

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 ادهزینی، 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 ضمام خارج سلولی چون پیلای تیپ I یا پیلی 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 ترشچی تیپ I یا T1SS، سیستم ترشچی تیپ II یا T2SS، سیستم ترشچی تیپ III یا T3SS، سیستم ترشچی تیپ IV یا T4SS و سیستم ترشچی تیپ VI یا T6SS اشاره نمود و در نهایت مایکوباکتری ها که دارای انولوپ و پوشش شبه گرم منفی هستند، کد کننده سیستم ترشچی تیپ VII یا T7SS هستند که این ماشین ترشچی اغلب محدود به این باکتری بوده و تاکنون در سایر گرم منفی ها دیده نشده است و به دلیل مشخص نبودن دقیق ساختار و مکانیسم عمل آن در هیچ یک از گروه های فوق قرار نگرفته و به صورت مجزا به آن خواهیم پرداخت (۴).

Sec یا General Secretary Pathways

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

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

SecA و باز شدن کانال SecY نشان از اتصال آلواستریکی 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. متعاقبا با اتصال مجدد و ریباندینگ SecA در سیتوزول، 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 پروتئین از سیتوزول 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 سیتوپلاسمیک و نیروی "pulling" تولیدی توسط SecDF در ناحیه جانبی غشای سیتوپلاسمیک است (۱۳، ۱۴).

Tat یا twin-arginine translocation

سیستم ترشچی پروتئین Tat در غشای سیتوپلاسمی بیشتر یوباکتری ها و آرکی باکتری ها وجود دارد و ویژگی اصلی و منحصر به فرد آن انتقال پروتئین های کامل فولد شده است که دقیقا برعکس سیستم Sec می باشد (۱۶،۱۵). 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 (۱۷-۱۹). پروتئین های تولیدی هدف ماشین ترشچی Tat توسط سیگنال پپتیدهایی که شامل یک جفت آرژنین موتیف محافظت شده است شناسایی می شود که دلیل 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 پروتئین بالغ یک جایگاه شناسایی سیگنال پپتیداز

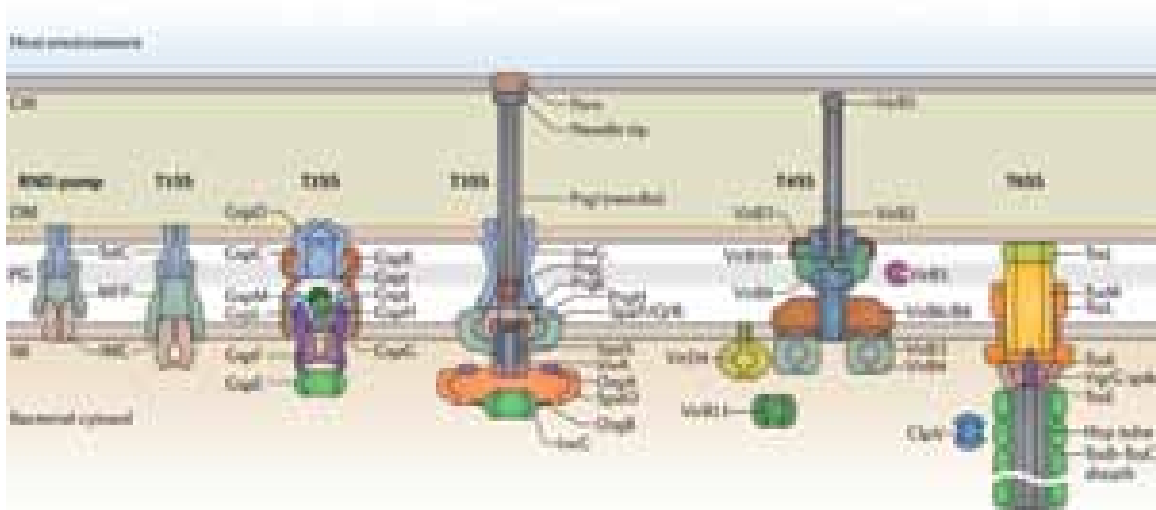
ساختار هومولوگ در عملکردشان می باشد. مطالعات نشان داده که با جایگزینی و تغییر تنها یک آمینواسید در ساختار **TatA** در باکتری اشیریشیا کلی می تواند هر دو عملکرد زیر واحدهای **TatA** و **TatB** را به دست آورد. به علاوه **TatA** در باکتری باسیلوس سوبتیلیس که فاقد زیر واحد **TatB** است می تواند جایگزین برای هر دو 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 تاخوردده 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 میکروارگانیزم 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 ترشچی توانایی انتقال پروتئین های بدون تاخوردگی را دارد. موتور تولید کننده انرژی در سیستم ترشچی **Tat** نیروی محرک پروتونی به نام **PMF** است، البته در برخی میکروارگانیزم ها این انرژی توسط نیروی محرک سدیم تامین می شود (۲۰).

