

Time-dependent analysis of biofilm-regulatory gene expression during biofilm maturation in *Pseudomonas aeruginosa*

Siavash Aynesazi¹

Parastoo Sharifian²

Mahnaz Tavakoli³

Mohammad Mohammadzadeh^{2*}

1. Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

2. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

3. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding Author:
M.mohammadzadeh@abzums.ac.ir

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that frequently causes severe healthcare-associated infections, particularly in immunocompromised patients. Biofilm formation is a major virulence factor that contributes to bacterial persistence and increased resistance to antimicrobial agents. This study aimed to evaluate the expression patterns of key biofilm-regulatory genes during different stages of biofilm maturation.

Methods: The standard strain *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 was cultured, and biofilm formation was quantified using a microtiter plate assay. The expression levels of the biofilm-associated regulatory genes *lasR*, *rhlR*, *gacA*, and *retS* were assessed at multiple time points over a five-day period using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0. The study was approved by the Ethics Committee of Alborz University of Medical Sciences (IR.ABZUMS.REC.1398.066) and was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

Results: Expression analysis demonstrated a significant time-dependent increase in the expression levels of all investigated genes (*lasR*, *rhlR*, *gacA*, and *retS*) throughout the biofilm maturation process, from the planktonic phase (day 0) to mature biofilm formation (day 5) ($P < 0.0001$). The greatest increases were observed for *gacA* and *lasR*, with approximately 56-fold and 50-fold upregulation, respectively, compared with baseline expression levels.

Conclusion: The biofilm maturation process in *P. aeruginosa* is associated with significant upregulation of key regulatory genes involved in quorum sensing and two-component regulatory systems. The observed increase in both activating and inhibitory regulatory genes highlights the complexity of the genetic network governing biofilm development and may provide potential targets for future anti-biofilm therapeutic strategies.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Biofilms; Quorum Sensing; Two-Component Regulatory Systems; Gene Expression Regulation, Bacterial; Virulence Factors

How to cite this article: Mohammadzadeh M, Aynesazi S, Sharifian P, Tavakoli M. Time dependent analysis of biofilm regulatory gene expression during biofilm maturation in *Pseudomonas aeruginosa*. Alborz University Medical Journal 2026; 15 (2): 127 -137

بررسی وابسته به زمان بیان ژن های تنظیم کننده بیوفیلیم طی مراحل بلوغ بیوفیلیم در سودوموناس آئروژینوزا

چکیده

مقدمه: سودوموناس آئروژینوزا پاتوژن فرصت طلبی است که اغلب منجر به عفونت های بیمارستانی خطرناکی در افراد با سیستم ایمنی ضعیف شده می شود. از مهم ترین عوامل مهم بیماری زایی این باکتری توانایی تولید بیوفیلیم بوده که با مقاوم ساختن باکتری در مقابل اکثر آنتی بیوتیک ها درمان عفونت با این باکتری را دشوار می سازد. کنترل تولید بیوفیلیم و مراحل بلوغ آن تحت تأثیر ژن های متعددی است. هدف از این مطالعه ارزیابی تغییرات بیان ژن های اصلی کنترل کننده تولید بیوفیلیم در طی مراحل بلوغ آن است.

روش کار: این مطالعه بر روی سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۱۰۱۴۵ صورت گرفت. پس از کشت و تأیید نهائی سویه، باکتری از لحاظ تولید بیوفیلیم با میکروتیتر - پلیت مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس میزان تغییرات بیان ژن های *retS*, *gacA*, *rhlR*, *lasR* در زمان های مختلف در پروسه تولید و بلوغ بیوفیلیم با استفاده از روش Real-time PCR انجام گرفت و نتایج با استفاده از نرم افزار ۰.۸ GraphPad Prism مورد تجزیه - تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: نتایج سنجش بیان ژن نشان داد که بیان تمامی ژن های *retS*, *gacA*, *rhlR*, *lasR* در طول دوره پنج روزه بلوغ بیوفیلیم به صورت کلی از زمان صفر (پلاتکتونی) تا روز پنجم (بیوفیلیم بالغ) روند افزایشی معنی داری داشت ($P < 0.001$). به طور خاص، بالاترین میزان افزایش بیان مربوط به ژن *gacA* (تقریباً ۵۶ برابر) و *lasR* (تقریباً ۵۰ برابر) بود.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که در طی تولید و بلوغ بیوفیلیم در سودوموناس آئروژینوزا، بیان ژن های کنترل کننده، حتی ژن هایی که اثر مهاری بر تولید بیوفیلیم دارند روند افزایش وابسته به زمان دارند که حاکی از ارتباط پیچیده این ژن ها در حین کنترل تولید بیوفیلیم در این باکتری است.

