

سیستم های ترشعی در باکتری ها

• دکتر حبیب ضیغمی

استادیار باکتری شناسی پزشکی، مدیر گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان (رئیس اداره آزمایشگاه های استان زنجان)، زنجان، ایران

zeighami@zums.ac.ir

• وحید لهراسبی

کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

vahidlohrasbi@yahoo.com

چکیده

همه باکتری ها، چه گرم مثبت باشد و چه گرم منفی، دارای مجموعه های غنی از نانوماشین های ماکرومولکولی برای ترشح طیف وسیعی از سوبستراهای تولیدی خود مثل مولکول های کوچک، پلی پپتیدها، پروتئین ها و DNA می باشند. این سوبستراهای تولیدی نقش حیاتی در پاسخ باکتری ها به محیط پیرامون خود و اجرا و حفظ فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلفشان چون خاصیت ادhezینی، پاتوژنسیته و بیماریزایی، تطبیق با محیط پیرامون و حفظ بقایشان دارد. در سال های اخیر توجه به ساختار و مکانیسم عمل این ماشین های انتقالی، که شامل ۶ سیستم ترشعی شناخته شده در باکتری های گرم منفی (از I تا VI)، سیستم ترشعی تیپ VII شناسایی شده در مایکوباکتریوم ها، مسیر ترشعی عمومی (Sec) و مسیر انتقالی Tat می باشند، بیش از پیش شده است. وسعت دانش و دانسته های ما از این سیستم های ترشعی روز به روز در حال توسعه و هر روز فهم و درک ما از مکانیسم و نحوه ترشح پروتئین ها و DNA باکتری ها به خارج از سیتوپلاسم آن ها در حال گسترش است. به علاوه افزایش روز افزون بروز مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها یکی از نگرانی های مهم جهانی به حساب می آید. از این رو دانستن مکانیسم و ساختار این سیستم های ترشعی برای تولید نسل جدیدی از آنتی بیوتیک ها و واکسن ها و کاهش مرگ و میر ناشی از بیماری های عفونی باکتریایی امری است ضروری. در این مطالعه مروری برآنیم تا با بررسی دقیق ساختار و مکانیسم عمل سیستم های ترشعی عمومی، تک و دو مرحله ای، به طور خلاصه به بررسی نسل های

جدید مواد ضد میکروبی علیه این سیستم های ترشعی پردازیم.

واژگان کلیدی: سیستم های ترشعی، Sec، Tat، مواد ضد میکروبی جدید

مقدمه

پروتئین های سنتزی توسط ریبوزوم باکتری ها برای رسیدن به جایگاه هدف خود با موانع متعددی روبرو می شوند. عبور از این سدها و موانع برای پروتئین ها با آن حجم و اندازه مولکولی بزرگ، کاری است غیر ممکن، لذا وجود و حضور نانو ماشین های ماکرومولکولی با نام سیستم های ترشعی برای ترشح و صدور محصولات تولیدی در داخل باکتری به خارج از آن امری است ضروری و اجتناب ناپذیر (۱).

در باکتری های گرم منفی سیستم های ترشعی را می توان به ۳ گروه تقسیم بندی نمود: آن هایی که در غشای داخلی (Inner membrane یا IM) و غشای خارجی (Outer membrane یا OM) گسترده شده اند، آن هایی که فقط در IM توسعه یافته اند و در نهایت آن هایی که فقط در OM حضور دارند. انتقال دهندگان گسترش یافته در غشای IM شامل ماشین انتقال دهنده Sec و سیستم ترانسپورتر Tat می باشد (۲، ۳). از سیستم های ترشعی توسعه یافته در غشای خارجی یا OM می توان به سیستم ترشعی تیپ V یا T5SS و ماشین های اسمبل ضمائم خارج سلولی چون پیلای تیپ I یا پیلای P و Curli اشاره نمود. از ماشین های ترشعی گسترش یافته در هر دو غشای

داخلی و خارجی که تا به امروز مشخص شده نیز می توان به سیستم ترشحي تپ I يا T1SS، سیستم ترشحي تپ II يا T2SS، سیستم ترشحي تپ III يا T3SS، سیستم ترشحي تپ IV يا T4SS و سیستم ترشحي تپ VI يا T6SS اشاره نمود و در نهايت مايکوباکتری ها که دارای انولوپ و پوشش شبه گرم منفی هستند، کد کننده سیستم ترشحي تپ VII يا T7SS هستند که این ماشین ترشحي اغلب محدود به این باکتری بوده و تاکنون در سایر گرم منفی ها دیده نشده است و به دليل مشخص نبودن دقيق ساختار و مکانيسم عمل آن در هيچ یک از گروه های فوق قرار نگرفته و به صورت مجزا به آن خواهیم پرداخت (۴).

Sec یا General Secretary Pathways

گذرگاه اصلی پروتئين های سنتزی توسط باکتری از ورای غشای داخل سلولی يا IM، مسیر ترشحي Sec است که دارای اجزای چاپرونی سيتوزولیک و زیر واحدهای داخل غشایی می باشد. این مسیر فراهم کننده ورود سوبستراهای سنتز شده در داخل سيتوزول به فضای پری پلاسمیک و غشای خارجی است. کمپلکس پروتئينی SecYEG یک هتروتریمریک پروتئين است که در مرکز مسیر انتقالی Sec قرار داشته و نقش کانال انتقال دهنده سوبسترا از سيتوزول داخل سلولی به فضای خارج آن را فراهم می کند (۷-۵). SecA مسئول اصلی تامین انرژی و تغییر کنفورماسیون کانال برای انتقال پروتئين است (۹،۸). کمپلکس هترودیمریک غشایی SecDF نقش فرعی و جانبی را در فرآیند انتقال پروتئين در مسیر ترشحي Sec بر عهده دارد (۱۰).

