ویژگی‌های نانوساختار لایه سطحی در برخی از باکتری‌های بیماری‌زا

شیلا جلال‌پور،[1] روحا کسری کرمانشاهی،[2] اشرف‌السادات نوحی،[3] حمید زرکش اصفهانی[4]

۱. مدرس میکروب شناسی، انجمن پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا
۲. استاد زیست‌شناسی، دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم پایه
۳. استاد زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، دانشکده علوم
۴. استادیار زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۲/۲۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۵/۴

چکیده

زمینه و هدف: لایه سطحی (Surface Layer) قسمتی از انولوپ سلولی است که در باکتری‌ها و آرشی‌ها دیده می‌شود. لایه سطحی یک ساختار تک لایه‌ای است که از زیرواحدهای پروتئینی یا گلیکوپروتئینی به‌وجود آمده است. لایه سطحی خارجی‌ترین ساختارسلولی است که در تبادل و واکنش با محیط پیرامون باکتری می‌باشد. عملکردهای این ساختار در گونه‌های مختلف باکتریایی از تنوع زیادی برخوردار می‌باشد.

مواد و روش کار: مقالات مرتبط با لایه سطحی از مقالات Pubmed، Elsevier Science و Yahoo از سال ۱۹۹۵ تا ۲۰۱۰ استخراج گردید. برای این کار کلمات کلیدی لایه سطحی، بیماری‌زایی و باکتری‌های پاتوژن، واژه‌هایی بودند که جستجو شدند.

یافته‌ها: در مورد لایه سطحی در تمامی مقالات پژوهشی و مروری مشابه انجام گرفته، اتفاق نظر وجود دارد که وجود این ساختار سطحی در باکتری‌ها منجر به افزایش بیماری‌زایی در آن‌ها می‌گردد.

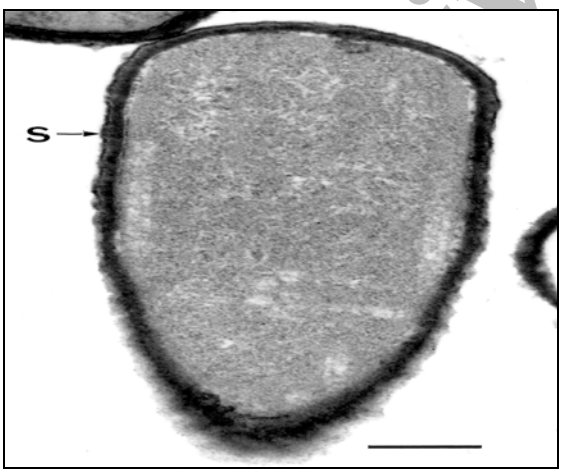
نتیجه‌گیری: لایه سطحی در باکتری‌های پاتوژن با حفاظت باکتری دربرابر حملات باکتریوفاژی و فاگوسیتوزی، مقاومت باکتری در برابر pH اسیدی، چسبندگی، پایداری غشاء پلاسمایی، جایگاه‌های اتصالی برای اگزوپروتئین‌ها منجر به افزایش بیماری‌زایی، پایداری عفونت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میزبان می‌گردد. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده شیوع قابل ملاحظه لایه سطحی در باکتری‌های پاتوژن بوده است و این امر بیانگر اهمیت شناسایی باکتری‌های مولد این ساختار در آزمایشگاه‌ها می‌باشد. **[م ت ع پ ز، ۱۲(٤):۱۰-۳]**

کلیدواژه‌ها: لایه سطحی، بیماری‌زایی، باکتری‌های پاتوژن

مقدمه

لایه‌های خارج غشایی عاملی برای تطبیق و تحمل شرایط خاص اکولوژیکی برای پروکاریوت‌ها محسوب می‌شوند و از آن‌جا که تمامی واکنش‌ها و سنتزها در باکتری به‌واسطهٔ اطلاعاتی است که از سطح سلول به داخل ارسال می‌گردد در واقع تنها پل حسی و ارتباطی باکتری با محیط پیرامونش ساختارهای سطحی باکتری می‌باشند.[1] ساختارهای سلولی پروکاریوتی متشکل از غشاء سیتوپلاسمی، سیتوپلاسم و ساختارهای خارج دیواره‌ای می‌باشند که عبارتند از: گلیکوکالیکس (کپسول)، تاژک، تاژه، تار و لایه سطحی (S-layer).

