سیستم های ترشحی در باکتری ها

• دکتر حبیب ضیغمی

استادیار باکتری شناسی پزشکی، مدیرگروه 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، پلی‌پپتیدها، 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 ٦ سیستم ترشحی شناخته شده در باکتری های گرم منفی (از I تا VI)، سیستم ترشحی تیپ VII شناسایی شده در مایکوباکتریوم ها، مسیر ترشحی عمومی (Sec) و مسیر انتقالی Tat می باشند، بیش از پیش شده است. وسعت دانش و دانسته های ما از این سیستم های ترشحی 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 ترشحی 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 ترشحی عمومی، تک و دو مرحله ای، به طور خلاصه به بررسی نسل های جدید مواد ضد میکروبی علیه این سیستم های ترشحی بپردازیم.

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

مقدمه

پروتئین های سنتزی توسط ریبوزوم باکتری ها برای رسیدن به جایگاه هدف خود با موانع متعددی روبرو می‌شوند. 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 سیستم‌های ترشحی 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 ترشحی را می‌توان 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، آن‌هایی 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 (۳،۲). از سیستم های ترشحی توسعه یافته در غشای خارجی یا OM می توان به سیستم ترشحی تیپ V یا T5SS و ماشین های اسمبل ضمائم خارج سلولی چون پیلی تیپ I یا پیلی P و Curli اشاره نمود. از ماشین های ترشحی گسترش یافته در هر دو غشای

داخلی و خارجی که تا به امروز مشـخص شده نیز می توان به سیسـتم ترشحی تیپ I یا T1SS، سیستم ترشحی تیپ II یا T2SS، سیسـتم ترشحی تیپ III یا T3SS، سیستم ترشـحی تیپ IV یا T4SS و سیستم ترشحی تیپ VI یا T6SS اشـاره نمود و در نهایت مایکوباکتری ها که دارای انولوپ و پوشش شـبه گرم منفی هستند، کد کننده سیستم ترشحی تیپ VII یا T7SS هستند که این ماشین ترشحی اغلب محـدود به این باکتری بوده و تاکنون در سـایر گرم منفی ها دیده نشـده اسـت و به دلیل مشخص نبودن دقیق سـاختار و مکانیسم عمل آن در هیچ یک از گروه های فوق قرار نگرفته و به صورت مجزا به آن خواهیم پرداخت (٤).

General Secretory Pathways یا Sec

گذرگاه اصلی پروتئین های سنتزی توسط باکتری از ورای غشـای داخل سلولی یا IM، مسـیر ترشحی Sec است که دارای اجزای چاپرونی سـیتوزولیک و زیر واحدهای داخل غشایی می باشد. این مسیر فراهم کننده ورود سوبستراهای سـنتز شده در داخل سـیتوزول به فضای پری پلاسمیک و غشای خارجی اسـت. کمپلکس پروتئینی SecYEG یک هتروتریمریک پروتئین است که در مرکز مسیر انتقالی Sec قرار داشـته و نقش کانال انتقال دهنده سوبسترا از سیتوزول داخل سـلولی به فضای خارج آن را فراهم می کند (۷-۵). SecA مسئول اصلی تامین انرژی و تغییر کنفورماسیون کانال بـرای انتقال پروتئین اسـت (۹،۸). کمپلکس هترودیمریک غشـایی SecDF نقش فرعی و جانبـی را در فرآیند انتقال پروتئین در مسیر ترشحی Sec بر عهده دارد (۱۰).