در شروع انتقال پروتئين، ابتدا پیش پروتئين تا نخورده توسط پروتئين چاپرون SecB به کمپلکس SecYEG متصل به SecA، می رسد. کمپلکس SecYEG-SecA آغازگر فرآیند انتقال با صرف انرژی و هیدرولیز ATP است. نخست ATP به پروتئين SecA متصل شده با این اتصال سیگنال ورود پیش پروتئين به کانال SecYEG ارسال شده و همزمان اتصال بین SecB با کمپلکس فوق از بین می رود (۱۱،۱۲). با مصرف شدن ATP و تغییر کنفورماسیون SecA، کانال SecYEG باز شده و پذیرای ورود پیش پروتئين خواهد بود. به علاوه فعالیت آنزیم ATPase ای در

SecA و باز شدن کانال SecY نشان از اتصال آلوستریکی این دو زیر واحد دارد. سپس هیدرولیز ATP توسط SecA منجر به آزاد شدن یکی از پروموتورهای SecA از کمپلکس شده در حالی که SecYEG در تعامل و اتصال با پروموتور SecA باقی می ماند. متعاقباً با اتصال مجدد و ریباندینگ SecA در سيتوزول، باعث احیا و بازسازی دیمر SecA شده که ممکن است وظیفه ای در مرحله انتقال و جایجایی بدون اتصال به نوکلئوتید را بر عهده داشته باشد (۱۳،۱۴). حال ATP به SecA متصل شده و یک مرحله حرکت سوبسترا رخ می دهد و الباقی حرکت سوبسترا از طریق تکرار سه سیکل فوق ذکر یعنی جداسازی SecA، اتصال مجدد یا ریباندینگ و اتصال ATP و هیدرولیز، باعث انجام مراحل انتقال پیش پروتئين از سيتوزول به فضای پری پلاسمیک می گردد. بررسی ها نشان داد که انتقال سوبسترا می تواند وابسته به نیروی "pushing" القا شده توسط SecA در غشای سيتوپلاسمیک و نیروی "pulling" تولیدی توسط SecDF در ناحیه جانبی غشای سيتوپلاسمیک است (۱۴، ۱۳).

Tat یا twin-arginine translocation

سیستم ترشحي پروتئين Tat در غشای سيتوپلاسمی بیشتر یوباکتری ها و آرکی باکتری ها وجود دارد و ویژگی اصلی و منحصر به فرد آن انتقال پروتئين های کامل فولد شده است که دقیقاً برعکس سیستم Sec می باشد (۱۵،۱۶). سیستم Tat که مخفف کلمه twin-arginine translocation می باشد، مختص پروکاریوت ها نبوده و در یوکاریوت ها نیز یافت شده است. این سیستم به شکل پیشرفته و محافظت شده تر در تیلانوئید گیاهان و کلروپلاست جلبک ها و میتوکندری ها اسفنج ها وجود دارد (۱۹-۱۷). پروتئين های تولیدی هدف ماشین ترشحي Tat توسط سیگنال پپتیدهایی که شامل یک جفت آرژنین موتیف محافظت شده است شناسایی می شود که دليل نامگذاری این مسیر نیز همین است. این ناحیه دارای ۳ بخش ناحیه n در N ترمینال و یک ناحیه هیدروفوبیک h در مرکز و یک ناحیه c در انتهای C ترمینال. به علاوه در بالا دست +1 ناحیه c پروتئين بالغ یک جایگاه شناسایی سیگنال پپتیداز

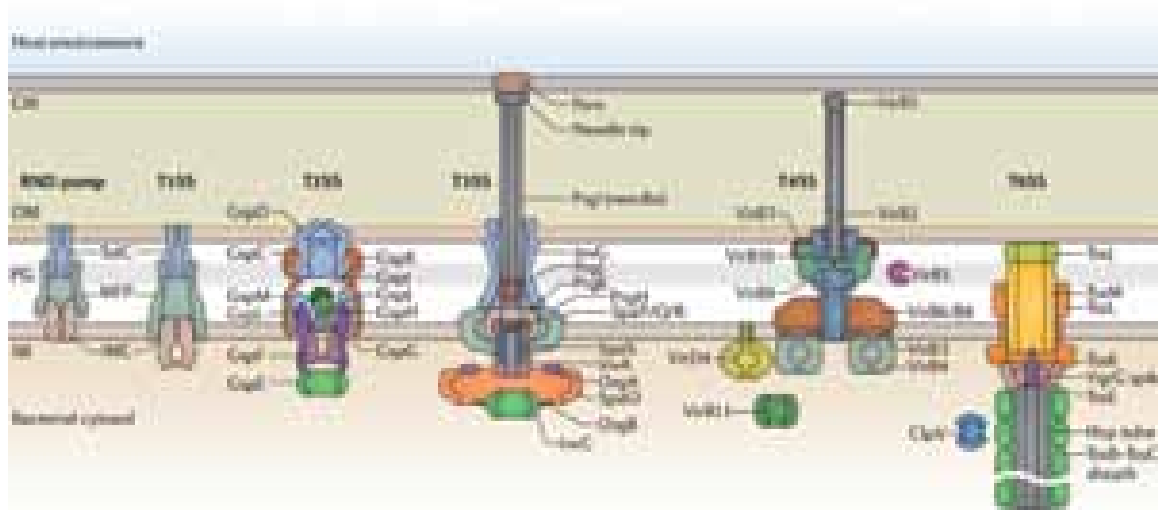
ساختار هومولوگ در عملکردشان می باشد. مطالعات نشان داده که با جایگزینی و تغییر تنها یک آمینواسید در ساختار TatA در باکتری اشیریشیا کلی می تواند هر دو عملکرد زیر واحدهای TatA و TatB را به دست آورد. به علاوه TatA در باکتری باسیلوس سوبتیلیس که فاقد زیر واحد TatB است می تواند جایگزین برای هردوی این زیر واحدها باشد (۲۴-۲۱).

شروع چرخه انتقال توسط اتصال سیگنال پپتیدها به کمپلکس TatBC آغاز می گردد. مرحله اول زمانی است که سوبسترای پروتئینی به کمپلکس TatBC متصل می شود سیگنال پپتید جفت آرژنینی در نزدیکی TatC قرار گرفته در حالی که ناحیه h سیگنال پپتید و دامین تاخورد به TatB متصل می شود که این واکنش بدون صرف انرژی است. در مرحله دوم PMF باعث اتصال قوی تر سوبسترا به کمپلکس TatBC می شود و باعث تجمع پروموتورهای TatA در کنار کمپلکس TatBC می شود که وابسته به PMF است. در مرحله سوم سوبسترا توسط TatA خارج شده ولی سیگنال پپتید همچنان به کمپلکس TatBC متصل خواهد بود. هنوز مشخص نیست که این مرحله به PMF نیاز دارد یا خیر. در مرحله آخر بعد از خروج سوبسترا سیگنال پپتید توسط سیگنال پپتیداز برش خورده و زیر واحدهای TatA از کمپلکس TatBC جدا و پراکنده می شود (۲۶، ۲۵).