نقل و انتقال سوبسترا توسط مسیر ترشچی **Tat** به خارج فضای سیتوپلاسمیک توسط زیر واحدهای خانواده **TatA** و **TatB** و **TatC** انجام می شود. مشاهدات در برخی از میکروارگانیزم ها نشان می دهد زیر واحدهای **TatA** و **TatC** برای انتقال کافی است ولی این موضوع در تمام میکروارگانیزم 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 ترشچی 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 جزئی 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 فرآیند 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 ترشحي تيب III

سیستم ترشحي تيب III يك نانوماشین دبل ممبران جاسازی شده در باكتري های پاتوژنی چون سالمونلا، شیگلا، یرسینیا، سودوموناس و انتروپاتوژنیک اشريشيا کلی است. این ماشین ترشحي همچنين در ترشح پروتئين 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 باكتري می شود (۳۳). ساختار این ابر ماشین ترشحي شبیه سرنگ بوده لذا با نام های کمپلکس سوزنی یا Injectisome نیز از آن یاد می شود که به طور تقریبی از ۲۵ پروتئين تشکیل شده است (۳۵، ۳۴).

پایه سیستم ترشحي تيب 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 PrgH و PrgK در غشای داخلی قرار دارد. در IM علاوه بر زیر واحدهای فوق پروتئين های SpaP, SpaQ, SpaR, SpaS و Inva وجود دارد که به نظر می رسد در ارتباط با کانال داخل ممبرانی PRGK-PRGH و برخی از پروتئين 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 حدوداً ۵/۷ زیر واحد در هر چرخش را می سازند. این ابعاد باریک قطر داخلی تیوب تنها انتقال سوبسترای تانخورده را ممکن می سازد (۳۸).

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

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

سیستم ترشحي تيب IV

سیستم ترشحي تيب IV یکی از منحصر به فردترین این ابر ماشین های مولکولی ترشحي است که علاوه بر پروتئين، توانایی ترشح DNA به داخل باكتري یا سلول یوکاریوتی را دارد. این سیستم ترشحي هم در باكتري های گرم منفی و هم گرم مثبت و حتی در برخی از آرکی باكتري ها نیز دیده شده است. این سیستم ترشحي 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 ترشحي تيب IV یکی از منحصر به فردترین ویژگی های این سیستم است که در تمام میکروارگانیسم های واجد این مسیر ترشحي دیده می شود. این سیستم ترشحي در فرآیند پاتوژنی باكتري های پاتوژنی چون هلیکوباکتر پیلوری، توکسین های بوردتلا پرتوسیس و لژیونلا پنوموفیلا دخیل است (۴۲).

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

تشکیل دهنده داربست و دستگاه انتقال سوپسترا است در حالی که زیر واحدهای VirB2 و VirB5 تشکیل دهنده پیلوس گسترش یافته به فضای خارج سلولی این سیستم ترشچی است (۴۳، ۴۴). زیر واحد VirB1 یک پروتئین پری پلاسمیک بوده که فرآیند تخریب پپتیدوگلیکان را به منظور سنتز پیلوس سیستم ترشچی برعهده دارد. این سیستم قدرتمند ترشچی 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 ترشچی تیپ IV باعث از کار افتادن نقل و انتقال سوپسترا به خارج باکتری می شود. بررسی های تجربی بر روی باکتری آگروباکتریوم تومفاسینس دو مدل برای انتقال سوپسترا برای سیستم ترشچی 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 سوپسترا 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 طولی شدن پیلی در اثر فعالیت زیر واحدهای VirB11 با VirB4 بوده و پس از آن با فعال شدن زیر واحدهای VirB11 با VirD4 سوپسترای مورد نظر به داخل میزبان تلقیح می گردد (۴۴).

