Original Article

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

Shakiba Darvish Alipour Astaneh[1], Iraj Rasooli[2, 3*], Seyed Latif Mousavi Gargari[2]

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

مقاله اصیل

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

شکیبا درویش علیپور آستانه[1]، ایرج رسولی[2،3*]، سید لطیف موسوی گرگری[2]

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

دریافت مقاله: ۹۲/۱۱/۲۹ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۲/۰۲

چکیده

هدف: اسنیتوباکتر 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 ترشحی دوجزئی می‌تواند در چسبندگی باکتری نقش داشته باشد. هدف از انجام این تحقیق، شناسایی، مطالعه و بررسی نقش پروتئین‌های این خانواده در چسبندگی اسنیتوباکتر بومانی به سلول اپیتلیال انسانی است.

مواد و روش‌ها: هومولوگ ژن‌های کد کننده پروتئین فیلامنت- هماگلوتینین وابسته به سیستم ترشحی دو جزئی در ژنوم اسنیتوباکتر 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 و توانایی برای تشکیل بیوفیلم در سلول‌های نوترکیب، اسنیتوباکتر 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 الایزای سلول کامل تأیید شد. آزمایش‌ها نشان داد که این سلول‌های نوترکیب و اسنیتوباکتر بومانی نسبت به سلول اشریشیا کلی BL21(DE3) توانایی بالاتری برای تشکیل بیوفیلم دارد. همچنین سلول‌های FhaB1، FhaB2 و اسنیتوباکتر بومانی نسبت به اشریشیا کلی BL21(DE3) به میزان بیشتری به سطح سلول‌های اپیتلیال ریه انسانی اتصال می‌یابند.

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

کلیدواژگان: اسنیتوباکتربومانی، سیستم ترشحی دوجزئی، چسبندگی

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

مقدمه

اسنیتوباکتر بومانی (*Acinetobacter baumannii*)، یک باکتری گرم منفی، غیر متحرک با پتانسیل بالا برای کلونیزاسیون، گسترش در بین بیماران بستری شده در بیمارستان و توانایی ایجاد بیماری است. این باکتری، عفونت‌های شدیدی

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 به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های درمانی مقاوم هستند [۲]. در اواخر ۱۹۹۰ کارباپنم (Carbapenem) و پلی‌میکسین (Polymyxin) علیه عفونت‌های شدید این میکرورگانیسم‌ها در بیمارستان‌ها استفاده می‌شد [۳]. امروز سویه‌های مقاوم به کارباپنم‌ها در سراسر دنیا گسترده شده است بنابراین توسعه اندک عوامل درمان جایگزین، نگران کننده است [٤]. 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 میکروارگانیسم توانایی گسترش روی ابزارهای پزشکی و محیط‌های بیمارستانی را داراست [۵]. علاوه بر آن اسنیتوباکتر توانایی کلونیزاسیون روی سطوح زنده همانند پوست، بافت مخاطی [٦] 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 ترشحی نوع ۵ وابسته است. این سیستم ترشحی در بین باکتری‌های گرم منفی به‌طور وسیعی گسترده شده است. در این سیستم باکتری‌ها بدون هیچ واسطه‌ای پروتئین را به خارج از سلول ترشح می‌کنند [۱۰]. در پروتئین‌های خود انتقالی دو جزئی دومین‌های اگزوپروتئین و کانال به‌صورت جدا از هم است ولی توسط ژن‌های ساختاری کد می‌شود که در یک پروموتور قرار گرفته است [۱۱]. دومین اگزوپروتئین 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 ارگانیسم بتواند در چندین ناحیه مختلف از سلول‌های اپی‌تلیالی کلونیزه شده و به بیماری‌زایی باکتری کمک می‌کند. بنابراین سیستم ترشحی دو جزئی، به‌طور شاخص شامل یک بخش کانال در غشای خارجی باکتری است که به انتقال اگزوپروتئین به خارج از سلول کمک می‌کند. سه نوع پروتئین در این خانواده قرار گرفته‌است از جمله فیلامنت- هماگلوتینین (Filamentous hemagglutinin: FHA) در بوردتلا پروتوزیس (*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 ترشحی 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 ومانع 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

