کلونی‌های شمارش شده تقسیم بر تعداد باکتری‌های اولیه افزوده شده به هر چاهک محاسبه شد [۱۵].

میزان تشکیل بیوفیلم در سلول‌های نوترکیب،

اسنتوباکتر بومانی و اشیریشیا کلی BL21(DE3)

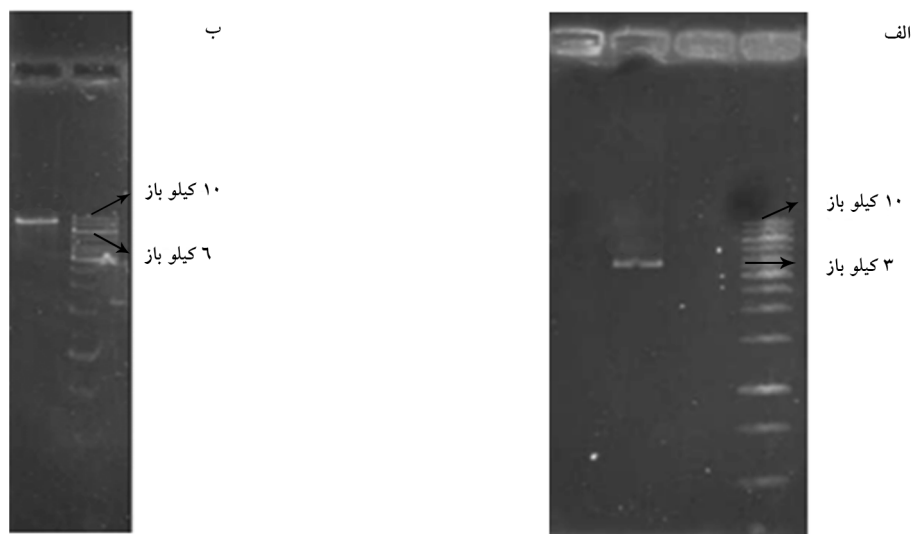
توانایی سویه‌های نوترکیب، اسنتوباکتر بومانی و اشیریشیا کلی BL21(DE3) برای تشکیل بیوفیلم به روش Brossard سنجش شد [۱۶]. در هر یک از چاهک‌های یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای، ۲۰ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری به ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت M9 Biofilm Medium حاوی آنتی‌بیوتیک آمپیرسیلین و IPTG افزوده و به مدت ۵ روز در

شد. محیط کشت رویی خارج شد و پس از دو بار شستشو با بافر فسفات از بافر پوشش دهنده روی آن اضافه شد تا هر یک از باکتری‌های نوترکیب به‌صورت سوسپانسیون درآید و جذب نوری آن‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ برسد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده باکتری، درون چاهک‌های میکروپلیت اضافه شد. پلیت‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شبانه روز قرار داده شد. در ادامه پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک و تثبیت شد. بعد از ۳ تا ۵ بار شستشو با بافر فسفات سالین، به‌منظور جلوگیری از واکنش ناخواسته سرم و آنتی‌بادی کونژوگه در چاهک‌های میکروپلیت، محل‌هایی از چاهک که توسط سلول پوشانده نشده است با استفاده از فسفات بافر سالین حاوی ۵ درصد از شیر خشک پوشش داده شد. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از بافر پوشش دهنده به هر چاهک اضافه شد و یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از اتمام زمان گرماگذاری و در بین تمامی مراحل، مرحله شستشو به‌وسیله فسفات بافر سالین ۳ تا ۵ بار انجام گرفت. بعد از اتمام مراحل شستشو، از سرم موش‌های تزریق شده با پروتئین کایمر سریال رقتی از رقت ۱/۲۵۰ تا ۱/۸۰۰۰ در فسفات بافر سالین تهیه و در چاهک‌های مربوط اضافه شد و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. بعد از اتمام زمان مورد نظر به چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱/۱۰۰۰۰ از آنتی‌بادی آنتی IgG موشی کونژوگه شده با آنزیم HRP (Horseradish Peroxidase) در فسفات بافر سالین اضافه شد. پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱ ساعت قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای TMB (Tetramethylbenzidine) به هر چاهک اضافه شد. میکروپلیت در مکان تاریک قرار گرفت تا واکنش انجام شود. پس از گذشت ۱۵ دقیقه از واکنش، با استفاده از اسید سولفوریک ۲/۵ نرمال، واکنش متوقف شد. جذب نوری پلیت‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. از سلول *E. coli* BL21(DE3) به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