سیستم ترشچی تیپ V

سیستم ترشچی تیپ V که با نام سیستم ترشچی Autotransporter نیز شناخته می شود، به دلیل وجود تنها یک پلی پپتید تشکیل دهنده منفذ ترشچی ساختاری یکتا و بی نظیر دارد. دلیل نامگذاری اتوترانسپورتر نیز به همین دلیل بوده است چرا که مواد مترشحه خود را تنها با یک پلی پپتید به خارج باکتری می راند. سیستم ترشچی تیپ V علاوه بر نقش ترشچی 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 ترشچی تیپ نیازمند وجود ترانسلوکتور SecYEG برای انتقال پلی پپتید اتوترانسپورتر تانخورده از ورای غشای داخلی به فضای پری پلاسمیک می باشد.

سیستم ترشچی تیپ V از یک دامین ترشچی 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 ترشچی همچون سایر سیستم های انتقال دهنده غشای خارجی به وجود گرادیان ATP یا پروتون به عنوان منبع انرژی به منظور انتقال سوپسترا نیاز ندارد (۵۲).

ماشین ترشچی تیپ V به ۵ زیر کلاس A تا E تقسیم می شود. بعد از انتقال سوپسترا 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 سوپسترا از طریق سیستم ترشچی تیپ V شده است (۵۳). کمپلکس Bam که شامل پروتئین ایترنال BamA و ۴ لیوپروتئین BamB, BamC, BamD است در همکاری با پروتئین ترانسلوکتور در ورود بسیاری از مواد به داخل غشای خارجی دخیل است (۵۴).

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

سیستم ترشچی تیپ VI

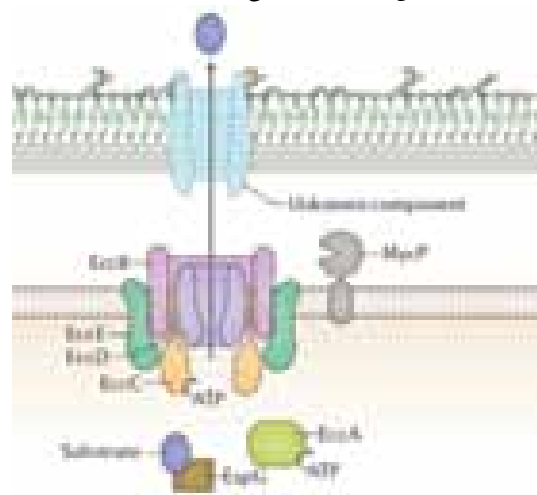
سیستم ترشچی تیپ VI یکی از مسیرهای ترشچی تازه شناخته شده است که از سال ۲۰۰۰ میلادی به بعد اطلاعاتی مبنی بر وجود آن و نوع فعالیتش در انتقال پروتئین های توکسیک به داخل سلول های یوکاریوتی و پروکاریوتی و نقش محوری آن در پاتوژنز برخی از باکتری ها ردیابی و کشف شد. بیشترین دانش ما از این مسیر ترشچی باز می گردد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



و همچنین اجزاء فرعی است (۴۶، ۴۷).

سیستم ترشچی تیپ VI از ۲ کمپلکس اصلی تشکیل شده است: کمپلکس غشایی که شامل پروتئین های داخل غشایی است که هومولوگ اجزا سیستم ترشچی تیپ IV است و دیگری کمپلکس دم که هومولوگ دم های قابل انقباض باکتریوفاژ است (۴۸). کمپلکس Tail در سیستم ترشچی تیپ VI به انولوپ و پوشش سلول به واسطه کمپلکس غشایی لنگر می اندازد. Tail sheath یک ساختمان طویل توبولار است که تقریباً عمود بر غشا قرار گرفته و در عمق سیتوپلاسم باکتری گسترش یافته است (۴۹).

