Downloaded from labdiagnosis.ir at 12:03 +0330 on Monday January 21st 2019

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

● رضا بهلولی خیاوی

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

meshkinlab@yahoo.com

● اسماعیل نوری زاده

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

esmailnourizadeh@gmail.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 مکانیزم‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی را در بر می گیردکه هم در سلول میزبان و هم در سلول باکتریایی وجود دارند. در این مطالعه مروری، بر پروتئین هایی که در کنش و واکنش بین Bartonella bacilliformis و سلول میزبان دخالت دارند تمرکز شده است. تعدادی از این پروتئین ها می‌توانند 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

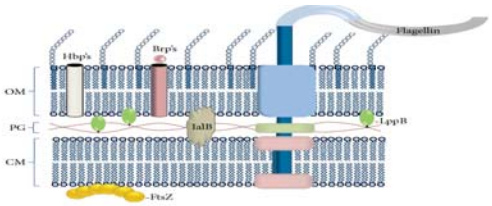
بارتونلا باسیلی فورمیس عضوی از زیر گروه آلفا ۲ از پروتئوباکتری ها بوده و عامل بیماری در بیماران به صورت Carri'on یا تب Oroya می باشد. B. bacilliformis برای اولین بار در سال ۱۹۵۰ توسط آلبرتو بارتون توصیف شد. پژوهش های متعددی در این مورد انجام شده که مطالعات بالینی و تجربی را نیز شامل می شود. در ۲۵ سال گذشته، مسلما 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

Downloaded from labdiagnosis.ir at 12:03 +0330 on Monday January 21st 2019

تعامل B. bacilliformis با میزبان تاکید دارد. ما فرض می کنیم که پروتئین های خاصی می توانند کاندیدهایی ایده آل از نظرآنتی 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- پاتوژنز و بیماریزایی باکتری

B. bacilliformis توسط نیش پشه خاکی فلبوتومینه که 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 verruga 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.



شکل ۱: آنتی ژن پروتئین های مختلف ب. باسیلی فورمیس و جایگاه آن ها در سلول:
Brp's= پروتئین ها تکرار بارتونلا، FtsZ = پروتئین تقسیم سلول Hbp's =hemin-binding پروتئین، IalB= invasion-associated locus B پروتئین، LppB= لیپوپروتئین ب، OM= غشای خارجی، PG= پپتیدوگلیکان، CM= غشای سیتوسولیک (فرآیند غشایی)

❑ ۳- پروتئین های کاندید برای توسعه واکسن بارتونلوزیس

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 درداخل 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 درآزمایش 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 می‌یابد و دارای اتصال ضعیفی از تحرک های ضعیف مختلف می باشد. این داده ها نشان می دهند که تاژک‌ها موجب اتصال قوی باکتری به گلبول قرمز می شوند و یا ارتباط بین سلول‌های میزبان و باکتریایی را افزایش می‌دهند. با

Downloaded from labdiagnosis.ir at 12:03 +0330 on Monday January 21st 2019

در نظـــر گرفتن کاهش قابل توجـــه در عفونت گلبول قرمز به دلیل آنتـــی بادی‌های ضد flagellin، این پروتئین یک آنتی ژن امیدوار کننده برای اســـتفاده در واکسن زیر واحد قوی خواهد بود.

۳-۲- Brps (Bartonella repeat proteins)

بارتونـــلا به انواع مختلفی از ســـلول هـــای یوکاریوتی از طریـــق اتصال به پروتئین های اتوترانســـپورتر 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 شـــده اند که برای خارج کردن ترکیبات انتقالی هدف به خارج از غشای سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرند. B. bacilliformis دارای ســـه ژن کد کننده brp است که قـــدرت تکثیر پروتئین های بارتونـــلا را دارد(Brps). پروتئیـــن هـــای Brp بارتونـــلا باســـیلی فورمیس دمین های مشـــترک و خصوصیات ساختاری مشابه با TAAS نشـــان می دهنـــد. در حالی که نقـــش پروتئین های Brp بارتونلا باســـیلی فورمیس هنوز بررســـی نشـــده اســـت و ممکن اســـت در فرآیند های بیولوژیکی مشـــابهی از جمله اتوآگلوتیناســـیون، اتصال به ســـلول های میزبان، پروتئین های ماتریکس خارج ســـلولی (فیبرونکتین و کلاژن)، مهار فاگوسیتوز و القاء پاسخ proangiogenic در سلول های میزبـــان به عنوان پروتئین های TAA از بارتونلا باســـیلی فورمیس و بارتونلا کوئینتانا حضور داشته باشند.

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

محل تهاجمی پروتئین B (IalB) (شـــکل ۲) در اصل از طریـــق غربالگری کتابخانه ژنومـــیB. bacilliformis برای ســـویه های مهاجـــم اوکاریوتیـــکE. coli میزبان کشف شـــد. IalB دارای اثر قابل توجهی بر افزایش حمله B. bacilliformis بـــه گلبول قرمز می باشـــد. ممکن اســـت که تغییرات محیطی در حین انتقال باکتری از پشه خاکی به انسان (مانند تغییر در درجه حرارت، در دسترس بـــودن آهن و pH) روی بیـــان ژن IalB اثر بگذارد. در تحقیقات دیگر، ســـطح پروتئین IalB با تغییر درIalB و تغییرات دما یا pH در مرحله رشد در ارتباط بود. بیشترین میزان حضور ialB در بارتونلا باسیلی فورمیس زمانی است که PH اســـیدی برابر ۵ و درجه حرارت رشـــد ۲۰ درجه ســـانتی‌گراد و یا تغییرات درجه حرارت پایین از ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی گراد باشد.