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، بیوفیلیم، سیستم های تنظیم کننده دوجزئی، کوئوروم سنسینگ

سیاوش آینه سازی^۱

پرستو شریفیان^۲

مهناز توکلی^۳

محمد محمدزاده^{۴*}

۱. گروه میکروبیشناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲. گروه میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
۳. گروه میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول:

M.mohammadzadeh84@yahoo.com

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باسیل گرم منفی، غیرتخمیری، متحرک و اکسیداز مثبت است که به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب، عامل یک سوم از عفونت های ریوی در افراد با نقص ایمنی و شایع ترین دلیل مرگ بیماران سیستمیک فیبروزیس می باشد. از مهم ترین مکانیسم های بیماری زایی این باکتری، توانایی بالای آن در تولید بیوفیلم است که منجر به مقاومت گسترده نسبت به اغلب آنتی بیوتیک ها و شکست های درمانی می شود (۱). بیوفیلم تجمعی پیچیده از باکتری ها است که در یک ماتریکس گلیکوکالیکس محصور شده و در سطوح مختلفی مانند مفصل مصنوعی، کاتترهای وریدی، سوندها و بافت های مخاطی تشکیل می شود. این ساختارها مقاومت بسیار بالایی در برابر عوامل محیطی و درمانی نشان داده و به کانون انتشار باکتری تبدیل می شوند (۵-۲). تشکیل و بلوغ بیوفیلم یک فرآیند هماهنگ و چندمرحله ای است که تحت کنترل شبکه های پیچیده سیگنالینگ بین سلولی و تغییرات بیان ژنی قرار دارد (۶). این فرآیند حدود ۵ روز طول می کشد و شامل مراحل اتصال اولیه، اتصال برگشتناپذیر، تشکیل میکروکلونی ها، بلوغ سه بعدی و در نهایت آزادسازی باکتری ها از بیوفیلم است (۷).

در سودوموناس آئروژینوزا، سیستم های حساس شامل سیستم های تنظیم کننده دوجزئی (Two-component regulatory systems) و کوئوروم سنسینگ (Quorum-sensing) نقش مهمی در بیماری زایی و تشکیل بیوفیلم ایفا می کنند. سیستم های اصلی کوئوروم سنسینگ شامل سیستم Las (با ژن های lasI و lasR) و سیستم Rhl (با ژن های rhlI و rhlII) هستند که فعالیت های رونویسی و تولید فاکتورهای ویرولانس کلیدی (مانند الاستاز، رامنولیبید، اگزوتوکسین A و پیوسیانین) را تنظیم می کنند (۸-۱۱). سیستم GacA/GacS نیز به عنوان یک سیستم دوجزئی اصلی، ارتباط قطعی با کنترل تشکیل بیوفیلم دارد (۱۲، ۱۳). علاوه بر این، سیستم تنظیمی RetS/LadS که بر بسیاری از فاکتورهای بیماری زایی اثر می گذارد، نیز شناخته شده است. RetS یک کیناز حسگر هیبریدی است که در مطالعات جهش یافته، کاهش فاکتورهای عفونت حاد و افزایش سطح بیان اپرون های دخیل در تشکیل بیوفیلم را نشان داده است (۱۴، ۱۵). با وجود مطالعات پیشین درباره نقش ژن های تنظیمی در بیوفیلم، الگوی زمانی هماهنگ بیان این ژن ها در طول مراحل متوالی تشکیل بیوفیلم، تحت شرایط کنترل شده و در یک مدل واحد، هنوز به طور نظام مند بررسی

نشده است. بنابراین، هدف از این مطالعه ارزیابی تغییرات بیان ژن های کنترل کننده تولید بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا طی مراحل مختلف تولید و بلوغ بیوفیلم می باشد.

روش کار

آماده سازی سویه های مورد مطالعه

برای مطالعه سویه های استاندارد سودوموناس آئروژینوزا (ATCC: ۱۰۱۴۵) به عنوان کنترل مثبت و سودوموناس آئروژینوزا (ATCC: ۲۷۸۵۳) به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. جهت تهیه کشت تازه، سویه ها در محیط کشت TSB (مرک، آلمان) کشت داده و محیط های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

بهینه سازی تولید بیوفیلم در سویه مورد مطالعه به روش

میکروپلیت تیت

برای ارزیابی توانایی تولید بیوفیلم، ابتدا از کشت تازه هر دوسویه، سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک فارلند تهیه شد. سوسپانسیون با محیط کشت TSB به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق و ۱۰۰ میکرولیتر از آن درون چاهک های ته گرد میکروپلیت ۹۶ خانه ریخته شد. پس از بستن درپوش، میکروپلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از رشد، جهت حذف سلول های پلانکتونی، پلیت به مدت ۵ ثانیه روی شیکر قرار گرفت و مایع رویی تخلیه شد. چاهک ها یک بار با سرم فیزیولوژی استریل شست و شو داده شدند. سپس به هر چاهک ۱۲۵ میکرولیتر محلول کریستال ویوله ۰/۱٪ افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه گردید. بعد از تخلیه، چاهک ها دو بار با سرم فیزیولوژی استریل شسته و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. در ادامه، ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۰٪ به هر چاهک افزوده و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، جذب نوری نمونه ها در ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری شد. میانگین OD ده چاهک برای هر سویه محاسبه شد و بر اساس رابطه زیر، توان تولید بیوفیلم تعیین گردید (۱۶، ۱۷).

