نقش سنجش حد نصاب در توکسین زایی *کلستریدیوم پرفرینجنس*

سیما آزادمنش[۱]، لیدا عبدالمحمدی خیاو*[۲]، رامین باقری نژاد[۳]، بهجت مجیدی[۴]

۱- دانش آموخته دکتری تخصصی باکتری شناسی گیاهی، بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتریایی بیهوازی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، کرج، ایران

۲- دانش آموخته دکتری تخصصی باکتری شناسی، بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتریایی بیهوازی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، کرج، ایران

۳- دانش آموخته دکتری تخصصی باکتری شناسی، بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتریایی بیهوازی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، کرج، ایران

۴- دانش آموخته دکتری تخصصی بیوشیمی، بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتریایی بیهوازی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شعبه مشهد، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، مشهد، ایران

* **نویسنده مسوول**: دانش آموخته دکتری تخصصی باکتری شناسی- آدرس: کرج، خیابان شهید بهشتی، حصارک، کرج، البرز، ایران. صندوق پستی ۳۱۹۷۵/۱۴۸ کد پستی: ۳۱۹۷۶۱۹۷۵۱ - تلفن تماس: 02634050400 - فکس: 02634552194 - ایمیل: l.mohammadi@rvsri.ac.ir

چکیده

کلستریدیوم پرفرنجنس، یک باکتری بی‌هوازی گرم مثبت و اسپوردار بوده که به‌طور گسترده در طبیعت پراکنده است. این باکتری قادر به ترشح توکسین‌های پروتئینی و آنزیم‌ها بوده که به بیماری‌زایی آن کمک می‌کند. تنظیم بیان ژن این توکسین-ها تحت کنترل شبکه‌ای قرار دارد که ارتباطات سلول-سلول را برقرار می‌نمایند. به‌منظور توکسین‌زایی، سلول‌های باکتریایی با تولید و تشخیص سیگنال‌های خارج‌سلولی، به‌ویژه از طریق مولکول‌های اختصاصی سیگنالینگ کوچک که به عنوان خودالقاگر شناخته می‌شوند، ارتباط برقرار می‌شود. این سیگنال‌ها در تولید توکسین‌ها و حدت بسیار مهم هستند. همچنین این سیستم در فرآیندهای اسپورزایی و تشکیل بیوفیلم در این باکتری نقش داشته که اهمیت نقش این سیستم را نشان می‌دهد. با توجه به اهمیت میزان تولید توکسین‌ها در سویه‌های واکسینال و مطالعات محدودی که تاکنون در زمینه تنظیم بیان توکسین‌های باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* انجام شده، در این مقاله نقش مهم سیستم‌های سنجش حد نصاب در تولید و ترشح توکسین‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* بر اساس مرور مطالعات موجود بررسی شده‌است. در نهایت، نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد که سیستم‌های تنظیمی سنجش حد نصاب از جمله Agr و سیستم دو جزئی VirS/VirR نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های ویرولانس در *کلستریدیوم پرفرنجنس* دارند. همچنین، نقش مولکول‌های خودالقاگر در تنظیم فاکتورهای حدت و حفظ تعادل میکروبیوم روده، زمینه‌ساز توسعه اهداف درمانی نوین در مقابله با این پاتوژن خواهد بود. به‌طور کلی، تنظیم بیان ژن در

کلستریدیوم پرفرینجنس پیچیده بوده و ژن‌های رمزگذار توکسین‌ها را نمی‌توان به‌صورت سیستم‌های کاملا" مجزا در نظر گرفت.

واژگان کلیدی: پپتیدهای خودالقاگر، تولید توکسین، سیستم سنجش حد نصاب، *کلستریدیوم پرفرینجنس*

مقدمه

جنس *کلستریدیوم* اولین بار توسط پرازموفسکی در سال ۱۸۸۰ توصیف شد (۱). نام جنس از نام یونانی kloster (در لاتین *Clostridium*) به معنای دوکی‌شکل، گرفته‌شد. این جنس یکی از بزرگ‌ترین جنس‌های پروکاریوتی در شاخه‌ی Firmicutes است که حاوی بیش از ۳۰۰ گونه می‌باشد (۲). به‌دلیل ظرفیت اسپورزایی، باکتری‌های این جنس می‌توانند برای مدت طولانی در خاک به‌صورت بالقوه عفونت‌زا باقی بمانند که نشان‌دهنده‌ی خطر قابل توجه آنان برای جمعیت حیوانات و انسان است. یکی از مهم‌ترین گونه‌های آن *کلستریدیوم پرفرینجنس* می‌باشد که به‌طور گسترده در طبیعت به‌ویژه در خاک و دستگاه گوارش انسان و حیوانات پراکنده است (۳). این گونه متشکل از باسیل‌های گرم مثبت اسپوردار بی‌هوازی اجباری است (۲). این باکتری تولید توکسین‌های قوی و متنوعی می‌کند (۴). از این توانایی در تولید توکسین‌های مختلف، در سیستم طبقه‌بندی آن استفاده شده به‌طوری که سویه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* بر اساس تولید توکسین‌های اصلی آلفا (CPA)، بتا (CPB)، اپسیلون (ETX)، یوتا (ITX)، انتروتوکسین (CPE) و NetB (توکسین شبه انتریت نکروتیک B) به هفت توکسینوتایپ (A تا G) تقسیم می‌شوند. جدول شماره ۱ توکسینوتایپ *کلستریدیوم پرفرینجنس* بر اساس توکسین‌های اصلی را آورده‌است. مشخص شده‌است که ژن تولید کننده‌ی توکسین آلفا (*plc*) و پرفرینگولایزین بر روی کروموزومی قرار دارد. اما ژن‌های تولیدکننده‌ی توکسین‌های بتا، اپسیلون و یوتا بر روی پلاسمیدهای بزرگ قرار گرفته‌اند (۵، ۳). ژن انتروتوکسین (*cpe*) نیز توسط یک پلاسمید بزرگ یا

یک ترانسپوزون که ظاهراً وارد کروموزوم شده‌است، حمل می‌شود (۶). علاوه بر این توکسین‌های اصلی، *کلستریدیوم پرفرینجنس* توکسین‌های دیگری مانند کاپا (کلاژناز، ژلاتیناز)، تتا یا پرفرینگولیزین (سیتولیزین) تولید می‌نماید (۷).

جدول ۱- توکسینوتایپ‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* بر اساس توکسین‌های اصلی (۸)

Toxinotype	α (CPA)	β (CPB)	ε (ETX)	τ (ITX)	Enterotoxin (CPE)	Necrotic enteritis B-like toxin (NetB)
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	±	-
D	+	-	+	-	±	-
E	+	-	-	+	±	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

+ وجود توکسین

- عدم وجود توکسین

کلستریدیوم پرفرینجنس می‌تواند باعث ایجاد بیماری‌های مختلفی در انسان و حیوانات شود. این باکتری بیش‌تر دستگاه گوارش و بافت‌های نرم را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در انسان، این باکتری یکی از علل شایع مسمومیت غذایی است و همچنین می‌تواند منجر به بیماری‌های شدیدتری نظیر قانقاریای گازی و انتریت نکروزان شود. (۹). یکی از تیپ‌های مهم این باکتری، *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ D می‌باشد که عامل انتروتوکسمی یا قلوه‌نرمی در گوسفند، بز و کم‌تر گاو می‌باشد و سبب مرگ‌ومیر ناگهانی به‌خصوص در دام‌های پروار بعد از تغییر ناگهانی رژیم غذایی می‌شود (۱۰، ۱۱). *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ B و C در ایجاد بیماری‌های دستگاه گوارش نظیر اسهال عفونی بره‌ها و پیگ‌بل نقش ایفا می‌کنند (۱۲). *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A می‌تواند منجر به بیماری‌های شدیدی نظیر قانقاریای گازی و انتریت نکروتیک شود. در جدول ۲ بیماری-های مرتبط با تیپ‌های مختلف *کلستریدیوم پرفرینجنس* آورده شده‌است.

