

توکسین های شیگلا دیسانتری (شیگا توکسین)

● مهدی حسین زاده

گروه پزشکی مولکولی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران



● جاوید تقی نژاد

گروه میکروبیولوژی، واحد ملکان، دانشگاه آزاد اسلامی، ملکان، ایران

jataghinejad@gmail.com



چکیده

مثل سندرم همولیتیک اورمیک (HUS)، ترومبوسیتوپنی، کم خونی همولیتیک و نارسایی کلیه می شود (۳). بعدها نشان داده شد که برخی از سویه های اشریشیا کلی یک سم بسیار مرتبط به نام Stx2 تولید می کنند که عملکردی مشابه با Stx/Stx1 دارد، اما از نظر ایمونولوژیکی متمایز می باشد. Stxs (همچنین به عنوان سموم Vero و قبلاً به عنوان سموم شیگا مانند شناخته می شد). گروهی از سموم پروتئین AB₅ باکتریایی حدود ۷۰ کیلو دالتون هستند که سنتز پروتئین را در سلول های یوکاریوتی حساس مهار می کنند. سنتز پروتئین توسط Stxs از طریق حذف یک باقی مانده آدنین از 28S rRNA ریبوزوم 60S مسدود می شود. فعالیت N-گلیکوزیداز سم در زیر واحد A قرار دارد. پنتامر زیر واحدهای B واسطه اتصال سم به گیرنده سلولی گلوبوتیاوسیل سرامید (Gb₃) است. ژن های زیر واحد در یک اپرون A با ژن زیر واحد ۵ نسبت به زیر واحد B کدگذاری می شوند، که اپرون stx معمولاً در توالی یک باکتریوفاژ القایی، لیزوژنیک و لامبدا مانند یافت می شود (۴).

تا به امروز هیچ گونه ای از Stx که توسط Shigella تولید می شود شرح داده نشده است، اما Stx گاهی در S. sonnei و تیپ IV در S. dysenteriae یافت می شود (۵). تنها دو نوع Stx1a شناسایی شده است: Stx1c و Stx1d. هر دو Stx1c و Stx1d را می توان از نظر ایمونولوژیکی از Stx1 متمایز کرد (۶). Stx1c و Stx1d به ندرت در بیماری های انسانی یافت می شوند و هنگامی که با StEC جدا شده از بیماران همراه باشند، با یک دوره بیماری خفیف مرتبط

سویه های شیگلا دیسانتری یک اگزوتوکسین به نام توکسین شیگا آزاد می کنند که همانند توکسین شیگا تولید شده توسط اشریشیا کلی انتروهموراژیک می باشد. سم Stx توسط فاژ کد می شود به دو زیر گروه Stx1 و Stx2 دسته بندی می گردد. سم Stx2 بیشتر از انسان جدا سازی شده است. درمان آنتی بیوتیکی باکتری های تولید کننده Stx مرسوم نیست چون بیان هر دو توکسین را القاء می کند و اجازه می دهد تا انتشار یابند. به نظر نمی رسد Stx به طور فعال از سلول منتقل شود. Stx یک توکسین AB₅ است که زیر واحد B واسطه اتصال به گلیولپید غشایی گلوبوتریوزل سر آمید (Gb₃) است. زیر واحد B اندوسیتوز را در غشاء پلاسمایی القاء می کند. تجمع وزیکول ها در نزدیک اندوزوم در سلول حساس به توکسین باعث می شود که Stx از مسیر اندوسیتوزی جدا شود. هدف از مطالعه مروری حاضر بررسی توکسین های شیگلا دیسانتری و اشریشیا کلی انتروهموراژیک و مکانیسم عمل آن می باشد.

کلید واژه ها: شیگلا توکسین، سم Stx، اشریشیا کلی انتروهموراژیک

مقدمه

شیگلا دیسانتری و سم Stx در قرن ۱۹ توسط نایسر و کیوشی شیگا و کنرادی شناسایی و کشف شد (۱ و ۲). تقریباً ۸۰ سال بعد از کشف و شناسایی سم شیگلا، در گروهی از ایزوله های اشریشیا کلی سم Stx1 شناسایی گردید. این باکتری ها باعث اسهال خونی و عواقب جدی

هستند (۷).