$$\begin{aligned} \text{عدم تشکیل بیوفیلم} &= -OD^{Co+} \leq OD^{Co-} \\ \text{تولیدکننده بیوفیلم ضعیف} &= OD^{Co+} > OD^{Co-}; \leq 2 \times OD^{Co-} \\ \text{تولیدکننده بیوفیلم متوسط} &= OD^{Co+} > OD^{Co-}; 2-4 \times OD^{Co-} \\ \text{تولیدکننده بیوفیلم قوی} &= OD^{Co+} > OD^{Co-}; > 4 \times OD^{Co-} \end{aligned}$$

استخراج RNA و تولید cDNA

برای استخراج RNA، باکتری تولیدکننده بیوفیلم طبق شرایط بهینه در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شد. در زمان‌های ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۵ روز، مایع رویی (حاوی سلول‌های پلانکتونی) حذف و از سلول‌های چسبیده به کف چاهک‌ها جهت استخراج RNA استفاده گردید. تمام نمونه‌ها با سرم فیزیولوژی استریل به کدورت نیم مگ‌فارلند رسانده شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از هر سوسپانسیون در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته، ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و رسوب دوباره شسته شد. استخراج RNA طبق دستورالعمل کیت RNX (سیناژن، ایران) انجام شد. غلظت و خلوص RNA توسط نانودراپ (Boeko، آلمان) در نسبت OD_{۲۶۰}/OD_{۲۸۰} ارزیابی و غلظت نمونه‌ها به ۲۰۰ نانوگرم/میکرولیتر تنظیم شد. برای سنتز cDNA از کیت cDNA سنتز (سیناژن، ایران) استفاده گردید. غلظت و کیفیت cDNA با همان روش اندازه‌گیری شده و به ۵۰۰ نانوگرم/میکرولیتر رسانده شد.

PCR کیفی جهت ارزیابی شرایط PCR و عملکرد پرایمرها و cDNA

پیش از انجام Real-Time PCR، عملکرد پرایمرها و کیفیت cDNA توسط PCR کیفی بررسی شد. پرایمرهای ژن‌های هدف (*lasR*, *rhlR*), (*gacA*, *retS*) و ژن مرجع (*tufB*) به‌عنوان کنترل داخلی با نرم‌افزار Allele ID ۶,۰ طراحی و در پایگاه NCBI مورد BLAST قرار گرفتند. PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲ میکرولیتر مسترمیکس (یکتا تجهیز، ایران)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۱۵ پیکومول)، ۹ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و ۲ میکرولیتر cDNA در ۳۵ چرخه دمایی با دستگاه چرخش گر حرارتی گرادیان (اپندورف، آلمان) اجرا شد. الگوی تک‌باند حاصل کیفیت مناسب نمونه‌ها را تأیید کرد. توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. مشخصات و توالی پرایمرها

پرایمر	۳' → ۵' توالی پرایمر از
<i>tufB</i> F <i>tufB</i> R	GTGAGAACGTTGGTATCCTG GTGGTACGGAAGTAGAAGCTG
<i>gacA</i> F <i>gacA</i> R	AGGTGCAGCGTGATTAAG GCATCTTCACGTCCATCAG
<i>retS</i> F <i>retS</i> R	TCCCTATTTCCGCCAGAC CCAGCTTGACCACGATTG
<i>lasR</i> F <i>lasR</i> R	TGGATGCTCAAGGACTACG TTCACATTGGCTTCCGAG
<i>rhlR</i> F <i>rhlR</i> R	CTGGAAAAGGAAGTGC GG GTAGTTCTGCATCTGGTATCG

ژن *tufB* به‌عنوان ژن مرجع انتخاب شد، زیرا این ژن یک ژن خانه‌دار پایدار بوده و بیان آن در شرایط مختلف رشد باکتری و در طول زمان نسبتاً ثابت گزارش شده است؛ بنابراین گزینه‌ای مناسب برای نرمال‌سازی داده‌های Real-Time PCR در مطالعات مرتبط با سودوموناس آئروژینوزا محسوب می‌شود.

ارزیابی بیان ژن با روش Real-Time PCR

بیان نسبی ژن‌های هدف با استفاده از دستگاه ۶۰۰۰ Rotor-Gene (کیاژن، آمریکا) و مسترمیکس سایر گرین در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. اجزای واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۵ پیکومول)، ۱ میکرولیتر cDNA و ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر بود.

شده، و برای تحلیل آماری از آزمون t-test مستقل (برای مقایسه دو گروه) و ANOVA یک طرفه (برای مقایسه بیش از دو گروه) استفاده شد. حد آستانه معنی داری آماری $p \text{ value} \leq 0.05$ در نظر گرفته شد و نتایج در قالب بیان حداکثر، حد میانه و حداقل ارائه گردید.

یافته‌ها

تعیین کمیت تولید بیوفیلیم

نتایج حاصله از روش میکروتیتر پلیت سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ به نسبت سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۱۰۱۴۵ به عنوان کنترل منفی نشان داد که سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۱۰۱۴۵ در شرایط آزمایشگاهی طراحی شده توانائی تولید بیوفیلیم قوی دارد که نسبت های OD مقایسه در جدول ۳ آمده است.

