

## بررسی ارتباط جهش در فاکتور عفونت‌زاوی VirB2 بروسلا ملی‌تنسیس با ایمنی‌زاوی و ماندگاری درون سلولی این باکتری

علی پوری‌ایسین<sup>۱\*</sup>، سید رضا روضه‌ئی<sup>۲</sup>، محمد علی شکر‌گزار<sup>۳</sup>، غلام‌رضا جوادی<sup>۴</sup>، مجید صادقی‌زاده<sup>۵</sup>

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، انتیتو 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 میزان را فراهم آورد. امروزه مطالعات روی توصیف جهش‌های حذفی در این ژن مت مرکز 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 ماکروفازهای J774 و موش‌های BALB/c و میزان ایمنی‌زاوی آن بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: برای این‌که 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، ماکروفازهای J774 و موش‌های BALB/c با بروسلا ملی‌تنسیس سویه وحشی و جهش‌یافته آلوده شدند، همچنین ترشح IgG، ایترولوکین ۱۲ و ایترفرون گاما در مدل موشی بررسی شد.

نتایج: بعد از ۴۸ ساعت، تعداد بروسلاهای جهش‌یافته نسبت به سویه وحشی در ماکروفازهای J774 به شدت کاهش یافت و بروسلاهای جهش‌یافته *virB2* از  $1 \times 10^7$  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 ایترولوکین ۱۲ و ایترفرون گاما فقط در موش‌های آلوده به سویه وحشی باکتری افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: حضور ژن *virB2* برای تکثیر درون سلولی در ماکروفازهای 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 عفونت‌زاوی و ترشح ایترولوکین ۱۲ و ایترفرون گاما نشان داده شد. اما حضور یا عدم حضور این ژن تأثیری در تولید IgG کل ندارد.

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

گونه‌های مختلف آنها وجود دارد [۱۱، ۱۲]. ژنوم بروسلا ملی‌تنسیس به‌طور کامل تعیین توالی شده است که شامل ۳۲۹۴۹۳۵ جفت باز بوده که در درون دو کروموزوم حلقی یکی به اندازه ۲۱۱۷۱۴۴ جفت باز و دیگری ۱۱۷۷۷۸۷ جفت باز ORF توزیع شده است. این ژنوم از ۳۱۹۷ منطقه (Open Reading Frame) رمزدهنده شکل گرفته است، به‌طوری که ۲۴۸۷ عدد از آنها یعنی حدود ۷۸ درصد عملکردی هستند [۳]. بروسلا فاقد سیستم‌های ترشحی نوع I، II و III بوده اما حضور ژن‌های رمزدهنده ترشح‌کننده وابسته (Secretory-dependent) و ترشح‌کننده غیروابسته (Secretory-independent) و تاثرک 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 میزان و بیماری‌زا است. به‌طوری که ماندگاری بروسلا در محیط‌های مختلف از جمله محفظه‌های درون سلولی پستانداران منوط به وجود آن‌هاست [۱۶]. جهش‌های حذفی در T4SS نشان داده است که بقا و تکثیر بروسلا در ماکروفازها و سلول‌های اپی‌تیلیال مانند مدل موشی از بین خواهد رفت. بهترین مطالعات روی این سیستم ترشحی در مدل آگروباکتریوم توموفاشینس (Agrobacterium tumefaciens) انجام گرفته است. به‌طوری که در این باکتری T4SS از ۱۲ قسمت به‌ترتیب از VirB1 تا VirB12 و VirD4 (VirB12) تشکیل شده است. آزمایش‌های بیوشیمیابی، 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 فضاء، غشای داخلی و خارجی را از طریق فضایی محفوظ

