

بررسی ارتباط جهش در فاکتور عفونت‌زایی VirB2 بروسلا ملی‌تنسیس با ایمنی‌زایی و ماندگاری درون سلولی این باکتری

علی پوریاسین^{۱*}، سیدرضا روضه‌ئی^۲، محمدعلی شکرگزار^۳، غلام‌رضا جوادی^۴، مجید صادقی‌زاده^۵

۱- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک مولکولی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- کارشناس، گروه میکروبیولوژی، آزمایشگاه پزشکی قلهک، تهران، ایران

۳- دانشیار، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۵- دانشیار، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۸/۰۵/۰۵

دریافت مقاله: ۸۸/۰۴/۰۷

چکیده

هدف: اپرون *virB* در بروسلا ملی‌تنسیس، سیستم ترشحی نوع IV (T4SS) را رمز می‌کند که برای تکثیر درون سلولی و ایجاد عفونت در مدل موشی مورد احتیاج است. محصول دومین ژن این اپرون، *VirB2* است که پیش‌بینی می‌شود مکانی را در سطح باکتری ایجاد کند تا امکان اتصال به میزبان را فراهم آورد. امروزه مطالعات روی توصیف جهش‌های حذفی در این ژن متمرکز شده است که انتظار می‌رود آثار این جهش در ژن‌های پایین‌دست این اپرون که T4SS را می‌سازند، نشان داده شود. در این تحقیق بررسی تأثیرات جهش *virB2* بر ماندگاری و تکثیر درون سلولی باکتری در ماکروفاژهای J774 و موش‌های BALB/c و میزان ایمنی‌زایی آن بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: برای این که لزوم حضور *VirB2* در ساختار و عملکرد T4SS مشخص شود، ابتدا با کلون‌سازی، ساختاری که در آن جهش حذفی *virB2* ایجاد شده و ژن مقاومت به کانامیسین جایگزین آن شده بود، ساخته شد. برای نشان دادن تکثیر درون سلولی باکتری، ماکروفاژهای J774 و موش‌های BALB/c با بروسلا ملی‌تنسیس سویه وحشی و جهش‌یافته آلوده شدند، همچنین ترشح IgG، اینترفرون ۱۲ و اینترفرون گاما در مدل موشی بررسی شد. **نتایج:** بعد از ۴۸ ساعت، تعداد بروسلای جهش‌یافته نسبت به سویه وحشی در ماکروفاژهای J774 به شدت کاهش یافت و بروسلای جهش‌یافته *virB2* از 1×10^6 CFU در طحال به کمتر از ۱۰۰۰ CFU در طحال در طی ۸ هفته رسید. همچنین IgG کل طی همین مدت در موش‌های هر دو گروه افزایش یافت، اما اینترفرون ۱۲ و اینترفرون گاما فقط در موش‌های آلوده به سویه وحشی باکتری افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: حضور ژن *virB2* برای تکثیر درون سلولی در ماکروفاژهای J774 ضروری است، باکتری‌های جهش‌یافته در ژن *virB2* قادر به ایجاد عفونت پایدار در مدل موشی نیستند. بنابراین نقش ضروری *VirB2* در ساختار T4SS در هنگام عفونت‌زایی و ترشح اینترفرون ۱۲ و اینترفرون گاما نشان داده شد. اما حضور یا عدم حضور این ژن تأثیری در تولید IgG کل ندارد.

کلیدواژگان: بروسلا ملی‌تنسیس، جهش *virB2*، T4SS، تکثیر درون سلولی، ایمنی‌زایی

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه ژنتیک مولکولی، صندوق پستی: ۴۹۳۳-۱۴۱۵۵

Email: yabesiali@yahoo.com

۱- مقدمه

بروسلا ملی‌تنسیس (*Brucella melitensis*) از دسته باکتری‌های اختیاری، هوازی، کوکوباسیلی شکل، گرم منفی و بیماری‌زای درون سلولی است که باعث سقط جنین در بز و گوسفند می‌شود، همچنین عامل تب مالت در انسان است [۱]. بروسلا ملی‌تنسیس که به‌عنوان یکی از جدی‌ترین عوامل بیماری‌های مشترک بین دام و انسان در جهان مطرح است، باعث ایجاد ضعف و تب متناوب در انسان می‌شود [۲]. این بیماری در صورت عدم درمان تا چند ماه باقی می‌ماند و به‌ندرت برای انسان کشنده است. معمولاً عفونت از راه گوارشی، تنفسی و از طریق خراش پوستی و ... منتقل می‌شود. اغلب ابتلا به عفونت در انسان از طریق شیر و فراورده‌های لبنی است [۳]. در پی نفوذ باکتری به مخاط اپی‌تلیوم به سوی غدد لنفی حرکت کرده و از طریق ماکروفاژها در درون غدد لنفی، طحال، کبد، مغز استخوان، غدد پستانی و اندام زایشی گسترش و تکثیر می‌یابند. افزایش بروسلا در میزبان به دلیل توانایی آن در فرار از مکانیسم‌های مرگ‌بار و همچنین تکثیر باکتری در درون ماکروفاژها است [۴، ۵]. بروسلا قادر است برای تکثیر و افزایش ماندگاری درون سلولی فاگوزوم‌هایی را در درون ماکروفاژها به روش جلوگیری از ادغام فاگوزوم با لیزوزوم، به‌وجود آورد [۶، ۷]، به‌همین دلیل قدرت مقابله با واکنش‌هایی مانند کاهش اکسیژن و pH اسیدی درون ماکروفاژها را پیدا می‌کند [۵]. بروسلا بعد از ورود به سلول میزبان وارد سیستم رتیکیولاندوتلیال (Reticuloendothelial system: RES) می‌شود، قرارگیری در این مکان باعث ماندگاری و عفونت‌زایی آن می‌شود [۶، ۷]. جنبه کلیدی عفونت‌زایی بروسلا، توانایی آن در بقا و تکثیر در فاگوزوم‌های حرفه‌ای و غیرحرفه‌ای است [۸، ۹]. در این زمان باکتری با ورود به درون فاگوزوم‌های ابتدایی، شرایط محیطی خاصی را در سلول‌های یوکاریوت برای بقا و تکثیر درون سلولی خود پدید می‌آورد [۲، ۱۰].

از دیدگاه تکاملی گونه‌های بروسلا بسیار نزدیک به هم بوده، به‌طوری که بیشتر از ۹۰ درصد شباهت در DNA

گونه‌های مختلف آن‌ها وجود دارد [۱۱، ۱۲]. ژنوم بروسلا ملی‌تنسیس به‌طور کامل تعیین توالی شده است که شامل ۳۲۹۴۹۳۵ جفت‌باز بوده که در درون دو کروموزوم حلقوی یکی به اندازه ۲۱۱۷۱۴۴ جفت‌باز و دیگری ۱۱۷۷۸۷ جفت‌باز توزیع شده است. این ژنوم از ۳۱۹۷ منطقه ORF (Open Reading Frame) رمزدهنده شکل گرفته است، به‌طوری که ۲۴۸۷ عدد از آن‌ها یعنی حدود ۷۸ درصد عملکردی هستند [۳، ۱۳]. بروسلا فاقد سیستم‌های ترشحی نوع I، II و III بوده اما حضور ژن‌های رمزدهنده ترشح‌کننده وابسته (Secretory-dependent) و ترشح‌کننده غیروابسته (Secretory-independent) و تاژک اختصاصی از سیستم‌های ترشحی نوع III، IV و V که به‌ترتیب در اتصال، عفونت‌زایی و همولیز نقش دارند، به اثبات رسیده است [۱۳]. سیستم‌های ترشحی نوع چهار یا T4SS (Type IV Secretion system) توسط بسیاری از باکتری‌های گرم منفی برای انتقال فاکتورهای عفونت‌زا به درون سلول‌های یوکاریوت یا به‌عنوان واسطه‌ای برای انتقال پلاسمید به کار می‌روند [۱۴، ۱۵]. T4SS از جمله فاکتورهای بسیار مهم برای انجام واکنش‌های بین میزبان و بیماری‌زا است. به‌طوری که ماندگاری بروسلا در محیط‌های مختلف از جمله محفظه‌های درون سلولی پستانداران منوط به وجود آن‌هاست [۱۶، ۱۷]. جهش‌های حذفی در T4SS نشان داده است که بقا و تکثیر بروسلا در ماکروفاژها و سلول‌های اپی‌تلیال مانند مدل موشی از بین خواهد رفت. بهترین مطالعات روی این سیستم ترشحی در مدل آگروباکتریوم تومفاسینس (*Agrobacterium tumefaciens*) انجام گرفته است. به‌طوری که در این باکتری T4SS از ۱۲ قسمت به‌ترتیب از VirB1 تا VirB11 و VirD4 (VirB12) تشکیل شده است. آزمایش‌های بیوشیمیایی، ژنتیکی و زیست‌شناسی سلولی نشان داده است که VirB2 تا VirB11 باعث تشکیل کانالی می‌شوند که از یک سمت به فضای سیتوپلاسمی و از طرف دیگر به فضای بیرون سلولی راه می‌یابد، به‌طوری که این فضا، غشای داخلی و خارجی را از طریق فضایی محفظه