در شـروع انتقال پروتئین، ابتدا پیـش پروتئین تا نخورده توسـط پروتئین چاپـرون SecB بـه کمپلکس SecYEG متصل به SecA، می رسـد. کمپلکس SecYEG-SecA آغازگر فرآیند انتقال با صرف انرژی و هیدرولیز ATP است. نخسـت 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 می‌رود (۱۲،۱۱) بـا مصرف شـدن ATP و تغییر کنفورماسـیون SecA، کانـال SecYEG باز شـده و پذیـرای 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. متعاقبـا با اتصال مجدد و ریباندینگ SecA در سیتوزول، باعث احیا و بازسازی دیمر SecA شده که ممکن است وظیفه ای در مرحله انتقال و جابجایی بدون اتصال به نوکلئوتید را بر عهده داشـته باشد (۱٤،۱۳). حال ATP به SecA متصل شده و یک مرحله حرکت سوبسترا رخ می دهد و الباقی حرکت سوبسـترا از طریق تکرار سـه سـیکل فوق ذکر یعنی جداسـازی SecA، اتصال مجدد یا ریباندینگ و اتصال ATP و هیدرولیز، باعث انجام مراحل انتقال پیش پروتئین از سـیتوزول به فضای پری پلاسمیک می گردد. بررسـی ها نشان داد که انتقال سوبسترا می تواند وابسـته به نیروی "pushing" القا شـده توسـط SecA در غشـای سیتوپلاسـمیک و نیـروی "pulling" تولیدی توسـط SecDF در ناحیه جانبی غشـای سیتوپلاسـمیک است (۱٤، ۱۳).

twin-arginine translocation یا Tat

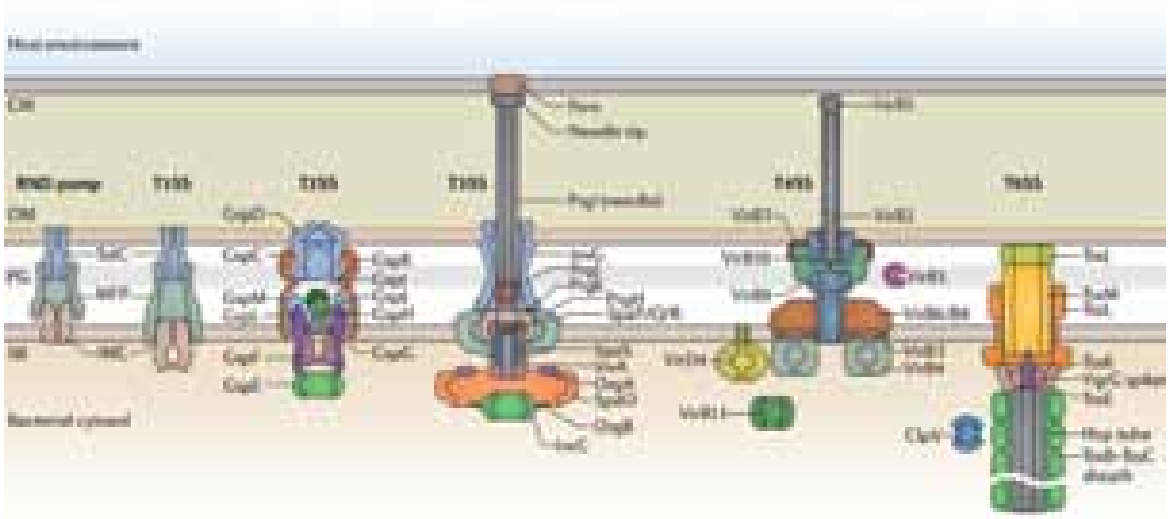
سیستم ترشـحی پروتئین Tat در غشـای سیتوپلاسمی بیشـتر یوباکتری ها و آرکی باکتری ها وجود دارد و ویژگی اصلـی و منحصـر به فـرد آن انتقـال پروتئین هـای کامل فولد شـده اسـت که دقیقا برعکس سیسـتم Sec می باشد (۱٦،۱۵). سیسـتم Tat که مخفف کلمه twin-arginine translocation می باشـد، مختص پروکاریوت ها نبوده و در یوکاریوت ها نیز یافت شـده اسـت. این سیسـتم به شـکل پیشرفته و محافظت شـده تر در تیلاکوئید گیاهان و کلروپلاست جلبک ها و میتوکندری ها اسفنج ها وجود دارد (۱۹-۱۷). پروتئین های تولیدی هدف ماشین ترشحی Tat توسط سیگنال پپتیدهایی که شامل یک جفت آرژنین موتیف محافظت شده است شناسـایی می شود که دلیل نامگذاری این مسیر نیز همین است. این ناحیه دارای ۳ بخش ناحیه n در N ترمینـال و یک ناحیه هیدروفوبیک h در مرکز و یک ناحیـه c در انتهای C ترمینال. به علاوه در بالا دسـت 1+ ناحیه c پروتئین بالغ یک جایگاه شناسـایی سیگنال پپتیداز