نقش FhaB1 و FhaB2 در چسبندگی اسیتوباکتریومانی به سلول اپیتلیال

را خالی کرده و چاهک‌ها با بافر نمک فسفات شستشو شد. رنگ ویوله درون هر چاهک در ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاوی استن-الکل (۲۰ به ۸۰ حجمی/حجمی) حل شد و با کمک قرائت گر ELISA (ELISA Reader) در طول موج برابر ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از اتمام زمان گرماگذاری، محیط کشت داخل چاهک‌ها را خالی کرده و با بافر نمک فسفات ۳ تا ۵ بار شستشو داده شد. محتوی چاهک‌ها با کریستال ویوله (Crystal Violet) ۱ درصد به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و بعد از اتمام زمان رنگ‌آمیزی، رنگ کریستال ویوله



شکل ۱ الف) تکثیر قطعه ۳۲۱۹ نوکلئوتیدی *fhaB1* (ب) قطعه ۵۷۹۷ نوکلئوتیدی *fhaB2* با کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

fhaB2 نام‌گذاری شد. این آگزوپروتئین‌ها در خانواده پروتئین‌های ترش‌حی قرار دارد. سیگنال پپتیداز، پپتید نشانه آگزوپروتئین *FhaB1* را در ناحیه بین اسیدآمینه ۲۶ و ۲۷ برش می‌دهد ولی آگزوپروتئین *FhaB2* را در نواحی بین اسیدآمینه ۷۶ و ۷۷ برش می‌دهد.

تکثیر ژن‌های *fhaB1*، *fhaB2* به روش واکنش

زنجیره‌ای پلیمرز

با توجه به شرایط ذکر شده برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، یک بانده ۵۸۰۰ نوکلئوتیدی برای قطعه ژن *fhaB2* و تک بانده اختصاصی ۳۶۰۰ نوکلئوتیدی *fhaB1* روی ژل آگارز مشاهده شد (شکل ۱ الف و ب).

نتایج

شناسایی ژن‌های کدکننده پروتئین چسبندگی

سیستم ترش‌حی دو جزئی در ژنوم اسیتوباکتریومانی

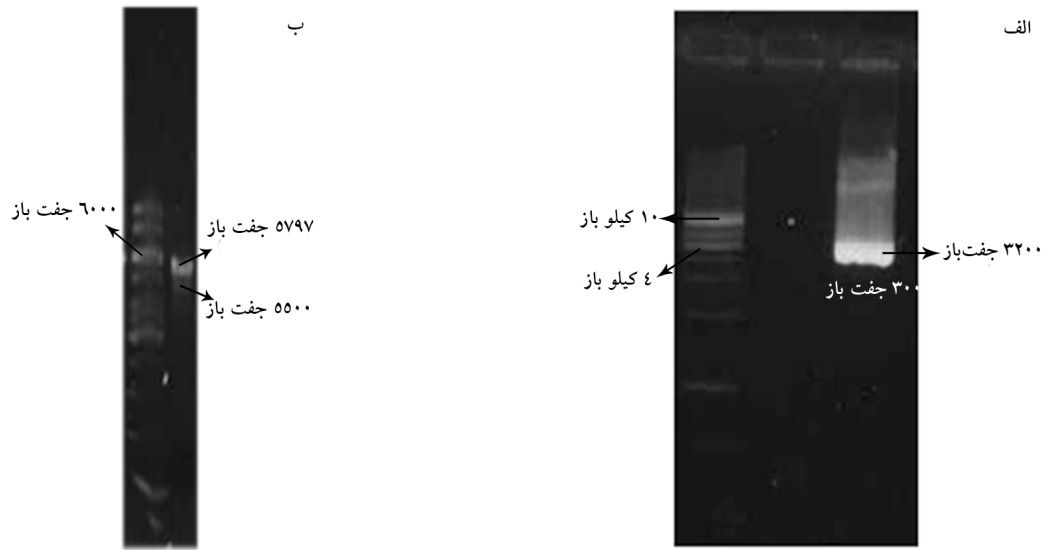
تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک با کمک قسمت‌های حفاظت شده آگزوپروتئین‌های وابسته به سیستم ترش‌حی دو جزئی در ژنوم اسیتوباکتریومانی، دو نوع ORF ۵/۸ کیلوباز و ۳/۶ کیلوباز را نشان داده است که متعلق به آگزوپروتئین‌های این خانواده است. هر دوی این آگزوپروتئین‌ها در ۲۰۰ اسیدآمینه اول خود ناحیه حفاظت شده‌ای دارد که برای شناسایی پروتئین‌های این خانواده به کار می‌رود. این دو ORF به ترتیب برای قطعه ۳/۲ کیلوبازی *fhaB1* و قطعه ۵/۸ کیلوباز