اصطلاح اشرشیاکلی تولید کننده سم شیگا (StEC) به یک سویه اشرشیا کلی اشاره دارد که ظرفیت تولید سم شیگا را از طریق انتقال ژن توسط یک فاژ تولید سم شیگا (Shiga-toxin/Stx) به دست آورده است. همه StECها نمی‌توانند انسان را آلوده کنند و تنها زیر مجموعه‌ای از آن‌ها مسئول بیماری‌های انسانی هستند و به پاتوژنی به نام اشرشیا کلی انتروهموژائیک (EHEC) تعلق دارند (۸). هدف از مطالعه حاضر بررسی مروری به سموم تولید توسط شیگلا دیسانتری و اشرشیا کلی انتروهموژائیک و مکانیسم اثر آن در انسان می‌باشد.

□ انتروتوکسین شیگلا (St)

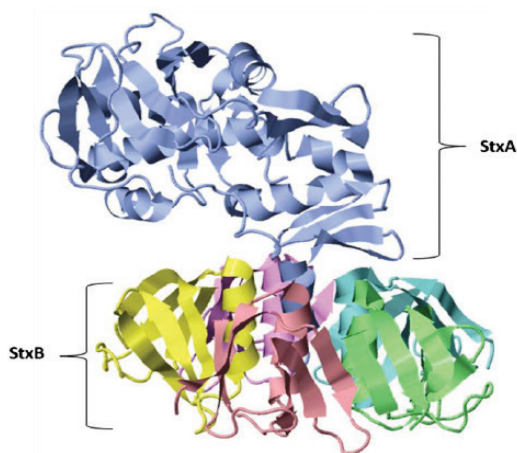
قبلاً دانشمندان فکر می‌کردند که شیگا توکسین منحصرأً توسط شیگلا دیسانتری تولید می‌شود. اما امروزه معلوم شده است که شیگا توکسین‌ها خود خانواده‌ای از سموم دو زیر واحدی A و B را تشکیل می‌دهند، که دارای شباهت‌های عملکردی و ساختاری زیادی هستند. این خانواده توکسین شامل خود شیگا توکسین و دیگر اعضای این وابسته به آن‌ها است. شیگا توکسین Stx توسط شیگلا دیسانتری تولید می‌شود در حالی که توکسین‌های شبه شیگا یا Stx1 و Stx2 توسط باکتری اشرشیا کلی انتروهموژائیک (EHEC) و اشرشیا کلی انترو توکسینوژنیک (ETEC) تولید می‌شود (۹).

Stx1 تقریباً با Stx یکسان است و فقط در یک اسید آمینه تفاوت دارد. Stx2 تقریباً ۶۰٪ با Stx شباهت دارد. Stx1 و Stx2 از نظر ایمنی زایی و بعضی اعمال با هم متفاوت‌اند. ولی ایزوفرم‌های Stx عملکرد و مسیر عمل یکسان دارند. توکسین Stx2 در باکتری اشرشیا کلی سویه O157:H7 تولید می‌شود که عامل اسهال‌ها و دیسانتری‌های متعددی در سطح جهان است. باکتری‌های تولید کننده این خانواده از توکسین‌ها دارای ویژگی‌های ساختاری و فیزیولوژیک مشابهی هستند (۱۰).

هولو توکسین دارای هر دو زیر واحد A و B است (شکل ۱). اثرات متفاوتی از این توکسین دیده شده است از این اثرات می‌توان به اثر سیتوتوکسیک، انتروتوکسیک

و نوروتوکسیک اشاره کرد. این سم نظر محققان را برای ساخت واکسن به خود جلب کرده است. کشف این سم توسط آقای تود در ۱۹۴۰ صورت گرفت، او این نکته را فهمید که فقط سرروتیپ I از شیگلا دیسانتری می‌تواند ایجاد فلج اندام کند. ژن شیگا توکسین روی کروموزوم قرار دارد. شیگا توکسین برای ویرولانسی شیگلا ضروری نیست اما اثرات بیماری را شدت می‌دهد یکی از اثرات مهم انتروتوکسین وجود خون در اسهال و ایجاد حالت دیسانتری است. اثرات انتروتوکسیکی این سم با اتصال به گیرنده سطح سلولی در سلول‌های روده کوچک شروع می‌شود که سبب عدم جذب الکترولیت‌ها، گلوکز و اسیدهای آمینه می‌شود. اثرات سیتوتوکسیکی آن با اتصال به گیرنده‌اش Gb₃ (نوعی گانگلوزید) در روده بزرگ و مهار سنتز پروتئین با غیر فعال سازی زیر واحد 60S ریبوزوم صورت می‌گیرد که سبب مرگ سلولی و آسیب به مویرگ‌های روده و خونریزی می‌شود. اثرات نوروتوکسیکی شیگا توکسین با تب کرامپ‌های شکمی و فلج اندام‌ها توأم است (۱۱).