وجود دارد که جایگاه برش اســت. سوالی که نخست ذهن هــر دانش پژوهــی را به خود جلب می کند این اســت که چرا باید یک میکروارگانیسم انتقال سوبستراهای خود را از مسیری به جز Sec که می تواند بیشتر پروتئین های باکتری را انتقال دهد، اســتفاده 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 سیســتم، جلوگیری از اتصال یون های فلزی پر کننده جایگاه فعال پروتئین های سوبســترا 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 انتقــال پروتئین های بدون تاخوردگــی را دارد. موتور تولید کننده انرژی در سیستم ترشحی Tat نیروی محرک پروتونی به نام PMF اســت، البته در برخی میکروارگانیســم 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 شــود. مشاهدات در برخی از میکروارگانیســم ها نشان می دهد زیر واحدهای TatA و TatC برای انتقال کافی اســت ولی ایــن موضوع در تمام میکروارگانیســم هــا مصداق نداشــته و برخــی به حضور TatB به همراه TatA نیاز دارد که نشــان از وجود نقش و ســاختار هومولوگ در عملکرشان می باشد. مطالعات نشان داده که با جایگزینی و تغییر تنها یک آمینواســید در ساختار TatA در باکتری اشریشــیا کلی مــی تواند هر دو عملکرد زیر واحدهای TatA و TatB را به دســت آورد. به علاوه TatA در باکتری باسیلوس ســوبتیلیس که فاقد زیر واحد TatB اســت می توانــد جایگزین برای هــردوی این زیر واحدها باشد (۲۴-۲۱).

شــروع چرخه انتقال توســط اتصال ســیگنال پپتیدها به کمپلکس TatBC آغاز می گردد. مرحله اول زمانی اســت که سوبسترای پروتئینی به کمپلکس TatBC متصل می‌شود ســیگنال پپتید جفت آرژنینی در نزدیکی TatC قرار گرفته در حالــی که ناحیه h ســیگنال پپتید و دامیــن تاخورده به TatB متصل می شــود که این واکنــش بدون صرف انرژی اســت. در مرحله دوم PMF باعث اتصال قوی تر سوبسترا به کمپلکس TatBC می شود و باعث تجمع پروموتورهای TatA در کنار کمپلکس TatBC می شــود که وابســته به PMF است. در مرحله سوم سوبسترا توسط TatA خارج شده ولی سیگنال پپتید همچنان به کمپلکس TatBC متصل خواهد بود. هنوز مشــخص نیست که این مرحله به PMF نیــاز دارد یا خیــر. در مرحله آخر بعد از خروج سوبســترا ســیگنال پپتید توســط ســیگنال پپتیداز برش خورده و زیر واحدهــای TatA از کمپلکــس TatBC جــدا و پراکنده می‌شود (۲۶, ۲۵).



شکل ۱: نمایی از ٦ 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 اگزوژن کوچک ترشحی هستند که اکثر آن‌ها وظیفه پمپ ترکیبات آنتی باکتریال به خارج سلول را بر عهده دارند که باعث مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری خواهد شد (۲۸).

هر دو سیستم ترشحی ۳ جزیی بوده و کانال های خروج سوبستراهای آن در دو غشای داخلی و خارجی باکتری‌های 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-Gly-X-Gly-X-Asp) 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 می‌نماید. 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 توکسین‌های 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 ٤ قسمت تشکیل شده است که شامل: کمپلکس غشای خارجی، یک pseudopilin پری‌پلاسمیک، یک پلتفرم داخل غشایی و یک ATPase سیتوپلاسمیک (۳۰).