جدول ۲- بیماری‌های ناشی از تیپ‌های مختلف جنس *کلستریدیوم پرفرینجنس* (۱۳, ۳)

عامل بیماری‌زا	نوع بیماری	میزبان ها
Clostridium perfringens type A	انتریت نکروتیک، قانقاریای گازی و، انتروتوکسمی، گاستروانتریت،	انسان، نشخوارکنندگان، اسب، سگ
Clostridium perfringens type B	اسهال خونی بره ها	بره ها
Clostridium perfringens type C	انتریت هموراژیک و نکروتیک	دامهای جوان
	پیگ بل	انسان
	استراک	گوسفندان بالغ
Clostridium perfringens type D	انتروتوکسمی	نشخوارکنندگان
Clostridium perfringens type E	گاستروانتریت	گاو، خرگوش
Clostridium perfringens type F	مسمومیت غذایی، اسهال متعاقب مصرف آنتی بیوتیکها	انسان
Clostridium perfringens type G	انتریت نکروتیک	طیور

در *کلستریدیوم پرفرینجنس*، سیستم سنجش حد نصاب (Quorum sensing, QS) به عنوان یکی از سیستم‌های تنظیم بیان ژنی شناخته شده‌است که در تولید توکسین‌های اصلی و فرعی توسط باکتری و تنظیم بیان ژن آن‌ها اهمیت دارد. همچنین این سیستم در *کلستریدیوم پرفرینجنس* در فرآیندهای اسپورزایی، حدت بیماریزایی (۳) و تشکیل بیوفیلم نقش دارد که اهمیت دو چندان این سیستم را نشان می‌دهد. با توجه به اهمیت میزان تولید توکسین‌ها در سویه‌های واکسینال و مطالعات محدودی که تاکنون در زمینه‌ی تنظیم بیان توکسین‌های باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* انجام شده، در این مطالعه تلاش شده نقش سیستم سنجش حد نصاب در تنظیم بیان توکسین‌ها تشریح شود.

سیستم سنجش حدنصاب

باکتری ها برای حفظ بقا در محیط‌های مختلف نیازمند درک شرایط محیطی و پاسخ به آن برای سازگاری با شرایط محیطی هستند که این عمل از طریق بیان ژن صورت می‌گیرد. مکانیسم مهم مرتبط با سازگاری باکتری با محیط اطراف، فرآیند سیستم سنجش حد نصاب می‌باشد. این سیستم، مکانیسم تنظیم ارتباطات سلول به سلول و اثرات آن به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم بر روی رونویسی و ترجمه‌ی پروتئین‌ها در میکروارگانیسم‌ها توصیف شد . فرآیند سیستم سنجش حد نصاب اولین بار در سال ۱۹۷۰ توسط **Nealson** در باکتری‌های *ویبریو فیشری* و *ویبریو هاروه‌ای* گزارش گردید. این سیستم ارتباطی در توده های بیوفیلم به‌کار رفته‌است. از آن زمان به بعد، نقش این سیستم در مکانیسم‌هایی نظیر تنظیم بیان ژن در فرآیند تشکیل بیوفیلم مورد بررسی قرارگرفت (۱۵). سیستم سنجش حد نصاب یک سیستم وابسته به تراکم و جمعیت است (۱۶). این سیستم به‌منظور ارتباط و برای به اشتراک گذاشتن اطلاعات و در نتیجه"گفتگو" بین سلول‌های باکتریایی استفاده می‌شود (۱۷). در این سیستم ارتباط و گفتگوی بین سلول‌های باکتریایی توسط مولکول‌های کوچک پیام‌رسان (Small signaling molecule, SM) انجام می‌شود (۱۸). این مولکول‌های پیام‌رسان در صورت رسیدن به یک حد نصاب (آستانه معین) منجر به شروع رویدادهای آبشاری در داخل سلول‌های باکتریایی کرده که در نهایت باعث تنظیم بیان ژن می‌شود. از این‌رو نام "سنجش حد نصاب" برای توصیف این مکانیسم به‌کار گرفته‌شد (۱۹). این سیستم در باکتری‌های مختلف به‌وسیله انواع مولکول‌های ارتباطی عمل می‌کند که در زیر به تفصیل برای *کلستریدیوم پرفرینجنس* بیان خواهد شد.

سیستم سنجش حد نصاب در *کلستریدیوم پرفرینجنس* شامل موارد زیر است:

۱- سیستم agr و پپتیدهای خودالقاگر

۲- سیستم دو جزئی VirS/Vir R

۳- سیستم خودالقاگر The Autoinducer (AI) System

کلستریدیوم پرفرینجنس از دو سیستم سنجش حد نصاب بهره می‌برد. اولین سیستم از یک پپتید به عنوان مولکول سیگنال برای تنظیم بیان ژن استفاده می‌کند که سیستم تنظیم‌کننده ژن جانبی (Accessory gene regulator) agr نامیده می‌شود (۱۸). در بسیاری از مطالعات، سیستم تنظیم بیان ژن دو جزئی (Two−component regulatory System) Vir نیز جزء agr می‌باشد که از مجموعه‌های سیستم سنجش حد نصاب استفاده می‌کند (۱۶). سیستم دوم، luxS نام دارد که اولین بار در *Vibrio harveyi* شناسایی شد. سیستم luxS بین باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی مشترک بوده و در نتیجه تصور می‌شود از این سیستم به عنوان ابزاری برای برقراری ارتباط‌های بین گونه‌ای در باکتری استفاده می‌کنند (۲۰).

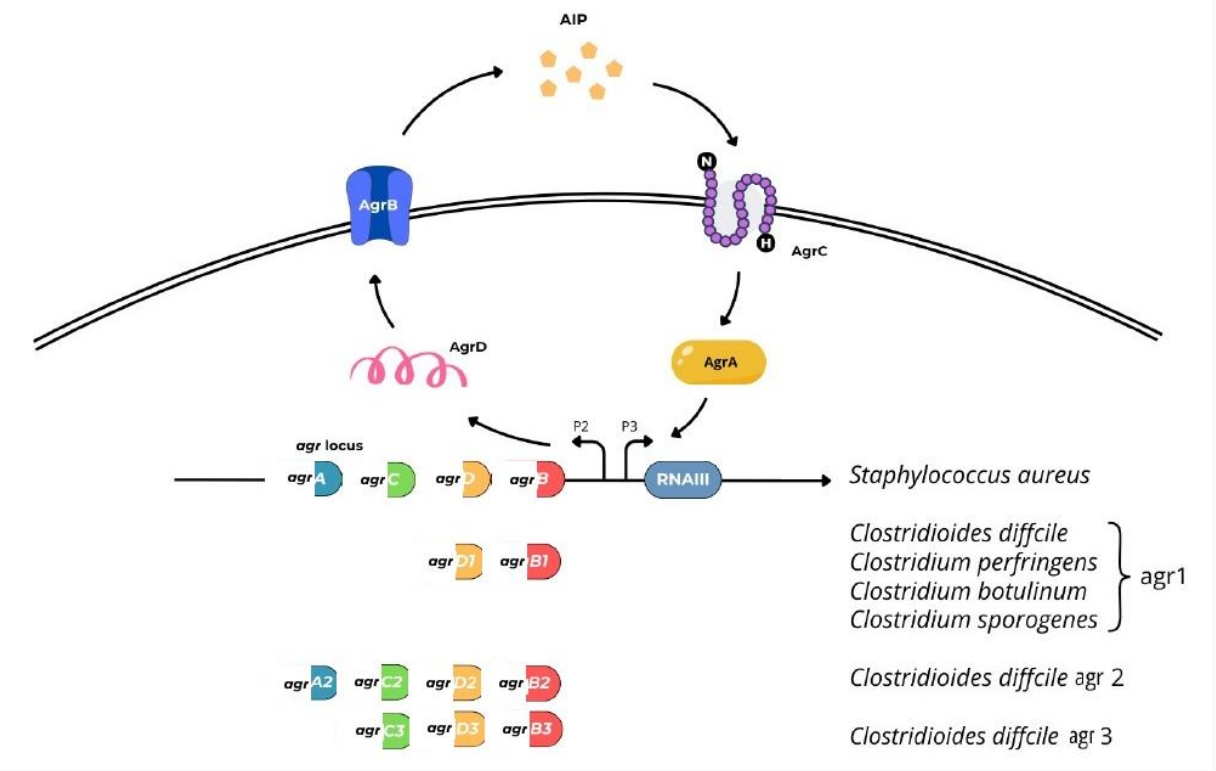
سیستم agr و پپتیدهای خود القاگر

ژن‌های رمزگذار پروتئین‌های این سیستم در ژن جانبی (*agr*) قرار دارند (۳). در جایگاه *agr* چهار ژن وجود دارد که عبارت‌اند از *agrB*، *agrD*، *agrC* و *agrA*.