همانطوری که سطح IalB mRNA یعنی مقدار پروتئین IalB در بارتونلا باســـیلی فورمیس در پاســـخ به pH=8 و یا کاهش ســـریع دما به ۳۷ درجه، کاهش یافته اســـت. احتمالا در موقع خونخواری توســـط حشـــرات، B. bacilliformis دســـتخوش یک تغییر دمـــا از 37°C بـــه20°C می گردد. همزمـــان با تغییر حداقل دما، بیـــان IalB باکتری زمانی که حشـــرات خونخواری بعدی را انجام می‌دهند تنظیم می‌گردد. تغییرات pH همچنین در معده پشه خاکی هم اتفاق می افتد (افزایـــش کمتر PH به ۷/۴) که احتمـــالا در آن بیان IalB تنظیـــم می گردد. وقتی که باکتری از پشـــه خاکی ناقل وارد میزبان انســـانی 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 شـــرایط کمتر تنظیم می گردد ولی از بین نمی رود. بدون شک، دیگر عوامل باکتریایی هم در پایبندی و تهاجم به گلبول قرمز دخیل می باشـــند. IalB در قسمت غشای داخلی باســـیلی فورمیس قرار دارد که بعید به نظر می رسد در آن محل با گلبول قرمز در ارتباط بوده باشد. در مقابـــل همولوگ IalB از باتونلا هنســـله در هر دو بخش داخلی و خارجی غشـــای باکتری قرار دارد. معلوم نیســـت که این پروتئین ناقل مبدل ســـیگنال در حمله گلبول قرمز انسان هست یا نه و مکانیزم عمل ناشناخته مانده است.

Downloaded from labdiagnosis.ir at 12:03 +0330 on Monday January 21st 2019

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 ۷۵ کیلو دالتون و ۶۵ کیلو دالتون پروتئین) که در اوایل بررسی روی این باکتری شناسایی شده اند. علاوه بر این انتهای C در FtsZBb شامل یک ناحیه ۲۵۶ آمینواسیدی است که غیر معمول بوده و در ارتباط با باکتری Rhizobium meliloti پیدا شده است. در نتیجه، FtsZ تقریبا دو برابر بزرگ تر از سایر همولوگ‌های 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 ۱۱/۲ تا ۷۵/۳ کیلو دالتون شناسایی کرده است. سه تا از این پروتئین ها (۴۲،۳۱/۵ و ۴۵ کیلو دالتون) وقتی در معرض سرم خرگوشی با ایمنی بالا قرار داده شدند خاصیت رسوب زایی ایمنی افزایش یافت. Iwaki-Egawa و Ihler شش پروتئین باسیلی فورمیس که واسطه واکنش بین باکتری و گلبول های قرمز بودند را شناسایی کردند (۱۰۰، ۹۲ ، ۸۴ ، ۴۶ ، ۳۷ و۱۲ کیلو دالتونی). یک لیپو پروتئین ایمنی زای ۴۳ کیلو دالتونی از باسیلی فورمیس از طریق غربالگری ژنومی DNA کتابخانه ای لامبادا شناسایی گردید. این پروتئین یک هومولوگ از پروتئین هایLppB گونه های هموفیلوس و پروتئینNlpD از E. coli است و در نتیجه LppB تعیین شد. لیپوپروتئینLppB به احتمال زیاد شبیه به مسیرهای بیوسنتز لیپوپروتئین باکتریایی دیگر سنتز می‌شود. افزایش ایمنی زایی پروتئین ها نشان می داد که سرم ۵ 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 ۳ پروتئین، گیلیکوفورین A و گلیکوفورین B می باشد. باند ۳ 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 ۳ 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 همولوگ های باکتریوفاژها Pap31، از پروتئین های بارتونلا هنسله و ۵ 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 داده‌ها 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. پروتیئن های HBP (Pap31) آنتی ژن‌های 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، همولوگ HbpE از Quintana B. یک آنتی ژن معمولا 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.

Downloaded from labdiagnosis.ir at 12:03 +0330 on Monday January 21st 2019

❑ ۴- نتیجه گیری

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 کاریون 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 تاثیر قابل توجهی که شیوع بارتونلوزیس برای جمعیت های آسیب پذیر در جنوب آمریکا دارد. بیماری کاریون 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.

References

1- Cesar Henriquez-Camacho, Palmira Ventosilla, Michael F.Minnick,Joaquim Ruiz, and CiroMaguiña: 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: bartonelloses 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 antiflagellin 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 Balgonella 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 backteriophage 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.

Downloaded from labdiagnosis.ir at 12:03 +0330 on Monday January 21st 2019