



The Immune-modulator Activity of *Pseudomonas aeruginosa* Extracted Protein: Azurin Charming Protein

Lina A. HASSAN¹, Mayyada F. DARWEESH¹ & Thualfakar Hayder HASAN²

¹ College of Science, University of Kufa, Al-Najaf, Iraq

² University of Alkafeel, Iraq

SUMMARY. Vaccines regarded as one of the most successful medical interventions to date, some microorganisms are capable to acting as immunomodulation agents one of them *Pseudomonas aeruginosa* produce secondary metabolite. Azurin a bacterial protein has antimicrobial and immunomodulatory activity, therefore this study aim to detect the ability of Azurin as immunomodulatory agents to modulate innate and adaptive cellular immunity. *P. aeruginosa* isolated from burn ,urinary tract infection patients, identify dependent on morphology and biochemical test then the presence of azu gene is confirmed by PCR amplification, extraction and purification of Azurin by ultra-filtration and detection protein by SDS- BAGE. The results revealed that out of 100 clinical sample only 28 isolates were *P. aeruginosa* and all isolate have azu gene with amplicon product 476 bp. On a 15% SDS-PAGE, the isolated protein was identified as a 14 kD band. Azurin's median inhibitory concentration IC50 was determined using the MTT technique, the result was 200.83 µg/mL against lymphocytes. Determination the immunomodulatory activity of Azurin by evaluated CD4 and CD56 gene expression using RT-PCR technique in peripheral blood lymphocyte cells PBICs that treated as four groups: un treated (control), treated with Azurin 200 µg/mL, treated with Chitosan 0.5 µg/mL, finally treated with combination Azurin and Chitosan 200+0.5 µg/mL groups. The results observed that Azurin recorded high significance increased in CD4 expression in comparison to untreated lymphocytes, while the results of CD56 revealed that Chitosan was increased then Azurin as well as downregulation in expression of combination group for CD4 and CD56.

RESUMEN. Las vacunas son consideradas como una de las intervenciones médicas más exitosas hasta la fecha; algunos microorganismos son capaces de actuar como agentes inmunomoduladores, uno de ellos *Pseudomonas aeruginosa* produce metabolitos secundarios. Azurin, una proteína bacteriana tiene actividad antimicrobiana e inmunomoduladora, por lo tanto, este estudio tiene como objetivo detectar la capacidad de Azurin como agentes inmunomoduladores para modular la inmunidad celular innata y adaptativa. *P. aeruginosa* aislada de pacientes con quemaduras e infección del tracto urinario, se identifica según la morfología y la prueba bioquímica y luego se confirma la presencia del gen azu mediante amplificación por PCR, extracción y purificación de Azurin mediante ultrafiltración y proteína de detección por SDS-BAGE. Los resultados revelaron que de 100 muestras clínicas, solo 28 aislados eran *P. aeruginosa* y todos los aislados tenían el gen azu con un producto de amplicón de 476 pb. En una SDS-PAGE al 15 %, la proteína aislada se identificó como una banda de 14 kD. La concentración inhibidora mediana de Azurin IC50 se determinó mediante la técnica MTT, el resultado fue de 200,83 µg/mL frente a los linfocitos. Determinación de la actividad inmunomoduladora de Azurin mediante la expresión génica de CD4 y CD56 evaluada utilizando la técnica de RT-PCR en células de linfocitos de sangre periférica PBICs que se trataron en cuatro grupos: no tratadas (control), tratadas con Azurin 200 µg/mL, tratadas con Chitosan 0,5 µg/ mL, finalmente tratados con grupos combinados Azurin y Chitosan 200+0,5 µg/mL. Los resultados observaron que Azurin registró un aumento significativo en la expresión de CD4 en comparación con los linfocitos no tratados, mientras que los resultados de CD56 revelaron que el quitosano aumentó luego de Azurin, así como una regulación negativa en la expresión del grupo combinado para CD4 y CD56.

KEY WORDS: azurin, chitosan, CD4, CD56 expression, *Pseudomonas aeruginosa*.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: thualfakar@alkafeel.edu.iq