اگزوپروتئین نوترکیب اسنیتوباکتر بومانی ATCC19606 با ساختار کامل است تا با کمک آن نقش اگزوپروتئین‌های سیستم ترشحی 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 ترشح دو جزئی در سویه‌های مختلف اسنیتوباکتر 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 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 دی اکسیدکربن کشت داده می‌شوند. آغازگرها (Primers)، آنزیم‌های محدود کننده *Xho*1، *Nde*1 از شرکت ژن فن‌آوران (ایران)، کیت تخلیص پلاسمید و کیت تخلیص زنجیره‌ای پلیمراز از شرکت سیناکلون (ایران) خریداری شد.

شناسایی ژن‌های کد کننده پروتئین چسبندگی سیستم ترشحی دو جزئی در ژنوم اسنیتوباکتر بومانی

هومولوگ ژن‌های کد کننده پروتئین چسبندگی وابسته به سیستم ترشحی دو جزئی در ژنوم اسنیتوباکتر 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.

جدول ۱ مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای قطعات ژنی *fha*B1، *fha*B2

نام قطعه ژن	مشخصات توالی آغازگر	تعداد بازهای آغازگر (نوکلئوتید)	اندازه قطعه تکثیرشده (نوکلئوتید)
***fha*B1**	Fr-CTTA CATATG ATGAACAAGAATAGTTATCGCATTATTT	۳۸	۳۲۱۹
	Rp-CTTA CTCGAG TCAATTTTTTTTCTTTTCTCAAGA	۳۵	
***fha*B2**	Fr-CTTA CATATG ATGAATAAAAATCTTTATCGAATCATTTT	۳۹	۵۶۹۶
	Rp-CTTACTCGAG TTACATATTTCTCCAAAAAGAATTAAAC	۳۸	

طراحی آغازگر و تکثیر ژن‌های *fha*B1، *fha*B2 به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

ابتدا توالی ژن‌های مورد نظر در اسنیتوباکتر 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 آغازگرهای مناسب طراحی شد. همچنین در انتهایی ′۵ آن‌ها، جایگاه برش آنزیم *Nde*1 و کدون آغاز ترجمه و در انتهایی ′۳ جایگاه برش *Xho*1 اضافه شد. نام، فرمول و تعداد بازهای آغازگر در جدول ۱ آورده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای مناسب و با استفاده از کیت Maxime PCR Pre Mix Kit (i-pfu) با ۱ میکرومولار از هر دو آغازگر

بالادست، پایین‌دست و ۱۰۰ نانوگرم از DNA اسنیتوباکتر بومانی به‌عنوان DNA الگو در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت. برنامه مورد استفاده برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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 سانتی‌گرد به‌مدت ۱ دقیقه برای اتصال آغازگرها به رشته الگو، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤ دقیقه برای تکثیر ژن *fha*B1 و زمان ٦ دقیقه برای تکثیر قطعه *fha*B2 و در پایان یک مرحله تکثیر نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد است. محصولات زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از نشانگر وزن مولکولی DNA در ژل آگارز ۱ درصد تأیید شد.

همسانه‌سازی و تراریخت نمودن سلول‌های مستعد BL21(DE3)

محصولات زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از کیت تخلیص زنجیره‌ای پلیمراز شرکت Bioneer (کره) خالص‌سازی شد. سپس پلاسمید تخلیص شده pET22b و محصولات زنجیره‌ای پلیمراز با دو آنزیم *Nde*1، *Xho*1 به‌مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برش داده شد. محصولات زنجیره‌ای پلیمراز و ناقل ژنی pET22b برش خورده، با کمک کیت تخلیص محصول زنجیره‌ای پلیمراز خالص‌سازی شد. واکنش الحاق به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد انجام و با روش الکتروپوریشن (Electroporation) به میزبان اشریشیا کلی BL21(DE3) (*Escherichia coli*) انتقال داده شد. برای تأیید همسانه‌سازی از کلون‌های نوترکیب کشت داده و تخلیص پلاسمید به روش لیز قلیایی [١٤] انجام گرفت؛ سپس با کمک آغازگرهای اختصاصی و پلاسمیدهای حاوی ژن نوترکیب به‌عنوان الگو، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفت. برای تأیید بیشتر، پلاسمیدهای حاوی ژن نوترکیب با استفاده از آنزیم *Nde*1، *Xho*1 برش داده شد. تمامی این مراحل با استفاده از روش‌های استاندارد انجام گرفت [١٤].