همسازي و ترايخت نمودن سلول‌هاي

مستعد BL21(DE3)

نتايج برش آنزيمي که روي سازه‌هاي ژني pET22b-B2، pET22b-B1 انجام شده در شکل ۲ الف، ۲ ب نشان داده

شده است. کلون‌هاي تاييد شده ذخيره (Stock) تهيه و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداري شدند. کلون‌هاي تاييد شده حاوي ژن‌هاي نوترکيب *fhaB2*، *fhaB1* به ترتيب FhaB2، FhaB1 نام گذاري شدند.



شکل ۲ برش آنزيمي سازه‌هاي نوترکيب توسط آنزيم‌هاي *Nde1*، *Xho1* (الف) pET22b-B1 (ب) pET22b-B2



شکل ۳ تاييد بيان پروتئين‌هاي نوترکيب با کمک وسترن بلات (الف) FhaB1، ۱۱۰ كيلودالتون (ب) FhaB2، ۱۹۰ كيلودالتون

نقش FhaB1 و FhaB2 در چسبندگی اسنتیوباکتر بومانی به سلول اپیتلیال

FhaB1, FhaB2 است و اسنتیوباکتر بومانی در مقایسه با سلول اشیریشیا کلی تمایل بیشتری به سلول اپی تلیال ریه دارند. این در حالی است که سلول‌های نوترکیب FhaB2 در چسبندگی روی سلول اپی تلیال HeLa نقش ندارند (شکل ۵).

میزان تشکیل بیوفیلم در سلول‌های نوترکیب و

اسنتیوباکتر بومانی

اگزوپروتئین‌های FhaB1, FhaB2 و اسنتیوباکتر بومانی در مقایسه با اشیریشیا کلی BL21(DE3) تمایل بیشتری را برای تشکیل بیوفیلم روی سطوح پلی استری داشتند. میزان تشکیل بیوفیلم در سویه‌های نوترکیب FhaB1, FhaB2, اسنتیوباکتر بومانی و اشیریشیا کلی BL21(DE3) به ترتیب ۷۲، ۷۸، ۵۰ و ۱۲ درصد است.

بحث

اسنتیوباکتر بومانی، برای بقا، تکثیر و انتشار در سطح بدن پستانداران عوامل بیماری‌زایی متعددی دارد. در بین این عوامل، علاوه بر پیلی و فیمبریه که در چسبندگی باکتری و کلونیزاسیون نقش مهمی را ایفا می‌کند [۱۷] یک سری از پروتئین‌های غیر فیمبریه در ژنوم اسنتیوباکتر بومانی مطالعه شده‌اند که در خانواده سیستم ترشچی دو جزئی است [۱۸] و می‌تواند در چسبندگی باکتری به سطوح غیر زنده مؤثر باشد. اعضای این خانواده از پروتئین‌های خود انتقالی، از دسته پروتئین‌های ترشچی/خارج غشایی است که به کمک اجزای تشکیل دهنده خود به صورت مستقل از غشا عبور کرده و در سطح غشای خارجی سلول باکتری قرار می‌گیرد. این پروتئین‌ها در خانواده پروتئین‌های سیستم ترشچی دو جزئی قرار گرفته و در دامنه وسیعی از باکتری‌های گرم منفی تولید شده و عملکرد متنوعی همچون تهاجم، تشکیل بیوفیلم، سمیت و چسبندگی دارد.

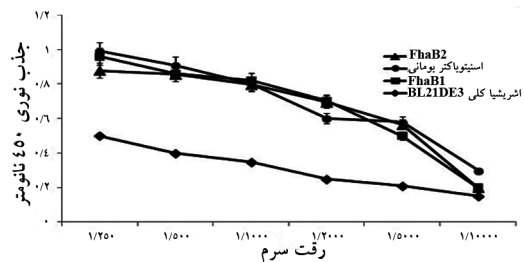
ژن‌های کد کننده اگزوپروتئین و کانال که وابسته به سیستم ترشچی دو جزئی است در ژنوم سویه‌های مختلف اسنتیوباکتر

بررسی بیان در سازه‌های ژنی pET22b-B2، pET22b-B1

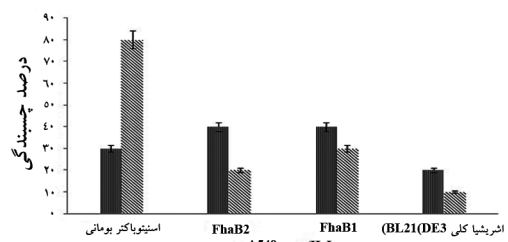
مشاهده باندهای ۱۱۰ و ۱۹۰ کیلودالتون می‌تواند نمایانگر بیان پروتئین‌های نوترکیب در سلول‌های تراریخت شده باشد. این باندهای پروتئینی توسط آزمایش وسترن تأیید شد (شکل ۳ الف، ب، ۳).