پری‌پلاسمی به هم متصل می‌نماید و با ساختار هوموالیگومری یک سوراخ خارجی را تشکیل می‌دهد [۱۵، ۱۸]. VirB6 تا VirB10 قسمت مرکزی T4SS و مسیر انتقال مواد را تشکیل می‌دهند. VirB2 و VirB5 اجزای بزرگ و کوچک این کانال هستند که T4SS را به‌صورت رابطی با سلول میزبان در می‌آورند [۱۹، ۲۰]. نقش پروتئین VirB3 نسبت به بقیه خیلی کمتر مشخص شده است، اما عملکرد آن می‌تواند در ارتباط با مکان‌یابی اجزای T4SS برای گرد آوردی (Montage) باشد [۲۱، ۲۲]. VirB4 و VirB11 در قسمت غشای داخلی برای فعالیت NTPase قرار گرفته‌اند که هرکدام به‌عنوان عاملی در غشای داخلی برای اتصال پروتئین‌های VirB به فضای پری‌پلاسمی محسوب می‌شوند [۲۳]. VirD4 به دهانه سیتوپلاسمی این کانال متصل شده و در انتقال مواد و فعالیت NTPase نقش دارد [۲۴]. نقش VirB1 برای عفونت‌زایی ضروری نیست و عملکرد آن شبیه یک لیتیک ترانس‌گلیکولاز (Lytic transglycosylase) است که می‌تواند عمل گرد آوردی T4SS را از طریق لیز پپتیدوگلیکان غشایی و ایجاد مکان مناسب تسهیل کند [۲۵].

در موش عفونت با بروسلائی سوش وحشی و جهش‌یافته VirB در ابتدا موجب ترشح IgG2a می‌شود که دلالت بر پاسخ Th1 (T helper 1) دارد [۲۶]. ترشح این آنتی‌بادی در عفونت با سوش وحشی بیشتر از جهش‌یافته است که می‌تواند به دو دلیل باشد: ۱- از دست دادن آنتی‌ژن معین در نوع جهش‌یافته که مانع از تحریک سیستم ایمنی می‌شود، به‌طوری که بعد از ۵۶ روز تعداد باکتری‌ها در طحال بسیار کاهش می‌یابد [۲۷]. ۲- میزان ترشح سیتوکین‌ها (Cytokines) در ۳ تا ۴ روز اول بعد از عفونت تفاوت دارد در حالی که تعداد باکتری سوش وحشی و جهش‌یافته مشابه است [۲۷، ۲۸]. سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (Antigen-Presenting Cells: APCs) بعد از دریافت بروسلا ایترلوکین ۱۲ (Interleukin 12: IL-12) ترشح می‌کنند. ترشح این سیتوکین موجب تحریک Th1 و ترشح اینترفرون گاما (Interferon-gamma: INF- γ) توسط آن‌ها و فعال شدن مکانیسم میکروب‌کشی ماکروفاژها می‌شود [۲۹]. اما

طی عفونت با نوع جهش‌یافته VirB ترشح IL-12 و به دنبال آن، تحریک Th1 و ترشح IFN- γ صورت نمی‌پذیرد [۳۰]. بنابراین مقابله سیستم ایمنی با عفونت بروسلائی با واسطه عملکرد Th1 انجام می‌گیرد [۲۹]. INF- γ و IL-12 کنترل تکثیر بروسلا را در موش بر عهده دارند و تولید IL-10 باعث کاهش توانایی کنترل عفونت بروسلائی در موش می‌شود [۳۱]. براساس اطلاعات، در هنگام آلودگی میزبان به انواع بروسلاها، فعال شدن پاسخ‌های ایمنی به‌صورت محدود انجام می‌گیرد، همچنین بین تکثیر و ماندگاری بروسلا در محیط کشت و قرارگیری آن در RE در محیط درون‌بدن (In vivo) با T4SS ارتباطی وجود دارد که هنوز به‌طور کامل معلوم نشده است. اما بین وجود T4SS که موجب آزاد کردن محرک‌هایی شده و ترشح IL-12 و IFN- γ در سیتوزول وابستگی وجود دارد. به‌طوری که T4SS مستقیم یا غیرمستقیم موجب پاسخ‌های ایمنی میزبان می‌شود. در این تحقیق با حذف قسمتی از ژن *virB2* و قرار دادن ژن مقاومت به کانامایسین (Kanamycin) توسط روش جایگزینی ژنی (Gene replacement) به‌جای آن، اثر جهش VirB2 و آثار آن بر ماندگاری و ایمنی‌زایی مدنظر بررسی شد. به‌طوری که با آلوده کردن ماکروفاژهای J774 موشی در محیط آزمایشگاه (In vitro) و آلوده کردن موش به‌صورت درون‌بدن توسط بروسلا ملی‌تنسیس، میزان ماندگاری این باکتری در مدت زمان‌های مشخص تعیین شد. از طرف دیگر با اندازه‌گیری IgG، IL-12 و IFN- γ در سرم موش طی ۸ هفته، ایمنی‌زایی و میزان تحریک سیستم ایمنی مشخص شد [۲۹].

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- انتخاب سویه باکتری، محیط کشت و

شرایط رشد

در این تحقیق از سویه بروسلا ملی‌تنسیس 16M که از آزمایشگاه رفرانس دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تحویل گرفته شد، استفاده شد. بعد از رشد سویه استاندارد

با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر (Roche, Germany)، ۳۰۰ نانوگرم DNA و ۰/۲ میکروگرم از آغازگرهای (Primers) اختصاصی اضافه شدند. بعد از طراحی سه جفت آغازگر (جدول ۱)، محل‌های برش اختصاصی در ابتدای هر کدام از آغازگرها اضافه شد و بر طبق جدول زیر، تکثیر برای دو منطقه ژنی بالادست و پایین‌دست ژن *virB2* انجام شد.

	۵'	۹۴ درجه سانتی‌گراد	شروع داغ (Hot Start)
۴۵ چرخه	۳۰	۹۴ درجه سانتی‌گراد	ذوب (Melting)
	۳۰	۶۴ درجه سانتی‌گراد	اتصال (Priming)
	۳۰	۷۲ درجه سانتی‌گراد	پلیمریزاسیون (Polymerization)
	۵'	۷۲ درجه سانتی‌گراد	بسط نهایی (End Extension)

برای تکثیر ژن مقاومت به کانامایسین از روی حامل PET 28 (Novagen, USA) که حاوی این ژن است، تکثیر بر طبق جدول زیر صورت گرفت.