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

سوبستراهای ترشح شده توسط ماشین ترشحی تیپII ابتدا به شکل پلی‌پپتید بدون تاخوردگی توسط کمپلکس SecYEG و یا پلی‌پپتید تاخورده توسط سیستم Tat، به ناحیه پری‌پلاسمیک 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 پری‌پلاسمیک 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 سکرتین و در نتیجه هل داده شدن آن توسط سودوپیلوس به روش شبه پیستون است (۳۲).

سیستم ترشحی تیپ III

سیستم ترشحی تیپ III یک نانوماشین دبل ممبران جاسازی شده در باکتری های پاتوژنی چون سالمونلا، شیگلا، یرسینیا، سودوموناس و انتروپاتوژنیک اشریشیا کلی است. این ماشین ترشحی 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 ترشحی شبیه سرنگ بوده لذا با نام های کمپلکس سوزنی یا Injectisome نیز از آن یاد می شود که به طور تقریبی از ۲۵ پروتئین تشکیل شده است (۳۵، ۳٤).

پایه سیستم ترشحی تیپ III از ۲ حلقه متحد المرکز 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 می رسد در ارتباط با کانال داخل ممبرانی PRGK-PRGH و برخی از پروتئین های ساختمانی است (۳۷, ۳٦). 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 می سازند. این ابعاد باریک قطر داخلی تیوب تنها انتقال سوبسترای تانخورده را ممکن می سازد (۳۸).

به دنبال اتصال و ارتباط باکتری پاتوژن با سلول میزبان، با ترشح پروتئین های افکتور متعدد و فعال شدن مکانیسم سیگنالینگ پیچیده، سیستم ترشحی تیپ III با تغییراتی همراه شده و کنفورماسیون فیلامنت سوزنی شکل آن تغییر می کند. انتقال موثر و هدفمند سوبستراهای فولد نشده در سیستم ترشحی تیپ III از طریق پلیمریزه شدن فیلامنت سوزنی کنترل شده توسط سیگنالینگ باکتری و میزبان انجام می گیرد که از یک پروسه آبشاری تبعیت می کند. این ماشین ترشحی 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 ترشحی تیپ III هم اکنون به طور کامل شناخته نشده است ولی امروز ما می دانیم که این کمپلکس ها می توانند یک گروه از پروتئین های سیتوپلاسمی چون SpaO, OrgA و OrgB را شناسایی کنند که باعث القای اسمبل شدن کمپلکس نیدل در پلتفرم پایه این سیستم ترشحی می شود. میزان افینیتی و تمایل چاپرون های مختلف این سیستم ترشحی به این پروتئین های سیتوپلاسمی آن، تضمین کننده انجام موفقیت آمیز ترشح پروتئین های ترنسلوکیتور پیش از پروتئین های افکتور است. انرژی این نقل و انتقالات توسط ATPase به نام InvC انجام می گیرد که تنها ATPase شناخته شده در سیستم ترشحی تیپ III است (٤۰،٤۱).

سیستم ترشحی تیپ IV

سیستم ترشحی تیپ IV یکی از منحصر به فردترین این ابر ماشین های مولکولی ترشحی است که علاوه بر پروتئین، توانایی ترشح DNA به داخل باکتری یا سلول یوکاریوتی را دارد. این سیستم ترشحی هم در باکتری های گرم منفی و هم گرم مثبت و حتی در برخی از آرکی باکتری ها نیز دیده شده است. این سیستم ترشحی 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 ترشحی تیپ IV یکی از منحصر به فردترین ویژگی های این سیستم است که در تمام میکروارگانیسم های واجد این مسیر ترشحی دیده می شود. این سیستم ترشحی در فرآیند پاتوژنی باکتری های پاتوژنی چون هلیکوباکتر پیلوری، توکسین های بوردتلا پرتوسیس و لژیونلا پنوموفیلا دخیل است (٤۲).