ژن *agrA* تنظیم‌کننده‌ی نسخه‌برداری، ژن *agrB* پروتئین غشایی لازم برای ترشح اتوپپتید و *agrC* حسگر غشایی برای دریافت سیگنال خودالقاگر را رمزگذاری کرده و *agrD* نیز پیش‌ساز اتوپپتید را می‌سازد (۲۱). سیستم agr یک سیستم ارتباطی در باکتری‌های گرم‌مثبت به‌ویژه *استافیلوکوکوس اورئوس* است (۲۲). در *استافیلوکوکوس اورئوس*، پروپپتید خودالقاگر از ژن *agrD* تولید شده که سپس تغییرات لازم در ساختار این پروپپتید AgrD توسط پروتئین AgrB (۲۶ کیلودالتون) ایجاد می‌گردد. همچنین ژن‌های یک سیستم دو جزئی، به نام *agrAC*، در پایین دست *agrBD* قرار دارند. AgrC (۴۶ کیلودالتون) یک پروتئین حس‌گر برای پپتید AgrD است و هنگامی که غلظت این پروتئین خودالقاگر (AIP) به یک حد آستانه برسد، AgrC فعال می‌شود. AgrC فعال، موجب فعال‌سازی فاکتور تنظیم‌کننده‌ی پاسخ، یعنی AgrA هم‌خانواده‌ی خود می‌گردد. فعال‌سازی AgrA تنظیم رونویسی در باکتری را به‌دنبال دارد. جایگاه‌های مشابه *agr* در ژنوم سایر پاتوژن‌های کلستریدیایی از جمله *کلستریدیوم دیفیسیل*، *کلستریدیوم بوتولینوم* و *کلستریدیوم اسپوروژنز* وجود دارد. *کلستریدیوم دیفیسیل* و *کلستریدیوم اسپوروژنز* دارای چهار اپرون *agr* مانند است. درحالی‌که *کلستریدیوم بوتولینوم* دارای دو اپرون *agr* مانند است که ظاهراً یکی تولید اسپور و دیگری تولید نوروتوکسین بوتولینوم را کنترل می‌کند (۲۳). *کلستریدیوم پرفرینجنس* سویه‌ی ۱۳ دارای دو اپرون *agrBD* می‌باشد و هیچ سیستم دو جزئی (TCS) *agrC-agrA* در بالادست یا پایین‌دست *agrBD* در ژنوم *کلستریدیوم پرفرینجنس* سویه ۱۳ وجود ندارد (۲۴).

بررسی نقش سیستم agr در تولید توکسین در *کلستریدیوم پرفرینجنس* در مطالعه‌ای که توسط **Ohtani** و همکاران بر روی یک سویه‌ی جهش‌یافته *agrBD* به نام TS۲۳۰ انجام شد، ملاحظه گردید که کشت آن بر روی بلاد آگار همولیز ضعیفی را ایجاد نموده، اما وقتی این سویه با سویه‌ی جهش‌یافته‌ی VirSR همولیز منفی که سیگنال پپتید را تولید می‌کند، همزمان کشت داده‌شد، مجددا توانایی خود را برای ایجاد همولیز در محیط کشت بلاد آگار به‌دست آورده و در قسمت های تلاقی‌یافته بر روی محیط کشت همولیز مشاهده شد.. این تحقیق نشان داد که سویه‌ی TS۲۳۰ سیگنال لازم برای تحریک تولید توکسین θ (یا PFO) را از دست داده‌است، اما زمانی که سیگنال را از سویه‌ی دیگری دریافت کرد، توانست مجددا تولید توکسین را فعال کند (۲۵). مطالعات متعددی در این زمینه در دهه ۱۹۷۰ انجام گردید که به توانایی تولید توکسین‌ها توسط *کلستریدیوم پرفرینجنس* مربوط می‌شود. در این مطالعات، دو نوع سویه معرفی شدند: یکی با وجود دارا بودن ژن توکسین تتا، توکسین تولید نمی‌کرد و در کشت هم‌زمان نیز فعال نمی‌شد. سویه‌ی دوم، علی‌رغم نداشتن

توکسین، در حضور سایر سویه‌ها توانست توکسین تولید کند. با توجه به این یافته‌ها، این تصور به ذهن رسید که باید یک سیگنال برای تحریک تولید توکسین تتا در *کلستریدیوم پرفرینجنس* وجود داشته‌باشد. به‌نظر می‌رسد سیستم agr ارتباط تنگاتنگی با این پدیده دارد (۲۶). در مطالعه **Ohtani** در سال ۲۰۱۶ عنوان شد در سویه‌ی جهش‌یافته‌ی TS۲۳۰، رونویسی از ژن‌های *plc*، *colA*، و *pfoA* کاهش یافته اما با افزودن ژن *agrBD* مجددا رونویسی فعال شد. به‌عبارت دیگر سویه‌ی نوع وحشی یا سویه‌ی مکمل می‌تواند ژن‌های مسئول رونویسی توکسین را در سویه‌ی جهش‌یافته TS۲۳۰ تحریک کند. این داده‌ها نشان داد که ناحیه‌ی *agrBD* در باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* مسئول تولید یک سیگنال است. آزمایشی دیگر با استفاده از سویه‌ی جهش‌یافته‌ی دوگانه‌ی *agrBD-virSR* نشان داد که سویه‌ی وحشی ۱۳ *کلستریدیوم پرفرینجنس* نمی‌تواند بیان ژن تولید توکسین را تحریک کند. این نکته نشان می‌دهد اگرچه هیچ سیستم دو جزئی در اطراف ژن *agrBD* وجود ندارد ولی VirS به عنوان یکی از پروتئین‌های حس‌گر برای سیگنال پپتید وجود دارد (۲۴). در گزارش **Li** بیان شد *agrB* در سویه‌ی F۵۶۰۳ (سویه‌ی بیماریزای غیرگوارشی انسان) می‌تواند تولید انتروتوکسین و توکسین بتا ۲ را به‌طور مثبت تنظیم کند. مطالعه او نشان داد در این سویه‌ی جهش‌یافته میزان تولید توکسین آلفا و پرفرنگولیزین O در طول رشد رویشی کاهش یافت. نکته مهم دیگر این است که وقتی سویه در محیط اسپورزایی کشت داده‌شد، سویه‌ی جهش‌یافته نتوانست به‌طور مؤثری اسپور تشکیل دهد و مانع تولید انتروتوکسین نیز گردید. افزودن *agrB* تا حدی یا به‌طور کامل، تمام تغییرات فنوتیپی در سویه‌ی جهش‌یافته را معکوس کرد و تأیید کرد که توقف یا کاهش تولید توکسین به‌دلیل غیرفعال شدن جایگاه *agr* بود (۲۷). **Ma** و همکاران و **ویدال** و همکاران در مطالعاتشان نشان دادند که پپتید ۸ آمینواسیدی مشتق شده از پپتیدهای AgrD با نام R-۸ سبب افزایش تولید توکسین بتا می‌شود (۲۵, ۲۸). در مطالعه‌ی دیگری پس از بررسی اثر پپتیدهای سنتز شده‌ی پنج آمینواسیدی بر روی سویه‌های جهش‌یافته CN۱۷۹۵ تیپ B (*agrB* null mutants) یا CN۳۶۸۵ تیپ C که فاقد قدرت تولید پروتین‌های AgrD و AgrB می‌باشد (این پروتین‌ها تحت یک اوپران سنتز می‌شوند) مشاهده کردند که در هر دو سویه‌ی تحت اثر پپتید پنج آمینواسیدی حلقوی، سیگنالینگ به خوبی القا گردید درحالی که پپتیدهای شش اسید آمینه‌ای در بعضی از سویه‌ها قادر به ممانعت از تولید توکسین بودند (۲۸). همچنین توانایی حس سیگنال‌های پپتید خودالقاگر در سویه‌های مختلف باکتری، متفاوت است. ویدال در سال ۲۰۱۲ و **Ma** در سال ۲۰۱۵ گزارش نمودند که سویه CN۳۶۸۵ سیگنال‌های پپتید خود القاءگر سایر تیپ‌ها (تیپ‌های A، B، C و D) را به خوبی حس کرده، در حالی که CN۱۷۹۵ حتی پپتید خودالقاگرِ خود را به سختی حس کرد (۲۵, ۲۸). **Lyon** و همکاران نشان دادند که VirSR با AgrAC *استافیلوکوکوس اورئوس* مطابقت دارد. AgrAC رونویسی RNAIII را تنظیم می‌کند که در *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان یک عامل کلیدی سیستم agr است که بیان بسیاری از ژن‌ها را تنظیم می‌کند (۱۸). به‌نظر می‌رسد نحوه‌ی تنظیم بیان ژن توسط RNAIII با VR-RNA در *کلستریدیوم پرفرینجنس* شباهت دارد. البته تفاوت در نحوه‌ی قرارگیری آن در ژنوم مشاهده می‌شود. به‌طوری که در *استافیلوکوکوس اورئوس*، ژن‌های تنظیم‌کننده در ژنوم جمع شده‌اند، اما در *کلستریدیوم پرفرینجنس*، *virS/virR*، VR-RNA و *agrBD* در ژنوم پراکنده هستند. در *استافیلوکوکوس اورئوس* پپتید سیگنالی که بیان ژن را تحریک می‌کند توسط *agrD* تولید می‌شود. در *استافیلوکوکوس اورئوس* بسته به توالی‌های اسید آمینه AgrD در چهار گروه طبقه‌بندی می‌شود. در مقابل، چنین تنوع توالی اسید آمینه در AgrD *کلستریدیوم پرفرینجنس* وجود ندارد (۲۹). که در شکل ۱ نشان داده شده‌است.