	۵'	۹۴ درجه سانتی‌گراد	شروع داغ
۴۵ چرخه	۳۰	۹۴ درجه سانتی‌گراد	ذوب
	۳۰	۶۲ درجه سانتی‌گراد	اتصال
	۳۰	۷۲ درجه سانتی‌گراد	پلیمریزاسیون
	۵'	۷۲ درجه سانتی‌گراد	بسط نهایی

۳-۲- ساخت پلاسمید pUKD

با استفاده از کیت Topo[®] Cloning (Invitrogen, USA) با دستورالعمل One Shot[®] Chemically (Invitrogen, USA) سلول‌های پذیرنده Top10 *E. Coli* (Invitrogen, USA) آماده و ژن‌های بالادست و پایین‌دست *virB2* و مقاومت به کانامایسین که قبلاً تکثیر شده و محصول آن‌ها از درون ژل توسط کیت استخراج DNA از ژل (Bioneer, South Korea) تخلیص شده و وارد حامل PCR-Topo (Invitrogen, USA)

روی محیط کشت SBA (Schaeidler Brucella Agar) (Liofilchem, Italy) که حاوی ۵ درصد خون گاو سالم است، هر تک کلونی به مدت دو روز در درون محیط بروسلا برات (Brucella Broth) (Liofilchem, Italy) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۵ درصد دی‌اکسید کربن رشد داده شد. باکتری‌هایی که برای تزریق به موش در نظر گرفته شدند، برای جلوگیری از بروز جهش‌های Spontaneous Rough ابتدا در محیط کشت Potato Infusion Agar (Liofilchem, Italy)، سپس در بروسلا برات تکثیر یافتند. در نهایت غلظت 1×10^9 CFU (Colony-Forming Unit) در هر میلی‌لیتر تهیه شده و با سوسپانسیون باکتریایی فوق با حجم‌های ۱ میلی‌لیتر در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آنتی‌بیوتیک‌هایی که استفاده شدند شامل کانامایسین (۵۰-۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) (Roche, Germany)، آمپی‌سیلین (Ampicillin) (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) (Roche, Germany) و جنتامایسین (Gentamycin) (۵۰-۲۵ میلی‌گرم در لیتر) (Roche, Germany) بودند.

۲-۲- آماده‌سازی باکتری، استخراج و تکثیر DNA

برای استخراج DNA ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی روی محیط SBA برده شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور ۵ درصد دی‌اکسید کربن رشد یافت. چند کلونی از باکتری در PBS (Phosphate Buffered Saline) رقیق شد و پس از انجام مراحل آماده‌سازی تلخیص DNA توسط کیت استخراج Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Germany) انجام شد. تکثیر ژن با روش PCR به وسیله دستگاه ترمال سایکلر (ABI Prism, USA) انجام شد. در هر لوله PCR که حجم نهایی آن ۵۰ میکرولیتر بود، ۲/۵ میکرولیتر Tris-HCl ۱۰۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر KCl ۱۰۰ میلی‌مولار، ۱/۵ میکرولیتر dNTPs ۴۰۰ میکرومولار، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر Enhancer با غلظت ۵ واحد در میلی‌لیتر، ۰/۸ میکرولیتر DNA پلیمرز Taq

۲-۴- انتقال حامل pUKD به درون بروسلا و انجام نو ترکیبی هومولوگ و تأیید آن

CFU 1×10^8 در هر میلی‌لیتر بروسلا ملی‌تنسیس روی محیط SBA که حاوی ۵ درصد خون گاو سالم است منتقل شده و براساس دستورالعمل تهیه سوسپانسیون سلولی برای الکتروپوریشن (Electroporation)، باکتری‌های رشد یافته آماده شدند. الکتروپوریشن توسط دستگاه Eppendorf 2510 Electroporator (Germany) انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های الکتروپوریت شده روی محیط SBA حاوی ۴۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کانامایسین، کشت داده شد و بعد از دو هفته علائم رشد در این پلیت‌ها که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۵ درصد دی‌اکسید کربن قرار گرفته بودند، ظاهر شد. ۲۰ کلونی از مجموع کلونی‌های رشد یافته انتخاب شده و هر کدام جداگانه روی محیط SBA حاوی کانامایسین تکثیر یافتند. بروسلا ملی‌تنسیس رشد یافته روی SBA حاوی کانامایسین دارای جهش حذفی در ژن *virB2* است (به دلیل این‌که سوش وحشی بروسلا ملی‌تنسیس نسبت به کانامایسین حساس است). اما برای اطمینان از جایگزینی صحیح قطعه هدف با هومولوگ خود در باکتری یک جفت آغازگر (جدول ۱) که ۲۵۰ جفت‌باز بالادست و پایین دست ژن هدف را تکثیر می‌نماید، طراحی شد. به‌طوری که محصول ۲۶۲۰ جفت‌بازی، مؤید نو ترکیبی هومولوگ و وجود جهش حذفی در بروسلا خواهد بود. بعد از رشد بروسلا از هر پلیت استخراج DNA صورت گرفت و PCR بر طبق جدول زیر انجام شد.

	۵'	۹۴ درجه سانتی‌گراد	شروع داغ
۴۵ چرخه	۴۰	۹۴ درجه سانتی‌گراد	ذوب
	۴۰	۵۶ درجه سانتی‌گراد	اتصال
	۶۰	۷۲ درجه سانتی‌گراد	پلیمریزاسیون
	۱۰'	۷۲ درجه سانتی‌گراد	بسط نهایی

شده بود، وارد سلول‌های باکتریایی شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در محیط LB Agar (Luria Bertani) (Liofilchem, Italy) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد و تک کلونی‌ها در LB Broth (Liofilchem, Italy) به مدت ۲۴ ساعت در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی شیکر (Shaker) قرار داده شد تا در نهایت توسط کیت استخراج پلاسمید (Bioneer, South Korea)، پلاسمیدهای حاوی ژن‌های مربوط تخلیص شدند. قطعه ۵۸۲ جفت‌بازی بالادست *virB2* که درون حامل PCR-Topo-1 است توسط دو آنزیم (Roche, Germany) *BamHI* و (Roche, Germany) *XhoI* برش خورده و از درون ژل یک درصد آگارز تخلیص شده و توسط DNA Ligation Kit (Qiagen, Germany) وارد پلاسمید pET 32a (Nonagen, USA) برش خورده توسط همان دو آنزیم ذکر شده، شد. نام حامل جدید حامل pU همان دو آنزیم ذکر شده، شد. در مرحله بعد حامل pU به همراه PCR-Topo-2 که حاوی قطعه ۸۷۰ جفت‌بازی مقاومت به کانامایسین است، توسط دو آنزیم *BamHI* و *KpnI* (Roche, Germany) برش داده شد و با DNA Ligation kit (Qiagen, Germany) به هم ملحق شده و حامل pUK (pUK vector) نام گرفت. در آخر حامل pUK و PCR-Topo-3 حاوی قطعه ۶۶۸ جفت‌بازی پایین دست *virB2* توسط دو آنزیم *XbaI* و *KpnI* (Roche, Germany) هضم و بعد از الحاق حامل pUKD (pUKD vector) نامیده شد. برای غربال‌گری حامل جدید به دلیل حضور ژن مقاومت به کانامایسین از LB agar حاوی آمپی‌سیلین و کانامایسین استفاده شد. تمام مراحل کلونینگ و ساخت پلاسمیدها توسط آنزیم‌های برش‌گر اختصاصی همان مرحله و در نهایت توسط PCR بررسی شده و پس از اطمینان از وجود جهش حذفی در محل ژن *virB2* در حامل pUKD، برای تکثیر به درون *E. Coli* Top10 فرستاده شد.