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

تشکیل دهنده داربست و دستگاه انتقال سوبسترا است در حالی کـه زیر واحدهای VirB2 و VirB5 تشـکیل دهنده پیلوس گسـترش یافته به فضای خارج سـلولی این سیسـتم ترشحی است (٤٤،٤٣). زیر واحد VirB1 یک پروتئین پری‌پلاسمیک بوده که فرآیند تخریب پپتیدوگلیکان را به منظور سنتز پیلوس سیستم ترشـحی برعهده دارد. این سیسـتم قدرتمند ترشحی بـرای فعالیت های خود از سـه عـدد ATPase به نام های VirB4, VirB11 و VirD4 بهره می گیرد (٤٥).

نبود یکی از سه زیر واحد ATPase ای سیستم ترشحی تیپ IV باعث از کار افتادن نقل و انتقال سوبسترا به خارج باکتری می شـود. بررسـی های تجربی بر روی باکتری آگروباکتریوم تومفاسینس دو مدل برای انتقال سوبسترا برای سیستم ترشحی تیپ IV پیشنهاد کرده است که با این حال هنوز ابعاد ناشناخته بسـیاری در این زمینه وجود دارد: یکی مدل سـنتز پیلوس که در ارتباط با تعامل VirB11 با VirB4 اسـت و دیگری مدل انتقال سوبسـترا که در نتیجه تعامل VirB11 با VirD4 رخ می‌دهد. پیشـنهاد شده سوییچ شدن بین این دو مدل زمانی که قسمت TIP پیلوس به رسپتور مخصوص خود متصل می‌شود رخ می دهد که هنوز این رسـپتور شناخته نشده است و نتیجه آن طویل شـدن پیلی در اثـر فعالیت زیر واحدهای VirB11 بـا VirB4 بـوده و پس از آن با فعال شـدن زیـر واحدهای VirB11 با VirD4 سوبسـترای مورد نظـر به داخل میزبان تلقیح می گردد (٤٤).

سیستم ترشحی تیپ V

سیسـتم ترشـحی تیـپ V که بـا نام سیسـتم ترشـحی Autotransporter نیز شناخته می شود، به دلیل وجود تنها یک پلی پپتید تشـکیل دهنده منفذ ترشـحی ساختاری یکتا و بی نظیر دارد. دلیل نامگذاری اتوترانسـپورتر نیز به همین دلیل بوده اسـت چرا که مواد مترشحه خود را تنها با یک پلی پپتید به خارج باکتری می راند. سیسـتم ترشـحی تیپ V علاوه بر نقش ترشـحی و ادهزینی اش در باکتری ها، به عنوان یکی از عوامل مهم در تشکیل بیوفیلم باکتری ها نیز نقش ایفا می کند (٥١). این سیسـتم ترشـحی تیپ نیازمند وجود ترانسلوکیتور SecYEG بـرای انتقال پلـی پپتید اتوترانسـپورتر تانخورده از ورای غشـای داخلی به فضای پری پلاسـمیک می باشـد.

سیستم ترشـحی تیپ V از یک دامین ترشـحی به نام دامین "passenger" و یک دامین ترانس ممبران غشای خارجی به نام "translocator" یا "دامین بتا" تشکیل شده است. بخشی از دامیـن پسـنجر در میان منفذ ترانسـلوکاتور داخل غشـای خارجی که سـاختار پروتئینی بشکه بتا دارد قرار گرفته است. این سیسـتم ترشحی همچون سایر سیسـتم های انتقال‌دهنده غشـای خارجی به وجود گرادیـان ATP یا پروتون به عنوان منبع انرژی به منظور انتقال سوبسترا نیاز ندارد (٥٢).