وجود دارد که جایگاه برش است. سوالی که نخست ذهن هر دانش پژوهی را به خود جلب می کند این است که چرا باید یک میکروارگانیسم انتقال سوبستراهای خود را از مسیری به جز Sec که می تواند بیشتر پروتئین های باکتری را انتقال دهد، استفاده کند؟ پاسخ به این سؤال برای تمامی سوبستراها صادق نیست ولی ۳ دلیل اصلی برای استفاده از مسیر Tat مشخص شده است: نیاز کوفاکتورها برای ورود با این سیستم، جلوگیری از اتصال یون های فلزی پرکننده جایگاه فعال پروتئین های سوبسترا و انتقال کمپلکس های هترو الیگومریک.

خصوصیت اصلی سیستم Tat توانایی انتقال پروتئین های فولد شده است در حالی که سایر سیستم های ترشحی توانایی انتقال پروتئین های بدون تاخوردگی را دارد. موتور تولید کننده انرژی در سیستم ترشحی Tat نیروی محرک پروتونی به نام PMF است، البته در برخی میکروارگانیسم ها این انرژی توسط نیروی محرک سدیم تامین می شود (۲۰).

نقل و انتقال سوبسترا توسط مسیر ترشحی Tat به خارج فضای سیتوپلاسمیک توسط زیر واحدهای خانواده TatA و TatB و TatC انجام می شود. مشاهدات در برخی از میکروارگانیسم ها نشان می دهد زیر واحدهای TatA و TatC برای انتقال کافی است ولی این موضوع در تمام میکروارگانیسم ها مصداق نداشته و برخی به حضور TatB به همراه TatA نیاز دارد که نشان از وجود نقش و



شکل ۱: نمایی از ۶ سیستم ترشحی در باکتری های گرم منفی

سیستم ترشحی تیپ I و افلاکس پمپ RND

باکتری های دارای سیستم ترشحی نوع ۱ طیف وسیعی از سوبستراهای پروتئینی را از سیتوپلاسم به خارج سلول ترشح می کنند (۲۷). سیستم ترشحی تیپ یک قرابت ساختاری زیادی با Efflux pumps دارویی خانواده RND دارد. RND ها پمپ های آگزوزن کوچک ترشحی هستند که اکثر آن ها وظیفه پمپ ترکیبات آنتی باکتریال به خارج سلول را بر عهده دارند که باعث مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری خواهد شد (۲۸).

هر دو سیستم ترشحی ۳ جزیی بوده و کانال های خروج سوبستراهای آن در دو غشای داخلی و خارجی باکتری های گرم منفی گسترده شده است. در سیستم ترشحی تیپ I زیر واحد IMC یک خانواده از کاست انتقال دهنده متصل به (ATP ABC) ترانسپورتر) بوده که به ۳ گروه مختلف بر اساس انتهای آمینی شان تقسیم می شود. نخستین عملکرد دیمر IMC در ماشین ترشحی تیپ I، شناسایی یک موتیف غنی از گلیسین (-Gly-X-Gly-X-) است که به طور معمول به صورت متوالی در C ترمینال سوبسترای ترشحی حضور دارد. دومین عملکرد IMC تامین انرژی سیستم ترشحی به واسطه هیدرولیز ATP توسط ناحیه C ترمینال خود است. بررسی ها بر روی افلاکس پمپ RND نشان داد که IMC این ماشین ترشحی از یک گرادیان پروتون برای جابجایی سوبسترا به جای مصرف ATP استفاده می نماید. زیر واحد MFP سیستم ترشحی تیپ I در تشخیص سوبسترا با IMC در تعامل بوده و در انتقال آن از کانال خود نقش دارد. این زیر واحد یک کانال هوموهگزامریک است که دارای یک دامین آلفا Hairpin در تعامل با TolC و یک دامین بشکه بتا و یک دامین لیپوفیل در تعامل با IMC می باشد. زیر واحد TolC یک کانال تریمریک بوده که سمت بشکه بتا آن در غشای خارجی باکتری های گرم منفی قرار گرفته و سمت بشکه آلفا هلیکس پری پلاسمیک اش در ارتباط با MFP است (۱).

سیستم ترشحی تیپ II

سیستم ترشحی تیپ II در بسیاری از باکتری ها چه

پاتوژنیک و چه غیر پاتوژنیک وجود دارد. این سیستم ترشحی وظیفه انتقال پروتئین های انتقال یافته به فضای پری پلاسمیک توسط Sec و Tat را دارد که شامل پروتئین های مختلفی چون آنزیم های هیدرولیزین، مثل: pseudolysin در سودوموناس آئروژینوزا یا pullulanase در کلبسیلا پنومونیه و توکسین های مختلف چون cholera toxin در ویبریو کلره است (۲۹).

سیستم ترشحی تیپ II از ۱۲ تا ۱۵ جزء تشکیل شده است که این زیر واحدها با نام general secretion pathway یا Gsp نامیده می شود. این سیستم از ۴ قسمت تشکیل شده است که شامل: کمپلکس غشای خارجی، یک pseudopilin پری پلاسمیک، یک پلنفرم داخل غشایی و یک ATPase سیتوپلاسمیک (۳۰).

سیستم ترشحی تیپ II دارای یک سودوپیلوس منحصر به فرد می باشد که منحصر محدود به فضای پری پلاسمیک بوده و بروز خارج سلولی، برخلاف پیلوس حقیقی، ندارد. سودوپیلوس سیستم ترشحی تیپ II ساختمانی مشابه با پیلی تیپ IV دارد (۳۱).

