

پروتئین های بارتونلا باسیلی فورمیس: کاندیدهای برای تهیه و توسعه واکسن

● اسماعیل نوری زاده

کاردان علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی
اردبیل، شبکه بهداشت و درمان شهرستان
مشکین شهر

esmailnourizadeh@gmail.com



● رضا بهلولی خیایوی

کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه
علوم پزشکی اردبیل، شبکه بهداشت و درمان
شهرستان مشکین شهر

meshkinlab@yahoo.com



چکیده

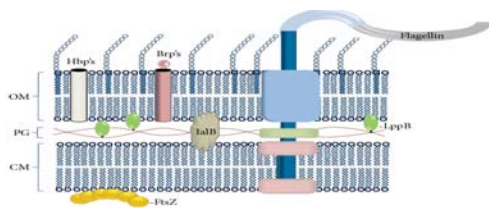
بارتونلا باسیلی فورمیس عامل اتیولوژیک بیماری
کاریون یا تب اورویا می باشد. در عفونت با این باکتری
یک مدل جالب از اختصاصی بودن میزبان انسانی نشان
داده می شود. تفاوت های قابل ملاحظه در یافته های
بالینی بیماری کاریون، سازگاری پیچیده این باکتری با
میزبان انسانی را ناشی از پایداری بیش از حد آن، باقی
ماندن به صورت مخزن برای انتقال از طریق ناقلین و فرار
از سیستم ایمنی می دانند. این رویدادها مکانیزم های
بیوشیمیایی و ژنتیکی را در بر می گیرد که هم در سلول
میزبان و هم در سلول باکتریایی وجود دارند. در این مطالعه
مروزی، بر پروتئین هایی که در کنش و واکنش بین
Bartonella bacilliformis و سلول میزبان دخالت
دارند تمرکز شده است. تعدادی از این پروتئین ها می توانند
به عنوان کاندیدهایی برای تهیه و توسعه واکسن مورد
استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: بارتونلا باسیلی فورمیس، تب اورویا،
بیماری کاریون، کاندیدهای تولید واکسن

۱- مقدمه

بارتونلا باسیلی فورمیس عضوی از زیر گروه آلفا ۲ از
پروتئوباکتری ها بوده و عامل بیماری در بیماران به صورت
B. bacilliformis یا تب Oroya می باشد. برای اولین بار در سال
۱۹۵۰ توسط آلبرتو بارتون توصیف
شد. پژوهش های متعددی در این مورد انجام شده که
مطالعات بالینی و تجربی را نیز شامل می شود. در ۲۵ سال
گذشته، مسلماً مهم ترین مطالعات در مورد فیزیوپاتولوژی
این بیماری انجام شده است. بارتونلوزیس در طول تاریخ
در پرو، اکوادور و کلمبیا که جزو مناطق مهم بومی جهان در
نظر گرفته می شوند توصیف شده است. تفاوت قابل توجه
در تظاهرات بالینی در طول عفونت با *B. bacilliformis*
نشان دهنده یک سازش پیچیده بین میزبان انسانی به علت
پایداری بیش از حد باکتری، باقی ماندن به صورت مخزن
برای انتقال از طریق ناقلین و فرار از سیستم ایمنی است.
رابطه باکتری و میزبان یادآور بسیاری از مکانیسم های
بیوشیمیایی و ژنتیکی موجود در پروتئین های باکتری و
میزبان می باشد. این بررسی بر روی پروتئین های درگیر در





شکل ۱: آنتی ژن پروتئین های مختلف ب. باسیلی

فورمیس و جایگاه آن ها در سلول:

Brp's = پروتئین ها تکرار بار تونلا، **FtsZ** = پروتئین تقسیم سلول **Hbp's** = hemin-binding پروتئین، **IalB** = invasion-associated locus B پروتئین، **LppB** = لیوپروتئین ب، **OM** = غشای خارجی، **PG** = پپتیدوگلیکان، **CM** = غشای سیتوسولیک (فرآیند غشایی)