جدول ۱ آغازگرهای هر منطقه برای PCR و آنزیم‌های برش‌گر لازم برای همسانه‌سازی

آغازگر	آنزیم برش‌گر	توالی	ژن هدف	اندازه
B-Up-F	<i>XhoI</i>	5'-CTCGAGGCTGCCCCAGTAAAAAACGAC-3'	بالادست <i>virB2</i>	۵۸۲ جفت‌باز
B-Up-R	<i>BamHI</i>	5'-GGATCCACGGTCTGCTTGCTCAATGTCTAT-3'	پایین‌دست <i>virB2</i>	۵۸۲ جفت‌باز
B-D-F	<i>KpnI</i>	5'-GGTACCCCATAGCCATCATCTGGTCCG-3'	بالادست <i>virB2</i>	۶۶۸ جفت‌باز
B-D-R	<i>XbaI</i>	5'-TCTAGTCTCCTTGTCCTGCGTCTCG-3'	پایین‌دست <i>virB2</i>	۶۶۸ جفت‌باز
Kan-F	<i>BamHI</i>	5'-GGATCCACAAGGGGTGTATGAGC-3'	مقاومت به کانامیسین	۸۷۰ جفت‌باز
Kan-R	<i>KpnI</i>	5'-GGTACCTCAAATATGTATCCGCTC-3'	مقاومت به کانامیسین	۸۷۰ جفت‌باز
Out-F	-----	5'-CCTGAAGATGGGATCCAAGATCC-3'	ژن جایگزین شده نوترکیب	۲۶۲۰ جفت‌باز
Out-R	-----	5'-CGCCGGCACTGGCCGGTAATTAAC-3'	ژن جایگزین شده نوترکیب	۲۶۲۰ جفت‌باز

۲-۵- آلوده کردن ماکروفاژهای J774 موشی و

تعیین میزان ماندگاری

سلول‌های ماکروفاژ موشی J774 که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران گرفته شد، درون پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای با غلظت $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ سلول در هر چاهک (Cells/well) حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM مغذی (GIBCO, Germany) تقسیم و یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور ۵ درصد دی‌اکسید کربن کشت داده شد. بروسلا ملی‌تنسیس سوش وحشی و جهش‌یافته به‌مدت ۲۴ ساعت روی SBA رشدیافته و پس از رقیق‌سازی توسط DMEM مغذی، ۱۰ میکرولیتر از آن که حاوی حدود 5×10^7 عدد باکتری است به هر چاهک اضافه شد. برای همزمان‌سازی عفونت پلیت را به‌مدت ۵ دقیقه در 250 g سانتریفوژ کرده سپس ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شد. باکتری‌هایی که وارد ماکروفاژها نشده بودند با سه بار شستشو توسط PBS دور ریخته شدند و این لحظه زمان صفر در نظر گرفته شد. درون هر چاهک ۰/۵ میلی‌لیتر محیط DMEM مغذی حاوی

۵۰ میلی‌گرم در لیتر جنتامایسین ریخته و ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور ۵ درصد دی‌اکسید کربن قرار داده شد، در ادامه ۰/۵ میلی‌لیتر محیط DMEM مغذی که حاوی ۲۵ میلی‌گرم در لیتر جنتامایسین است جایگزین محیط قبل شد. چاهک‌های مشخص در زمان‌های صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت بعد از عفونت خالی گشته و ماکروفاژها توسط ۰/۵ میلی‌لیتر از توین ۲۰ (Tween 20) با غلظت ۵ درصد لیز شدند. چاهک‌ها با ۰/۵ میلی‌لیتر از PBS شسته و ماندگاری باکتری‌ها با تهیه رقت‌های متوالی در PBS و کشت روی محیط SBA و شمارش کلونی‌ها اندازه‌گیری شد. این آزمایش سه بار و هر بار به‌صورت سه‌تایی انجام شد و خطای استاندارد (Standard Error) در هر مرحله اندازه‌گیری و مشاهدات به‌وسیله برنامه آماری student's T test بررسی شد.

۲-۶- آلوده کردن موش BALB/c و تعیین

میزان ماندگاری

۱۰۰ میکرولیتر PBS حاوی 5×10^8 CFU بروسلا ملی‌تنسیس سوش وحشی و جهش‌یافته از طریق تزریق درون

صفاقی (Intraperitoneal injection) به موش‌های ماده BALB/c که بین ۶ تا ۱۰ هفته سن داشتند و در گروه‌های پنج‌تایی تقسیم‌بندی شده بودند، انتقال یافت. یک گروه هم به‌عنوان شاهد انتخاب و فقط PBS به آن‌ها تزریق شد. به‌ترتیب، طحال هر گروه پنج‌تایی از هفته اول تا هشتم زیر هود خارج و در ۳ میلی‌لیتر بافر PBS کاملاً خرد شده و پس از تهیه رقت‌های متوالی و کشت روی محیط SBA تعداد کلونی‌ها شمارش شد. شمارش بروسلا‌ی سوش وحشی و جهش‌یافته از طحال هر گروه پنج‌تایی به‌طور جداگانه صورت گرفت و خطای استاندارد در هر مرحله اندازه‌گیری و مشاهدات به‌وسیله برنامه آماری student's T test بررسی شد.

۲-۷- اندازه‌گیری میزان ایمنی‌زایی در سرم موش

پس از آلوده کردن موش‌ها و تزریق PBS به گروه شاهد از هفته اول تا هشتم قبل از برداشتن طحال، خون‌گیری انجام شد و میزان تولید IgG کل، IL-12 و IFN γ درون سرم آن‌ها توسط کیت الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) اختصاصی موش (Quantikine® Germany)، اندازه‌گیری شد. این آزمایش سه بار و هر بار به‌صورت پنج‌تایی انجام شد. خطای استاندارد در هر مرحله اندازه‌گیری و مشاهدات به‌وسیله برنامه آماری student's T test بررسی شد.

۳- نتایج

۳-۱- ساخت حامل pUKD دارای جهش

حذفی به اندازه ۱۸۷ جفت‌باز در منطقه *virB2*

آغازگرهای بالادست قسمتی از ژن *virB2* و منطقه بین ژنی *virB1-virB2* را تکثیر کرده و آغازگرهای پایین‌دست بخشی از *virB4*، تمام *virB3* و ۱۳۱ جفت‌باز از انتهای ۳' ژن *virB2* را تکثیر می‌نماید. بدین ترتیب از ۳۱۸ جفت‌باز ژن

virB2، ۱۸۷ جفت‌باز حذف شد. بعد از انجام مراحل مختلف ساخت حامل pUKD، هضم آنزیمی توسط دو آنزیم برش‌دهنده بالادست ژن *virB2* (*XhoI*) و پایین‌دست *virB2* (*XbaI*) صورت گرفته و قطعه‌ای به اندازه ۲۱۲۰ جفت‌باز برش داده شد (شکل ۱-الف)، که مجموع سه قسمت ژنی بالادست *virB2* (۵۸۲ جفت‌باز)، ژن مقاومت به کانامایسین (۸۷۰ جفت‌باز) و پایین‌دست *virB2* (۶۶۸ جفت‌باز) است. برای تأیید اندازه قطعه برش داده شده، آغازگرهای B-Up-F و B-D-R استفاده و همان قطعه ۲۱۲۰ جفت‌بازی تکثیر شد. بعد از اطمینان از ساخت قطعه مورد نظر، الکتروپوریشن انجام شد، و تعدادی از کلونی‌های تولید شده بعد از انجام این روش بررسی شدند.