سوبستراهای ترشح شده توسط ماشین ترشحی تیپ II ابتدا به شکل پلی پپتید بدون تاخوردگی توسط کمپلکس SecYEG و یا پلی پپتید تاخورده توسط سیستم Tat، به ناحیه پری پلاسمیک انتقال می یابد تا در ادامه فرایند انتقال توسط این ماشین ترشحی انجام گیرد. در این سیستم فرض بر این است که به کمک هیدرولیز ATP و قدرت دهی آن به سودوپیلین پری پلاسمیک باعث هول دادن سوبسترا به داخل کانال غشای خارجی و باز شدن آن می شود. مشاهدات حاکی از آن است که پروتئین GspL در تعامل با هر دو زیر واحد GspE و GspG است که نتیجه این تعامل می تواند در اسمبل و داسمبل شدن سودوپیلین توسط GspL و ATPase به نام GspE دخیل باشد. از طرفی تعامل سودوپیلین با زیر واحدهای GspC و GspD تسهیل کننده ورود سوبسترا به داخل کانال سکرترین و در نتیجه هل داده شدن آن توسط سودوپیلوس به روش شبه پیستون است (۳۲).

سیستم ترش‌چی تیپ III

سیستم ترش‌چی تیپ III یک نانوماشین دبل ممبران جاسازی شده در باکتری های پاتوژنی چون سالمونلا، شیگلا، یرسینیا، سودوموناس و انتروپاتوژنیک اشریشیا کلی است. این ماشین ترش‌چی همچنین در ترشح پروتئین های افکتور به سیتوپلاسم یا غشای پلاسمایی سلول هدف یوکاریوتی نیز دخیل است که باعث مودولاسیون و تغییر عملکرد سلول میزبان به واسطه تقویت تهاجم و کلونیزاسیون باکتری می‌شود (۳۳). ساختار این ابر ماشین ترش‌چی شبیه سرنگ بوده لذا با نام های کمپلکس سوزنی یا Injectisome نیز از آن یاد می‌شود که به طور تقریبی از ۲۵ پروتئین تشکیل شده است (۳۵، ۳۴).

پایه سیستم ترش‌چی تیپ III از ۲ حلقه متحد المركز داخلی به هم چسبیده که از نظر قطر داخلی با هم متفاوت اند (یکی ۲۷ نانو و دیگری ۱۸ نانو) تشکیل شده که به دو حلقه خارجی از طریق ساختمانی به نام گردن به هم متصل اند. ۲ حلقه داخلی از دو زیر واحد به نام های PrgK و PrgH در غشای داخلی قرار دارد. در IM علاوه بر زیر واحدهای فوق پروتئین های SpaP, SpaQ, SpaR, SpaS و Inva وجود دارد که به نظر می‌رسد در ارتباط با کانال داخل ممبرانی PRGK-PRGH و برخی از پروتئین های ساختمانی است (۳۶، ۳۷). اطلاعات ساختمانی به دست آمده از اسمبل نیدل توسط solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy و Rosetta modelling در محیط In vitro نشان داد که این تیوب دارای یک قطر خارجی ۸۰ آنگسترومی و قطر داخلی ۲۵ آنگسترومی بوده و زیر واحد های PrgI آن یک مارپیچ راستگرد با حدودا ۵/۷ زیر واحد در هر چرخش را می‌سازند. این ابعاد باریک قطر داخلی تیوب تنها انتقال سوبسترای تانخورده را ممکن می‌سازد (۳۸).

به دنبال اتصال و ارتباط باکتری پاتوژن با سلول میزبان، با ترشح پروتئین های افکتور متعدد و فعال شدن مکانیسم سیگنالینگ پیچیده، سیستم ترش‌چی تیپ III با تغییراتی همراه شده و کنفورماسیون فیلامنت سوزنی شکل آن تغییر می‌کند. انتقال موثر و هدفمند سوبستراهای فولد نشده در سیستم ترش‌چی تیپ III از طریق پلیمریزه شدن فیلامنت سوزنی کنترل شده توسط سیگنالینگ باکتری و میزبان انجام

می‌گیرد که از یک پروسه آبشاری تبعیت می‌کند. این ماشین ترش‌چی دارای چاپرون‌های مخصوصی بوده که وظیفه انتقال صحیح پروتئین‌ها به این سیستم را داشته و تضمین کننده عدم عرضه پروتئین‌های غیر اختصاصی این سیستم را دارد (۳۹). با وجود این که درک ما از چگونگی تعامل این کمپلکس چاپرون‌سوبسترا با سیستم ترش‌چی تیپ III هم اکنون به طور کامل شناخته نشده است ولی امروز ما می‌دانیم که این کمپلکس ها می‌توانند یک گروه از پروتئین های سیتوپلاسمی چون OrgA, OrgB و SpaO را شناسایی کنند که باعث القای اسمبل شدن کمپلکس نیدل در پلتفرم پایه این سیستم ترش‌چی می‌شود. میزان افینیتی و تمایل چاپرون های مختلف این سیستم ترش‌چی به این پروتئین های سیتوپلاسمی آن، تضمین کننده انجام موفقیت آمیز ترشح پروتئین های ترنسلوکتور پیش از پروتئین های افکتور است. انرژی این نقل و انتقالات توسط ATPase به نام InvC انجام می‌گیرد که تنها ATPase شناخته شده در سیستم ترش‌چی تیپ III است (۴۰، ۴۱).

سیستم ترش‌چی تیپ IV

سیستم ترش‌چی تیپ IV یکی از منحصر به فردترین این ابر ماشین های مولکولی ترش‌چی است که علاوه بر پروتئین، توانایی ترشح DNA به داخل باکتری یا سلول یوکاریوتی را دارد. این سیستم ترش‌چی هم در باکتری های گرم منفی و هم گرم مثبت و حتی در برخی از آرکی باکتری ها نیز دیده شده است. این سیستم ترش‌چی نقش اساسی را در فرآیند کانجوگیشن پلاسمید بر عهده دارد و توانایی گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی به واسطه نقل و انتقال پلاسمید را داراست. این توانایی سیستم ترش‌چی تیپ IV یکی از منحصر به فردترین ویژگی های این سیستم است که در تمام میکروارگانیسم های واجد این مسیر ترش‌چی دیده می‌شود. این سیستم ترش‌چی در فرآیند پاتوژنی باکتری های پاتوژنی چون هلیکوباکتر پیلوری، توکسین های بوردتلا پرتوسیس و لژیونلا پنوموفیلا دخیل است (۴۲).