## ۱- مقدمه

بروسلا ملی‌تنسیس (*Brucella melitensis*) از دسته باکتری‌های اختیاری، هوایی، کوکوباسیلی شکل، گرم منفی و بیماری‌زا درون سلولی است که باعث سقط جنبین 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 ابتلاء به عفونت در انسان از طریق شیر و فراورده‌های لبنی است [۳]. در پی نفوذ باکتری به مخاط اپی‌تیلیوم به سوی غدد لنفاوی حرکت کرده و از طریق ماکروفازها در درون غدد لنفاوی، طحال، کبد، معز استخوان، غدد پستانی و اندام زایشی گسترش و تکثیر می‌یابند. افزایش بروسلا در میزان به دلیل توانایی آن در فرار از مکانیسم‌های مرگبار و همچنین تکثیر باکتری در درون ماکروفازها است [۴، ۵]. بروسلا قادر است برای تکثیر و افزایش ماندگاری درون سلولی فاگوزووم‌هایی را در درون ماکروفازها به روش جلوگیری از ادغام فاگوزووم با لیزوزوم، به وجود آورد [۶، ۷]، به‌همین دلیل قدرت مقابله با واکنش‌هایی مانند کاهش اکسیژن و pH اسیدی درون ماکروفازها را پیدا می‌کنند [۵]. بروسلا بعد از ورود به سلول میزان وارد سیستم رتیکوآندوتیلیال (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 فاگوزووم‌های حرفه‌ای و غیرحرفه‌ای است [۸، ۹]. در این زمان باکتری با ورود به درون فاگوزووم‌های ابتدایی، شرایط محیطی خاصی را در سلول‌های یوکاریوت برای بقا و تکثیر درون سلولی خود پدید می‌آورد [۱۰، ۲].

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

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

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۱-۲- 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

پری‌پلاسمی به هم متصل می‌نماید و با ساختار هومولیگومری یک سوراخ خارجی را تشکیل می‌دهد [۱۸، ۱۵]. 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 به صورت 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]. VirB11 در قسمت غشای داخلی برای فعالیت NTPase قرار گرفته‌اند که هر کدام به عنوان 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 بروسلا می‌شود و حشی 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 و حشی 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، به طوری 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 حالی‌که تعداد باکتری سوش و حشی 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 ایترفورون گاما (Interferon-gamma: INF-γ) توسط آن‌ها و فعال شدن مکانیسم میکروب‌کشی ماکروفازها می‌شود [۲۹]. اما

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

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

برای تکثیر ژن مقاومت به کانامايسین از روی حامل PET (Novagen, USA) ۲۸ درجه سانتی‌گراد (Novagen, USA) که حاوی این ژن است، تکثیر بر طبق جدول زیر صورت گرفت.

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

### ۳-۲- ساخت پلاسمید pUKD

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

(Schaedler Brucella Agar) SBA (Liofilchem, Italy) که حاوی ۵ درصد خون گاو سالم است، هر تک کلونی به مدت دو روز در درون محیط بروسلا براث (Liofilchem, Italy) (Brucella Broth) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۵ درصد دی اکسید کربن رشد داده شد. باکتری‌هایی که برای تزریق به موش در نظر گرفته شدند، برای جلوگیری از بروز جهش‌های Spontaneous Rough (Liofilchem, Italy) Potato Infusion Agar سپس در بروسلا براث تکثیر یافته‌ند. در نهایت غلظت سپس در بروسلا براث (Colony-Forming Unit)  $1 \times 10^9$  CFU در هر میلی‌لیتر تهیه شده و با سوسپانسیون باکتری‌ایی فوق با حجم‌های ۱ میلی‌لیتر در ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آنی‌بیوتیک‌هایی که استفاده شدند شامل کانامايسین (۱۰۰-۵۰ میلی‌گرم در لیتر) (Ampicillin) (Roche, Germany)، آمپی سیلین (Gentamycin) (Roche, Germany) و جنتامايسین (Roche, Germany) (5۰-۲۵ 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 دی اکسید کربن رشد یافت. چند کلونی از باکتری در PBS (Phosphate Buffered Saline) توسط رقیق شد و پس از انجام مراحل آماده‌سازی تلخیص DNA توسط Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit کیت استخراج PCR (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 *Taq* پلیمراز DNA

## ۲-۴- انتقال حامل pUKD به درون بروسلا و انجام نوترکیبی هومولوگ و تأیید آن

$1 \times 10^8$  CFU در هر میلی لیتر بروسلا ملی تنسیس روی محیط SBA که حاوی ۵ درصد خون گاو سالم است متقل شده و براساس دستورالعمل تهیه سوسپانسیون سلولی برای الکتروپوریشن (Electroporation)، باکتری‌های رشدیافته آماده شدند. الکتروپوریشن توسط دستگاه Eppendorf 2510 Electroporator (Germany) انجام شد.

۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های الکتروپوریت شده روی محیط SBA حاوی ۴۵ میلی گرم در میلی لیتر کانامایسین، کشت داده شد و بعد از دو هفته عالیم رشد در این پلیت‌ها که در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در حضور ۵ درصد دی اکسید کربن قرار گرفته بودند، ظاهر شد. ۲۰ کلونی از مجموع کلونی‌های SBA رشدیافته انتخاب شده و هر کدام جداگانه روی محیط حاوی کانامایسین تکثیر یافتند. بروسلا ملی تنسیس رشدیافته روی SBA حاوی کانامایسین دارای جهش حذفی در ژن virB2 است (به دلیل این‌که سوش وحشی بروسلا ملی تنسیس 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 پایین‌دست ژن هدف را تکثیر می‌نماید، طراحی شد. به‌طوری که محصول ۲۶۲۰ جفت‌بازی، مؤید نوترکیبی هومولوگ 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 سانتی گراد	شروع داغ
چرخه ۴۵	۴۰	۹۴ درجه سانتی گراد	ذوب
	۴۰	۵۶ درجه سانتی گراد	اتصال
	۶۰	۷۲ درجه سانتی گراد	پلیمریزاسیون
	۱۰'	۷۲ درجه سانتی گراد	بسط نهایی

شده بود، وارد سلول‌های باکتریایی شد. سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در محیط (Luria Bertani) LB Agar (Liofilchem, Italy) در ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد و تک کلونی‌ها در (Liofilchem, Italy) LB Broth (به‌مدت ۲۴ ساعت در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی گراد 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 PCR-Topo-1 که درون حامل virB2 (Roche, Germany) BamHI و XbaI (Roche, Germany) برش خورده و از درون ژل یک درصد آگارز تخلیص شده و توسط (Qiagen, Germany) DNA Ligation Kit (Nonagen, USA) pET 32a پلاسمید توسط (Roche, Germany) pU vector (pU vector) گذاشته شد. در مرحله بعد حامل pU به همراه همان دو آنزیم ذکر شده، شد. نام حامل جدید حامل pU کانامایسین است، توسط دو آنزیم KpnI و BamHI (Roche, Germany) DNA Ligation kit (Roche, Germany) برش داده شد و با pUK (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 پایین‌دست (Roche, Germany) XbaI و KpnI توسط دو آنزیم virB2 (Roche, Germany) vector) pUKD (pUKD vector) نامیده هضم و بعد از الحق حامل pUKD شد. برای غربال‌گری حامل جدید به‌دلیل 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 Top10 *E.Coli* فرستاده شد.

جدول ۱ آغازگرهای هر منطقه برای PCR و آنزیم‌های برش گر لازم برای همسانه‌سازی

آغازگر	آنژیم برش گر	توالی	آنژیم برش گر	آندازه	ژن هدف
B-Up-F	XbaI	5'-CTCAGGGCTGCCAGTAAAAACGAC-3'	virB2	۵۸۲ جفت باز	بالا دست
B-Up-R	BamH1	5'-GGATCCACGGCTGCTGCTCAATGTCTAT-3'	virB2	۵۸۲ جفت باز	پایین دست
B-D-F	KpnI	5'-GGTACCCATAGCCATCATCTGGTCCG-3'	virB2	۶۶۸ جفت باز	بالا دست
B-D-R	XbaI	5'-TCTAGTCTCCTGTCCTGCGTCTCG-3'	virB2	۶۶۸ جفت باز	پایین دست
Kan-F	BamH1	5'-GGATCCACAAGGGTGTATGAGC-3'	مقاومت به کاتامیسین	۸۷۰ جفت باز	
Kan-R	KpnI	5'-GGTACCTCAAATATGTATCCGCTC-3'	مقاومت به کاتامیسین	۸۷۰ جفت باز	
Out-F	-----	5'-CCTGAAGATGGATCCAAGATCC-3'	ژن جایگزین شده نوترکیب	۲۶۲۰ جفت باز	
Out-R	-----	5'-CGCCGGCACTGGCCGGTAATTAAAC-3'	ژن جایگزین شده نوترکیب	۲۶۲۰ جفت باز	

۵۰ میلی‌گرم در لیتر جنتامایسین ریخته و ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور ۵ درصد دی اکسید 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 ماکروفازها توسط ۰/۵ میلی‌لیتر از تویین ۲۰ (Tween 20) با غلظت ۵ درصد لیز شدن. چاهک‌ها با ۰/۵ میلی‌لیتر از PBS شسته و ماندگاری باکتری‌ها با تهیه رقت‌های متواالی در PBS و کشت روی محیط SBA و شمارش کلونی‌ها اندازه‌گیری شد. این آزمایش سه بار و هر بار به صورت سه‌تایی انجام شد و خطای استاندارد (Standard Error) در هر مرحله اندازه‌گیری و مشاهدات به‌وسیله برنامه آماری student's T test بررسی شد.