مکانیسم دقیق انقباض Hcp تیوب هنوز ناشناخته باقی مانده است. بر اساس مدل های پیشنهاد شده در سال های اخیر به نظر می رسد به دنبال یک سیگنال خارج سلولی ناشناخته، کنفورماسیون کمپلکس پایه تغییر کرده و باعث انقباض از sheath می شود، که نتیجه آن جابجایی از تیوب Hcp در داخل هترودمیرهای TssB-TssC شده و VgrG spike وارد سلول هدف می شود. عاملی که باعث پرتاب شدن ناگهانی تیوب Hcp به سمت خارج سلول می شود به نظر به دلیل حضور زیر واحدی بنام ClpV است چرا که بررسی ها نشان می دهد در سیستم ترشچی تیپ VI فرانسیسلا که فاقد هومولوگ ClpV است فاقد چنین رفتار دینامیکی است (۴۶، ۵۰).



شکل ۲: نمایی از سیستم ترشچی تیپ VII در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

سیستم ترشچی تیپ VII

سیستم ترشچی تیپ VII جدیدترین ماشین ترشچی بررسی شده در باکتری هاست که تاکنون تنها در ویرولانسی مایکوباکترها همچون مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نقش آن شناسایی شده است. پوشش دیواره مایکوباکترها شامل یک غشای پلاسمایی معادل غشای داخلی گرم منفی ها، یک فضای پری پلاسمیک واجد پپتیدوگلیکان و آرابینوگالاکتان و در نهایت یک کمپلکس ضخیم غشای خارجی واجد پوشش لیپیدی- مومی مایکولیک اسید به نام "mycomembrane" می باشد. سیستم ترشچی تیپ VII برای نخستین بار در سال ۲۰۰۳ شناسایی و به ESX-1 نامیده شد. این ماشین ترشچی توسط لوکوسی در مایکوباکتری ها کد می شود که این لوکوس در سویه های ضعیف شده مایکوباکتریوم بویس به نام "باسیل کالمت و گورین" است که از آن برای ساخت واکسن علیه توبرکلوزیس استفاده می شود. کلاستر ژنی سیستم ترشچی تیپ VII در باکتری های گرم مثبت مختلفی چون استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز و باسیلوس سوبتیلیس شناسایی شده است (۵۶).

سیستم ترشچی تیپ VII یک کمپلکس پروتئین ۱/۵ مگادالتونی است که شامل یک کمپلکس IM محافظت شده و یک دستگاه سیتوزولیک می باشد. کانال هسته IM متشکل از پروتئین های داخل غشایی EccB, EccC, EccD و EccE است که کانال مرکزی غشای داخلی این سیستم ترشچی را می سازد. EccC زیر واحد ATPase سیتوپلاسمیک است. EccD نقش کانال مرکزی این سیستم ترشچی را بازی کرده و در ارتباط با میکوزین MycP، یک پروتئاز غشایی دخیل در پردازش سوبسترا است. در سیتوپلاسم باکتری ۲ پروتئین فرعی به نام های EccA که یک ATPase داخل سیتوپلاسمی و دیگری EspG که به سوبسترا متصل شده و نقش چاپرونی را ایفا می کند، تسهیل کننده ترشح سوبسترا است. شناخت ما از این سیستم ترشچی جدید الکشف هنوز در مراحل ابتدایی خود است و ندانسته های زیادی در این سیستم ترشچی وجود دارد که چشم انتظار بررسی های آینده است (۵۵).

سیستم ترشحي و مواد آنتی باکتریال

بی شک آنتی بیوتیک ها یکی از موثرترین، موفق ترین و کم هزینه ترین کلاس دارویی است که برای درمان بیماری ها در دسترس قرار دارد. در سال های اخیر استفاده کنترل نشده از آن ها منجر به ایجاد پاتوژن های multidrug resistant شده است که زنگ خطر انقضاء آنتی بیوتیک های قدیمی را به صدا درآورده و جهان را نیازمند ابداع داروهای نوین و گسترش درمان های جدید برای مبارزه با این دست باکتری های عفونی کرده است (۵۷).