این سیستم از ۱۲ پروتئین به نام های VirB2, VirB1, VirB8, VirB7, VirB6, VirB5, VirB4, VirB3, VirB9, VirB10, VirB11 و VIRD4 تشکیل شده است. زیر واحد VirB3 به همراه پروتئین های 10- VirB6

تشکیل دهنده داربست و دستگاه انتقال سوستر است در حالی که زیر واحدهای VirB2 و VirB5 تشکیل دهنده پیلوس گسترش یافته به فضای خارج سلولی این سیستم ترشحی است (۴۳، ۴۴). زیر واحد VirB1 یک پروتئین پری پلاسمیک بوده که فرآیند تخریب پپتیدوگلیکان را به منظور سنتز پیلوس سیستم ترشحی برعهده دارد. این سیستم قدرتمند ترشحی برای فعالیت های خود از سه عدد ATPase به نام های VirB4, VirB11 و VirD4 بهره می گیرد (۴۵).

نبود یکی از سه زیر واحد ATPase ای سیستم ترشحی تیپ IV باعث از کار افتادن نقل و انتقال سوستر به خارج باکتری می شود. بررسی های تجربی بر روی باکتری آگروباکتریوم تومفاسینس دو مدل برای انتقال سوستر برای سیستم ترشحی تیپ IV پیشنهاد کرده است که با این حال هنوز ابعاد ناشناخته بسیاری در این زمینه وجود دارد: یکی مدل سنتز پیلوس که در ارتباط با تعامل VirB11 با VirB4 است و دیگری مدل انتقال سوستر که در نتیجه تعامل VirB11 با VirD4 رخ می دهد. پیشنهاد شده سویچ شدن بین این دو مدل زمانی که قسمت TIP پیلوس به رسپتور مخصوص خود متصل می شود رخ می دهد که هنوز این رسپتور شناخته نشده است و نتیجه آن طول شدن پیلی در اثر فعالیت زیر واحدهای VirB11 با VirB4 بوده و پس از آن با فعال شدن زیر واحدهای VirB11 با VirD4 سوسترای مورد نظر به داخل میزبان تلقیح می گردد (۴۴).

سیستم ترشحی تیپ V

سیستم ترشحی تیپ V که با نام سیستم ترشحی Autotransporter نیز شناخته می شود، به دلیل وجود تنها یک پلی پپتید تشکیل دهنده منفذ ترشحی ساختاری یکتا و بی نظیر دارد. دلیل نامگذاری اتوترانسپورتر نیز به همین دلیل بوده است چرا که مواد مترشح خود را تنها با یک پلی پپتید به خارج باکتری می راند. سیستم ترشحی تیپ V علاوه بر نقش ترشحی و آدهزینی اش در باکتری ها، به عنوان یکی از عوامل مهم در تشکیل بیوفیلم باکتری ها نیز نقش ایفا می کند (۵۱). این سیستم ترشحی تیپ نیازمند وجود ترانسلوکتور SecYEG برای انتقال پلی پپتید اتوترانسپورتر تانخورده از ورای غشای داخلی به فضای پری پلاسمیک می باشد.

سیستم ترشحی تیپ V از یک دامین ترشحی به نام دامین "passenger" و یک دامین ترانس ممبران غشای خارجی به نام "translocator" یا "دامین بتا" تشکیل شده است. بخشی از دامین پسینجر در میان منفذ ترانسلوکتور داخل غشای خارجی که ساختار پروتئینی بشکه بتا دارد قرار گرفته است. این سیستم ترشحی همچون سایر سیستم های انتقال دهنده غشای خارجی به وجود گرا دیان ATP یا پروتون به عنوان منبع انرژی به منظور انتقال سوستر نیاز ندارد (۵۲).

ماشین ترشحی تیپ V به ۵ زیر کلاس A تا E تقسیم می شود. بعد از انتقال سوستر از ورای IM به فضای پری پلاسمیک، این پلی پپتیدها توسط چاپرون های اختصاصی پری پلاسمیک به شکل تانخورده باقی می ماند. مطالعات اخیر موجب شناسایی یکی از این چاپرون های پری پلاسمیک با نام SurA شده است که باعث بهبود ترشح سوستر از طریق سیستم ترشحی تیپ V شده است (۵۳). کمپلکس Bam که شامل پروتئین ایترنال BamA و ۴ لیوپروتئین BamB, BamC, BamD و BamE است در همکاری با پروتئین ترانسلوکتور در ورود بسیاری از مواد به داخل غشای خارجی دخیل است (۵۴).

مکانیسم ترشح سوستر به OM در این سیستم ترشحی هنوز در هاله ای از ابهام است. تصور امروزی ما از این سیستم ترشحی نشان از خودبخودی نبودن سیستم ترشحی اتوترانسپورتر یا V است و نشان از همکاری دو کمپلکس Bam و زیر واحدهای پسینجر و ترانسلوکتور برای انتقال سوستر است (۵۵).

سیستم ترشحی تیپ VI

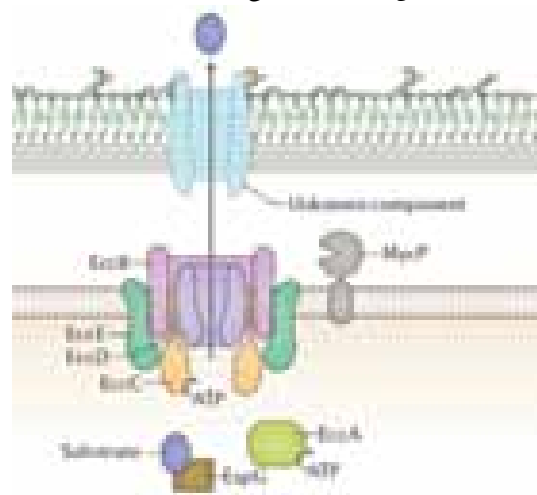
سیستم ترشحی تیپ VI یکی از مسیرهای ترشحی تازه شناخته شده است که از سال ۲۰۰۰ میلادی به بعد اطلاعاتی مبنی بر وجود آن و نوع فعالیتش در انتقال پروتئین های توکسیک به داخل سلول های یوکاریوتی و پروکاریوتی و نقش محوری آن در پاتوژنز برخی از باکتری ها ردیابی و کشف شد. بیشترین دانش ما از این مسیر ترشحی باز می گردد به سال ۲۰۰۶ هنگامی که این سیستم به طور گسترده بر روی Proteobacteria ردیابی و بررسی شد. این سیستم ترشحی متشکل از ۱۳ زیر واحد محافظت شده، اجزاء ضروری مرکزی



و همچنین اجزاء فرعی است (۴۶، ۴۷).