توکسین شیگا Stx یک پروتئین هگزامر با وزن مولکولی ۷۰/۵ کیلو دالتون بوده که از یک زیر واحد منومریک سمی و آنزیماتیک به نام StxA و از یک زیر واحد متصل شونده به رسپتور هموپنتامریک به نام StxB تشکیل شده است. قسمت غیر سمی StxB برای ورود و عملکرد قسمت سمی یا StxA ضروری می‌باشد (۱۰). در ادامه به شرح خصوصیات هر یک از این اجزا به طور کامل می‌پردازیم.



شکل ۱: ساختار شیگا توکسین



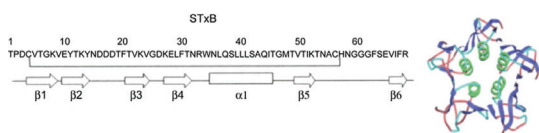
□ خصوصیات قسمت StxA

ناحیه StxA دارای وزن مولکولی در حدود ۳۲ کیلو دالتون بوده که خود از دو قطعه که با پیوند کووالانس به هم متصل شده‌اند: قطعه اول A1 نام دارد که وزن آن در حدود ۲۸ کیلو دالتون بوده و قطعه دوم به نام A2 دارای وزنی در حدود ۴ کیلو دالتون می‌باشد. ناحیه انتهایی C از قطعه A2 (C ترمینال A2) مسئول برهمکنش زیر واحد StxA با قسمت StxB این توکسین می‌باشد. در این برهمکنش زیر واحدهای آمینو اسیدی Leu 286 و Leu 282, Gly 283, Ala 284, Ile 285 و Met 287 با نفوذ به درون قسمت StxB نقش اساسی دارند و سبب گردهمایی زیر واحدهای A و B این توکسین می‌گردند. قسمت A1 از StxA ناحیه سمی و آنزیماتیک محسوب می‌شود و همان طور که در ادامه خواهیم دید با مکانیسمی خاص سبب مهار سنتز پروتئین می‌گردد (۱۱).

□ خصوصیات قسمت StxB

StxB ساختار هموپنتامریک (۵ زیر واحد) دارد که از ۵ UTR منومر کاملاً یکسان تشکیل شده است. هر منومر آن از ۲۷۰ نوکلئوتید و ۶۹ اسید آمینه تشکیل شده و وزن مولکولی حدود ۷/۷ کیلو دالتون دارد. هر منومر از یک مارپیچ آلفا^۱ و ۶ صفحه β^۲ تشکیل شده است. این ۵ منومر به طریقی تاخوردگی پیدا می‌کنند که صفحات β در سطح خارجی و مارپیچ‌های آلفا در داخل قرار می‌گیرند و ساختار حلقه مانندی را تشکیل می‌دهند (شکل ۲). مطالعات اخیر نشان داده است که بر خلاف گذشته که دانشمندان ناحیه StxB را قسمت کاملاً غیر سمی می‌پنداشتند، این قسمت دارای اندازه ناچیزی خاصیت سمی می‌باشد یعنی با اثر شکافتی بر DNA سلول هدف باعث القاء آپوپتوز از طریق فعال کردن کاسپازهای ۳، ۶ و ۸ در مسیر آپوپتوز می‌گردد. از طرفی باعث کاهش در بیان فاکتور حیاتی سلول‌های

B^۳ و افزایش بیان لیگاند القاء کننده آپوپتوز وابسته به TNF^۴ می‌گردد که با آزاد شدن یون‌های کلسیم از ER دنبال می‌شود. اما چون اثرات سمی این قسمت ناچیز بوده به همین علت نادیده گرفته می‌شود و از آن به عنوان قسمت غیر سمی یاد می‌شود. این ناحیه به کمک قسمت C ترمینال A2 به قسمت StxA با پیوند غیر کووالان متصل می‌گردد و باعث ورود این ناحیه به درون سلول می‌شود (۱۱).



شکل ۲: ساختار سه بعدی و توالی آمینواسیدی StxB هر منومر StxB از ۶۹ اسید آمینه تشکیل شده و وزن مولکولی حدود ۷/۷ کیلو دالتون دارد.