□ ۳- پروتئین های کاندید برای توسعه واکسن

بار تونلوزیس

۳-۱- Flagellin

B. bacilliformis توسط تاژک لوفوتریش خود بسیار متحرک می باشد، این تاژک زائده ۴۲ کیلو دالتونی بوده و از زیر واحد پروتئینی flagellin تشکیل یافته و در مقابل پروتئاز و یا تیمار با تریپسین مقاوم می باشد. طبق مطالعات، *B. bacilliformis* دارای ۱ تا ۱۰ تاژک قطبی به طول ۳ تا ۱۰ میکرومتر می باشد. علاوه بر سیستم گردش خون، تاژک باکتری را قادر می سازد تا با سرعت بالایی حرکت نماید و ممکن است به ورود پاتوژن در داخل گلبول های قرمز نیز کمک نماید. به نظر می رسد تحرک باکتری برای ورود مورد نیاز باشد، چون پس از ورود *B. bacilliformis* نشانه ای از حرکت باکتری در آزمایش های Mernaugh و Ihler مشاهده نشده است. آنتی سرم ضد تاژک در ارتباط بین *B. bacilliformis* و سلول های قرمز به طور قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل کاهش می یابد و دارای اتصال ضعیفی از تحرک های ضعیف مختلف می باشد. این داده ها نشان می دهند که تاژک ها موجب اتصال قوی باکتری به گلبول قرمز می شوند و یا ارتباط بین سلول های میزبان و باکتریایی را افزایش می دهند. با

تعامل *B. bacilliformis* با میزبان تاکید دارد. ما فرض می کنیم که پروتئین های خاصی می توانند کاندیدهایی ایده آل از نظر آنتی ژن پروتئینی باشند که برای تهیه یک واکسن شیمیایی سنتز می شوند تا وقوع فعل و انفعالات بین *B. bacilliformis* با سلول های میزبان را بلوکه نمایند. (شکل ۱).

□ ۲- پاتوژن و بیماریزایی باکتری

B. bacilliformis توسط نیش پشه خاکی فلبوتومینه در دره های رشته کوه های بلند آند زندگی می کند به انسان منتقل می شود. این بیماری اغلب، اما نه همیشه در دو مرحله ظاهر می شود. بیماری اولیه یا فاز حاد که تهدید کننده حیات است و توسط یک مرحله سپتیک بدتر شده و کم خونی همولیتیک شدید مشخصه آن است که ناشی از هجوم باکتری ها به گلبول های قرمز است که توسط طحال نابود می شوند. این مرحله، به عنوان تب *Oroya* شناخته شده است و در صورت عدم درمان میزان مرگ و میر بالا است (تا ۸۸٪) و در کودکان شایع تر می باشد. تب، رنگ پریدگی، ضعف عمومی، درد عضلانی، سردرد، یرقان و بزرگی کبد و طحال علائم اصلی تب *Oroya* هستند. در حالات پیشرفته، یک سرکوب سیستم ایمنی گذرا به عنوان یک نتیجه از مرحله سپتیک، اتفاق می افتد که منجر به شروع عفونت های فرصت طلب مانند توکسوپلاسموز، سل، سالمونلوز، شیگلا، هیستوپلاسموز، مالاریا و پنوموسیستیس می شود. در مرحله مزمن ثانویه، که به عنوان *verruca peruana* (زگیل پرو) شناخته شده است ۴ تا ۸ هفته پس از شروع تب *Oroya* هجوم باکتری ها به سلول های اندوتلیال تولید ضایعات hemangiomatous زگیل مانند در پوست و غشاهای مخاطی می نماید. طول مدت مرحله انفجاری ۳ تا ۶ ماه است. ضایعات به صورت کوچک (پاپول کوچک مایل به قرمز کوچکتر از ۳ نانومتر)، مولار (تومورهای ندولر < ۵ میلی متر) و ندول های منتشره زیر جلدی طبقه بندی می شوند. در ساکنان مناطق آندمیک، به ویژه دانش آموزان، اغلب فاز انفجاری پیشرفته به عنوان تنها جلوه ای از این بیماری می باشد. انسان ها تنها منبع شناخته شده *B. bacilliformis* هستند.