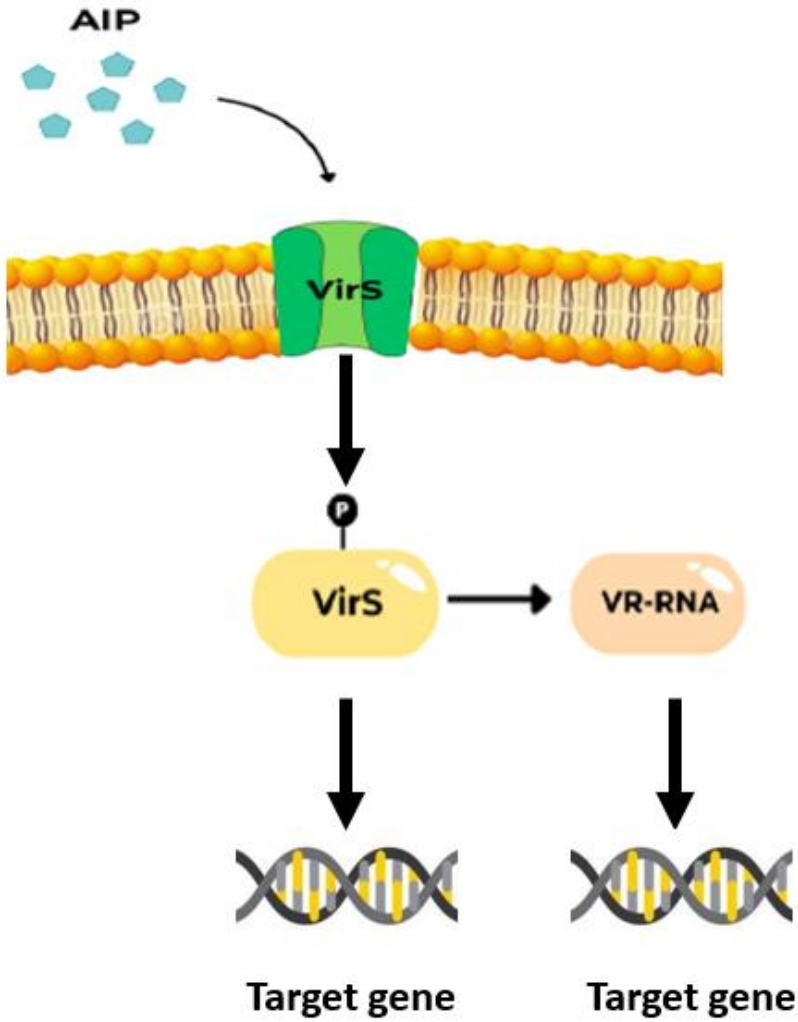
شکل ۱- ساختار ژنتیکی و سازماندهی سیستم سیگنالینگ Agr با واسطه پپتید خودالقاگر در *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کلستریدیوم دیفیسیل* و *کلستریدیوم* spp (۳۰)

همان‌طور که در بالا اشاره شد تولید توکسین‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* تحت کنترل سیستم Agr بسته به سویه‌های باکتری و منشاء سلولی، متفاوت عمل می‌کند. مثلا سلول Caco-۲که از روده‌ی بزرگ منشاء گرفته‌است و سلول MDCK از کلیه‌ی سگ نشأت گرفته‌است ممکن است، پاسخ متفاوت داشته باشند. (۶). مطالعه‌ی **Chen** نشان داد در سویه‌ی جهش یافته‌ی *کلستریدیوم پرفرینجنس* فاقد *agrB*، میزان تولید توکسین بتا کاهش یافته است. با بازگردانی ژن *agrB* در سویه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ B CN۱۷۹۳ و CN۱۷۹۵ تولید توکسین بتا مجددا فعال شد، اما جهش در ژن *agrB* تاثیری در تولید توکسین اپسیلون (ETX) و توکسین بتا ۲ (CPB۲) نداشت (۳۱). آزمایش‌ها بر روی سویه CN۳۶۸۵ تیپ C نیز نشان داد که تولید توکسین بتا توسط سیستم agr تنظیم شد. همچنین نشان داده‌شد که سیستم agr برای ایجاد آنتریت نکروزان توسط سویه‌ی (CN۳۶۸۵) *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ B مورد نیاز بود (۲۵). یافته‌های فوق نشان داد که سیستم agr می‌تواند تولید توکسین بتا را در هر دو سویه‌ی *کلستریدیوم پرفرینجنس* B و C تنظیم کند. در سویه CN۳۷۱۸ تیپ D نیز سیستم agr نقش مهمی در حدت سویه داشت. ولی تولید توکسین اپسیلون در سویه‌ی *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ B تحت تنظیم سیستم agr قرار نگرفت (۳۱). جالب توجه است سیگنالی که از *agrD* تولید می‌شود، سیگنالی برای VirS است. با این‌حال، در تنظیم تولید توکسین اپسیلون در سویه‌ی *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ D CN۳۷۱۸، تولید توکسین اپسیلون توسط سیستم agr تنظیم شد، نه توسط سیستم VirS/VirR. این اولین گزارشی بود که نشان می‌داد سیستم agr همیشه سیستم VirS/VirR را فعال نمی‌کند (۳۲).

سیستم دو جزیی VirS/Vir R

تولید بسیاری از توکسین‌ها که توسط *کلستریدیوم پرفرینجنس* در طول رشد رویشی انجام می‌شود، تا حدی توسط سیستم تنظیمی دو جزئی VirS/VirR کنترل می‌شود (۶، ۲۴). در این سیستم VirS یک هیستیدین کیناز و VirR تنظیم‌کننده‌ی

پاسخ است (۳۳). در سیستم دو جزئی پیام یا سیگنال، شرایط محیطی است. مطالعات پیشین در این باکتری نشان داده که ژن‌های توکسین آلفا (*plc*)، ژن پرفرینگولیزین O (*pfoA*) و کلاژناز، (*cola*) (۳۴)، NetB و توکسین بتا (*cpb*) توسط سیستم تنظیمی دو جزئی VirS/VirR (۳۵). در سطح رونویسی تنظیم می‌شود (۳۶). تحقیقات **Ba-Thein** و همکاران در سال ۱۹۹۶ نشان داد که این سیستم به‌طور مستقیم بیان *pfoA* را تنظیم کرد اما بیان ژن‌های توکسین‌های دیگر را مستقیماً تنظیم نکرده و به احتمال زیاد شبکه‌ی تنظیمی شامل تنظیم کننده‌های ثانویه در این امر دخیل هستند (۳۶). در حالی‌که مطالعات **Hassan** و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داد که ژن‌های *netB* و *pfoA* به صورت مستقیم تنظیم می‌شوند (۳۷). تحقیق **Mehdizadeh** و همکاران نشان داد که VirS که برای اتصال سیگنال پپتید حیاتی است، مشتق از AgrD است. (۸) .VirS/R توسط سیگنالی فعال می‌شود که عامل اتوفسفوریلاسیون VirS و به‌دنبال آن انتقال فسفات به VirR است (۳۸). VirR فسفریله شده مستقیماً بیان ژن *netB* و *pfoA* را تنظیم می‌کند. همچنین VirS/VirR به‌طور غیرمستقیم بیان ژن‌های *cpb* و *cpa* را با فعال‌کردن تولید یک RNA تنظیمی کوچک به نام .VR-RNA کنترل می‌کند. آبشار VirS/VirR-VR-RNA با تنظیم مثبت، پاتوژنز را کنترل می‌کند. همان‌طور که در بالا اشاره شد تنظیم بیان مستقیم توسط VirS/R انجام شده درحالی‌که در تنظیم غیرمستقیم توسط VR-RNA انجام می‌شود که در شکل ۲ نشان داده‌شد.