تأیید بیان پروتئین‌های نوترکیب با کمک الایزای سلول کامل

نتایج آزمایش نشان داد که سلول‌های نوترکیب و اسنتیوباکتر بومانی، اگزوپروتئین‌های FhaB1, FhaB2 را در سطح غشای خارجی خود بیان می‌کنند (شکل ۴).



شکل ۴ الایزای سلول کامل برای تأیید بیان پروتئین‌های نوترکیب در سطح غشای خارجی سلول اشیریشیا کلی BL21DE3



شکل ۵ بررسی میزان چسبندگی FhaB1, FhaB2, اسنتیوباکتر بومانی و اشیریشیا کلی BL21(DE3) به سلول‌های اپی تلیال انسانی

مقایسه میزان چسبندگی سلول‌های نوترکیب با

اسنتیوباکتر بومانی به سلول‌های اپی تلیال انسانی

آن دسته از سلول‌های نوترکیب که واجد اگزوپروتئین

انسانی در شرایط آزمایشگاهی را نشان دهد. این پروتئین‌ها در تشکیل بیوفیلم روی سطح غیر زنده نیز نقش مهمی دارد، به طوری که میزان آب‌گریزی سطح سلول می‌تواند پیوند آب‌گریز را بین سطح سلول میکروب و سطوح غیر زنده افزایش داده و این امر در تشکیل بیوفیلم مؤثر است [۲۳]. بررسی حاضر نیز که میزان تشکیل بیوفیلم را در سلول‌های نوترکیب FhaB1، FhaB2 و اسنتیوباکتر بومانی با اشیشیاکلی مقایسه کرده، این نتایج را تأیید کرده است ولی نکته قابل تأمل این است که پروتئین‌های نوترکیب FhaB1، FhaB2 وابسته به سیستم ترشحی دو جزئی هستند و باید با کمک کانال‌های وابسته به این سیستم در سطح غشا قرار گیرند. در پژوهش حاضر به دلیل این که کانال‌های وابسته به این سیستم در سطح غشا قرار ندارد اگزوپروتئین‌های مورد مطالعه بیشتر در فضای پری‌پلاسمی باکتری تجمع می‌یابد و نمی‌تواند بر سطح غشا قرار گیرد. بنابراین سویه‌های نوترکیب به دلیل این که بیان بسیار بالایی از پروتئین را نشان ندادند خصوصیت چسبندگی به سلول اپی‌تلیال یا آب‌گریزی آن‌ها نسبت به اسنتیوباکتر بومانی اختلاف زیادی ندارد. به همین منظور سلول‌های نوترکیبی را می‌توان طراحی کرد که حاوی هر دو سازه نوترکیب اگزوپروتئین و کانال باشد تا در کلونیزاسیون و چسبندگی باکتری نقش مؤثرتری داشته باشد. در این صورت پروتئین‌های مورد مطالعه می‌تواند به‌عنوان کاندیدی در طراحی واکسن در استراتژی درمانی اسنتیوباکتر بومانی مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت‌های دانشگاه شاهد در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

بومانی شناسایی شده است. بررسی بیوانفورماتیکی توالی‌های شناسایی شده در مقایسه با توالی اگزوپروتئین FhaB1، FhaB2 در اسنتیوباکتر بومانی ATCC19606 نشان داده که این توالی‌ها به جز در نواحی حفاظت شده در سایر مناطق با هم متفاوت است. در این نوع سیستم خود انتقالی ۲۰۰ اسید آمینه در پایانه N اگزوپروتئین مناطق حفاظت شده را تشکیل داده [۱۵، ۲۱] که در انتقال این پروتئین‌ها به سطح غشای خارجی و شناسایی پروتئین‌های وابسته به این سیستم نقش دارد. درصد تشابه اگزوپروتئین‌های اسنتیوباکتر بومانی به اگزوپروتئین مورکسلا ۳۰ درصد و در اشیشیا کلی O157H7 ۴۰ درصد را نشان داده است.