همچنین، زمان صفر که معادل وضعیت پلانکتونی باکتری پیش از شروع تشکیل بیوفیلیم است، به عنوان مرجع نرمال سازی زمانی انتخاب شد تا تغییرات بیان ژن ها در مراحل مختلف بلوغ بیوفیلیم به صورت مقایسه ای و وابسته به زمان ارزیابی گردد.

برنامه حرارتی شامل ۳۵ چرخه طبق جدول ۱ بود. تحلیل منحنی ذوب جهت بررسی اختصاصی بودن تکثیر انجام شد. مقادیر بیان نسبی با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید.

آنالیز آماری

آنالیز آماری مطالعه با استفاده از نرم افزار GraphPad prism ورژن ۸ استفاده گردید. تمامی آزمایش های کمی تولید بیوفیلیم و آنالیز بیان ژن به روش Real-Time PCR در ۱۰ تکرار تکنیکی مستقل انجام شدند. داده های حاصل از این تکرارها به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش

جدول ۲. نتایج جذب نوری سویه کنترل مثبت به نسبت کنترل منفی جهت ارزیابی شرایط اپتیمم تست تولید بیوفیلیم

میزان تولید بیوفیلیم	جذب نوری کنترل مثبت به منفی	جذب نوری کنترل منفی	جذب نوری کنترل مثبت	
+++	۴/۵	۰/۰۸	۰/۳۶	۱
+++	۵/۳	۰/۰۶	۰/۳۲	۲
+++	۴/۹	۰/۰۸	۰/۳۹	۳
++	۳/۵	۰/۰۸	۰/۲۸	۴
++	۳/۳	۰/۰۹	۰/۳۰	۵
+++	۵/۷	۰/۰۷	۰/۴	۶
+++	۴/۴	۰/۰۷	۰/۳۱	۷
+++	۴/۷	۰/۰۸	۰/۳۸	۸
+++	۶/۱	۰/۰۶	۰/۳۷	۹
++	۳/۹	۰/۰۹	۰/۳۵	۱۰
+++	۴/۶	۰/۰۸	۰/۳۴	میانگین
قوی +++، متوسط ++، ضعیف +				

نتایج PCR کیفی جهت ارزیابی شرایط PCR و عملکرد پرایمرها و cDNA

تمام آمپلیکون‌های ژن‌های مورد بررسی روی آگارز ۱٪ و با استفاده از مارکر DNA لدر ۵۰ نوکلئوتیدی الکتروفورز شدند. برای تمام ژن‌ها الگوی تک باند در محدوده وزنی موردانتظار مشاهده گردید و از کیفیت cDNA و پرایمرها اطمینان حاصل گردید.

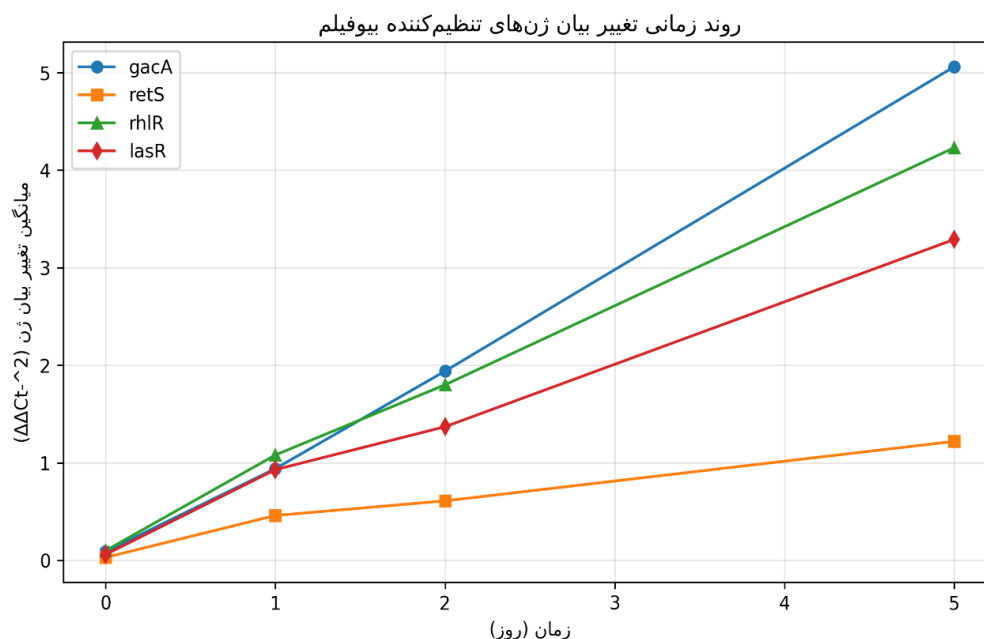
نتایج تغییرات بیان ژن‌ها با روش Real-time PCR