۳-۲- تولید سویه جدید بروسلا ملی‌تنسیس

مقاوم به کانامایسین

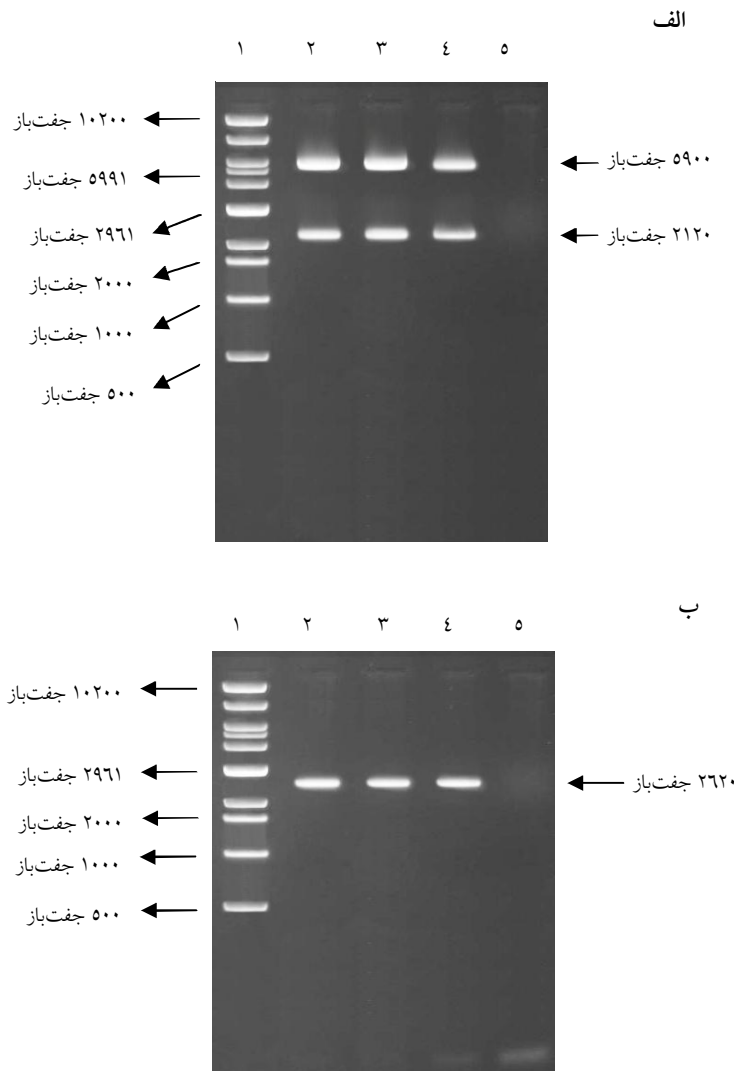
هرکدام از کلونی رشدیافته در محیط حاوی کانامایسین بعد از الکتروپوریشن، روی محیط کشت مجزایی رشد یافتند و همگی بعد از استخراج DNA، توسط دو آنزیم برش‌گر *XbaI* و *XhoI* (شکل ۱-الف) و هم به‌وسیله آغازگرهای اختصاصی B-Up-F و B-D-R بررسی شدند و تمام آن‌ها صاحب منطقه ۲۱۲۰ جفت‌بازی بودند. برای اطمینان از جایگزینی صحیح این قطعه نسبت به هومولوگ خود در بروسلا ملی‌تنسیس سوش وحشی، برای تمامی محیط‌های کشت، PCR توسط دو آغازگر Out-F مربوط به قسمت *virB1* (۲۵۰ جفت‌باز بالاتر از آغازگر B-Up-F) و Out-R در *virB4* (۲۵۰ جفت‌باز پایین‌تر از آغازگر B-D-R) که قطعه‌ای به‌طول ۲۶۲۰ جفت‌باز خواهد داد، انجام شد (شکل ۱-ب) که تنها در ۲ عدد از کلونی‌های رشدیافته این قطعه به‌دست آمد که نشان‌دهنده جابه‌جایی صحیح قطعه ۲۱۲۰ جفت‌بازی با قطعه هومولوگ خود در بروسلا ملی‌تنسیس بود.

۳-۳- بررسی میزان رشد بروسلا فاقد *virB2*

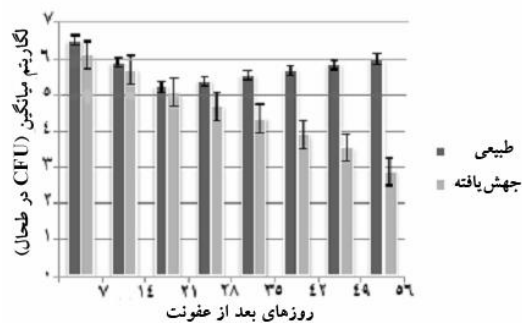
در ماکروفاژها

در این تحقیق جهش قطبی با ورود ژن مقاومت به

کانامایسین درون *virB2* ایجاد شد. با توجه به این‌که *VirB2* جزء ساختار اصلی T4SS است تأثیر این جهش روی ماندگاری بروسلا ملی‌تنسیس درون ماکروفاژ موشی J774 ارزیابی شد.



شکل ۱ الف: هضم آنزیمی حامل pUKD توسط دو آنزیم *XbaI* و *XhoI* (ستون ۱) نشانگر ۵۰۰ جفت‌بازی شرکت Bioneer (South Korea)، ستون‌های ۲، ۳، ۴: قطعه ۲۱۲۰ جفت‌بازی خارج شده از pET32a که مجموع منطقه ژنی بالادست *virB2* ژن مقاومت به کانامایسین و منطقه ژنی پایین‌دست *virB2* در درون حامل pUKD است و قطعه ۵۹۰۰ جفت‌بازی مربوط به pET32a است، ستون ۵: کنترل منفی است. ب: تأیید نوترکیبی هومولوگ به‌وسیله دو آغازگر Out-F و Out-R که هرکدام ۲۵۰ نوکلئوتید بالادست و پایین‌دست سه ژن هدف را تکثیر می‌کنند. ستون ۱) نشانگر ۵۰۰ جفت‌بازی شرکت Bioneer (South Korea)، ستون ۲، ۳، ۴: محصول PCR به اندازه ۲۶۲۰ جفت‌باز، ستون ۵: کنترل منفی است.

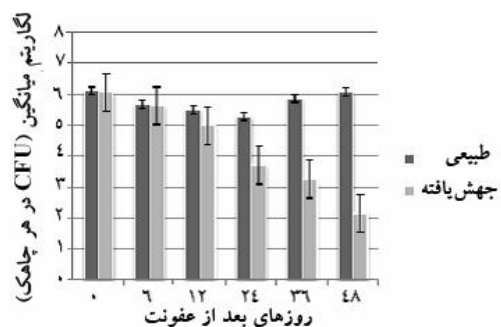
نمودار ۳: تأثیر جهش *virB2* و کاهش میزان بروسلا در طحال موش BALB/c

۳-۵- بررسی نقش جهش *virB2* در ایمنی‌زایی

ماکروفاژها

همزمان با بررسی ماندگاری بروسلا در مدل موشی، ایمنی‌زایی هم بررسی شد و قبل از خارج ساختن طحال از هفته اول تا هشتم خون‌گیری انجام شد و میزان آنتی‌بادی و سیتوکین‌های مختلف که در ماکروفاژها هنگام آلودگی یا ذره‌خواری از خود ترشح می‌کنند، ارزیابی شد. نمودار ۴-الف نوع و میزان افزایش را از هفته اول تا هشتم نشان می‌دهد. جهش *VirB2* تأثیر چندانی بر میزان ترشح *IgG* کل ندارد، به‌طوری‌که در موش آلوده به بروسلا سوش وحشی و جهش‌یافته میزان *IgG* افزایش می‌یابد. البته موش آلوده با سوش وحشی *IgG* بیشتری تولید می‌کند که با توجه به کاهش مقدار بروسلا جهش‌یافته در همین مدت، تقلیل میزان افزایش *IgG* در موش آلوده به بروسلا با جهش *VirB2* نسبت به سوش وحشی، قابل توجیه است. اما ترشح *IL-12* و *IFN-γ* طی ۷ روز بعد از عفونت با بروسلاهای جهش‌یافته نسبت به سوش وحشی بسیار اندک بود، به‌طوری‌که براساس نمودار ۴-ب و ۴-ج اختلاف چندانی در تولید *IL-12* و *IFN-γ* بین موش‌های آلوده به بروسلا جهش‌یافته و کنترل که *PBS* به آن‌ها تزریق شده بود، دیده نشد؛ اما این تغییر در مقایسه بین موش‌های آلوده شده با سوش وحشی و کنترل بسیار چشمگیر بود.

براساس نمودار ۲ بعد از آلوده کردن ماکروفاژها توسط بروسلا ملی‌تنسیس سوش وحشی و جهش‌یافته روی پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای که به‌صورت سه‌تایی انجام شده بود، بعد از ۲۴ ساعت توانایی ماندگاری درون سلولی در بروسلاهای جهش‌یافته کاهش یافت. به‌طوری‌که تعداد باکتری‌ها از حدود 1×10^6 CFU در هر چاهک به حدود کمتر از ۵۰۰۰ CFU در هر چاهک رسید و بعد از ۴۸ ساعت به کمتر از ۲۰۰ CFU در هر چاهک تقلیل پیدا کرد. در حالی‌که در نمونه آلوده شده به سوش وحشی بعد از ۴۸ ساعت تعداد باکتری‌ها به حدود زمان صفر رسید.