۳-۳- IalB (invasion-associated locus B)

محل تهاجمی پروتئین IalB (شکل ۲) در اصل از طریق غربالگری کتابخانه ژنومی *B. bacilliformis* برای سویه های مهاجم اوکاریوتیک *E. coli* میزبان کشف شد. IalB دارای اثر قابل توجهی بر افزایش حمله *B. bacilliformis* به گلبول قرمز می باشد. ممکن است که تغییرات محیطی در حین انتقال باکتری از پشه خاکی به انسان (مانند تغییر در درجه حرارت، در دسترس بودن آهن و pH) روی بیان ژن IalB اثر بگذارد. در تحقیقات دیگر، سطح پروتئین IalB با تغییر در IalB و تغییرات دما یا pH در مرحله رشد در ارتباط بود. بیشترین میزان حضور IalB در بارتونلا باسیلی فورمیس زمانی است که PH اسیدی برابر ۵ و درجه حرارت رشد ۲۰ درجه سانتیگراد و یا تغییرات درجه حرارت پایین از ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتیگراد باشد.

همانطور که سطح IalB mRNA یعنی مقدار پروتئین IalB در بارتونلا باسیلی فورمیس در پاسخ به pH=8 و یا کاهش سریع دما به ۳۷ درجه، کاهش یافته است. احتمالاً در موقع خونخواری توسط حشرات، *B. bacilliformis* دستخوش یک تغییر دما از 37°C به 20°C می گردد. همزمان با تغییر حداقل دما، بیان IalB باکتری زمانی که حشرات خونخواری بعدی را انجام می دهند تنظیم می گردد. تغییرات pH همچنین در معده پشه خاکی هم اتفاق می افتد (افزایش کمتر PH به ۷/۴) که احتمالاً در آن بیان IalB تنظیم می گردد. وقتی که باکتری از پشه خاکی ناقل وارد میزبان انسانی می گردد این رویداد را می توان با یک تغییر سریع در درجه حرارت به ۳۷ °C و افزایش PH به ۷/۴ نشان داد. بیان ژن IalB تحت این شرایط کمتر تنظیم می گردد ولی از بین نمی رود. بدون شک، دیگر عوامل باکتریایی هم در پابندی و تهاجم به گلبول قرمز دخیل می باشند. IalB در قسمت غشای داخلی باسیلی فورمیس قرار دارد که بعید به نظر می رسد در آن محل با گلبول قرمز در ارتباط بوده باشد. در مقابل همولوگ IalB از بارتونلا هنسله در هر دو بخش داخلی و خارجی غشای باکتری قرار دارد. معلوم نیست که این پروتئین ناقل مبدل سیگنال در حمله گلبول قرمز انسان هست یا نه و مکانیزم عمل ناشناخته مانده است.

در نظر گرفتن کاهش قابل توجه در عفونت گلبول قرمز به دلیل آنتی بادی های ضد flagellin، این پروتئین یک آنتی ژن امیدوار کننده برای استفاده در واکسن زیر واحد قوی خواهد بود.

۳-۲- Brps (Bartonella repeat proteins)

بارتونلا به انواع مختلفی از سلول های یوکاریوتی از طریق اتصال به پروتئین های اتوترانسپورتر ۳ حمله می کنند (TAAs). همه TAA ها از مسیر ترشحی V شکل استفاده می کنند و از یک دمین انتقال دهنده و یک دمین بتا تشکیل شده اند که برای خارج کردن ترکیبات انتقالی هدف به خارج از غشای سلولی مورد استفاده قرار می گیرند. *B. bacilliformis* دارای سه ژن کد کننده brp است که قدرت تکثیر پروتئین های بارتونلا را دارد (Brps). پروتئین های Brp بارتونلا باسیلی فورمیس دمین های مشترک و خصوصیات ساختاری مشابه با TAAS نشان می دهند. در حالی که نقش پروتئین های Brp بارتونلا باسیلی فورمیس هنوز بررسی نشده است و ممکن است در فرآیند های بیولوژیکی مشابهی از جمله اتواگلوتیناسیون، اتصال به سلول های میزبان، پروتئین های ماتریکس خارج سلولی (فیبرونکتین و کلاژن)، مهار فاگوسیتوز و القاء پاسخ proangiogenic در سلول های میزبان به عنوان پروتئین های TAA از بارتونلا باسیلی فورمیس و بارتونلا کوئینتاننا حضور داشته باشند.