تغییرات بیان ژن‌های *gacA*, *retS*, *lasR*, *rhlR* به نسبت ژن *tufB* در

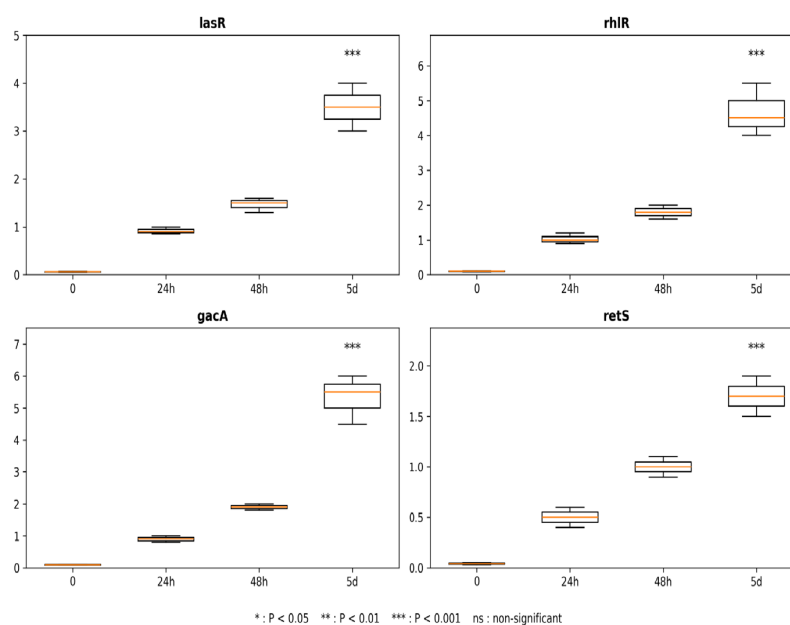
زمان‌های صفر، ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۵ روز ارزیابی گردید (تصویر ۱). نتایج نشان از افزایش بیان تمامی ژن‌ها از زمان صفر (فرم پلانکتونی) تا زمان ۵ روز (فرم بیوفیلم بالغ) داشت ($P < 0.0001$). جزئیات نتایج به صورت حداقل بیان، حداکثر بیان و میانگین بیان در زمان‌های مختلف در جدول ۳ آورده شده است. همچنین نسبت تغییرات بیان ژن‌ها در زمان‌های مختلف صفر به ۲۴ ساعت، صفر به ۴۸ ساعت، صفر به ۵ روز، ۲۴ به ۴۸ ساعت، ۴۸ ساعت به ۵ روز و ۲۴ ساعت به ۵ روز در تصویر ۲ نشان داده شده است.

جدول ۳. تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه در مدت زمان بلوغ بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی

ژن	زمان	حداقل بیان	حداکثر بیان	میانگین بیان	SD	میانگین نسبت بیان به <i>tufB</i>	P value
<i>gacA</i>	۰	۰/۰۷	۰/۱	۰/۰۹	۰/۰۱	۰/۰۹	$P < 0.0001$
	۲۴ ساعت	۰/۷۲	۱/۰۷	۰/۹۴	۰/۱	۰/۸۹	
	۴۸ ساعت	۱/۹۳	۱/۹۷	۱/۹۴	۰/۰۱	۱/۹۵	
	۵ روز	۴/۳۲	۶/۰۴	۵/۰۶	۰/۵۴	۵/۱۳	
<i>retS</i>	۰	۰/۰۲	۰/۰۵	۰/۰۳	۰/۰۱	۰/۰۴	$P < 0.0001$
	۲۴ ساعت	۰/۳۳	۰/۵۷	۰/۴۶	۰/۰۷	۰/۸۹	
	۴۸ ساعت	۰/۴۱	۰/۷۵	۰/۶۱	۰/۱	۱/۹۵	
	۵ روز	۰/۹	۱/۷۹	۱/۲۲	۰/۳۲	۵/۱۳	
<i>rhlR</i>	۰	۰/۰۸	۰/۱	۰/۱	۰/۰۱	۰/۱	$P < 0.0001$
	۲۴ ساعت	۰/۷۲	۱/۵۳	۱/۰۸	۰/۲۸	۱/۰۹	
	۴۸ ساعت	۱/۳۹	۲/۲۴	۱/۸	۰/۲۷	۱/۷۸	
	۵ روز	۳/۴۹	۵/۸۴	۴/۲۳	۰/۷۳	۴/۶۹	
<i>lasR</i>	۰	۰/۰۴	۰/۰۷	۰/۰۶	۰/۰۱	۰/۰۶۶	$P < 0.0001$
	۲۴ ساعت	۰/۷۵	۱/۰۶	۰/۹۳	۰/۱۱	۰/۹۳	
	۴۸ ساعت	۱/۱۳	۱/۸	۱/۳۷	۰/۲۲	۱/۶۱	
	۵ روز	۲/۷	۴/۳۴	۳/۲۹	۰/۵۷	۳/۴۳	



تصویر ۱. روند تغییرات وابسته به زمان بیان ژن های تنظیم کننده تولید بیوفیلیم شامل *gacA*، *retS*، *rhIR* و *lasR* در سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۱۰۱۴۵ در شرایط آزمایشگاهی. نمونه ها در زمان صفر (فرم پلانکتونی)، ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۵ روز (بیوفیلیم بالغ) جمع آوری شدند. میزان بیان ژن ها با استفاده از روش RealTime PCR و بر اساس فرمول $\Delta\Delta C_t^2$ محاسبه و نسبت به ژن مرجع *tufB* نرمال سازی شد. نمودار نشان دهنده افزایش تدریجی و وابسته به زمان بیان تمامی ژن های مورد بررسی در طی فرآیند بلوغ بیوفیلیم می باشد.