ماشـین ترشـحی تیپ V به ٥ زیر کلاس A تا E تقسـیم مـی شـود. بعـد از انتقـال سوبسـترا از ورای IM به فضای پری‌پلاسمیک، این پلی پپتیدها توسط چاپرون های اختصاصی پری‌پلاسمیک به شکل تانخورده باقی می ماند. مطالعات اخیر موجب شناسـایی یکی از این چاپرون های پری‌پلاسـمیک با نام SurA شده است که باعث بهبود ترشح سوبسترا از طریق سیسـتم ترشـحی تیپ V شده اسـت (٥٣). کمپلکس Bam کـه شـامل پروتئیـن اینترنـال BamA و ٤ لیپوپروتئیـن BamD, BamC , BamB و BamE است در همکاری با پروتئین ترانسلوکاتور در ورود بسیاری از مواد به داخل غشای خارجی دخیل است (٥٤).

مکانیسـم ترشح سوبسـترا به OM در این سیستم ترشحی هنـوز در هالـه ای از ابهام اسـت. تصور امروزی مـا از این سیسـتم ترشحی نشـان از خودبخودی نبودن سیستم ترشحی اتوترنسـپورتر یا V اسـت و نشـان از همکاری دو کمپلکس Bam و زیر واحدهای پسـنجر و ترانسـلوکیتور برای انتقال سوبسترا است (٥٥).

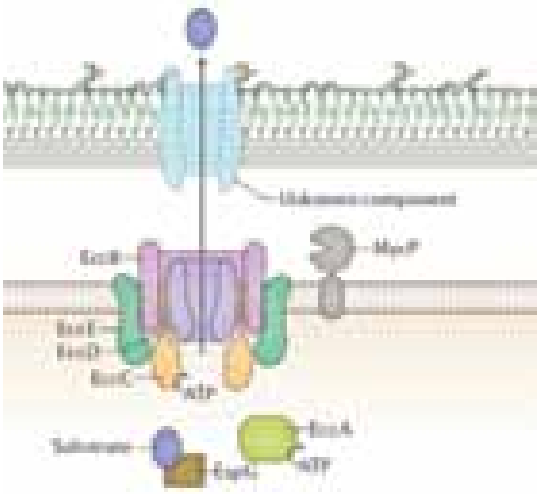
سیستم ترشحی تیپ VI

سیسـتم ترشحی تیپ VI یکی از مسـیرهای ترشحی تازه شناخته شـده است که از سال ٢٠٠٠ میلادی به بعد اطلاعاتی مبنـی بر وجـود آن و نـوع فعالیتش در انتقـال پروتئین های توکسـیک به داخل سـلول های یوکاریوتـی و پروکاریوتی و نقـش محـوری آن در پاتوژنز برخی از باکتـری ها ردیابی و کشف شد. بیشترین دانش ما از این مسیر ترشحی باز می گردد به سـال ٢٠٠٦ هنگامی که این سیستم به طور گسترده بر روی Proteobacteria ردیابی و بررسی شد. این سیستم ترشحی متشکل از ١٣ زیر واحد محافظت شده، اجزاء ضروری مرکزی

و همچنین اجزاء فرعی است (٤٦،٤٧).

سیستم ترشحی تیپ VI از ۲ کمپلکس اصلی تشکیل شده است: کمپلکس غشایی که شامل پروتئین های داخل غشایی است که هومولوگ اجزا سیستم ترشحی تیپ IV است و دیگری کمپلکس دم که هومولوگ دم های قابل انقباض باکتریوفاژ است (٤٨). کمپلکس Tail در سیستم ترشحی تیپ VI به انولوپ و پوشش سلول به واسطه کمپلکس غشایی لنگر می اندازد. Tail sheath یک ساختمان طویل توبولار است که تقریبا عمود بر غشا قرار گرفته و در عمق سیتوپلاسم باکتری گسترش یافته است (٤٩).

مکانیسم دقیق انقباض Hcp تیوب هنوز ناشناخته باقی مانده است. بر اساس مدل های پیشنهاد شده در سال‌های 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 هترودیمرهای 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 ترشحی تیپ VI فرانسیسلا که فاقد هومولوگ ClpV است فاقد چنین رفتار دینامیکی است (٥٠، ٤٦).