سیستم ترشحي تيپ VI از ۲ کمپلکس اصلي تشکيل شده است: کمپلکس غشايي که شامل پروتئين هاي داخل غشايي است که هومولوگ اجزا سيستم ترشحي تيپ IV است و ديگري کمپلکس دم که هومولوگ دم هاي قابل انقباض باکتریوفاژ است (۴۸). کمپلکس Tail در سيستم ترشحي تيپ VI به انولوپ و پوشش سلول به واسطه کمپلکس غشايي لنگر مي اندازد. Tail sheath یک ساختمان طويل توبولار است که تقريباً عمود بر غشا قرار گرفته و در عمق سيتوپلاسم باکتری گسترش يافته است (۴۹).

مکانيسم دقيق انقباض Hcp تيوب هنوز ناشناخته باقي مانده است. بر اساس مدل هاي پيشنهاد شده در سال هاي اخير به نظر مي رسد به دنبال یک سيگنال خارج سلولي ناشناخته، کنفورماسيون کمپلکس پايه تغيير کرده و باعث انقباض از sheath مي شود، که نتيجه آن جابجايي از تيوب Hcp در داخل هتروديمري هاي TssB-TssC شده و VgrG spike وارد سلول هدف مي شود. عاملی که باعث پرتاب شدن ناگهاني تيوب Hcp به سمت خارج سلول مي شود به نظر به دليل حضور زير واحدی بنام ClpV است چرا که بررسی ها نشان مي دهد در سيستم ترشحي تيپ VI فرانسيسلا که فاقد هومولوگ ClpV است فاقد چنين رفتار ديناميکی است (۴۶، ۵۰).



شکل ۲: نمایی از سيستم ترشحي تيپ VII در مايکوباکتریوم توبرکلوزيس

سيستم ترشحي تيپ VII

سیستم ترشحي تيپ VII جديدترين ماشين ترشحي بررسی شده در باکتری هاست که تاکنون تنها در ويرو لانس مايکوباکتریها همچون مايکوباکتریوم توبرکلوزيس نقش آن شناسايی شده است. پوشش ديواره مايکوباکتریها شامل یک غشای پلاسمایی معادل غشای داخلی گرم منفی ها، یک فضای پری پلاسمیک واجد پپتیدوگلیکان و آرابینوگالاکتان و در نهايت یک کمپلکس ضخيم غشای خارجي واجد پوشش لیپیدی- مومی مايکولیک اسيد به نام "mycomembrane" می باشد. سيستم ترشحي تيپ VII برای نخستين بار در سال ۲۰۰۳ شناسايی و به ESX-1 ناميده شد. اين ماشين ترشحي توسط لوکوسی در مايکوباکتری ها کد می شود که اين لوکوس در سويه هاي ضعيف شده مايکوباکتریوم بویس به نام "باسيل کالمت وگورین" است که از آن برای ساخت واکسن عليه توبرکلوزيس استفاده می شود. کلاستر زنی سيستم ترشحي تيپ VII در باکتری هاي گرم مثبت مختلفی چون استافیلوکوکوس اورئوس، لیستريا مونوسیتورنز و باسیلوس سوبتیلیس شناسايی شده است (۵۶).

سیستم ترشحي تيپ VII یک کمپلکس پروتئين ۱/۵ مگادالتونی است که شامل یک کمپلکس IM محافظت شده و یک دستگاه سيتوزولیک می باشد. کانال هسته IM متشکل از پروتئين هاي داخل غشايي EccB, EccC, EccD و EccE است که کانال مرکزی غشای داخلی اين سيستم ترشحي را می سازد. EccC زير واحد ATPase سيتوپلاسمیک است. EccD نقش کانال مرکزی اين سيستم ترشحي را بازی کرده و در ارتباط با ميکوزين MycP، یک پروتئاز غشايي دخیل در پردازش سوبسترا است. در سيتوپلاسم باکتری ۲ پروتئين فرعی به نام هاي EccA که یک ATPase داخل سيتوپلاسمی و ديگري EspG که به سوبسترا متصل شده و نقش چاپرونی را ایفا می کند، تسهيل کننده ترشح سوبسترا است. شناخت ما از اين سيستم ترشحي جديد الکشف هنوز در مراحل ابتدایی خود است و ندانسته هاي زيادی در اين سيستم ترشحي وجود دارد که چشم انتظار بررسی هاي آینده است (۵۵).

سیستم ترشحي و مواد آنتي باکترىال

بى شک آنتى بىوتیک ها یکى از موثرترین، موفقترین و کم هزینه ترین کلاس داروى است که برای درمان بيمارى ها در دسترس قرار دارد. در سال هاى اخير استفاده کنترل نشده از آن ها منجر به ايجاد پاتوژن هاى *multidrug resistant* شده است که زنگ خطر انقضاء آنتى بىوتیک هاى قدیمى را به صدا درآورده و جهان را نیازمند ابداع داروهای نوین و گسترش درمان هاى جدید برای مبارزه با این دست باکترى هاى عفونى کرده است (۵۷).

از این میان کلاس هاى متعددى از ترکیبات شیمیایى و اثر آن بر روى سیستم ترشحي تیپ III بررسی شده است. اگر چه مکانیسم فعالیت بیشتر این مولکول هاى شیمیایى فاش نشده و شاید دست نیافتنى باشد، ولی اثر آن ها بر روى سیستم ترشحي تیپ III توسط پژوهشگران به اثبات رسیده است. *Phenoxyacetamides* و *benzimidazoles* اثرات مهارى علیه *Pseudomonas aeruginosa* و *Yersinia pseudotuberculosis* از خود نشان داده اند. بررسی ها از اثر مهار کنندگى *salicylaldene acylhydrazides* بر روى این سیستم ترشحي در بسيارى از باکترى هاى گرم منفى حکایت دارد. *Thiazolidinones* باعث کاهش تعداد کمپلکس سوزنى سیستم ترشحي تیپ III در سالمونلا تیفیموریم شده و همچنین اثراتى بر روى سیستم ترشحي تیپ II در سودوموناس ها مى گذارد که به نظر به خاطر وجود پروتئين سکرترین مشترک در این دو سیستم ترشحي است. عمده مشکل ما در کاربرد این مواد مهارى مکانیسم عمل آن ها است که دست پژوهشگران را در استفاده از آن ها به عنوان داروى درمانى بسته مى گذارد (۵۸، ۵۹).