از دیگر ویژگی‌های مهم پروتئین‌های این خانواده دارا بودن پپتید نشانه طولیل با ویژگی‌های مشخص است [۱۹] که در مورد پروتئین‌های FhaB1، FhaB2 وجود پپتید نشانه در آمینواسید ۲۶، پروتئین FhaB1 و آمینواسید ۷۶ پروتئین FhaB2 نشان دهنده ترشحی بودن این پروتئین‌ها است.

با توجه به عملکردهای متنوع در این پروتئین‌ها تعداد محدودی از این پروتئین‌ها در سطح مولکولی شناخته شده و ارتباط آن‌ها با بیماری‌زایی ثابت شده است. به‌عنوان مثال می‌توان از پروتئین‌های خود انتقالی، Pertacin و FHA در بوردتلا پروتوزیس و پروتئین HAP در هموفیلوس آنفلونزا غیر تیپیک (*Non-Typable Haemophilus influenzae*) نام برد [۲۰]. بررسی‌های بیشتر همچنین مشخص کرده که پروتئین FhaB-like (اگزوپروتئین‌های شبیه به پروتئین فیلامنت-هماگلوتینین B) در اسنتیوباکتر بومانی شامل هر دو دومین ترشحی و عملکردی است و باید بتواند مشابه با اگزوپروتئین‌های MhaB1، MhaB2 در مورکسلا [۱۳]، FhaB در بوردتلا [۲۲] توانایی چسبیدن به سلول‌های اپی‌تلیال

منابع

[1] Dijkshoorn L, Nemeč A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-

resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5(12): 939-51.

- [2] Bahador A, Taheri M, Pourakbari B, Hashemizadeh Z, Rostami H, Mansoori N, Raofian R. Emergence of rifampicin, tigecycline, and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* in Iran; spreading of MDR strains of novel International Clone variants. *Microb Drug Resist* 2013; 19(5): 397-406.
- [3] Livermore DM¹, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol* 2000; 3(5): 489-95.
- [4] Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2006; 43 Suppl 2: S49-56.
- [5] Kramer A, Schwabke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 130.
- [6] Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med* 2008; 358(12): 1271-81.
- [7] Lee JC, Koerten H, van den Broek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R, van den Barselaar M, van der Reijden T, van der Meer J, van de Gevel J, Dijkshoorn L. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Res Microbiol* 2006; 157(4): 360-6.
- [8] Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2002; 3(11): 1033-40.
- [9] Sauer FG, Barnhart M, Choudhury D, Knight SD, Waksman G, Hultgren SJ. Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment. *Curr Opin Struct Biol* 2000; 10(5): 548-56.
- [10] Grijpstra J, Arenas J, Rutten L, Tommassen J. Autotransporter secretion: varying on a theme. *Res Microbiol* 2013; 164(6): 562-82.
- [11] Benz I, Schmidt MA. Structures and functions of autotransporter proteins in microbial pathogens. *Int J Med Microbiol* 2011; 301(6): 461-8.
- [12] Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68(4): 692-744.
- [13] Balder R, Hassel J, Lipski S, Lafontaine ER. *Moraxella catarrhalis* strain O35E expresses two filamentous hemagglutinin-like proteins that mediate adherence to human epithelial cells. *Infect Immun* 2007; 75(6): 2765-75.
- [14] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [15] Plamondon P, Luke NR, Campagnari AA. Identification of a novel two-partner secretion locus in *Moraxella catarrhalis*. *Infect Immun* 2007; 75(6): 2929-36.
- [16] Brossard KA, Campagnari AA. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infect Immun* 2012; 80(1): 228-33.
- [17] Levin AS, Levy CE, Manrique AE, Medeiros EA, Costa SF. Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21(1): 58-62.
- [18] Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* 2001; 69(3): 1231-43.
- [19] Henderson IR, Cappello R, Nataro JP.

- Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion. Trends Microbiol 2000; 8(12): 529-32.
- [20] Wells TJ, Tree JJ, Ulett GC, Schembri MA. Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface. FEMS Microbiol Lett 2007; 274(2): 163-72.
- [21] Choi PS, Dawson AJ, Bernstein HD. Characterization of a novel two-partner secretion system in *Escherichia coli* O157:H7. J Bacteriol 2007; 189(9): 3452-61.
- [22] Piatti G. Identification of immunodominant epitopes in the filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. FEMS Immunol Med Microbiol 1999; 23(3): 235-41.
- [23] Desrousseaux C, Sautou V, Descamps S, Traoré O. Modification of the surfaces of medical devices to prevent microbial adhesion and biofilm formation. J Hosp Infect 2013; 85(2):87-93.