## ۶-۱- آلوده کردن موش BALB/c و تعیین میزان ماندگاری

۱۰۰ میکرولیتر PBS حاوی  $5 \times 10^5$  CFU بروسلا ملی‌تنسیس سوش و حشی و جهش‌یافته از طریق تزریق درون

## ۶-۲- آلوده کردن ماکروفازهای J774 موشی و تعیین میزان ماندگاری

سلول‌های ماکروفاز موشی J774 که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران گرفته شد، درون پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای با غلاظت  $1 \times 10^0 - 2 \times 10^0$  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 دی اکسید کربن کشت داده شد. بروسلا ملی‌تنسیس سوش و حشی و جهش‌یافته به مدت ۲۴ ساعت روی SBA رشد یافته و پس از رقیق‌سازی توسط DMEM مغذی، ۱۰ میکرولیتر از آن که حاوی حدود  $5 \times 10^7$  عدد باکتری است به هر چاهک اضافه شد. برای همزمان‌سازی عفونت پلیت را به مدت ۵ دقیقه در ۲۵۰ g سانتریفوژ کرده سپس ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شد. باکتری‌هایی که وارد ماکروفازها 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

*virB2* ۱۸۷ جفت‌باز حذف شد. بعد از انجام مراحل مختلف ساخت حامل pUKD، هضم آنزیمی توسط دو آنزیم *virB2* برش دهنده بالادست ژن *XbaI* (*virB2*) 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 کانامايسین (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.

### ۲-۳- تولید سویه جدید بروسلا ملی‌تنسیس مقاوم به کانامايسین

هر کدام از کلونی رشدیافته در محیط حاوی کانامايسین بعد از الکتروپوریشن، روی محیط کشت مجزایی رشد یافتد و همگی بعد از استخراج DNA، توسط دو آنزیم برش‌گر *XbaI* و *XhoI* (شکل ۱-الف) و هم به‌وسیله آغازگرهای اختصاصی B-D-R و B-Up-F برسی 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 به طول 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.

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

### ۷-۲- اندازه‌گیری میزان ایمنی زایی در سرم موش پس از آلووده 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 $\gamma$ درون سرم آن‌ها توسط کیت (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) الیزا اختصاصی موش (Quantikine® Germany)، اندازه‌گیری شد. این آزمایش سه بار و هر بار به‌صورت پنج تایی انجام شد. خطای استاندارد در هر مرحله اندازه‌گیری و مشاهدات به‌وسیله برنامه آماری student's T test بررسی شد.

## ۳- نتایج

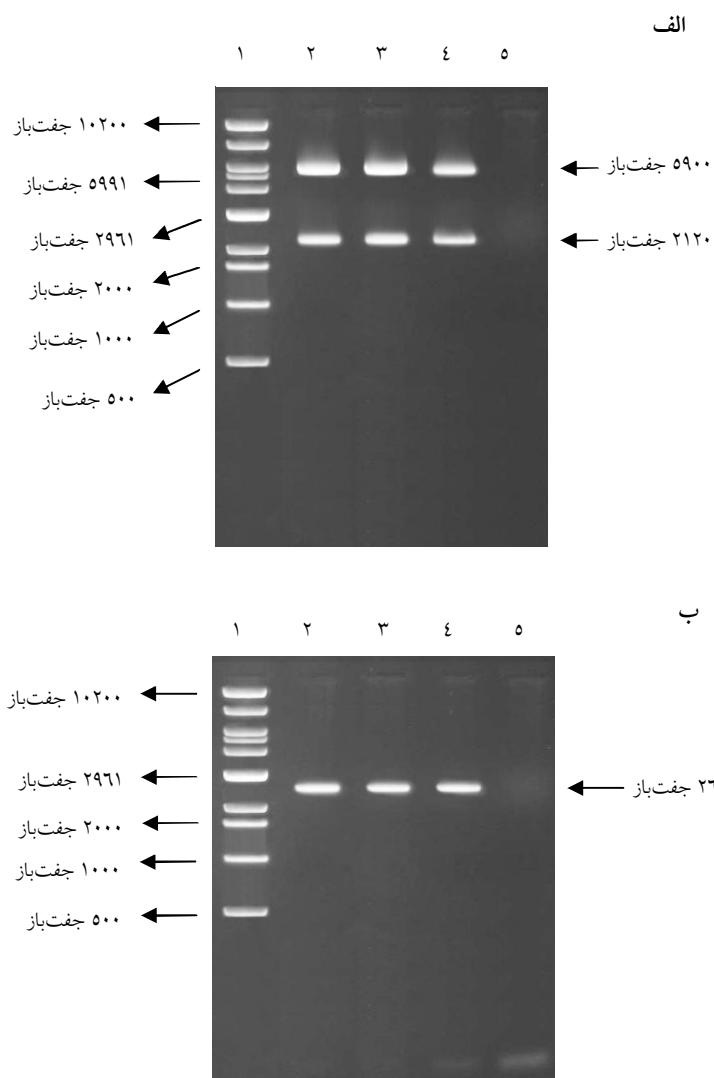
### ۱-۳- ساخت حامل pUKD دارای جهش حذفی به اندازه ۱۸۷ جفت‌باز در منطقه *virB2*