علاوه بر اثر مواد مهارى بر روى سیستم ترشحي تیپ III اثر این مواد بر روى سیستم ترشحي تیپ IV نیز بررسی شده است که نتایج جالب توجهی را از خود نشان داده اند. به عنوان مثال مطالعات موتاسیون نشان

داد که دیمیریزاسیون VirB8 اثرات وخیمى را بر روى عملکرد سیستم ترشحي تیپ IV در بروسلا سوئیس دارد. همین دستاورد عاملی بر بررسی اثر ۳۰۰۰۰ ترکیب مهار کننده و شناسایی ۴۸ ترکیب مهارى سیستم ترشحي تیپ IV به کمک دیمیریزاسیون VirB8 در بروسلا آبورتوس شود. یکى از این ترکیبات 2-B81 بوده که باعث مهار رشد داخل سلولى بروسلا آبورتوس در ماکروفاژها شده است (۶۱، ۶۰).

بحث و نتیجه گیرى

دانش امروز ما از سیستم هاى ترشحي برآیند بیش از ۷۴ سال پژوهش دانش پژوهان مختلف در این باره است. شناسایی و بررسی ابعاد جدید و پیچیده این نانوماشین ها ماکرومولکولى ما را با ابعاد جدیدى از پاتوژن باکترى ها آشنا ساخت و نشان داد سیستم هاى ترشحي تا چه میزان برای بقا و آدپته شدن میکروارگانیسم هاى مختلف با محیط اطرافشان اهمیت دارد. اهمیتی که جرقه تولید نسل جدیدى از داروها، واکسن ها و آنتى ویروالانت هاى میکروبی شده است. جرقه اى که پشتوانه آن وجود پیشرفت هاى گسترده درک ما از ساختار مولکولى این ماشین هاى ترشحي باکترىال است. دانش پژوهان امیدوارند که دانش بنیادى گسترده دیروز تا امروز بتواند پلی باشد برای رسیدن به یک محصول زیستى کارا برای مصارف درمانى در آینده تا بتواند پاسخگوی مقاومت داروى چند دهه اخیر میکروارگانیسم ها باشد. دانستن مکانیسم و ساختار این سیستم هاى ترشحي برای رسیدن به استفاده اى کاربردى از آن ها امرى است ضرورى تا بتوان بر روى دانش بنیادین حاصله از گذشتگان، پلی برای رسیدن به دانش کاربردى آینده زد، ولی با وجود گسترش دانش ما از سیستم هاى ترشحي هنوز سوالات زیادى در این باره بى پاسخ باقیمانده است. سوالاتى که بدون رسیدن به پاسخ آن ها، عملا به کارگیرى از این دانش برای حصول نتیجه کاربردى به عنوان کاندید دارو و واکسن بى فایده خواهد بود.



References

- 1- Costa TR, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*. 2015;13(6):343-59.
- 2- Lycklama a Nijehot JA, Driessen AJM. The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. *Phil Trans R Soc B*. 2012;367:1016-28.
- 3- Palmer T, Berks BC. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(7):483-96.
- 4- Gerlach RG, Hensel M. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2007;297:401-15.
- 5- Homma T, Yoshihisa T, Ito K. Subunit interactions in the *Escherichia coli* protein translocase: SecE and SecG associate independently with SecY. *FEBS letters*. 1997;408(1):11-5.
- 6- Kato Y, Nishiyama K-i, Tokuda H. Depletion of SecDF-YajC causes a decrease in the level of SecG: implication for their functional interaction. *FEBS letters*. 2003;550(1):114-8.
- 7- Duong F, Wickner W. Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *The EMBO journal*. 1997;16(10):2756-68.
- 8- Robson A, Booth AEG, Gold VAM, Clarke AR, Collinson I. A Large Conformational Change Couples the ATP Binding Site of SecA to the SecY Protein Channel. *Journal of Molecular Biology*. 2007;374(4):965-76.
- 9- Osborne AR, Clemons WM, Rapoport TA. A large conformational change of the translocation ATPase SecA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(30):10937-42.
- 10- Gardel C, Benson S, Hunt J, Michaelis S, Beckwith J. secD, a new gene involved in protein export in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 1987;169(3):1286-90.
- 11- Mao C, Hardy SJ, Randall LL. Maximal efficiency of coupling between ATP hydrolysis and translocation of polypeptides mediated by SecB requires two protomers of SecA. *Journal of bacteriology*. 2009;191(3):978-84.
- 12- Karamanou S, Gouridis G, Papanikou E, Sianidis G, Gelis I, Keramisanou D, et al. Preprotein-controlled catalysis in the helicase motor of SecA. *The EMBO journal*. 2007;26(12):2904-14.
- 13- Natale P, Swaving J, van der Does C, de Keyzer J, Driessen AJ. Binding of SecA to the SecYEG complex accelerates the rate of nucleotide exchange on SecA. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(14):13769-77.
- 14- Economou A, Pogliano JA, Beckwith J, Oliver DB, Wickner W. SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell*. 199.81-117:(7)83;5.
- 15- Saint-Joanis B, Demangel C, Jackson M, Brodin P, Marsollier L, Boshoff H, et al. Inactivation of Rv2525c, a substrate of the twin arginine translocation (Tat) system of *Mycobacterium tuberculosis*, increases β -lactam susceptibility and virulence. *Journal of bacteriology*. 2006;188(18):6669-79.
- 16- Dilks K, Giménez MI, Pohlschröder M. Genetic and biochemical analysis of the twin-arginine translocation pathway in halophilic archaea. *Journal of bacteriology*. 2005;187(23):8104-13.
- 17- Cline K, Theg S. Molecular machines involved in protein transport across cellular membranes. 2007.
- 18- Hinsley AP, Stanley NR, Palmer T, Berks BC. A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the 'invariant' arginine residues of the consensus targeting motif. *FEBS letters*. 2001;497(1):45-9.
- 19- Wagener N, Ackermann M, Funes S, Neupert W. A pathway of protein translocation in mitochondria mediated by the AAA-ATPase Bcs1. *Molecular cell*. 2011;44(2):191-202.