تصویر ۲. نمودارهای جعبه ای مقایسه بیان نسبی ژن های *gacA*، *rhIR*، *lasR* و *retS* در زمان های مختلف بلوغ بیوفیلیم (۰، ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۵ روز) در سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۱۰۱۴۵. داده ها بر اساس مقادیر بیان نسبی ژن ها رسم شده اند.

بحث

در این مطالعه، تغییرات بیان ژن‌های کلیدی کنترل‌کننده تولید بیوفیلیم در سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۱۰۱۴۵ طی مراحل مختلف تولید و بلوغ بیوفیلیم بررسی شد. نوآوری این مطالعه در بررسی هم‌زمان و مقایسه‌ای الگوی زمانی بیان چهار ژن کلیدی تنظیم‌کننده بیوفیلیم در یک چارچوب آزمایشی واحد است که امکان درک بهتر تعاملات سلسله‌مراتبی و هماهنگی این مسیرها در طول مراحل مختلف تشکیل و بلوغ بیوفیلیم را فراهم می‌آورد. بیوفیلیم‌ها ساختارهای پیچیده و مقاومی هستند که در برابر عوامل محیطی و درمانی مقاومت بالایی از خود نشان می‌دهند. تشکیل آن‌ها نتیجه تعامل پیچیده بین سیگنال‌های سلولی و بیان ژن‌های تنظیم‌کننده است. در سودوموناس آئروژینوزا، سیستم‌های کوئوروم سنسینگ Las و Rhl و همچنین سیستم دوجزئی GacA/S نقش حیاتی در تنظیم تولید بیوفیلیم و فاکتورهای ویروالانس دارند.

نتایج Real-Time PCR نشان داد که بیان تمامی ژن‌های *lasR*, *rhlR*, *retS* و *gacA* از حالت پلانکتونیک (زمان ۰) تا بیوفیلیم بالغ (روز پنجم) به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. این یافته‌ها حاکی از آن است که فرایند بلوغ بیوفیلیم با افزایش تدریجی فعالیت ژن‌های تنظیم‌کننده همراه است و بیان این ژن‌ها به زمان وابسته است.

افزایش بیان *lasR* و *rhlR* که جزء سیستم‌های کوئوروم سنسینگ هستند، نشان‌دهنده تقویت تعاملات سلول به سلول و هماهنگی تولید فاکتورهای ویروالانس در طول بلوغ بیوفیلیم است. این یافته با مطالعات قبلی مطابقت دارد که بیان *lasR* و *rhlR* در مراحل میکروکلونی و بلوغ بیوفیلیم افزایش می‌یابد و نقش مهمی در پایداری و ساختار سه‌بعدی بیوفیلیم ایفا می‌کند. به‌عنوان مثال موهان و همکارانش نشان دادند که در شرایط تولید بیوفیلیم در سویه سودوموناس آئروژینوزا PO۱، هر دو ژن افزایش بیان داشتند و با اضافه‌کردن ماده آرتوکارپسین که خاصیت ضد بیوفیلیم دارد بیان این ژن‌ها به‌صورت معنی‌داری کاهش یافته است (۱۸).

در یک مطالعه دیگر به بررسی شبکه‌های تنظیمی مرتبط با عوامل بیماری‌زای سودوموناس آئروژینوزا پرداخته شد و نقش کوئوروم سنسینگ را در تنظیم بیان ژن‌های ویروالانس مورد بررسی قرار داده شد. در این مطالعه نشان داده شد که هر دو ژن در تولید بیوفیلیم نقش اساسی دارند؛ ولی نقش ژن *rhlR* در تولید بیوفیلیم نسبت به *lasR* اهمیت بالاتری دارد (۱۹).

همچنین گزارش شده که بیان هر دو ژن در حضور ترکیبات ضد بیوفیلیم به طور معنی‌داری نسبت به حالت نبود این ترکیبات در سویه PO۱ کاهش پیدا کرده است که تأییدکننده نقش مهم هر دو در شرایط تولید بیوفیلیم است (۲۰).

مطالعه جسک و همکاران نشان داد که الگوهای بیان ژن در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا تحت شرایط بیوفیلیم به طور مستقل تکامل یافته‌اند و نقش مهم‌تر ژن *rhlR* را نسبت به ژن *lasR* در شرایط تولید بیوفیلیم نشان داد. به‌طوری که در شرایط تولید بیوفیلیم بر خلاف مطالعه حاضر کاهش بیان در ژن *lasR* و مطابق مطالعه ما افزایش بیان *rhlR* نسبت به شرایط پلانکتونی مشاهده گردید (۲۱). البته نتایج مطالعه ما افزایش حدوداً ۴ برابری در ژن *rhlR* و افزایش ۳ برابری در ژن *lasR* از شرایط پلانکتونی به شرایط بیوفیلیم دیده شد که می‌تواند نشان از اهمیت بالاتر ژن *rhlR* در تولید بیوفیلیم سودوموناس آئروژینوزا باشد. البته در مطالعه جسک نتایج بیشتر بر اساس ایزوله‌های بالینی صورت گرفت در حالیکه مطالعه حاضر روی سویه استاندارد انجام شد که می‌تواند حاکی از تفاوت در نحوه کنترل بیان ژن در ایزوله‌های جدا شده از بالین به نسبت سویه‌های استاندارد باشد.