۳-۴- FtsZ

FtsZ پروتئین *B. bacilliformis* یک پروتئین 75~ کیلو دالتون و هومولوگ ساختاری بارتونلا هنسله و پروتئین دخیل در تقسیم سلولی است. FtsZBb به شدت در انسان ایمنی ایجاد می کند و یکی از دو آنتی ژن عمده می باشد (برای مثال 75 کیلو دالتون و 65 کیلو دالتون پروتئین) که در اوایل بررسی روی این باکتری شناسایی شده اند. علاوه بر این انتهای C در FtsZBb شامل یک ناحیه 256 آمینواسیدی است که غیر معمول بوده و در ارتباط با باکتری *Rhizobium meliloti* پیدا شده است. در نتیجه، FtsZ تقریباً دو برابر بزرگ تر از سایر هومولوگ های FtsZ است، شاید به آنتی ژن آن مربوط باشد. جالب توجه است که ژن FtsZ در میان طرح های MLST برای مطالعات کلونالی و ارتباط تکاملی با سویه های باسیلی فورمیس قرار گرفته است.

۳-۵- پروتئین های متفرقه غشای خارجی

چندین نوع پروتئین مختلف در غشای خارج سلولی باسیلی فورمیس شناسایی شده است. Minnick 14 تا پروتئین با دامنه 11/2 تا 75/3 کیلو دالتون شناسایی کرده است. سه تا از این پروتئین ها (31/5، 42، و 45 کیلو دالتون) وقتی در معرض سرم خراگوشی با ایمنی بالا قرار داده شدند خاصیت رسوب زایی ایمنی افزایش یافت. Ihler و Iwaki-Egawa و باکتری پروتئین باسیلی فورمیس که واسطه واکنش بین باکتری و گلبول های قرمز بودند را شناسایی کردند (100، 92، 84، 46، 37 و 12 کیلو دالتون). یک لیپو پروتئین ایمنی زای 43 کیلو دالتون از باسیلی فورمیس از طریق غربالگری ژنومی DNA کتابخانه ای لامبادا شناسایی گردید. این پروتئین یک هومولوگ از پروتئین های LppB گونه های هموفیلوس و پروتئین NlpD از *E. coli* است و در نتیجه LppB تعیین شد. لیپوپروتئین LppB به احتمال زیاد شبیه به مسیرهای بیوسنتز لیپوپروتئین باکتریایی دیگر سنتز می شود. افزایش ایمنی زایی پروتئین ها نشان می داد که سرم 5 بیمار در دروه نقاهت از بیماری تب اورویا و وروگا بودند. Buckles و McGinnis Hill نشان دادند که

باسیلی فورمیس قادر به باند شدن با چندین پروتئین گلبول قرمز انسانی از جمله زیر واحدهای آلفا و بتا اسپکترین، باند 3 پروتئین، گلیکوفورین A و گلیکوفورین B می باشد. باند 3 یک گلیکوپروتئین بزرگ انتقال دهنده از غشای گلبول قرمز است و ممکن است یکی از گیرنده های گلبول قرمز بارتونلا باسیلی فورمیس باشد. علاوه بر این، پیشنهاد شده است که باند 3 در حمله پلاسمودیوم به گلبول های قرمز نقش دارد.