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

عمل القای سلول‌های حاوی سازه‌های نوترکیب با القاگر IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)انجام شد. عمل القا به‌مدت ٤ 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، سلول ها 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 الکتروفورزشد. سپس با کمک آزمایش وسترن که در آن از سرم موش‌های تزریق شده با پروتئین کایمر به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده شده است، بیان اگزوپروتئین در سلول‌های نوترکیب تأیید شد. طراحی و سنتز ژن کایمر برای تولید پروتئین، از روی ناحیه حفاظت شده و ایمنی‌زا ژن‌های اگزوپروتئین و کانال وابسته به سیستم ترشح دو جزئی از سویه‌های مختلف اسنیتوباکتر بومانی صورت گرفته است.

تأیید بیان پروتئین‌های نوترکیب با کمک الایزای سلول کامل

به‌منظور تأیید بیان پروتئین نوترکیب 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 نوترکیب طبق روش ذکر شده در بالا انجام گرفت. سپس محیط‌های کشت حاوی سلول برداشته شد و درون تیوپ‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری و در ۳۵۰۰ دور به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ

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 ٦٠٠ نانومتر به ٠/٥ برسد. سپس ١٠٠ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده باکتری، درون چاهک‌های میکروپلیت اضافه شد. پلیت‌ها در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شبانه روز قرار داده شد. در ادامه پلیت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد خشک و تثبیت شد. بعد از ٣ تا ٥ 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 ٥ درصد از شیر خشک پوشش داده شد. برای این منظور ١٠٠ میکرولیتر از بافر پوشش دهنده به هر چاهک اضافه شد و یک ساعت در ٣٧ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از اتمام زمان گرماگذاری و در بین تمامی مراحل، مرحله شستشو به‌وسیله فسفات بافر سالین ٣ تا ٥ بار انجام گرفت. بعد از اتمام مراحل شستشو، از سرم موش‌های تزریق شده با پروتئین کایمر سریال رقتی از رقت ١/٢٥٠ تا ١/٨٠٠٠ در فسفات بافر سالین تهیه و در چاهک‌های مربوط اضافه شد و به‌مدت ١ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. بعد از اتمام زمان مورد نظر به چاهک‌ها ١٠٠ میکرولیتر از رقت ١/١٠٠٠٠ از آنتی‌بادی آنتی IgG موشی کونژوگه شده با آنزیم HRP (Horseradish Peroxidase) در فسفات بافر سالین اضافه شد. پلیت‌ها در ٣٧ درجه سانتی‌گراد برای مدت ١ ساعت قرار داده شد. سپس ١٠٠ میکرولیتر از سوبسترای TMB (Tetramethylbenzidine) به هر چاهک اضافه شد. میکروپلیت در مکان تاریک قرار گرفت تا واکنش انجام شود. پس از گذشت ١٥ دقیقه از واکنش، با استفاده از اسید سولفوریک ٢/٥ نرمال، واکنش متوقف شد. جذب نوری پلیت‌ها در طول موج ٤٥٠ نانومتر خوانده شد. از سلول *E.coli* BL21(DE3) به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