نمودار ۲: تأثیر جهش *virB2* و کاهش میزان ماکروفاژهای موشی J774

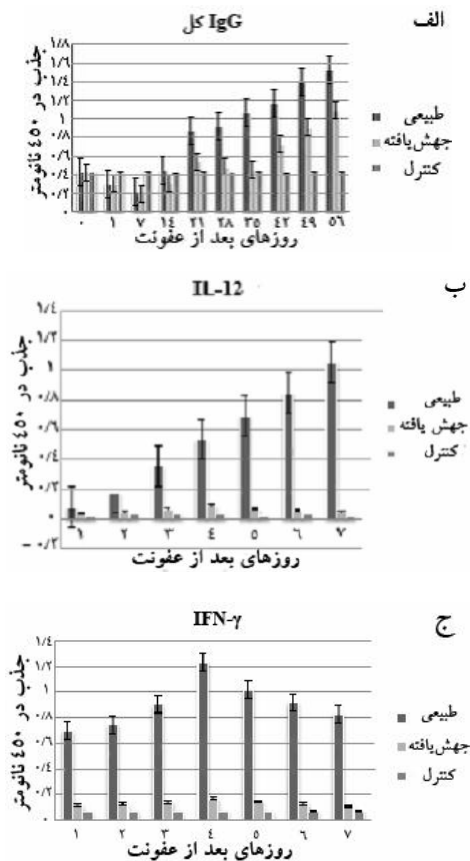
۳-۶- بررسی نقش جهش *virB2* در میزان تکثیر

و ماندگاری بروسلا ملی‌تنسیس در مدل موشی

بررسی تعداد بروسلاهای درون سلولی در طحال موش‌های BALB/c از هفته اول تا هشتم (نمودار ۳) مؤید این مطلب بود که تکثیر و ماندگاری باکتری‌ها رو به کاهش است؛ به‌طوری‌که در انتهای هفته هشتم تعداد بروسلاهای جهش‌یافته از 5×10^5 CFU در طحال به کمتر از ۱۰۰۰ CFU در طحال تقلیل پیدا کرد. اما بروسلاهای سوش وحشی از 5×10^5 CFU در طحال به کمتر از 1×10^6 CFU در طحال افزایش یافت که دلیل واضحی بر ضرورت منطقه‌زنی *virB2* بر تکثیر و بقای بروسلاها در مدل حیوانی است.

برای عفونت‌زایی به ماکروفاژها متصل شود [۲۵، ۳۲]. همچنین معلوم شده که VirB2 دارای یک نقش ضروری در گرد آوردی اجزای T4SS بوده که به دلیل ساختار شبه پیلوسی است که توسط این پروتئین ساخته می‌شود که به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی در آگروباکتریوم تومفاشینس نشان داده شده است [۳۳، ۳۴]. بروسلاها از مکان معینی در سطح خود که همان T4SS است، قادر به اتصال با ماکروفاژها هستند و بعد از چند دقیقه باکتری از طریق تا شدن غشای ماکروفاژ و تشکیل یک ماکروپینوزوم (Macropinosome) به درون آن راه می‌یابد [۳۵]. براساس مطالعات لستری (Lestrade) و همکاران جهش در اپرون *virB* از القا و تولید سیستم ترشحی نوع IV که فاکتور اصلی در عفونت‌زایی است، جلوگیری می‌نماید؛ به همین دلیل پروتئین‌های VirB2 برای تکثیر درون سلولی در ماکروفاژها و سلول‌های هلا (HeLa) مهم هستند [۳۶]. همچنین مطالعاتی که بر پایه جهش‌زایی در T4SS باکتری‌های بروسلا ملی‌تنسیس، بروسلا سوئیس (*B. suis*) و بروسلا ابورتوس (*B. abortus*) صورت گرفته است، تحقیقات لستری و همکاران را در محیط کشت و مدل موشی تأیید می‌کند [۳۷، ۲۵، ۸]. در غربال‌گری توسط ایجاد جهش که در بروسلا ابورتوس برای فاکتورهای عفونت‌زایی انجام شد، نشان داد که اپرون *virB* برای بقای بروسلا در RES نیاز است، این وابستگی به VirB هم در مدل حیوانی و هم در سلول‌های ماکروفاژ و هلا به اثبات رسیده است [۲۵، ۳۸].

در این تحقیق تکثیر و ماندگاری بروسلا ملی‌تنسیس در مدت ۸ هفته در طحال موش اندازه‌گیری شد و تا روز پنجم کاهش چشمگیری در نوع جهش‌یافته نسبت به سوش وحشی دیده نشد؛ اما بعد از آن رفته رفته تعداد باکتری‌های جهش‌یافته در طحال نسبت به سوش وحشی کاهش یافت، البته این کاهش کمتر از کاهش در نوع جهش‌یافته بروسلا ابورتوس در تحقیق لستری و همکاران بود. مطالعات رولان (Rolan) و همکاران نشان دادند که T4SS در بروسلا ابورتوس برای مهاجرت ابتدایی به طحال موشی که به‌وسیله تزریق درون صفاقی آلوده



نمودار ۴ بررسی میزان ایمنی‌زایی در موش BALB/c آلوده شده توسط بروسلا ملی‌تنسیس طبیعی و جهش‌یافته *virB2* و کنترل

۴- بحث

هدف از این تحقیق بررسی آثار جهش حذفی ژن *virB2* روی میزان ماندگاری بروسلا ملی‌تنسیس و ایمنی‌زایی ماکروفاژهای موشی در محیط آزمایشگاهی و مدل حیوانی با توجه به تغییر عملکرد T4SS است.

براساس مطالعات انجام شده در سیستم T4SS میکروارگانیزم آگروباکتریوم تومفاشینس، حضور پروتئین VirB2 هم بر سطح بروسلا به اثبات رسیده است. پیش‌بینی می‌شود که VirB2 با ساخت یک ساختار شبه پیلوس (Pilus-Like) و از طریق تعامل با پروتئین‌های VirB1 و VirB3 مکان یا مجرای فراسلولی را فراهم آورد تا بتواند باکتری را به محیط بیرون مرتبط سازد و از این طریق بروسلا

شده، احتیاج نیست؛ اما برای حضور بیش از سه روز بعد از عفونت لازم است [۲۷]. مطالعات دیگر هم این واقعه را به اثبات رسانده‌اند [۳۹، ۴۰]. تحقیقات رولان و همکاران منطبق بر نتایج لستریت و همکاران است، که براساس جهش‌های *virB* در بروسلا ملی تنسیس نشان داد که تا ۵ روز اول بعد از عفونت کاهش تعداد بروسلاها اتفاق نیفتاد [۲۷، ۳۶، ۴۱]. همچنین راجاشکارا و همکاران (Rajashekara) در بروسلا ملی تنسیس این پدیده را اثبات کرده و نشان دادند که برای انتشار و مهاجرت ابتدایی باکتری از محل تزریق، T4SS ضروری نیست [۴۲]. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که جهش *virB2* هم تا ۵ روز اول، موجب کاهش چشمگیر تعداد بروسلاها در طحال موش نشد که با تحقیقات فوق مطابقت دارد. در بروسلا ابورتوس بعد از گذشت سه روز از عفونت مکانیسم ایمنی در موش فعال می‌شود که موجب کاهش تعداد باکتری در طحال می‌شود. به‌طوری که بعد از ۱۴ تا ۲۱ روز بعد از عفونت میزان باکتری‌های سوش وحشی و جهش‌یافته *virB* تقلیل یافتند، اما بروسلاهای جهش‌یافته ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر بر پایه CFU نسبت به سوش وحشی کاهش داشتند [۲۷، ۴۳]. دلیل این تفاوت می‌تواند تأثیرات مختلف مکانیسم ایمنی در موش‌های طبیعی و جهش‌یافته *VirB* باشد. نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً مکانیسم‌های مختلف سیستم ایمنی در کاهش ماندگاری بروسلاهای سوش وحشی و جهش‌یافته T4SS دخالت دارد [۲۷]. تولید $\text{IFN-}\gamma$ در عفونت بروسلاهای در موش بین روزهای سوم و هفتم بعد از عفونت آغاز می‌شود [۴۴]. $\text{IFN-}\gamma$ در شرایط درون‌بدن در سلول‌هایی که آلوده باشند موجب از بین رفتن بروسلاهای سوش وحشی و جهش‌یافته می‌شود [۲۷]. در این تحقیق میزان $\text{IFN-}\gamma$ ، IL-12 در سرم موش‌های آلوده از روز اول تا هفتم اندازه‌گیری شد و براساس نتایج در موش آلوده به سوش وحشی $\text{IFN-}\gamma$ از روز اول تا چهارم افزایش و سپس کاهش داشت؛ اما در موش آلوده به نوع جهش‌یافته نسبت به کنترل افزایش بسیار اندکی داشت.