۳-۶- پروتئین های Hemin-Binding (Hbp's)

پروتئین های Hemin-Binding بارتونلا باسیلی فورمیس مرتبط با هومولوگ های باکتریوفاژها Pap31، از پروتئین های بارتونلا هنسله و 5 پروتئین hemin-binding از بارتونلا کوئینتا هستند. *B. bacilliformis* دارای سه ژن hbp کدکننده پشت سر هم در روی کروموزوم آن است. علاوه بر این به عنوان یک گیرنده برای همین محسوب می شوند و در ارتباط با فاژ است. جمع آوری داده ها از بارتونلا هنسله نشان می دهد که این پروتئین ها نیز ممکن است به عنوان اتصال برای فیبرونکتین، هپارین و سلول های میزبان مانند سلول های اندوتلیال دخیل باشند. پروتئین های HBP (Pap31) آنتی ژن های با بیان بالایی هستند که در محیط کشت بارتونلا باسیلی فورمیس رشد می کنند و ایمونوژنیستیه غالب آن را به عنوان آنتی ژن ایده آل برای استفاده در آزمایش الایزا و ایمونوبلات ها تعیین می کنند. در واقع، استفاده از این آنتی ژن تک پروتئینی در ELISA، وسترن بلات یا روش جریان جانبی منجر به سرعت به تشخیص عفونت *B. bacilliformis* می شود. تا چه اندازه Hbp's بارتونلا باسیلی فورمیس در انسان سیستم ایمنی را فعال می کند هنوز ناشناخته است. با این حال، هومولوگ HbpE از *Quintana B.* یک آنتی ژن معمولاً شناخته شده در سرم بیماران مبتلا به تب خندق می باشد. این مشاهدات نشان می دهد که یک یا چند Hbp پروتئین از بارتونلا باسیلی فورمیس ممکن است فعال کننده سرمی در انسان بوده و در نتیجه برای ساختن واکسن کاندید باشد.

۴- نتیجه گیری

تاثیر قابل توجهی که شیوع بارتونلوزیس برای جمعیت های آسیب پذیر در جنوب آمریکا دارد. بیماری کاربون یکی از بیماری های نوپدید است که ریشه کنی آن با آنتی بیوتیک ها و آفت کش ها امکان پذیر نمی باشد. بنابراین، موثرترین راهکار کنترل بیماری از طریق ساخت و توسعه یک واکسن برای پیشرفت بهداشت عمومی خواهد بود. پیشرفت هایی که در ژنومیکس و پروتئومیکس بارتونلا باسیلی فورمیس به وجود آمده امیدی برای طراحی واکسن قابل قبول در آینده نزدیک خواهد بود.

عفونت *B. bacilliformis* نشان دهنده یک مدل جالب از اختصاصی بودن میزبان انسانی برای یک باکتری است. در حالی که ما در حال حاضر بیشتر در مورد زیست شناسی باکتری و بیماریزایی بیماری کاربون اطلاعاتی داریم ولی ما هنوز فاقد دانش کافی برای انتخاب کاندیدهای پروتئین خاص برای تولید یک فرمول واکسن هستیم. مطالعات مقایسه ای در مورد ژنومیک و پروتئومیکس زیادی وجود ندارد، به خصوص با توجه به