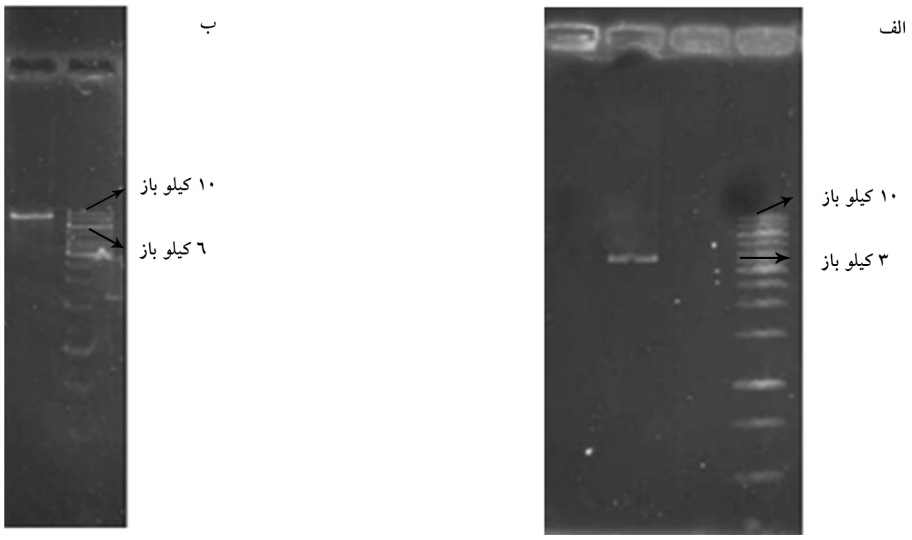
مقایسه میزان چسبندگی سلول‌های نوترکیب با اسنیتوباکتر بومانی به سلول‌های اپی‌تلیال انسانی

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، ٢ تا ٣ بار شستشو و در محیط کشت فوق سوسپانسیون شد تا تعداد باکتری‌های نوترکیب FhaB1، FhaB2، اسنیتوباکتر بومانی ATCC19606 و اشریشیا کلی BL21(DE3) به $١٠^{٧}$ سلول باکتری در هر میلی‌لیتر برسد. برای آماده‌سازی سلول، حدودا $١٠^{٥}$ سلول از رده‌های سلول اپی‌تلیال انسانی شامل A549، HeLa در هر چاهک پلیت ٦ تایی کشت سلول ریخته و به مدت ٢٤ ساعت گرماگذاری می‌شود. بعد از اتمام گرماگذاری، به هر چاهک حاوی سلول ١٠٠ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری افزوده و ٣ ساعت در ٣٧ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس سویه‌های که نچسبیده با کمک بافر فسفات سالین به‌علاوه ٠/١٥ درصد ژلاتین شستشو داده شد. سلول‌ها با استفاده از محلول تریپسین برداشته و محتوی چاهک ها با استفاده از سری رقت در پلیت نوترینت آگار (Nutrient Agar) حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای ٣٧ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. میزان چسبندگی به کمک درصد تعداد کلونی‌های شمارش شده تقسیم بر تعداد باکتری‌های اولیه افزوده شده به هر چاهک محاسبه شد [١٥].

میزان تشکیل بیوفیلم در سلول‌های نوترکیب، اسنیتوباکتر بومانی و اشریشیا کلی BL21(DE3)

توانایی سویه‌های نوترکیب، اسنیتوباکتر بومانی واشریشیا کلی BL21(DE3) برای تشکیل بیوفیلم به روش Brossard سنجش شد [١٦]. در هر یک از چاهک‌های یک میکروپلیت ٩٦ خانه‌ای، ٢٠ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری به ١٨٠ میکرولیتر محیط کشت M9 Biofilm Medium حاوی آنتی‌بیوتیک آمپیرسیلین و IPTG افزوده و به‌مدت ٥ روز در

دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از اتمام زمان گرماگذاری، محیط کشت داخل چاهک‌ها را خالی کرده و با بافر نمک فسفات ۳ تا۵ بار شستشو داده شد. محتوی چاهک‌ها با کریستال ویوله (Crystal Violet) ۱ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و بعد از اتمام زمان رنگ‌آمیزی، رنگ کریستال ویوله را خالی کرده وچاهک‌ها 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.