شکل ۲-- تنظیم بیان مستقیم و غیرمستقیم ژن توسط سیستم دوجزئی VirS/VirR (۳۰)

سیستم خود القاگر The Autoinducer (AI) System

سیستم خودالقاگر (autoinducer) یک سیستم رایج در باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی است (۳۹) که توسط ترکیباتی به نام خودالقاگرها (AIP :autoinducing peptide) صورت می‌گیرد (۴۰). خودالقاگرها در محیط به عنوان نمایشگر تراکم جمعیت باکتری‌ها افزایش می‌یابند و باکتری‌ها این اطلاعات را برای تغییر در بیان ژن‌ها، ردیابی می‌کنند. باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی از سیستم‌های سنجش حد نصاب متفاوتی استفاده می‌کنند (۴۱ ،۴۳). سیستم سنجش حد نصاب با واسطه‌ی پپتید حلقوی، اغلب در باکتری‌های گرم‌مثبت با GC پایین یافت می‌شود. هنگامی که غلظت خودالقاگرها در خارج سلول زیاد شود، به یک غشای گیرنده هیستیدین کیناز دو جزئی متصل می‌شوند (۴۴، ۴۵) معمولا اتصال به گیرنده‌ی کیناز را فعال نموده که سبب اتوفسفریله شدن و اتصال فسفات به تنظیم‌کننده‌ی پاسخ هم‌جنس (Cognate) و نهایتا رونویسی ژن‌ها در رگولون فعال می‌شود. گیرنده‌ی خودالقاگرها در باکتری‌های گرم‌مثبت در غشای سیتوپلاسمی آنهاست. در برخی موارد در باکتریایی گرم‌مثبت، خودالقاگرها به داخل سیتوپلاسم سلول منتقل شده که در آن‌جا برای تعدیل فعالیت با فاکتور رونویسی تعامل دارند. این امر به نوبه‌ی خود تغییرات در بیان ژن را تعدیل می‌کند (۴۰).

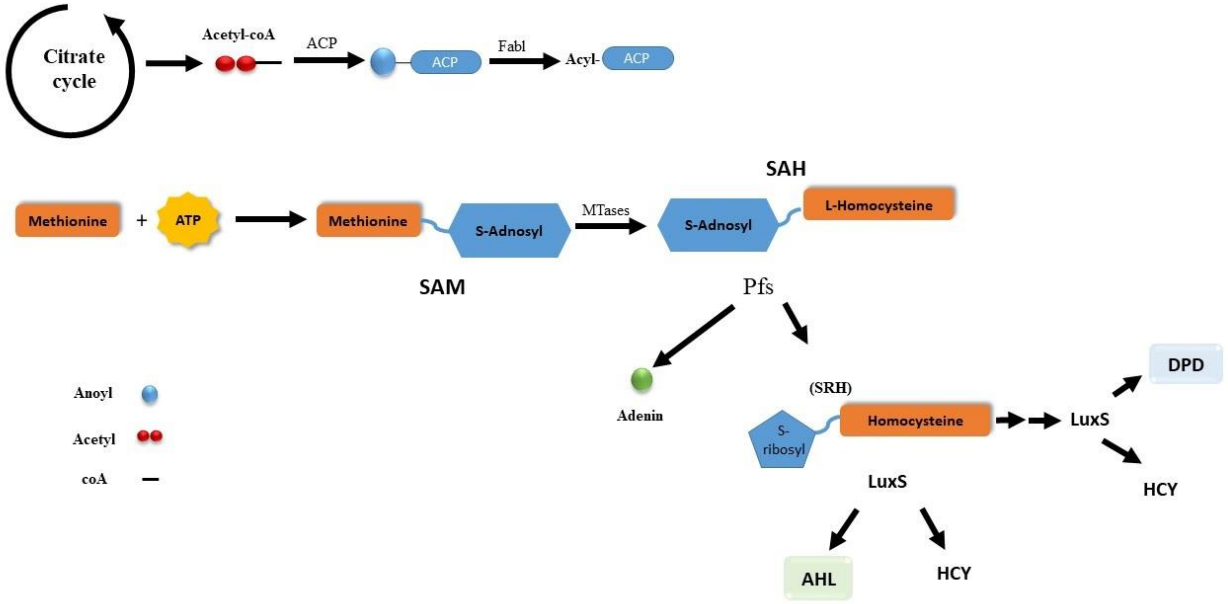
در باکتری‌های گرم‌منفی، مولکول سیگنال، آسیل هموسرین لاکتون (AHL) است (۴۶). آسیل هموسرین لاکتون منسوب به مولکول‌خودالقاگر نوع یک هستند. این باکتری‌ها دارای خودالقاءگرهایی از جنس غیر پپتیدی می‌باشند که دارای یک هسته آسیل هموسرین لاکتون بوده که یک زنجیره‌ی کربنی به آن متصل می‌شود (۳۰). این مولکول‌ها ممکن است دارای گروه‌های متفاوتی در زنجیره‌ی آسیلی خود باشند و همچنین طول زنجیره‌های آسیلی متفاوتی داشته باشند. بنابراین، مولکول-های سیگنال متفاوت آسیل هموسرین لاکتون متفاوتی وجود دارد، به عنوان مثال، oxododecanoyl-L-homoserine lactone یا hydroxydodecanoyl-L-homoserine lactone (۴۷). آسیل هموسرین لاکتون از S-ادنوزین متیونین (S-adenosyl-methionine (SAM) و پروتئین‌های حامل اسیدچرب و همولوگ‌های آن در سه مرحله‌ی آنزیمی ساخته می‌شود. SAMپیش‌سازی برای سنتز آسیل هموسرین لاکتون و خودالقاگر است (۴۸). خودالقاگرها ممکن است واسطه‌ی کلونیزاسیون باکتریایی مجرای روده باشند لذا ترکیب باکتری‌های روده را تغییر داده و پاسخ ایمنی میزبان را تغییر می‌دهند. این امر منجر به بیماری التهابی روده می‌شود (۳۰). آسیل هموسرین لاکتون در *سودوموناس ائروژینوزا* به خوبی مطالعه شده و اطلاعات زیادی برای آن در دسترس است. در این باکتری آسیل هموسرین لاکتون‌ها توسط پروتئینی به نام LasI (AHL سنتتاز) سنتز می‌شود. به دلیل تنوع آسیل هموسرین لاکتون‌ها توسط LuxR های متنوع شناسایی می‌شوند. LasR پروتئین گیرنده‌ی سیتوپلاسمی بوده که فعال‌کننده‌ی رونویسی است و بیان ژن‌های هدف را از طریق شناسایی توالی‌های DNA هدف به نام *lux* box تنظیم می‌کند. پروتئین LasR دارای دو حوزه است N-terminal autoinducer binding domain (LBD) که شناسایی AHLها را بر عهده دارد و C-terminal DNA binding domain (DBD) که عامل اتصال این پروتئین به DNA هدف است. بعد از اتصال آسیل هموسرین لاکتون به پروتئین LasR، پروتئین دایمریزه شده و رونویسی از ژن‌ها فعال می‌شود (۴۹).

سیستم خود القاگر ۲ یکی دیگر از سیستم‌های رایج در باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی است. تقریباً نیمی از باکتری‌هایی که توالی ژنوم آنها در پایگاه داده وجود دارد، دارای ژن *luxS* هستند (۵۰). LuxS (متالوآنزیم همودایمر کدگذاری شده توسط ژن *luxS*) سنتز کننده‌ی خود القاگر ۲ است. ساختار شیمیایی خود القاگر ۲ از مشتقات فورانوزیل بورات دی استر است که پیش ساز آن ۴-۵ دی هیدروکسی ۲-۳ پنتاندیون (DPD) می‌باشد.