- 20- Mould RM, Robinson C. A proton gradient is required for the transport of two lumenal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(19):12189-93.
- 21- Sargent F, Bogsch EG, Stanley NR, Wexler M, Robinson C, Berks BC, et al. Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *The EMBO Journal*. 1998;17(13):3640-50.
- 22- Sargent F, Stanley NR, Berks BC, Palmer T. Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli* A distinct and pivotal role for the TatB protein. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(51):36073-82.
- 23- Ize B, Gérard F, Zhang M, Chanal A, Voulhoux R, Palmer T, et al. In vivo dissection of the Tat translocation pathway in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*. 2002;317.35-327:(3).
- 24- Yen M-R, Tseng Y-H, Nguyen EH, Wu L-F, Saier MH. Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. *Archives of Microbiology*. 2002;177(6):441-50.
- 25- Alami M, Lüke I, Deitermann S, Eisner G, Koch H-G, Brunner J, et al. Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Molecular cell*. 2003;12(4):937-46.
- 26- Palmer T, Berks BC. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nature Rev Microbiol*. 2012;10:483-96.
- 27- Kanonenberg K, Schwarz CK, Schmitt L. Type I secretion systems—a story of appendices. *Research in microbiology*. 2013;164(6):596-604.
- 28- Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2006;4(8):629-36.
- 29- Nivaskumar M, Francetic O. Type II secretion system: a magic beanstalk or a protein escalator. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843:1568-77.
- 30- Korotkov KV, Sandkvist M, Hol WG. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nature Rev Microbiol*. 2012;10:336-51.
- 31- Campos M, Nilges M, Cisneros DA, Francetic O. Detailed structural and assembly model of the type II secretion pilus from sparse data. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:13081-6.
- 32- Nivaskumar M. Distinct docking and stabilization steps of the pseudopilus conformational transition path suggest rotational assembly of type IV pilus-like fibers. *Structure*. 2014;22:685-96.
- 33- Galan JE, Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*. 2006;444:567-73.
- 34- Schraidt O, Marlovits TC. Three-dimensional model of *Salmonella*'s needle complex at subnanometer resolution. *Science*. 2011;331(6021):1192-5.
- 35- Marlovits TC. Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature*. 2006;441:637-40.
- 36- Worrall LJ, Lameignere E, Strynadka NC. Structural overview of the bacterial injectisome. *Curr Opin Microbiol*. 2011;14:3-8.
- 37- Abrusci P. Architecture of the major component of the type III secretion system export apparatus. *Nature Struct Mol Biol*. 2013;20:99-104.
- 38- Radics J, Konigsmaier L, Marlovits TC. Structure of a pathogenic type 3 secretion system in action. *Nature Struct Mol Biol*. 2014;21:82-7.
- 39- Parsot C, Hamiaux C, Page AL. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol*. 2003;6:7-14.
- 40- Lara-Tejero M, Kato J, Wagner S, Liu X, Galan JE. A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. *Science*. 2011;331:1188-91.



- 41- Hu B. Visualization of the type III secretion sorting platform of *Shigella flexneri*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112:1047-52.
- 42- Alvarez-Martinez CE, Christie PJ. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009;73:775-808.
- 43- Christie PJ, Whitaker N, Gonzalez-Rivera C. Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843:1578-91.
- 44- Trokter M, Felisberto-Rodrigues C, Christie PJ, Waksman G. Recent advances in the structural and molecular biology of type IV secretion systems. *Curr Opin Struct Biol*. 2014;27:16-23.
- 45- Trokter M, Felisberto-Rodrigues C, Christie PJ, Waksman G. Recent advances in the structural and molecular biology of type IV secretion systems. *Current opinion in structural biology*. 2014;27:16-23.
- 46- Zoued A. Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843:1664-73.
- 47- Zheng J, Leung KY. Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. *Mol Microbiol*. 2007;66:1192-206.
- 48- Leiman PG. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:4154-9.
- 49- Basler M, Pilhofer M, Henderson GP, Jensen GJ, Mekalanos JJ. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature*. 2012;483:182-6.
- 50- Ho BT, Dong TG, Mekalanos JJ. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host Microbe*. 2014;15:9-21.
- 51- Leo JC, Grin I, Linke D. Type V secretion: mechanism (s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2012;367(1592):1088-101.
- 52- Junker M, Besingi RN, Clark PL. Vectorial transport and folding of an autotransporter virulence protein during outer membrane secretion. *Molecular microbiology*. 2009;71(5):1323-32.
- 53- Roman-Hernandez G, Peterson JH, Bernstein HD. Reconstitution of bacterial autotransporter assembly using purified components. *eLife*. 2014;3:e04234.
- 54- Ieva R, Tian P, Peterson JH, Bernstein HD. Sequential and spatially restricted interactions of assembly factors with an autotransporter β domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(31):E383-E91.
- 55- Solomonson M. Structure of the mycosin-1 protease from the mycobacterial ESX-1 protein type VII secretion system. *J Biol Chem*. 2013;288:17782-90.
- 56- Houben EN, Korotkov KV, Bitter W. Take five—Type VII secretion systems of *Mycobacteria*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2014;1843(8):1707-16.
- 57- Steadman D, Lo A, Waksman G, Remaut H. Bacterial surface appendages as targets for novel antibacterial therapeutics. *Future Microbiol*. 2014;900-9:887.
- 58- Aiello D, Williams JD, Majgier-Baranowska H, Patel I, Peet NP, Huang J, et al. Discovery and characterization of inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(5):1988-99.
- 59- Tree JJ, Wang D, McNally C, Mahajan A, Layton A, Houghton I, et al. Characterization of the effects of salicylidene acylhydrazide compounds on type III secretion in *Escherichia coli* O157: H7. *Infection and immunity*. 2009;77(10):4209-20.
- 60- Paschos A, Patey G, Sivanesan D, Gao C, Bayliss R, Waksman G, et al. Dimerization and interactions of *Brucella suis* VirB8 with VirB4 and VirB10 are required for its biological activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(19):7252-7.
- 61- Paschos A. An in vivo high-throughput screening approach targeting the type IV secretion system component VirB8 identified inhibitors of *Brucella abortus* 2308 proliferation. *Infect Immun*. 2011;79:1033-43.