از این میان کلاس های متعددی از ترکیبات شیمیایی و اثر آن بر روی سیستم ترشحي تیپ III بررسی شده است. اگر چه مکانیسم فعالیت بیشتر این مولکول های شیمیایی فاش نشده و شاید دست نیافتنی باشد، ولی اثر آن ها بر روی سیستم ترشحي تیپ III توسط پژوهشگران به اثبات رسیده است. Phenoxycetamides و benzimidazoles اثرات مهاری علیه *Pseudomonas aeruginosa* و *Yersinia pseudotuberculosis* از خود نشان داده اند. بررسی ها از اثر مهار کنندگی salicyllydene acylhydrazides بر روی این سیستم ترشحي در بسیاری از باکتری های گرم منفی حکایت دارد. Thiazolidinones باعث کاهش تعداد کمپلکس سوزنی سیستم ترشحي تیپ III در سالمونلا تیفیموریم شده و همچنین اثراتی بر روی سیستم ترشحي تیپ II در سودوموناس ها می گذارد که به نظر به خاطر وجود پروتئین سکرترین مشترک در این دو سیستم ترشحي است. عمده مشکل ما در کاربرد این مواد مهاری مکانیسم عمل آن ها است که دست پژوهشگران را در استفاده از آن ها به عنوان داروی درمانی بسته می گذارد (۵۸، ۵۹).

علاوه بر اثر مواد مهاری بر روی سیستم ترشحي تیپ III اثر این مواد بر روی 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 وخیمی را بر روی عملکرد سیستم ترشحي تیپ IV در بروسلا سوئیس دارد. همین دستاورد عاملی بر بررسی اثر ۳۰۰۰۰ ترکیب مهار کننده و شناسایی ۴۸ ترکیب مهاری سیستم ترشحي تیپ IV به کمک دیمیریزاسیون VirB8 در بروسلا آبورتوس شود. یکی از این ترکیبات B81-2 بوده که باعث مهار رشد داخل سلولی بروسلا آبورتوس در ماکروفاژها شده است (۶۱، ۶۰).

بحث و نتیجه گیری

دانش امروز ما از سیستم های ترشحي برآیند بیش از ۷۴ سال پژوهش دانش پژوهان مختلف در این باره است. شناسایی و بررسی ابعاد جدید و پیچیده این نانوماشین های ماکرومولکولی ما را با ابعاد جدیدی از پاتوژن باکتری ها آشنا ساخت و نشان داد سیستم های ترشحي تا چه میزان برای بقا و آدپته شدن میکروارگانیسم های مختلف با محیط اطرافشان اهمیت دارد. اهمیتی که جرقه تولید نسل جدیدی از داروها، واکسن ها و آنتی ویروالنت های میکروبی شده است. جرقه ای که پشتوانه آن وجود پیشرفت های گسترده درک ما از ساختار مولکولی این ماشین های ترشحي باکتریال است. دانش پژوهان امیدوارند که دانش بنیادی گسترده دیروز تا امروز بتواند پلی باشد برای رسیدن به یک محصول زیستی کارا برای مصارف درمانی در آینده تا بتواند پاسخگوی مقاومت دارویی چند دهه اخیر میکروارگانیسم ها باشد. دانستن مکانیسم و ساختار این سیستم های ترشحي برای رسیدن به استفاده ای کاربردی از آن ها امری است ضروری تا بتوان بر روی دانش بنیادین حاصله از گذشتگان، پلی برای رسیدن به دانش کاربردی آینده زد، ولی با وجود گسترش دانش ما از سیستم های ترشحي هنوز سوالات زیادی در این باره بی پاسخ باقیمانده است. سوالاتی که بدون رسیدن به پاسخ آن ها، عملا به کارگیری از این دانش برای حصول نتیجه کاربردی به عنوان کاندید دارو و واکسن بی 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 SecE. *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 luminal 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- Abruscì 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, Konigsmair 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.