مسیرهای بیوشیمیایی مربوط به تولید خودالقاگر ۲

DPD از SAM بوسیله *LuxS* سنتز می‌شود (۵۱). بنابراین SAM سوبسترایی برای سنتز آسیل هموسرین لاکتون و خودالقاگر ۲ است. به‌طور خلاصه، SAM که بستری برای انتقال متیل است، از بیوسنتز ال-متیونین و ATP تولید می‌شود. این واکنش توسط متیونین آدنوزیل ترانسفراز (MAT) صورت می‌گیرد که محصول ژن *metK* می‌باشد.. SAM از طریق از دست دادن گروه

متیل با واسطه متیل ترانسفرازها (MTases) به S-adenosyl- L-homocysteine (SAH) تبدیل می‌شود. SAH دو مسیر را طی می‌نمایند: یا (a) فرآیند تک مرحله‌ای به هموسیستئین (HCY)، توسط SAH-هیدرولاز یا (b) با فرآیند دو مرحله‌ای. فرآیندی که توسط آنزیم‌های Pfs و LuxS کاتالیز می‌شود. نوکلئوزیداز Pfs به‌طور غیرقابل برگشتی SAH را به آدنین و SRH می‌شکند. LuxS، SRH را به DPD و HCY تبدیل می‌کند. DPD دست‌خوش تغییرات بیشتری برای تشکیل مولکول فعال خودالقاگر ۲ می‌شود (۵۲). تصویر ۳ مراحل تولید AHL و DPD را نشان داده که توسط آنزیم‌های مختلف کاتالیز می‌شود. خودالقاگر ۲ در باکتری‌های گرم‌منفی به یک پروتئین متصل‌شونده پری‌پلاسمیک (LuxP) متصل شده سپس به یک کیناز (LuxQ) متصل می‌شود. در نهایت یک آبشار دی هیدروفسفریلاسیون را با تبدیل کیناز به فسفاتاز به راه می‌اندازد و نهایتاً بیان ژن هدف را تنظیم می‌کند (۵۳).



شکل ۳- نحوه تولید آسیل هموسرین لاکتون و ۴-۵ دی هیدروکسی ۲-۳ پنتااندیون

بررسی نقش سیستم خودالقاگر در تولید توکسین در *کلستریدیوم پرفرینجنس*

در *کلستریدیوم پرفرینجنس*، سیستم خودالقاگر ۲ (AL۲) در فاز میانی رشد لگاریتمی، بیان ژن‌های مرتبط با تولید توکسین را افزایش می‌دهد. luxS رونویسی *pfoA* و تولید توکسین تتا را فعال می‌کند و احتمالاً بر تنظیم پس از رونویسی توکسین‌های آلفا و کاپا تأثیر می‌گذارد (۲۴). در تحقیقی سوپرناتانت کشت سویه‌ی ۱۳ *کلستریدیوم پرفرینجنس* باعث تحریک لومینسانس سویه‌ی *V.harveyi* BB۱۷۰i ، شد، اما در سویه‌ی جهش‌یافته‌ی ۱۳ *کلستریدیوم پرفرینجنس*، LuxS نتوانست لومینسانس را تحریک کند (۲۲). این نتایج نشان‌داد که ژن *luxS* مسئول تولید سیگنالی است که لومینسانس *V.harveyi* وابسته به خودالقاگر ۲ را تحریک می‌کند. جهش *luxS* در سطح رونویسی *pfoA* را می‌توان با افزودن سوپرناتانت باکتری وحشی یا *اشرشیا کلی*DH۵α حامل ژن *luxS* *کلستریدیوم پرفرینجنس* مجدداً فعال کرد.

نقش خودالقاءگر ۲ در *کلستریدیوم پرفرینجنس*

نتایج مطالعه‌ی پیشین نشان‌داد که ژن *luxS* برای تولید خودالقاگر۲ در *کلستریدیوم پرفرینجنس* ضروری است (۱۷).

خودالقاگر۲ ممکن است عامل مهمی برای حفظ تعادل فلور طبیعی و باکتری‌های بیماری‌زا باشد. علاوه‌بر این، از آن‌جا که گزارش شده‌است که خودالقاگر۲ بسیاری از فاکتورهای ویرولانس را تنظیم می‌کند، لذا luxS می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی در بیماری‌های عفونی در نظر گرفته‌شود (۵۴).

خود خاموش‌سازی سنجش حد نصاب (sQQ) (self-quorum quenching)

به مکانیســـم‌هایی که باعث توقف ارتباطات بین‌سلولی در باکتری‌ها می‌شود، خود خاموش‌سازی سنجش حد نصاب اطلاق می شـــود. ترکیباتی که مهارکننده‌ی سنجش حد نصاب می‌باشند را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد؛ مهارکننده‌های طبیعی و مهارکننده‌های سنتتیک. در *کلستریدیوم پرفرینجنس* بعضی از مواد تولیدشده در حین رشد باکتری نظیر اسیدها باعث خودخاموش‌سازی می‌شوند. **Adachi** و همکاران در مطالعه‌ای متوجه شدند که بیان ژن *pfoA* تا اواخر فاز رشد late-log (growth phase) افزایش یافت ولی بیان آن پس از زمانی خاموش گردید، که نشان‌دهنده‌ی وجود یک سیستم خود خاموش‌سازی حد نصاب است. همچنین سوپرناتانت در کشت فاز ثابت، بیان ژن‌هایی که توسط سیستم دوجزئی VirSR تنظیم می‌شوند را سرکوب کرد. سیستم خود خاموش‌سازی نسبت به حرارت پایدار بوده و پس از فیلتراسیون از طریق غشای اولترا فیلتراسیون نیز این فعالیت همچنان وجود داشت، که نشان می‌دهد مولکول‌های کوچک به عنوان عوامل خود خاموش‌سازی عمل می‌کنند. علاوه بر این، خود خاموش‌سازی توسط اسید استیک و اسید بوتیریک خالص در کشت فاز ثابت، القا شد؛ که نشان داد اسیدهای آلی تولید شده توسط *کلستریدیوم پرفرینجنس* در خود خاموش‌سازی نقش دارند. از سوی دیگر در کشت با pH کنترل‌شده، خود خاموش‌سازی تا حد زیادی کاهش یافت. به‌طور کلی، بیان ژن‌های عوامل حدت *کلستریدیوم پرفرینجنس* در سیستم خود خاموش‌سازی توسط متابولیت‌های اسیدی کاهش می‌یابد. این امکان وجود استراتژی ضد ویرولانس با کنترل pH را نشان می‌دهد (۱۶). درصنعت از مهار فرآیند سنجش حد نصاب به عنوان اهداف درمانی استفاده می‌شود.

بحث

به جهت بقا و دوام در محیط‌های مختلفی همچون خاک، آب، مدفوع، روده و ماهیچه، سیستم‌های تنظیم‌کننده‌ی پیچیده‌ای برای تنظیم بیان ژن‌های توکسین‌زا در *کلستریدیوم پرفرینجنس* وجود دارد. این باکتری حداقل دو سیستم سنجش حد نصاب دارد (۱۷). اولین سیستم سنجش حد نصاب تا حدی شبیه سیستم Agr *استافیلوکوکوس اورئوس* است، که *agr* به عنوان یک اپرون متشکل از چهار ژن کدکننده‌ی پروتئین‌های AgrA، B، C و D می‌باشد (۵۵). تحقیقات **Vidal**و همکاران نشان داد که اپرون *agr* در سویه‌ی ۱۳ *کلستریدیوم پرفرینجنس* جهش‌یافته تولید توکسین آلفا را کاهش داد. با افزودن سوپرناتانت سویه‌ی وحشی تولید توکسین مجدداً فعال شد (۳۳، ۵۶)، بنابراین به‌نظر می‌رسد تنظیم بیان این ژن تحت کنترل سیستم Agr قرار دارد. از سوی دیگر ژن رمزگذاری شده انتروتوکسین نیز تحت کنترل همین سیستم قرار داشته و در مرحله‌ی اسپورزایی تنظیم می‌شود (۲۷). در تحقیقات **Ohtani** و همکاران، بر روی توکسین‌های فرعی کاپا و تتا مشخص شد که تولید آن‌ها نیز تحت کنترل سیستم Agr قرار داشته و با افزودن سوپرناتانت سویه‌ی وحشی تولید توکسین مجدداً فعال شد (۳۳). توکسین بتا ۲ نیز توسط این ژن بیان شده و میزان آن تحت کنترل این ژن افزایش می‌یابد (۲۷). در حالی‌که در مطالعه **Chen** و همکاران در سویه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ B ۱۷۹۳CN و CN۱۷۹۵ جهش‌یافته در ژن *agrB* تغییری در تولید توکسین بتا ۲ مشاهده نشد (۳۱) که به‌نظر می‌رسد تفاوت پاسخ به‌علت سویه‌های متفاوت باشد. برای توکسین بتا بیان ژن در کنترل این سیستم بوده و با حذف آن میزان تولید توکسین کاهش یافت (۲۸، ۳۱). **Chen** در سال ۲۰۱۱ گزارش‌کرد که تولید توکسین اپسیلون در *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ D تحت کنترل همین سیستم بود (۳۲). اگرچه در تحقیقات بعدی بر روی همین

سویه مشخص شد که سیستم Agr بر روی بیان ژن تولید توکسین اپسیلون نقشی ندارد (۵۷) که مطالعه **Chen** را زیر سوال می‌برد.