□ گیرنده سطح سلولی شیگا توکسین

StxB به گیرنده سطح سلولی خود به نام Gb₃ متصل می‌گردد که روی اکثر سلول‌های بدن بیان می‌شود [۱۲]. Gb₃ یا GSLs: یک گلیکو اسفنگولیپید (گلیوتریوزیل سرآمید) است که در برخی از مقالات از آن تحت عنوان CD77 نام برده شده است (۱۲). مطالعات اشعه X و کریستالوگرافی نشان داد که هر کدام از مونومرهای StxB دارای ۳ جایگاه پیوندی Gb₃ است، یعنی از نظر تئوری هر مولکول StxB می‌تواند به ۱۵ تا Gb₃ متصل شود (شکل ۳). مطالعات به کمک تکنیک NMR معلوم کرد که تنها یکی از این جایگاه‌ها برای تجمع و اتصال StxB به Gb₃ دارای اهمیت است. بالاخره به کمک تکنیک جهش زایی آشکار گردید که جهش در Phe30 در جایگاه II - باعث حذف اتصال می‌گردد (۱۳).

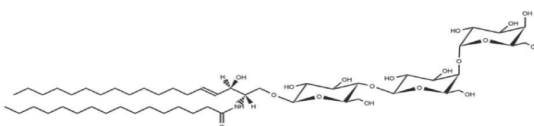
به هر حال تعامل بین StxB و Gb₃ نیاز به ترکیبی از

- 1- α helix
- 2- β sheet
- 3- B1c-2
- 4- TRAIL



گونه‌های Gb_3 با طول‌های متفاوتی از زنجیره اسید چرب در بخشی از ستون فقرات سرامیدشان دارد که برای اتصال بهینه هر سه جایگاه اتصال مورد نیاز است. ثابت اتصال (Kd) برای $Gb_3 - StxB$ در حدود ۹-۱۰ در غشاء پلاسمایی است. بر همکنش لیپید - پروتئین نیز ممکن است به اتصال $StxB$ به گیرنده و اتصال گیرنده به غشاء کمک کند و از این لحاظ دارای اهمیت است. قدرت این اتصال متغیر بوده و با تغییر طول زنجیره آسیل یا درصد اشباع بودن لیپیدها تغییر می‌کند. مطالعات نشان می‌دهد که در محیط محلول فرم تاخورد پنتامریک به همراه فرم تا نخورده^۵ منومریک پایدار است و منومرهای تاخورد به تنهایی پایدار نیستند (۱۳).

همان طور که گفته شد Gb_3 روی اکثر سلول‌های بدن بیان می‌شود با این حال مطالعات نشان داده است که بیان Gb_3 در سطح سلول‌های سرطانی انسان فراوانی بسیار زیادی دارد. Gb_3 بیان زیادی در سطح سلول‌های سرطانی مثل لنفوما، کارسینوماهای تخمدان، سینه و کولون دارد. همچنین این فراوانی در سطح سلول‌های دندریت (DC) انسانی و موش نیز دیده می‌شود (۱۴).



شکل ۳: ساختار مولکولی Gb_3 ، یک گلیکواسفنگولیپید (گلبوتریوزیل سرآمید) است

پس از اندوسیتوز، Stx به کمک وزیکول‌های کلاترینی به سمت شبکه ترانس دستگاه گلژی (TGN) روانه و یک شکافت پروتئولیتیکی به کمک فعالیت آنزیماتیک فورینی در ناحیه Cyc 242-Cyc 261 در این سم انجام می‌شود که برای فعالیت قسمت A1 ضروری است. ولی دو قطعه A1 و A2 از هم جدا نمی‌شوند و قطعه فعال آنزیمی A1 با پیوند دی‌سولفیدی به قطعه A2 متصل باقی می‌ماند و از TGN سم شیگا توسط وزیکول‌های پوشش دار COPI به ER نقل و مکان می‌کنند. علی‌رغم اینکه اکثر سموم کلاس AB برای انجام انتقالات درون سلولی خود به توالی KDEL وابسته‌اند، ترافیک درون سلولی Stx مستقل از این توالی می‌باشد. پس از ورود Stx به درون لومن ER دو قطعه A1 و A2 از هم جدا می‌شود، این سم با یک کمپلکس پیش ساز چند چارونی متشکل از پروتئین‌های HEDJ Bip و یک پروتئین تنظیم کننده گلوکز ۹۴ کیلو دالتونی (GRP94) متصل می‌شود. در این حالت این پروتئین تاخوردگی خود را از دست داده و به اصطلاح آنفولد می‌شود، در این حالت Stx به عنوان یک پروتئین با تاخوردگی اشتباه توسط شبکه اندوپلاسمی شناسایی می‌شود و به درون سیتوزول ترشح می‌گردد. این کار احتمالاً توسط کمپلکس SecE1 انجام می‌گیرد. تمامی پروتئین‌هایی که دارای تاخوردگی اشتباه هستند در سیتوزول توسط پروتئازوم تجزیه می‌گردند، اما چون Stx فاقد زیر واحد لیزین بوده نمی‌تواند یوبیکوئیتینه شود بنابراین پروتئازوم قادر به تخریب Stx نبوده و از این طریق از تخریب در سیتوزول محافظت می‌گردد. عمل گلیکوزیلاسیون در ER برای تسهیل این فرآیند ضروری می‌باشد (۱۵).