شکل ۱ (الف) تکثیر قطعه ۳۲۱۹ نوکلئوتیدی *fha*B1؛ (ب) قطعه ۵۷۹۷ نوکلئوتیدی *fha*B2با کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

نتایج

شناسایی ژن‌های کد کننده پروتئین چسبندگی سیستم ترشحی دو جزئی در ژنوم اسنیتوباکتر بومانی

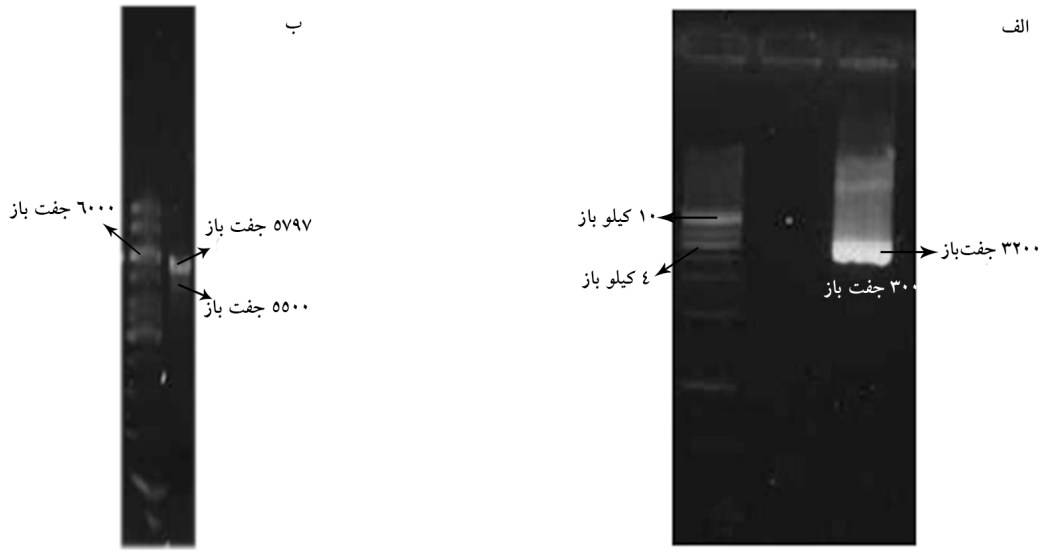
تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک با کمک قسمت‌های حفاظت شده اگزوپروتئین‌های وابسته به سیستم ترشحی دو جزئی در ژنوم اسنیتوباکتر بومانی، دو نوع ORF ۵/۸ کیلوباز و ۳/٦ کیلوباز را نشان داده است که متعلق به اگزوپروتئین‌های این خانواده است. هر دوی این اگزوپروتئین‌ها در ۲۰۰ اسیدآمینه اول خود ناحیه حفاظت شده‌ای دارد که برای شناسایی پروتئین‌های این خانواده به‌کار می‌رود. این دو ORF به‌ترتیب برای قطعه ۳/۲ کیلوبازی *fha*B1و قطعه ۵/۸ کیلوباز *fha*B2نام گذاری شد. این اگزوپروتئین‌ها در خانواده پروتئین‌های ترشحی قرار دارد. سیگنال پپتیداز، پپتید نشانه اگزوپروتئین FhaB1 را در ناحیه بین اسیدآمینه ٢٦ و ٢٧ برش می‌دهد ولی اگزوپروتئین FhaB2 را در نواحی بین اسیدآمینه ٧٦ و ٧٧ برش می‌دهد.