IL-12 تنها در سرم موش آلوده به بروسلاهای سوش وحشی افزایش داشت؛ اما IgG کل که طی ۵۶ روز سنجیده شد در هر دو نوع موش آلوده به بروسلاهای سوش وحشی و جهش‌یافته افزایش داشت با این تفاوت که سوش وحشی ترشح IgG را تقریباً دو برابر بیشتر تحریک کرد. نتایج این تحقیق منطبق بر مطالعات رولان و همکاران است به‌طوری که وی و همکارانش نشان دادند که طی ۷۰ روز بعد از عفونت میزان IgG هم در موش آلوده به بروسلاهای سوش وحشی و جهش‌یافته رو به افزایش است. اما میزان $\text{IFN-}\gamma$ و IL-12 فقط در موش آلوده به نوع سوش وحشی بالا رفت [۲۹]. تحقیقات هونگ (Hong) و همکاران و ساتیاسیلان (Sathiyaseelan) و ژان (Zhan) و همکاران هم این مسأله را نشان دادند. رولان و همکاران نشان دادند که جهش در ژن $\text{IFN-}\gamma$ در موش موجب کاهش بسیار زیاد بروسلاهای با جهش *VirB* نسبت به سوش وحشی شد که این نتایج در تحقیقات سان (Sun) و همکاران هم وجود دارد [۳۷]. در موش‌هایی با نقص در MHC (Major Histocompatibility Complex) کلاس I و CD8^+ سلول‌های T هم، چنین پدیده‌ای رخ داد. اما جهش و ایجاد نقص در سلول‌های B و T، کاهش معنی‌داری در جهش‌یافته *VirB* نشان نداد و ماندگاری بروسلاهای سوش وحشی و جهش‌یافته در طحال موش افزایش یافت. این مسأله نشان می‌دهد که T4SS موجب گریز بروسلا ابورتوس از سلول‌های B و T می‌شود [۲۷]. این پدیده در بروسلا ملی تنسیس هم گزارش شده است [۳۹]. جهش همزمان در سلول‌های B و CD4^+ سلول‌های T موجب کاهش بروسلاهای جهش‌یافته *VirB* در طحال موش نسبت به سوش وحشی نشد، که نشان می‌دهد شاید B Cell و CD4^+ T Cell در برداشتن بروسلا جهش‌یافته تأثیرگذار باشند. بنابراین T4SS احتمالاً بروسلا ابورتوس را قادر می‌سازد که از سیستم ایمنی با واسطه سلول‌های B و T فرار کند [۲۷]. در هنگام عفونت، بروسلاهای طبیعی ژن‌های مختلفی از جمله ژن‌های التهابی و ایمنی را در سطح بالایی تنظیم می‌کند که باعث ترشح $\text{IFN-}\gamma$ و ژن‌های القا

شده توسط $IFN-\gamma$ و $IFN-\alpha/\beta$ می‌شوند. اما در نوع جهش‌یافته این ژن‌ها بیان نمی‌شوند [۲۹، ۴۵].

براساس نتایج به‌دست آمده در این تحقیق جهش حذفی *virB2*، عفونت‌زایی و ماندگاری درون سلولی را در ماکروفاژهای J774 موشی به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد، به‌طوری که بعد از ۴۸ ساعت به حدود ۲۰۰ CFU در هر چاهک کاهش یافت. در حالی که در نمونه آلوده به سوش وحشی بعد از ۴۸ ساعت تعداد باکتری‌ها به حدود زمان صفر رسیدند. جهش‌های قطبی و غیرقطبی *VirB2* نقایصی را در ماندگاری درون سلولی در ماکروفاژهای J774 موشی ایجاد می‌نماید که دلیلی بر لزوم *VirB2* برای ماندگاری درون سلولی است [۲۵]. این پروتئین در بروسلا مانند آگروباکتریوم تومفاشینس برای فعالیت T4SS احتیاج است [۴۶]. طبق تحقیقات دن‌هارتی (den Hartigh) و همکاران در طی ۴۸ ساعت تعداد بروسلا ابورتوس سوش وحشی در ماکروفاژهای J774 از 1×10^6 CFU در هر چاهک اندکی زیاده‌تر شده و نوع جهش‌یافته *VirB2* از همین تعداد به حدود ۴۰۰ CFU در هر چاهک کاهش یافته است. جالب این‌که مطالعات وو (Wu) و همکاران نشان می‌دهد که T4SS برای ماندگاری و تحرک بروسلا در ماکروفاژها لازم نیست، به دلیل این‌که حضور و تکثیر بروسلا جهش‌یافته *VirB* افزایش یافت. اما نتایج قبلی در همین آزمایشگاه نشان داده بود که T4SS برای تحرک درون سلولی لازم است [۴۷، ۴۸]. از طرف دیگر با بررسی

میزان عفونت‌زایی، ماندگاری و تکثیر درون سلولی در موش‌های BALB/c نشان داده شد که طی ۸ هفته تعداد بروسلاهای جهش‌یافته *VirB2* از 1×10^6 CFU کاهش یافته است و به حدود کمتر از ۱۰۰۰ CFU در طحال رسید. اما بروسلاهای سوش وحشی از 5×10^6 CFU به کمتر از 1×10^6 CFU در طحال افزایش یافتند. دن‌هارتی و همکاران نشان دادند که تعداد بروسلا ابورتوس سوش وحشی در موش‌های BALB/c از حدود 1×10^6 CFU بعد از گذشت ۸ هفته به 1×10^6 CFU در طحال رسید و نوع جهش‌یافته *VirB2* از همین تعداد به ۲۰۰ CFU در طحال تقلیل یافت [۲۵]. مطالعات آندریاس (Andereas) که بر پایه ایجاد جهش‌های حذفی در *virB1* و *virB2* بود، حضور پروتئین *VirB2* را برای ماندگاری بروسلا ابورتوس در مدل موشی به اثبات رساند. طبق گزارش ایشان جهش قطبی در *VirB2* به‌طور واضح موجب نقص در ماندگاری و عفونت‌زایی بروسلا در موش می‌شود [۲۵].

۵- تشکر و قدردانی

قسمت عمده‌ای از مراحل انجام این طرح در آزمایشگاه پزشکی قلپک به مدیریت آقای دکتر ابراهیم کلانترمهرجردی صورت گرفت به‌همین دلیل از ایشان تقدیر و تشکر می‌گردد. همچنین از آقای دکتر عباس دوستی به‌دلیل در اختیار قرار دادن سویه وحشی بروسلا ملی‌تنسیس 16M قدردانی می‌شود.

۶- منابع

- [1] Corbel MJ. Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis 1997; 3(2): 213-21.
- [2] Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. Vet Microbiol 2002; 90(1-4): 435-46.
- [3] Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. J Bacteriol 2005; 187(8): 2715-26.