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

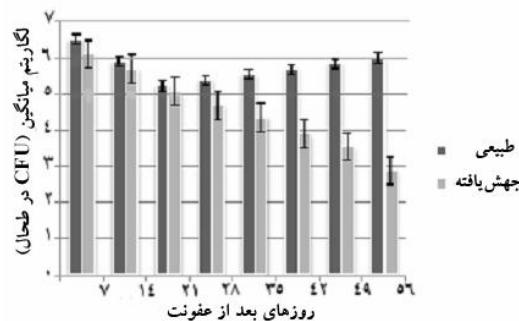
کانامایسین درون *virB2* ایجاد شد. با توجه به این که جزء ساختار اصلی T4SS است تأثیر این جهش روی ماندگاری بروسلا ملی‌تنسیس درون ماکروفاز موشی J774 ارزیابی شد.

### ۳-۳- بررسی میزان رشد بروسلای فاقد *virB2* در ماکروفازها

در این تحقیق جهش قطبی با ورود ژن مقاومت به



شکل ۱ الف: هضم آنزیمی حامل pUKD توسط دو آنزیم *Xba*I و *Xba*I؛ ستون ۱) نشانگر (Marker) (South Korea) Bioneer، ستون‌های ۲، ۳، ۴) قطعه ۲۱۲۰ جفت‌بازی خارج شده از pET32a که مجموع منطقه ژنی بالادست *virB2* ژن مقاومت به کانامایسین و منطقه ژنی پایین دست در درون *virB2* در حامل pUKD است و قطعه ۵۹۰۰ جفت‌بازی مربوط به pET32a است، ستون ۵) کترل منفی است. ب: تأیید نوترکیبی هومولوگ بهوسیله دو آغازگر Out-F و Out-R که هر کدام ۲۵۰ نوکلئوتید بالادست و پایین دست 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) کترل منفی است.



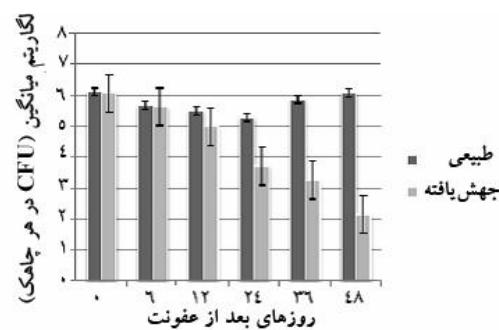
نمودار ۳ تأثیر جهش virB2 و کاهش میزان بروسلا در طحال موش cBALB

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

#### ماکروفازها

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 ماکروفازها هنگام آلودگی یا ذرخواری 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، بهطوری که در موش آلوده به بروسلای سوش و حشی و جهش‌یافته میزان IgG افزایش می‌یابد. البته موش آلوده با سوش و حشی بیشتری تولید می‌کند که با توجه به کاهش مقدار بروسلای جهش‌یافته در همین مدت، تقلیل میزان افزایش IgG در موش آلوده به بروسلا با جهش virB2 نسبت به سوش و حشی، قابل توجیه است. اما ترشح IL-12 و IFN-γ طی ۷ روز بعد از عفونت با بروسلاهای جهش‌یافته نسبت به سوش و حشی بسیار اندک بود، بهطوری که براساس نمودار ۴-ب و ۴-ج اختلاف چندانی در تولید IL-12 و IFN-γ بین موش‌های آلوده به بروسلای جهش‌یافته و کنترل که PBS به آنها تزریق شده بود، دیده نشد؛ اما این تغییر در مقایسه بین موش‌های آلوده شده با سوش و حشی و کنترل بسیار چشمگیر بود.