تکثیر ژن‌های *fha*B1، *fha*B2 به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

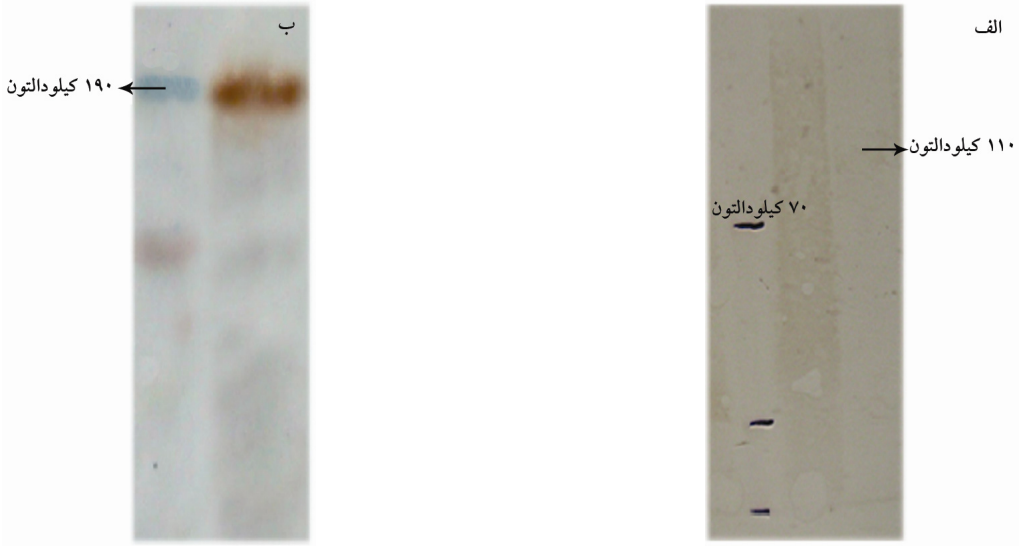
با توجه به شرایط ذکر شده برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، یک باند ۵۸۰۰ نوکلئوتیدی برای قطعه ژن *fha*B2و تک باند اختصاصی ۳٦۰۰ نوکلئوتید *fha*B1 روی ژل آگارز مشاهده شد (شکل ۱ الف و ب).

همسانه‌سازی و تراریخت نمودن سلول‌های مستعد BL21(DE3)

نتایج برش آنزیمی که روی سازه‌های ژنی pET22b-B2، pET22b-B1 انجام شده در شکل ۲ الف، ۲ ب نشان داده شده است. کلون‌های تأیید شده ذخیره (Stock) تهیه و در۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کلون‌های تأیید شده حاوی ژن‌های نوترکیب *fha*B1، *fha*B2 به‌ترتیب FhaB1، FhaB2 نام گذاری شدند.



شکل ۲ برش آنزیمی سازه‌های نوترکیب توسط آنزیم‌های *Xho*1، *Nde*1، (الف) pET22b-B1 (ب) pET22b-B2



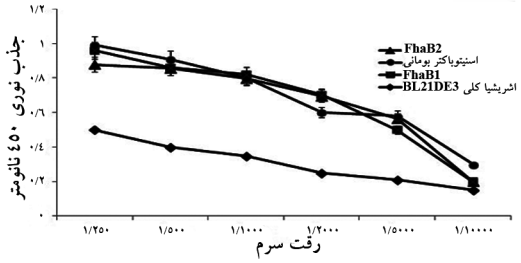
شکل ۳ تأیید بیان پروتئین‌های نوترکیب با کمک وسترن بلات (الف) FhaB1، ۱۱۰ کیلودالتون (ب) FhaB2، ۱۹۰ کیلودالتون

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

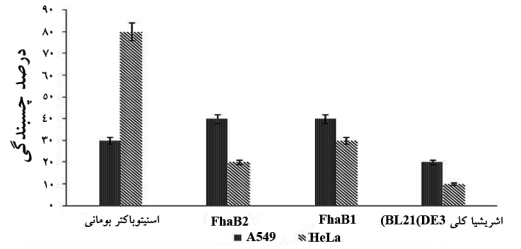
مشاهده باندهای ۱۱۰ و ۱۹۰ کیلودالتون می‌تواند نمایانگر بیان پروتئین‌های نوترکیب در سلول‌های تراریخت شده باشد. این باندهای پروتئینی توسط آزمایش وسترن تأیید شد (شکل ۳ الف، ۳ ب).