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

سیستم ترشحی تیپ VII

سیستم ترشحی تیپ VII جدیدترین ماشین ترشحی بررسی شده در باکتری هاست که تاکنون تنها در ویرولانس مایکوباکترها همچون مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نقش آن شناسایی شده است. پوشش دیواره مایکوباکترها شامل یک غشای پلاسمایی معادل غشای داخلی گرم منفی‌ها، 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 ترشحی تیپ VII برای نخستین بار در سال ۲۰۰۳ شناسایی و به ESX-1 نامیده شد. این ماشین ترشحی توسط لوکوسی در مایکوباکتری ها کد می شود که این لوکوس در سویه‌های ضعیف شده مایکوباکتریوم بویس به نام "باسیل کالمت وگورین" است که از آن برای ساخت واکسن علیه توبرکلوزیس استفاده می شود. کلاستر ژنی سیستم ترشحی تیپ VII در باکتری های گرم مثبت مختلفی چون استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز و باسیلوس سوبتیلیس شناسایی شده است (٥٦).

سیستم ترشحی 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 ترشحی را می سازد. EccC زیر واحد ATPase سیتوپلاسمیک است. EccD نقش کانال مرکزی این سیستم ترشحی 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 ترشحی جدید الکشف هنوز در مراحل ابتدایی خود است و ندانسته های زیادی در این سیستم ترشحی وجود دارد که چشم انتظار بررسی های آینده است (٥٥).

سیستم ترشحی و مواد آنتی باکتریال

بی شک آنتی بیوتیک ها یکی از موثرترین، موفق‌ترین و کم هزینه ترین کلاس دارویی است که برای درمان بیماری‌ها 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 ترشحی 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 ترشحی تیپ III توسط پژوهشگران به اثبات رسیده است. Phenoxyacetamides و benzimidazoles اثرات مهاری علیه Pseudomonas aeruginosa و Yersinia pseudotuberculosis از خود نشان داده اند. بررسی ها از اثر مهار کنندگی salicylidene acylhydrazides بر روی این سیستم ترشحی در بسیاری از باکتری های گرم منفی حکایت دارد. Thiazolidinones باعث کاهش تعداد کمپلکس سوزنی سیستم ترشحی تیپ III در سالمونلا تیفیموریم شده و همچنین اثراتی بر روی سیستم ترشحی تیپ II در سودوموناس‌ها می‌گذارد که به نظر به خاطر وجود پروتئین سکرتین مشترک در این دو سیستم ترشحی 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 (۵۹، ۵۸).

علاوه بر اثر مواد مهاری بر روی سیستم ترشحی تیپ III اثر این مواد بر روی سیستم ترشحی تیپ IV نیز بررسی شده است که نتایج جالب توجهی را از خود نشان داده اند. به عنوان مثال مطالعات موتاسیون نشان داد که دیمریزاسیون VirB8 اثرات وخیمی را بر روی عملکرد سیستم ترشحی تیپ IV در بروسلا سوئیس دارد. همین دستاورد عاملی بر بررسی اثر ۳۰۰۰۰ ترکیب مهار کننده و شناسایی ٤٨ ترکیب مهاری سیستم ترشحی تیپ IV به کمک دیمریزاسیون VirB8 در بروسلا آبورتوس شود. یکی از این ترکیبات B81–2 بوده که باعث مهار رشد داخل سلولی بروسلا آبورتوس در ماکروفاژها شده است (٦١، ٦٠).

بحث و نتیجه گیری

دانش امروز ما از سیستم های ترشحی برآیند بیش از ٧٤ 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 پاتوژنز باکتری ها آشنا ساخت و نشان داد سیستم های ترشحی 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 ویرولانت های میکروبی شده است. جرقه ای که پشتوانه آن وجود پیشرفت های گسترده درک ما از ساختار مولکولی این ماشین های ترشحی 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 میکروارگانیسم‌ها باشد. دانستن مکانیسم و ساختار این سیستم های ترشحی 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 ترشحی 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 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, McInally 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.