References

- 1- Cesar Henriquez-Camacho, Palmira Ventosilla, Michael F. Minnick, Joaquim Ruiz, and Ciro Maguina: *Proteins of Bartonella bacilliformis: Candidates for Vaccine Development. International Journal of Peptides*:2015.
- 2- B. Alexander, "A review of bartonellosis in Ecuador and Colombia," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 52, no. 4, pp. 354-359, 1995.
- 3- M. Kosek, R. Lavarello, R. H. Gilman et al., "Natural history of infection with *Bartonella bacilliformis* in a nonendemic population," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 182, no. 3, pp. 865-872, 2000.
- 4- M. F. Minnick, B. E. Anderson, A. Lima, J. M. Battisti, P. G. Lawyer, and R. J. Birtles, "Oroya fever and verruga peruana: bartonellosis unique to South America," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 8, no. 7, Article ID e2919, 2014.
- 5- D. C. Scherer, I. Deburon-Connors, and M. F. Minnick, "Characterization of *Bartonella bacilliformis* flagella and effect of anti-flagellin antibodies on invasion of human erythrocytes," *Infection and Immunity*, vol. 61, no. 12, pp. 4962-4971, 1993.
- 6- J. M. Battisti and M. F. Minnick, "Development of a system for genetic manipulation of *Bartonella bacilliformis*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, no. 8, pp. 3441-3448, 1999.
- 7- T. Riess, S. G. E. Andersson, A. Lupas et al., "*Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 200, no. 10, pp. 1267-1278, 2004.
- 8- S. J. Mitchell and M. F. Minnick, "Characterization of a two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes," *Infection and Immunity*, vol. 63, no. 4, pp. 1552-1562, 1995.
- 9- S. A. Coleman and M. F. Minnick, "Differential expression of the invasion-associated locus *B (ialB)* gene of *Bartonella bacilliformis* in response to environmental cues," *Microbial Pathogenesis*, vol. 34, no. 4, pp. 179-186, 2003.
- 10- M. R. Chenoweth, C. E. Greene, D. C. Krause, and F. C. Gherardini, "Predominant outer membrane antigens of *Bartonella henselae*," *Infection and Immunity*, vol. 72, no. 6, pp. 3097-3105, 2004.
- 11- I. Padmalayam, B. Anderson, M. Kron, T. Kelly, and B. Baumstark, "The 75-kilodalton antigen of *Bartonella bacilliformis* is a structural homolog of the cell division protein *FtsZ*," *Journal of Bacteriology*, vol. 179, no. 14, pp. 4545-4552, 1997.
- 12- M. F. Minnick, "Identification of outer membrane proteins of *Bartonella bacilliformis*," *Infection and Immunity*,





vol. 62, no. 6, pp. 2644–2648, 1994.

13- S. Iwaki-Egawa and G. M. Ihler, "Comparison of the abilities of proteins from *Bartonella bacilliformis* and *Bartonella henselae* to deform red cell membranes and to bind to red cell ghost proteins," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 157, no. 1, pp. 207–217, 1997.

14- I. Padmalayam, T. Kelly, B. Baumstark, and R. Massung, "Molecular cloning, sequencing, expression, and characterization of an immunogenic 43-kilodalton lipoprotein of *Bartonella bacilliformis* that has homology to NlpD/LppB," *Infection and Immunity*, vol. 68, no. 9, pp. 4972–4979, 2000.

15- E. L. Buckles and E. McGinnis Hill, "Interaction of *Bartonella bacilliformis* with human erythrocyte membrane proteins," *Microbial Pathogenesis*, vol. 29, no. 3, pp. 165–174, 2000.

16- H. K. Deng, D. Le Rhun, E. Le Naour, S. Bonnet, and M. Vayssier-Taussat, "Identification of *Bartonella Trw* host-specific receptor on erythrocytes," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 7, Article ID e41447, 2012.

17- T. J. Bowers, D. Sweger, D. Jue, and B. Anderson, "Isolation, sequencing and expression of the gene encoding a major protein from the bacteriophage associated with *Bartonella henselae*," *Gene*, vol. 206, no. 1, pp. 49–52, 1998.

18- J. A. Carroll, S. A. Coleman, L. S. Smitherman, and M. F. Minnick, "Hemin-binding surface protein from *Bartonella quintana*," *Infection and Immunity*, vol. 68, no. 12, pp. 6750–6757, 2000.

19- S. M. Dabo, A. W. Confer, B. E. Anderson, and S. Gupta, "*Bartonella henselae* Pap31, an extracellular matrix adhesin, binds the fibronectin repeat III13 module," *Infection and Immunity*, vol. 74, no. 5, pp. 2513–2521, 2006.

20- A. Taye, H. Chen, K. Duncan et al., "Production of recombinant protein Pap31 and its application for the diagnosis of *Bartonella bacilliformis* infection," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1063, pp. 280–285, 2005.