دومین سیستم سنجش حد نصاب در *کلستریدیوم پرفرینجنس* با واسطه *luxS* می باشدکه بیان توکسین‌ها را از طریق رونویسی و پس از رونویسی کنترل می‌کند. سیستم *luxS* رونویسی ژن توکسین تتا (*pfoA*) را افزایش داده و یک اثر تحریکی جزئی بر رونویسی ژن‌های توکسین آلفا (*plc*) و توکسین کاپا (*colA*) دارد. (۱۷، ۵۸).

همان‌طور که اشاره‌شد تولید توکسین‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* تحت کنترل سیستم سنجش حد نصاب نظیر agr در سویه‌های مختلف باکتری، متفاوت است. مطالعه **Vidal** در سال ۲۰۰۹ که بر روی *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ D انجام شد افزایش قابل توجهی در بیان ژن *etx* و تولید توکسین اپسیلون نشان داد، اما بیان ژن *cpa* و افزایش تولید توکسین آلفا مشاهده نشد. درحالی‌که در *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ C CN۳۶۸۵ باعث افزایش قابل توجهی در بیان ژن *cpa* و تولید توکسین آلفا ملاحظه گردید (۵۹).

اگرچه بسیاری از سیستم‌های تنظیمی ژن‌های توکسین‌زا در باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* شناسایی شده‌اند، اما در مقایسه با سایر عوامل بیماری‌زا هنوز دانش محدودی در مورد نحوه‌ی تنظیم بیان ژن‌های توکسین‌زای این باکتری در اختیار داریم. در سایر کلستریدیاهای بیماری‌زا به عنوان مثال، *کلستریدیوم دیفیسیل* و *کلستریدیوم بوتولینوم* گزارش شده‌است که اسیدهای آمینه خاصی در سرکوب تولید توکسین نقش ایفا می‌کنند و اهمیت وجود فاکتورهای سیگمای جایگزین برای تنظیم تولید توکسین نیز گزارش شده‌است (۶۰). تولید توکسین‌ها توسط متابولیت‌ها یا عوامل سیگما جایگزین در *کلستریدیوم پرفرینجنس* در مقایسه با *کلستریدیوم دیفیسیل* کمتر مورد مطالعه قرارگرفته است. مطالعات تنظیم بیان ژن در این باکتری به درک بهتر بیماری‌زایی آن کمک می‌کند. ضمناً می‌تواند در اتخاذ تصمیمات بهتر جهت پیشگیری و درمان بیماری‌های ناشی از *کلستریدیوم پرفرینجنس* نیز راه‌گشا باشد. لذا تحقیقات گسترده‌تر در مورد مکانیسم‌های تنظیمی ویرولانس *کلستریدیوم پرفرینجنس* بسیار مورد نیاز است.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی به‌نظر می‌رسد تنظیم بیان ژن‌های توکسین‌زا در *کلستریدیوم پرفرینجنس* نتیجه‌ی تعامل چندین مسیر سیگنال‌دهی از جمله سیستم‌های Lux و Agr باشد. این تعاملات نه تنها در درک بیماریزایی این باکتری نقش کلیدی دارند، بلکه می‌توانند مبنایی برای طراحی استرتژی‌های نوین ضد ویروسی و واکسن‌سازی مبتنی بر اختلال در سیستم‌های سنجش حد نصاب فراهم آورند. از سوی دیگر با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی که امروزه یکی از مهم‌ترین دغدغه‌ها در درمان شده است شاید بتوان نسل جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌ها را به‌خصوص در موارد حساسیت دارویی در آینده متصور شد که بر مبنای مهار سیستم سنجش حد نصاب طراحی شده‌باشند. همچنین شاید بتوان از این مهارکننده‌ها به‌صورت مکمل با دیگر داروها استفاده کرد تا پاسخ مناسب‌تری به درمان داده‌شود.

منابع

1.**Salvarani FM, Vieira EV.** Clostridial Infections in Cattle: A Comprehensive Review with Emphasis on Current Data Gaps in Brazil. *Animals.* 2024;14(20):2919.

2.**Darkoh C, Asiedu GA**. Quorum sensing systems in clostridia. In: Kalia, V. (eds)
Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight: Springer. 2014؛ 133-54.

3.**Uzal FA, Freedman JC, Shrestha A, Theoret JR, Garcia J, Awad MM, *et al*.** Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol*. 2014;9(3):361-77.

4.**McClane BA, Uzal FA., Fernandez-Miyakawa M., Lyerly D., Wilkins T D.** The enterotoxigenic clostridia: The prokaryotes.; 2004. 698–752 p.
5.**Rood JI, Adams V, Lacey J, Lyras D, McClane BA, Melville SB, *et al*.** Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*. 2018;53:5-10.

6.**Chen J, Ma M, Uzal FA, McClane BA.** Host cell-induced signaling causes *Clostridium perfringens* to upregulate production of toxins important for intestinal infections. *Gut Microbes*. 2014;5(1):96-107.
7.**Abdolmohammadi Khiav L, Zahmatkesh A.** Vaccination against pathogenic clostridia in animals: A review. *Trop Anim Health Prod*. 2021;53(2):284.
8.**Mehdizadeh Gohari I, A. Navarro M, Li J, Shrestha A, Uzal F, A. McClane BJV.** Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. perfringens. *Virulence*. 2021;12(1):723-53.
9.**McDonel JL.** Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D, and E. *Pharmacol Ther.* Pergamon Press, Oxford; United Kingdom. 1986.

10.**Abdolmohammadi Khiav L, Emadi A, Zahmatkesh A.** A simple method for purification of epsilon toxin of *Clostridium perfringens* type D for serum neutralization assay. *J. Microbiol. Methods.* 2022;193:106395.
11.**Asadi A, Abdolmohammadi Khiav L, Emadi A, Dadar M.** Evaluation of humoral immune responses against *C. perfringens* epsilon toxin in Iranian sheep and goats after vaccination. *VAS*. 2023;21:100305[In Persian].
12.**Abdolmohammadi Khiav L, Paradise A.** Molecular and toxigenic characteristics of *Clostridium perfringens* type B isolates from sheep and lamb. *J Vet Res*. 2021.
13.**Uzal FA, Vidal J, McClane BA, Gurjar AA.** *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases. *Open Toxinology*. 2010;2:24.
14.**Nealson KH, Platt T, Hastings JW.** Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol*. 1970;104(1):313-22.

15.**Irie Y, Parsek MR.** Quorum sensing and microbial biofilms. In: Romeo, T. (eds) Bacterial Biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology, Springer, Berlin, Heidelberg. 2008; 322. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_4
16.**Adachi K, Ohtani K, Kawano M, Singh RP, Yousuf B, Sonomoto K, *et al*.** Metabolic dependent and independent pH-drop shuts down VirSR quorum sensing in *Clostridium perfringens*. *J Biosci Bioeng*. 2018;125(5):525-31.
17.**Ohtani K, Hayashi H, Shimizu T.** The luxS gene is involved in cell–cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*. *Mol Microbiol*. 44(1), 2002;44(1):171-9.
18.**Lyon GJ, Novick RP.** Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides.* 2004;25(9):1389-403.
19.**Bassler BL.** How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol*. 1999;2(6):582-7.
20.**Ohtani K, Shimizu T.** Regulation of toxin production in *Clostridium perfringens*. *Toxins*. 2016;8(7):207.
21.**Wuster A, Babu MM.** Conservation and evolutionary dynamics of the agr cell-to-cell communication system across firmicutes. *J Bacteriol*. 2008;190(2):743-6.
22.**Novick RP, Muir TW.** Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol*. 1999;2(1):40-5.
23.**Cooksley CM, Davis IJ, Winzer K, Chan WC, Peck MW, Minton NP, *et al*.** Regulation of neurotoxin production and sporulation by a putative agrBD signaling system in proteolytic *Clostridium botulinum*. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(13):4448-60.
24.**Ohtani K.** Gene regulation by the VirS/VirR system in *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*. 41, 2016;41:5-9.
25.**Vidal JE, Ma M, Saputo J, Garcia J, Uzal FA, McClane BA.** Evidence that the Agr-like quorum sensing system regulates the toxin production, cytotoxicity and pathogenicity of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. *Mol Microbiol.* 2012;83(1):179-94.

26.**Imagawa T, Higashi Y**. An activity which restores theta toxin activity in some theta toxin-deficient mutants of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Immunol*. 1992;36(5):523-7.