تأیید بیان پروتئین‌های نوترکیب با کمک الایزای سلول کامل

نتایج آزمایش نشان داد که سلول‌های نوترکیب و اسنیتوباکتر بومانی، اگزوپروتئین‌های FhaB1، FhaB2 را در سطح غشای خارجی خود بیان می‌کنند (شکل ٤).



شکل ٤ الایزای سلول کامل برای تأیید بیان پروتئین‌های نوترکیب در سطح غشای خارجی سلول اشریشیا کلی BL21DE3



شکل ٥ بررسی میزان چسبندگی FhaB1، FhaB2، اسنیتوباکتر بومانی و اشریشیا کلی (BL21(DE3 به سلول‌های اپی‌تلیال انسانی

مقایسه میزان چسبندگی سلول‌های نوترکیب با اسنیتوباکتر بومانی به سلول‌های اپی‌تلیال انسانی

آن دسته از سلول‌های نوترکیب که واجد اگزوپروتئین FhaB1، FhaB2 است و اسنیتوباکتر بومانی در مقایسه با سلول اشریشیا کلی تمایل بیشتری به سلول اپی‌تلیال ریه دارند. این در حالی است که سلول‌های نوترکیب FhaB2 در چسبندگی روی سلول اپی‌تلیال HeLa نقش ندارند (شکل ٥).

میزان تشکیل بیوفیلم در سلول‌های نوترکیب و اسنیتوباکتر بومانی

اگزوپروتئین‌های FhaB1، FhaB2 و اسنیتوباکتر بومانی در مقایسه با اشریشیا کلی (BL21(DE3 تمایل بیشتری را برای تشکیل بیوفیلم روی سطوح پلی استری داشتند. میزان تشکیل بیوفیلم در سویه‌های نوترکیب FhaB1، FhaB2، اسنیتوباکتر بومانی و اشریشیا کلی (BL21(DE3 به‌ترتیب ۷۲، ۷۸، ۵۰ و ۱۲ درصد است.

بحث

اسنیتوباکتر 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 اسنیتوباکتر بومانی مطالعه شده‌اند که در خانواده سیستم ترشحی 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 ترشحی/ خارج غشایی است که به کمک اجزای تشکیل دهنده خود به‌صورت مستقل از غشا عبور کرده و در سطح غشای خارجی سلول باکتری قرار می‌گیرد. این پروتئین‌ها در خانواده پروتئین‌های سیستم ترشحی 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 ترشحی دو جزئی است در ژنوم سویه‌های مختلف اسنیتوباکتر

بومانی شناسایی شده‌است. بررسی بیوانفورماتیکی توالی‌های شناسایی شده در مقایسه با توالی اگزوپروتئین FhaB1، FhaB2 در اسنیتوباکتر 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 اسنیتوباکتر بومانی به اگزوپروتئین مورکسلا ۳۰ درصد و در اشریشیا کلی O157H7 ٤٠ درصد را نشان داده است.

از دیگر ویژگی‌های مهم پروتئین‌های این خانواده دارا بودن پپتید نشانه طویل با ویژگی‌های مشخص است [۱۹] که در مورد پروتئین‌های FhaB1، FhaB2 وجود پپتید نشانه در آمینواسید ۲٦، پروتئین FhaB1 و آمینواسید ۷٦ 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 اسنیتوباکتر 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 انسانی در شرایط آزمایشگاهی را نشان دهد. این پروتئین‌ها در تشکیل بیوفیلم روی سطح غیر زنده نیز نقش مهمی دارد، به‌طوری 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 اسنیتوباکتر بومانی با اشریشیاکلی 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 این‌که 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 این‌که بیان بسیار بالایی از پروتئین را نشان ندادند خصوصیت چسبندگی به سلول اپی‌تلیال یا آب‌گریزی آن‌ها نسبت به اسنیتوباکتر بومانی اختلاف زیادی ندارد. به‌همین 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 اسنیتوباکتر بومانی مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

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

منابع

[1] Dijkshoorn L, Nemec 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, Raoofian 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 DM[1], 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, Schwebke 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.