در مطالعه حاضر افزایش بیان حدود ۵ برابری در ژن *gacA* نیز مشاهده شد که حاکی از نقش مرکزی این سیستم دو جزئی در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلیم است. نتایج مطالعات مشابه هم حاکی از نقش پررنگ این ژن در کاهش تحرک باکتری و افزایش تولیدکننده بیوفیلیم در تغییر فاز از حالت پلانکتونی به فاز بیوفیلیم دارد و حذف این ژن در سویه‌های موتانت باعث شد تا تولید بیوفیلیم کاهش معنی‌داری داشته باشد (۲۲، ۲۳). جالب‌توجه است که ژن *retS* که به طور شناخته شده نقش مهمی بر برخی مسیرهای بیوفیلیم دارد، نیز در طول زمان افزایش بیانی به‌اندازه *gacA* نشان داد. در تقریباً تمامی مطالعات مرتبط نقش این ژن در سرکوب تولید بیوفیلیم ذکر شده است که نتایج مطالعه حاضر را به چالش می‌کشد. لازم است تأکید شود که این نتیجه‌گیری صرفاً مبتنی بر داده‌های بیان ژن است و هیچ‌گونه ارزیابی عملکردی یا فنوتیپی مستقیم از نقش این ژن انجام نشده است. از آنجاکه بیان یک ژن الزاماً به معنای فعالیت عملکردی آن نیست، احتمال دارد افزایش بیان *retS* بخشی از یک شبکه تنظیمی جبرانی و پیچیده باشد که طی آن ژن‌های فعال‌کننده و مهارکننده به‌صورت هماهنگ پایداری و سازگاری بیوفیلیم را مدیریت می‌کنند.

و بیان هم‌زمان ژن‌های فعال‌کننده و مهارى بیانگر شبکه پیچیده تنظیم‌کننده در این باکتری است. این دانش می‌تواند مبنایی برای طراحی راهکارهای درمانی هدفمند علیه بیوفیلیم‌ها فراهم کند.

اعلان‌ها

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی البرز به‌خاطر حمایت از این طرح پژوهشی و همچنین گروه میکروبی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی البرز به دلیل در اختیار قراردادن فضای آزمایشگاه برای این تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی البرز (IR.ABZUMS.REC.۱۳۹۸،۰۶۶) تأیید شده است. در طول تحقیق، قوانین اعلامیه هلسینکی رعایت شده است.

استفاده از هوش مصنوعی: در نگارش این مقاله از هوش مصنوعی استفاده نشده است.

مشارکت نویسندگان: طراحی پروژه توسط محمد محمدزاده، اجرای عملی پروژه توسط سیاوش آینه‌سازی و پرستو شریفیان، نگارش مقاله توسط محمد محمدزاده و سیاوش آینه‌سازی، مشارکت در نگارش مقاله و ویرایش ادبی توسط مهناز توکلی.

مقایسه نسبت تغییرات بیان ژن‌ها در زمان‌های مختلف نشان داد که بیشترین تغییرات در فاصله زمانی ۰ تا ۵ روز رخ داده است، که نشان‌دهنده اهمیت مراحل اولیه و میانی تولید بیوفیلیم در ایجاد بلوغ کامل و پایداری آن است. این یافته می‌تواند راهنمایی برای هدف‌گیری ژن‌ها در طراحی درمان‌های ضدبیوفیلیم باشد. در این مطالعه محدودیت‌های شامل استفاده از یک سویه استاندارد و شرایط آزمایشگاهی کنترل شده وجود داشت، که ممکن است به طور کامل رفتار بیوفیلیم در محیط بالینی را منعکس نکند. بنابر این مطالعات آینده می‌توانند شامل سویه‌های بالینی و بررسی تعامل ژن‌ها با شرایط استرس محیطی یا حضور آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. یکی دیگر از محدودیت‌های مطالعه حاضر آن است که تحلیل‌ها صرفاً بر اساس داده‌های بیان ژن انجام شده و ارزیابی عملکردی یا فنوتیپی مستقیم از بیوفیلیم صورت نگرفته است. بنابراین، اگرچه افزایش بیان ژن‌های تنظیم‌کننده در طی بلوغ بیوفیلیم مشاهده شد، تعمیم این یافته‌ها به عملکرد واقعی بیوفیلیم نیازمند انجام مطالعات تکمیلی شامل سنجش‌های فنوتیپی، آنالیز موتانت‌ها و بررسی‌های ساختمانی بیوفیلیم در آینده می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تولید و بلوغ بیوفیلیم در سودوموناس آئروژینوزا نتیجه تغییرات زمان‌مند بیان ژن‌های کلیدی است