براساس نمودار ۲ بعد از آلوده کردن ماکروفازها توسط بروسلا ملی‌تنسیس سوش و حشی و جهش‌یافته روی پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای که به صورت سه‌تایی انجام شده بود، بعد از ۲۴ ساعت توانایی ماندگاری درون سلولی در بروسلاهای جهش‌یافته کاهش یافت. بهطوری که تعداد باکتری‌ها از حدود  $1 \times 10^7$  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 سوش و حشی بعد از ۴۸ ساعت تعداد باکتری‌ها به حدود زمان صفر رسید.



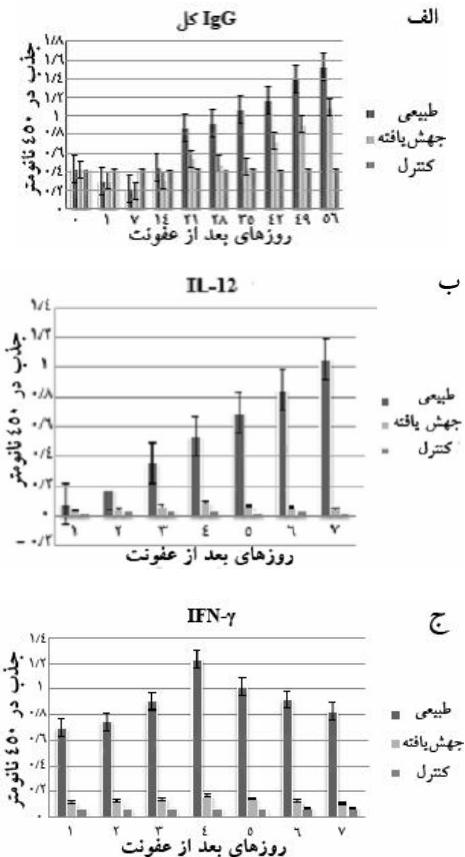
نمودار ۲ تأثیر جهش virB2 و کاهش میزان بروسلا در ماکروفازهای موشی J774

### 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، بهطوری که در انتهای هفته هشتم تعداد بروسلاهای جهش‌یافته از  $5 \times 10^5$  CFU در طحال به کمتر از ۱۰۰۰ CFU در طحال تقلیل پیدا کرد. اما بروسلاهای سوش و حشی از virB2 افزایش یافت که دلیل واضحی بر ضرورت منطقه‌زنی virB2 بر تکثیر و بقای بروسلاهای در مدل حیوانی است.

برای عفونت‌زایی به ماکروفازها متصل شود [۲۵، ۳۲]. همچنین معلوم شده که VirB2 دارای یک نقش ضروری در گرد آوردن اجزای T4SS بوده که به دلیل ساختار شبه پیلوسی است که توسط این پروتئین ساخته می‌شود که به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی در آگروبакتریوم تومغاشینس نشان داده شده است [۳۴، ۳۳]. بروسلاها از مکان معینی در سطح خود که همان T4SS است، قادر به اتصال با ماکروفازها هستند و بعد از چند دقیقه باکتری از طریق تا شدن غشای ماکروفاز و تشکیل یک ماکروپینوزوم (Macropinosome) (Lestrade) و راه می‌یابد [۳۵]. براساس مطالعات لستریت (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 ماکروفازها 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 لستریت و همکاران را در محیط کشت و مدل موشی تأیید می‌کند [۲۵، ۳۷]. 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 ماکروفاز و هلا به اثبات رسیده است [۳۸، ۲۵].

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 لستریت 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 ایمنی زایی 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 ایمنی زایی ماکروفازهای موشی در محیط آزمایشگاهی و مدل حیوانی با توجه به تغییر عملکرد T4SS است.