نتیجه گیری

Stx ها سموم قوی مرتبط با اسهال خونی و سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) است و همچنان یک نگرانی بهداشت جهانی است. Stx به عنوان ریبوتوکسین عمل می‌کند که سنتز پروتئین را در سلول متوقف و آپوپتوز را القا می‌کند، اما می‌تواند باعث تغییر بیان ژن یا پروتئین در سلول‌های اپیتلیال، سلول‌های اندوتلیال، مونوسیت‌ها و سلول‌های مزانژیالی گردد.

ورود شیگا توکسین به درون سلول و ترافیک درون سلولی آن

ورود شیگا توکسین به درون سلول میزبان از طریق مکانیسم سیستم انتقال معکوس صورت می‌گیرد. پس از اتصال Stx به گیرنده‌اش Gb_3 در بافت‌های لیپیدی در غشاء سلول‌های میزبان اندوسیتوز آغاز می‌شود. این اندوسیتوز به کمک پروتئین‌های پوششی مثل کلاترین یا کاتولین صورت می‌گیرد.



References:

- 1- George JN, Nester CM. Syndromes of thrombotic microangiopathy. *New England Journal of Medicine*. 2014; 371(7):654-66.
- 2- Trofa AF, Ueno-Olsen H, Otiwa R, Yoshikawa M. Dr. Kiyoshi Shiga: discoverer of the dysentery bacillus. *Clinical infectious diseases*. 1999; 29(5):1303-6.
- 3- Loirat C, Fakhouri F, Ariceta G, Besbas N, Bitzan M, Bjerre A, Coppo R, Emma F, Johnson S, Karpman D, Landau D. An international consensus approach to the management of atypical hemolytic uremic syndrome in children. *Pediatric nephrology*. 2016; 31:15-39.
- 4- Scully M, Cataland S, Coppo P, De La Rubia J, Friedman KD, Hovinga JK, Lämmle B, Matsumoto M, Pavenski K, Sadler E, Sarode R. Consensus on the standardization of terminology in thrombotic thrombocytopenic purpura and related thrombotic microangiopathies. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2017; 15(2):312-22.
- 5- Wick LM, Qi W, Lacher DW, Whittam TS. Evolution of genomic content in the stepwise emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of bacteriology*. 2005; 187(5):1783-91.
- 6- Ogura Y, Ooka T, Iguchi A, Toh H, Asadulghani M, Oshima K, Kodama T, Abe H, Nakayama K, Kurokawa K, Tobe T. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009; 106(42):17939-44.
- 7- Luna-Gierke RE, Griffin PM, Gould LH, Herman K, Bopp CA, Strockbine N, Mody RK. Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA. *Epidemiology & Infection*. 2014; 142(11):2270-80.
- 8- Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of clinical microbiology*. 2012; 50(9):2951-63.
- 9- Gupta SK, Strockbine N, Omondi M, Hise K, Fair MA, Mintz E. Emergence of Shiga toxin 1 genes within *Shigella dysenteriae* type 4 isolates from travelers returning from the Island of Hispanola. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2007; 76(6):1163-5.
- 10- Kumar A, Taneja N, Kumar Y, Sharma M. Detection of Shiga toxin variants among Shiga toxin-forming *Escherichia coli* isolates from animal stool, meat and human stool samples in India. *Journal of applied microbiology*. 2012; 113(5):1208-16.
- 11- Odumosu, O., et al., "AB toxins: a paradigm switch from deadly to desirable". *Toxins*, 2010. 2(7): p. 1612-1645.
- 12- Johannes, L. and W. Römer, "Shiga toxins—from cell biology to biomedical applications". *Nature Reviews Microbiology*, 2010. 8(2): p. 105-116.
- 13- Pina, D.G. and L. Johannes, "Cholera and Shiga toxin B-subunits: thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications". *Toxicon*, 2005. 45(4): p. 389-393.
- 14- Engedal, N., et al., "Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging". *Microbial biotechnology*, 2011. 4(1): p. 32-46.
- 15- Hassan A. Almoustafa, Mohammed A. Alshawsh, Zamri Chik. Review Article: "Technical aspects of preparing PEG-PLGA nanoparticles as carrier for chemotherapeutic agents by nanoprecipitation method". *International Journal of Pharmaceutics*. 2017: 275-284.