References

- Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS pathogens*. 2008;4(11):e1000213. [DOI:10.1371/journal.ppat.1000213]
- Reza G, Behnaz S. Effects of Oxygen on In-vitro Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. 2013.
- Wagner VE, Iglewski BH. *P. aeruginosa* biofilms in CF infection. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2008;35(3):124-34. [DOI:10.1007/s12016-008-8079-9]
- Telles JP, Cieslinski J, Tuon FF. Daptomycin to bone and joint infections and prosthesis joint infections: a systematic review. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2019;23:191-6. [DOI:10.1016/j.bjid.2019.05.006]
- Frausing MHJP, Nielsen JC, Johansen JB, Jørgensen OD, Olsen T, Kristensen J, et al. Cardiac surgery in patients with cardiac implantable electronic devices and risk of device infections: a nationwide nested case-control study. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology*. 2023;66(4):897-904. [DOI:10.1007/s10840-022-01236-7]
- Wang S, Payne GF, Bentley WE. Quorum sensing communication: molecularly connecting cells, their neighbors, and even devices. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*. 2020;11(1):447-68. [DOI:10.1146/annurev-chembioeng-101519-124728]
- Thi MTT, Wibowo D, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(22):8671. [DOI:10.3390/ijms21228671]
- Capatina D, Lupoi T, Feier B, Blidar A, Hosu O, Tertis M, et al. Label-free electrochemical aptasensor for the detection of the 3-O-C12-HSL quorum-sensing molecule in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosensors*. 2022;12(7):440. [DOI:10.3390/bios12070440]
- Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal transduction and targeted therapy*. 2022;7(1):199. [DOI:10.1038/s41392-022-01056-1]
- Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell*. 2015;6(1):26-41. [DOI:10.1007/s13238-014-0100-x]
- Duplantier M, Lohou E, Sonnet P. Quorum sensing inhibitors to quench *P. aeruginosa* pathogenicity. *Pharmaceuticals*. 2021;14(12):1262. [DOI:10.3390/ph14121262]
- Song H, Li Y, Wang Y. Two-component system GacS/GacA, a global response regulator of bacterial physiological behaviors. *Engineering Microbiology*. 2023;3(1):100051. [DOI:10.1016/j.engmic.2022.100051]
- Yu X, Chen M, Jiang Z, Hu Y, Xie Z. The two-component regulators GacS and GacA positively regulate a nonfluorescent siderophore through the Gac/Rsm signaling cascade in high-siderophore-yielding *Pseudomonas* sp. strain HYS. *Journal of bacteriology*. 2014;196(18):3259-70. [DOI:10.1128/JB.01756-14]
- Kaler KMR, Nix JC, Schubot FD. RetS inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by disrupting the canonical histidine kinase dimerization interface of GacS. *Journal of Biological Chemistry*. 2021;297(4). [DOI:10.1016/j.jbc.2021.101193]
- Liu C, Sun D, Zhu J, Liu W. Two-component signal transduction systems: a major strategy for connecting input stimuli to biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*. 2019;9:3279. [DOI:10.3389/fmicb.2018.03279]
- Coffey BM, Anderson GG. Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. *Pseudomonas methods and protocols*: Springer; 2014. p. 631-41. [DOI:10.1007/978-1-4939-0473-0_48]

17. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*. 2000;40(2):175-9. [DOI:10.1016/S0167-7012(00)00122-6]
18. Mohan MS, Salim SA, Ranganathan S, Parasuraman P, Anju V, Ampasala DR, et al. Attenuation of Las/Rhl quorum sensing regulated virulence and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by Artocarpesin. *Microbial Pathogenesis*. 2024;189:106609. [DOI:10.1016/j.micpath.2024.106609]
19. Wang Y, Gao L, Rao X, Wang J, Yu H, Jiang J, et al. Characterization of lasR-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*. 2018;8(1):13344. [DOI:10.1038/s41598-018-30813-y]
20. Vetrivel A, Vetrivel P, Dhandapani K, Natchimuthu S, Ramasamy M, Madheswaran S, et al. Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by selected LasR inhibitors. *International Microbiology*. 2023;26(4):851-68. [DOI:10.1007/s10123-023-00338-0]
21. Jeske A, Arce-Rodriguez A, Thöming JG, Tomasch J, Häussler S. Evolution of biofilm-adapted gene expression profiles in lasR-deficient clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *NPJ biofilms and microbiomes*. 2022;8(1):6. [DOI:10.1038/s41522-022-00268-1]
22. Song H, Li Y, Wang Y. Two-component system GacS/GacA, a global response regulator of bacterial physiological behaviors. *Eng Microbiol* 3: 100051. 2022. [DOI:10.1016/j.engmic.2022.100051]
23. Ali-Ahmad A, Fadel F, Sebban-Kreuzer C, Ba M, Péliissier GD, Bornet O, et al. Structural and functional insights into the periplasmic detector domain of the GacS histidine kinase controlling biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific reports*. 2017;7(1):11262. [DOI:10.1038/s41598-017-11361-3]