براساس مطالعات انجام شده در سیستم T4SS میکروارگانیسم آگروبکتریوم تومغاشینس، حضور پروتئین *VirB2* هم بر سطح بروسلا به اثبات رسیده است. پیش‌بینی می‌شود که *VirB2* با ساخت یک ساختار شبه پیلوس می‌شود که *VirB1* با ساخت یک فراسلولی را فراهم آورد تا بتواند *VirB3* مکان یا مجرایی فراسلولی را فراهم آورد تا بتواند باکتری را به محیط بیرون مرتبط سازد و از این طریق بروسلا

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

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 [۴۰، ۴۱]. تحقیقات رولان و همکاران منطبق بر نتایج لستریت و همکاران است، که براساس جهش‌های virB در بروسلای ملی تنسیس نشان داد که تا ۵ روز اول بعد از عفونت کاهش تعداد بروسلایها اتفاق نیفتاد [۴۱، ۳۶]. همچنین راجاشکارا و همکاران (Rajashekara) در بروسلای 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 بروسلایها در طحال موش نشد که با تحقیقات فوق مطابقت دارد. در بروسلای ابورتوس بعد از گذشت سه روز از عفونت مکانیسم ایمنی در موش فعال می‌شود که موجب کاهش تعداد باکتری در طحال می‌شود. به طوری که بعد از ۱۴ تا ۲۱ روز بعد از عفونت میزان باکتری‌های سوش و حشی و جهش یافته virB تقلیل یافته، اما بروسلای‌های جهش یافته ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر بر پایه CFU نسبت به سوش و حشی کاهش داشتند [۴۳، ۲۷]. دلیل این تفاوت می‌تواند تأثیرات مختلف مکانیسم ایمنی در موش‌های طبیعی و جهش یافته VirB باشد. نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً مکانیسم‌های مختلف سیستم ایمنی در کاهش ماندگاری بروسلای سوش و حشی و جهش یافته T4SS دخالت دارد [۲۷]. تولید  $\gamma$  IFN در عفونت بروسلای در موش بین روزهای سوم و هفتم بعد از عفونت آغاز می‌شود [۴۴].  $\gamma$  IFN در شرایط درونبدن در سلول‌هایی که آلوده باشند موجب از بین رفتن بروسلای سوش و حشی و IL-12 یافته می‌شود [۲۷]. در این تحقیق میزان  $\gamma$  IFN-12 در سرم موش‌های آلوده از روز اول تا هفتم اندازه‌گیری شد و براساس نتایج در موش آلوده به سوش و حشی  $\gamma$  IFN-12 از روز اول تا چهارم افزایش و سپس کاهش داشت؛ اما در موش آلوده به نوع جهش یافته نسبت به کنترل افزایش بسیار اندکی داشت.

میزان عفونت‌زایی، ماندگاری و تکثیر درون سلولی در موش‌های BALB/c نشان داده شد که طی ۸ هفته تعداد بروسلاهای جهش‌یافته *virB2* از  $1 \times 10^0$  CFU از  $1 \times 10^0$  CFU کاهش یافته است و به حدود کمتر از  $1 \times 10^0$  CFU در طحال رسید. اما بروسلاهای سوش وحشی از  $5 \times 10^0$  به کمتر از  $1 \times 10^0$  در طحال افزایش یافتند. دن‌هارتی و همکاران نشان دادند که تعداد بروسلا ابورتوس سوش وحشی در موش‌های همین تعداد به  $1 \times 10^0$  CFU از حدود *BALB/c* بعد از گذشت ۸ هفته به  $1 \times 10^1$  CFU در طحال رسید و نوع جهش‌یافته *virB2* از  $200$  در طحال تقلیل یافت [۲۵]. مطالعات آندریاس (Andreas) که بر پایه ایجاد جهش‌های *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 پژوهشی قلهک به مدیریت آقای دکتر ابراهیم کلانترمه‌حردی 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 ۱۶M قدردانی می‌شود.

- [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,

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

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  $200$  CFU در هر چاهک کاهش یافت. در حالی که در نمونه آلدود به سوش وحشی بعد از ۴۸ ساعت تعداد باکتری‌ها به حدود زمان صفر رسیدند. جهش‌های قطبی و غیرقطبی *VirB2* نقايسی 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 توهمفاسینس 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  $1 \times 10^0$  CFU در هر چاهک اندکی زیادتر شده و نوع جهش‌یافته *VirB2* از همین تعداد به حدود  $400$  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 بروسلای 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

## ۶- منابع

- 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] Boschioli ML, Foulon 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] Vizcaíno 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, Kyrides 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, Sivaneshan D, Hoepner 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, Sivaneshan 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, Sonderman 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, Vizcaíno 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] Lestrate 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, Lestrate 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, Paranavitana 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] Lestrate P, Delrue RM, Danese I, Didembourg C, Taminiac 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, Chordi 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.