- [4] Boschirolu ML, Foulongne V, O'Callaghan D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* 2001; 4(1): 58-64.
- [5] Celli J. Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol* 2006; 157(2): 93-8.
- [6] Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 2003; 198(4): 545-56.
- [7] Chumakov MI, Kurbanova IV. Localization of the protein VirB1 involved in contact formation during conjugation among *Agrobacterium* cells. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 168(2): 297-301.
- [8] Bellaire BH, Roop RM 2nd, Cardelli JA. Opsonized virulent *Brucella abortus* replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP-1-positive phagosomes in human monocytes. *Infect Immun* 2005; 73(6): 3702-13.
- [9] Detilleux PG, Deyoe BL, Cheville NF. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infect Immune* 1990; 58(7): 2320-8.
- [10] Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P, De Bolle X, Michel P, Godefroid J, Walravens K, Letesson JJ. Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect Immun* 2001; 69(8): 4816-22.
- [11] Verger JM, Grimont F, Grimont PA, Grayon M. Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1987; 138(2): 235-8.
- [12] Vizcaino N, Cloeckaert A, Verger J, Grayon M, Fernández-Lago L. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes Infect* 2000; 2(9): 1089-100.
- [13] DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpides N, Overbeek R. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ;99(1): 443-8.
- [14] Carle A, Höppner C, Ahmed Aly K, Yuan Q, den Dulk-Ras A, Vergunst A, O'Callaghan D, Baron C. The *Brucella suis* type IV secretion system assembles in the cell envelope of the heterologous host *Agrobacterium tumefaciens* and increases IncQ plasmid pLS1 recipient competence. *Infect Immun* 2006; 74(1): 108-17.
- [15] Höppner C, Carle A, Sivanesan D, Hoepfner S, Baron C. The putative lytic transglycosylase VirB1 from *Brucella suis* interacts with the type IV secretion system core components VirB8, VirB9 and VirB11. *Microbiology* 2005; 151(Pt 11): 3469-82.
- [16] Paschos A, Patey G, Sivanesan D, Gao C, Bayliss R, Waksman G, O'callaghan D, Baron C. Dimerization and interactions of *Brucella suis* VirB8 with VirB4 and VirB10 are

- required for its biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(19): 7252-7.
- [17] Pei J, Wu Q, Kahl-McDonagh M, Ficht TA. Cytotoxicity in macrophages infected with rough *Brucella* mutants is type IV secretion system dependent. *Infect Immun* 2008; 76(1): 30-7.
- [18] Christie PJ. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochem Biophys Acta* 2004; 1694(1-3): 219-34.
- [19] Hwang HH, Gelvin SB. Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *Plant Cell* 2004; 16(11): 3148-67.
- [20] Schmidt-Eisenlohr H, Domke N, Angerer C, Wanner G, Zambryski PC, Baron C. Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 1999; 181(24): 7485-92.
- [21] Shamaei-Tousi A, Cahill R, Frankel G. Interaction between protein subunits of the type IV secretion system of *Bartonella henselae*. *J Bacteriol* 2004; 186(14): 4796-801.
- [22] Yuan Q, Carle A, Gao C, Sivanesan D, Aly KA, Höppner C, Krall L, Domke N, Baron C. Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J Biol Chem* 2005; 280(28): 26349-59.
- [23] Atmakuri K, Cascales E, Christie PJ. Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol* 2004; 54(5): 1199-211.
- [24] Atmakuri K, Ding Z, Christie PJ. VirE2, a type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol* 2003; 49(6): 1699-713.
- [25] den Hartigh AB, Sun YH, Sondervan D, Heuvelmans N, Reinders MO, Ficht TA, Tsolis RM. Differential requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection. *Infect Immun* 2004; 72(9): 5143-9.
- [26] Vendrell JP, Delobbe A, Huguet MF, Peraldi F, Serre A, Cannat A. Biological properties of a panel of murine monoclonal anti-*Brucella* antibodies. *Immunology* 1987; 61(1): 7-10.
- [27] Rolán HG, Tsolis RM. Mice lacking components of adaptive immunity show increased *Brucella abortus* virB mutant colonization. *Infect Immun* 2007; 75(6): 2965-73.
- [28] Fernández-Lago L, Rodríguez-Tarazona E, Vizcaino N. Differential secretion of interleukin-12 (IL-12) subunits and heterodimeric IL-12p70 protein by CD-1 mice and murine macrophages in response to intracellular infection by *Brucella abortus*. *J Med Microbiol* 1999; 48(12): 1065-73.
- [29] Rolán HG, Tsolis RM. Inactivation of the type IV secretion system reduces the Th1 polarization of the immune response to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun* 2008; 76(7): 3207-13.
- [30] Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 1990; 145(11): 3796-806.
- [31] Sathiyaseelan J, Goenka R, Parent M, Benson

- RM, Murphy EA, Fernandes DM, Foulkes AS, Baldwin CL. Treatment of *Brucella*-susceptible mice with IL-12 increases primary and secondary immunity. *Cell Immunol* 2006; 243(1): 1-9.
- [32] Liu Z, Binns AN. Functional subsets of the virB type IV transport complex proteins involved in the capacity of *Agrobacterium tumefaciens* to serve as a recipient in virB-mediated conjugal transfer of plasmid RSF1010. *J Bacteriol* 2003; 185(11): 3259-69.
- [33] Fullner KJ, Lara JC, Nester EW. Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science* 1996; 273(5278): 1107-9.
- [34] Lai EM, Kado CI. Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 1998; 180(10): 2711-7.
- [35] Kim S, Watarai M, Makino S, Shirahata T. Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions. *Microb Pathog* 2002; 33(5): 225-37.
- [36] Lestrade P, Dricot A, Delrue RM, Lambert C, Martinelli V, De Bolle X, Letesson JJ, Tibor A. Attenuated signature-tagged mutagenesis mutants of *Brucella melitensis* identified during the acute phase of infection in mice. *Infect Immun* 2003; 71(12):7053-60.
- [37] Sun YH, Rolán HG, den Hartigh AB, Sondervan D, Tsolis RM. *Brucella abortus* virB12 is expressed during infection but is not an essential component of the type IV secretion system. *Infect Immun* 2005; 73(9): 6048-54.
- [38] Delrue RM, Martinez-Lorenzo M, Lestrade P, Danese I, Bielarz V, Mertens P, De Bolle X, Tibor A, Gorvel JP, Letesson JJ. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* 2001; 3(7): 487-97.
- [39] Izadjoo MJ, Polotsky Y, Mense MG, Bhattacharjee AK, Paranaivitana CM, Hadfield TL, Hoover DL. Impaired control of *Brucella melitensis* infection in Rag1-deficient mice. *Infect Immun* 2000; 68(9): 5314-20.
- [40] Meador VP, Tabatabai LB, Hagemoser WA, Deyoe BL. Identification of *Brucella abortus* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cows, goats, and mice with an avidin-biotin-peroxidase complex immunoenzymatic staining technique. *Am J Vet Res* 1986; 47(10): 2147-50.
- [41] Lestrade P, Delrue RM, Danese I, Didembourg C, Taminiau B, Mertens P, De Bolle X, Tibor A, Tang CM, Letesson JJ. Identification and characterization of in vivo attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *Mol Microbiol* 2000; 38(3): 543-51.
- [42] Rajashekara G, Glover DA, Krepps M, Splitter GA. Temporal analysis of pathogenic events in virulent and avirulent *Brucella melitensis* infections. *Cell Microbiol* 2005; 7(10): 1459-73.
- [43] Hong PC, Tsolis RM, Ficht TA. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect Immun* 2000; 68(7): 4102-7.
- [44] Fernández-Lago L, Monte M, Chordí A. Endogenous gamma interferon and interleukin-10 in *Brucella abortus* 2308 infection in mice.

- FEMS Immunol Med Microbiol 1996; 15(2-3): 109-14.
- [45] Roux CM, Rolán HG, Santos RL, Beremand PD, Thomas TL, Adams LG, Tsolis RM. Brucella requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice. Cell Microbiol 2007; 9(7): 1851-69.
- [46] Berger BR, Christie PJ. Genetic complementation analysis of the Agrobacterium tumefaciens virB operon: virB2 through virB11 are essential virulence genes. J Bacteriol 1994; 176(12): 3646-60.
- [47] Wu Q, Pei J, Turse C, Ficht TA. Mariner mutagenesis of Brucella melitensis reveals genes with previously uncharacterized roles in virulence and survival. BMC Microbiol 2006; 18(6): 102.
- [48] Pei J, Turse JE, Wu Q, Ficht TA. Brucella abortus rough mutants induce macrophage oncosis that requires bacterial protein synthesis and direct interaction with the macrophage. Infect Immun 2006;74(5): 2667-75.