27.**Li J, Chen J, Vidal JE, McClane BA**. The Agr-like quorum-sensing system regulates sporulation and production of enterotoxin and beta2 toxin by *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease strain F5603. *Infect Immun*. 2011;79(6):2451-9.
28.**Ma M, Li J, McClane BA.** Structure-function analysis of peptide signaling in the *Clostridium perfringens* Agr-like quorum sensing system. *J Bacteriol*. 2015;197(10):1807-18.
29.**Novick RP.** Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol*. 2003;48(6):1429-49.
30.**Markowska K, Szymanek-Majchrzak K, Pituch H, Majewska A.** Understanding quorum-sensing and biofilm forming in anaerobic bacterial communities. *Int J Mol Sci*. 2024;25(23):12808.
31.**Chen J, McClane BA.** Role of the Agr-like quorum-sensing system in regulating toxin production by *Clostridium perfringens* type B strains CN1793 and CN1795. *Infect Immun*. 2012;80(9):3008-17.
32.**Chen J, Rood JI, McClane BA.** Epsilon-toxin production by *Clostridium perfringens* type D strain CN3718 is dependent upon the agr operon but not the VirS/VirR two-component regulatory system. *mBio*. 2011;2(6): e00275-11. doi:10.1128/mbio. 00275-11.
33.**Ohtani K, Yuan Y, Hassan S, Wang R, Wang Y, Shimizu T.** Virulence gene regulation by the agr system in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol*. 2009;191(12):3919-27.
34.**Lyristis M, Bryant AE, Sloan J, Awad MM, Nisbet IT, Stevens DL, *et al*.** Identification and molecular analysis of a locus that regulates extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. *Mol Microbiol*. 1994;12(5):761-77.
35.**Yu Q, Lepp D, Mehdizadeh Gohari I, Wu T, Zhou H, Yin X, *et al*.** The Agr-like quorum sensing system is required for pathogenesis of necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* in poultry. *Infect Immun*. 2017;85(6):10.1128/iai. 00975-16.
36.**Ba-Thein W, Lyristis M, Ohtani K, Nisbet IT, Hayashi H, Rood JI, *et al*.** The virR/virS locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*. 1996;178(9):2514-20.
37.**Hassan S, Ohtani K, Wang R, Yuan Y, Wang Y, Yamaguchi Y, *et al*.** Transcriptional regulation of hemO encoding heme oxygenase in *Clostridium perfringens*. *J Microbiol*. 2010;48:96-101.
38.**Kawsar HI, Ohtani K, Okumura K, Hayashi H, Shimizu T.** Organization and transcriptional regulation of myo-inositol operon in *Clostridium perfringens*. perfringens. *FEMS Microbiol. Lett*. 2004;235(2):289-95.
39.**Xavier KB, Bassler BL.** LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr. Opin. Microbiol*. 2003;6(2):191-7.
40.**Rutherford ST, Bassler BL.** Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(11):a012427.
41.**Ng W-L, Perez L, Cong J, Semmelhack MF, Bassler BL.** Broad spectrum pro-quorum-sensing molecules as inhibitors of virulence in vibrios. *PLoS Pathog*. 2012;8(6):e1002767.
42.**Novick R, Projan S, Kornblum J, Ross H, Ji G, Kreiswirth B, *et al*.** The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet*. 1995;248:446-58.

43.**Williams P, Cámara M.** Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. Curr Opin Microbiol 2009;12(2):182-91.
44.**Håvarstein LS, Coomaraswamy G, Morrison DA.** An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92(24):11140-4.
45.**Solomon JM, Lazazzera BA, Grossman AD.** Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev*. 1996;10(16):2014-24.
46.**Grech A, Balzan M.** Quorum sensing. The synapse. 2019;18(2): 11-3.
47.**Pietschke C, Treitz C, Forêt S, Schultze A, Künzel S, Tholey A, *et al*.** Host modification of a bacterial quorum-sensing signal induces a phenotypic switch in bacterial symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(40):E8488-E97.

48.**Schauder S, Shokat K, Surette MG, Bassler BL.** The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol*. 2001;41(2):463-76.
49.**Bottomley MJ, Muraglia E, Bazzo R, Carfi A.** Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. *J Biol Chem*. 2007;282(18):13592-600.

50.**Federle MJ.** Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: complexities of interspecies signaling. *Contrib. Microbiol*. 2009;16:18.
51.**Slater RT, Frost LR, Jossi SE, Millard AD, Unnikrishnan M.** *Clostridioides difficile* LuxS mediates inter-bacterial interactions within biofilms. *Sci Rep*. 2019;9(1):9903.
52.**Zhang J, Zheng YG.** SAM/SAH analogs as versatile tools for SAM-dependent methyltransferases. *ACS Chem Biol*. 2016;11(3):583-97.
53.**Raffa RB, Iannuzzo JR, Levine DR, Saeid KK, Schwartz RC, Sucic NT, *et al*.** Bacterial communication ("quorum sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312(2):417-23.

54.**Belizário JE, Napolitano M.** Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Front. Microbiol*. 2015;6:151578.
55.**Novick RP, Geisinger E.** Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet*. 2008;42(1):541-64.
56.**Vidal JE, Chen J, Li J, McClane BA.** Use of an EZ-Tn 5-based random mutagenesis system to identify a novel toxin regulatory locus in *Clostridium perfringens* strain 13. *PLoS One.* 2009;4(7):e6232.
57.**Mehdizadeh Gohari I, Li J, Rood JI, McClane BA.** Reevaluation of whether a functional Agr-like quorum-sensing system is necessary for production of wild-type levels of epsilon-toxin by *Clostridium perfringens* type D strains. *mBio*. 2022;13(2):e00496-22.
58.**Petit L, Gibert M, Popoff MR.** *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol*. 1999;7(3):104-10.
59. **Vidal JE, Ohtani K, Shimizu T, McClane BA.** Contact with enterocyte-like Caco-2 cells induces rapid upregulation of toxin production by *Clostridium perfringens* type C isolates. *Cell Microbiol*. 2009;11: 1306-1328. https//doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01332.x
60.**Bouillaut L, Dubois T, Sonenshein AL, Dupuy B.** Integration of metabolism and virulence in *Clostridium difficile*. *Res. Microbiol*. 2015;166(4):375-83.

The role of quorum sensing in *Clostridium perfringens* toxinogenesis

Sima Azadmanesh[1]; Lida Abdolmohammadi Khiav[* 2]; Ramin Bagheri Nejad[3]; Behjat Mjdidi

1. Graduated from Ph.D. Plant Bacteriology, Anaerobic Bacterial Vaccine Research and Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2. Graduated from Ph.D. Bacteriology, Anaerobic Bacterial Vaccine Research and Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3. Graduated from Ph.D. Bacteriology, Anaerobic Bacterial Vaccine Research and Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4. Graduated from Ph.D. Biochemistry, Anaerobic Bacterial Vaccine Research and Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Mashhad Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran

* **Corresponding author**: Graduated from Ph.D. Bacteriology- Address: Shahid Beheshti Blvd, Hesarak, Karaj, Alborz, IRAN. 3197619751 P.O.Box: 31975/148 – Tel: +98 2634050400 – Fax: +98 2634552194 – Email: L.mohammadi@rvsri.ac.ir

Abstract:

Clostridium perfringens is a gram-positive anaerobic spore-forming bacterium which is widely spread in nature. The bacterial pathogen is able to secret protein toxins and enzymes which contribute to its pathogenicity. The regulation of gene expression of these toxins is controlled by a network that establishes cell-cell communication. In order to produce toxins, bacterial cells communicate through producing and recognizing extracellular signals, particularly specific small signaling molecules known as autoinducers. These quorum sensing signals are crucial for toxin production and virulence. This system also plays a role in the processes of sporulation and biofilm formation in this bacterium, which indicates the important role of this system. Considering the importance of toxin production in *C. perfringens*, vaccine strains and the limited studies that have been conducted so far. In this manuscript, the important role of the quorum sensing systems in the production and secretion of toxins in *C. perfringens* is investigated based on review of current studies. Finally, the results of the researches indicate that quorum sensing regulatory systems, including Agr and VirS/VirR two-component system, play an important role in regulating of the virulence genes expression in *C. perfringens*. Also, the role of autoinducer molecules in regulating of

virulence genes and maintaining the balance of the intestinal microbiome will pave the way for the development of novel therapeutic targets to combat this pathogen. Overally, the regulation of gene expression in *C. perfringens* is complex and some toxin-producing genes cannot be considered as a completely separate system.

Keywords: Autoinducing peptide, Toxin production, Quarum sensing, *Clostridium perfringen*