با انجام بیش از سه دهه تحقیق مشخص گردید، یکی از متداول‌ترین ساختارهای سطحی موجود در اکثر آرشی‌ها و باکتری‌ها عبارت است از یک ساختار کریستالی، تک لایه‌ای که از زیر واحدهای مشابه پروتئینی یا گلیکوپروتئینی به‌وجود آمده است و خارجی‌ترین لایه دیواره سلولی می‌باشد. تا کنون اسامی مختلفی برای این ساختار پیشنهاد شده است، از جمله آن‌ها می‌توان به ساختار منظم، پروتئین فراکریستالی، ساختار سطحی کریستالی باکتریایی اشاره کرد اما امروزه این ساختار، لایهٔ سطحی نامیده می‌شود (تصویر ۱).[2-6] پروتئین‌های سطحی در برابر عوامل محیطی بسیار پایدار شده‌اند، در صورتی که پروتئین‌های داخلی نسبت به عوامل خارجی حساس می‌باشند و توسط پوشش سلولی محافظت می‌شوند.



تصویر ۱: لایه سطحی در باسیلوس سرئوس (S=S-layer)[23]

S-layer پروتئینی بسیار مقاوم در برابر تغییرات فیزیکی و شیمیایی است و در انتخاب طبیعی ارگانیسم تحت شرایط متفاوت محیطی نقش مهمی ایفا می‌کند.[5-11] تاکنون پژوهش‌های متعددی در ارتباط با اثرات ویرولانسی S-layer در باکتری‌های پاتوژن انجام گرفته است، در این مقاله با بررسی پژوهش‌های انجام شده در ارتباط با ویژگی‌های S-layer در گونه‌های مختلف باکتریایی، هم چنین براساس نتایج حاصل از پژوهشی که

آدرس نویسنده مسئول: اصفهان، خیابان نظر غربی، کد پستی ۸۱۷۵۷۵۳۹۹۱

www.SID.ir

نویسندگان این مقاله بر روی اثر مهارکنندگی S-layer بر ورود آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه های باسیلوس سرئوس انجام داده اند، سعی شده است مروری بر نتایج حاصله از مطالعات انجام گرفته در این راستا انجام شود.

روش کار

برای بررسی و مطالعه در ارتباط با ویژگی‌های نانوساختار لایه سطحی در برخی از باکتری‌های بیماری‌زا مقاله‌های پژوهشی و مروری مرتبط با لایه سطحی از مقالات Pubmed، Elsevier Science و Yahoo از سال ۱۹۹۵ تا ۲۰۱۰ استخراج گردید. برای این کار واژه‌های لایه سطحی، بیماری‌زایی و باکتری‌های پاتوژن، کلماتی بودند که در عنوان و متن مقالات مرتبط با این پژوهش، جستجو شدند.

یافته‌ها

وزن مولکولی و بررسی اسیدآمینه‌ای در S-layer

از آن‌جا که S-layer در برخی از باکتری‌ها فسفریله و در برخی دیگر قندی شده است، وزن نهایی پروتئین بالغ S-layer به فرآیندهای پس از ترجمه از جمله قندی شدن، فسفریله شدن و ایجاد شکاف‌هایی در ناحیهٔ N ترمینال (مثلاً حذف پپتید نشانه) یا ناحیهٔ C ترمینال بستگی دارد.[۱۹-۱۲] وزن مولکولی S-layer در باکتری‌های مختلف kDa ۲۰۰-۴۰ برآورد شده است. سبک‌ترین S-layer در گونه‌های لاکتوباسیلوس با وزن مولکولی ۴۶kDa و سنگین‌ترین S-layer در گونه‌های ریکتسیا، با وزن مولکولی kDa ۱۶۹ مشاهده شده است.[۵،۱۰]

بررسی اسیدآمینه‌ای پروتئین S-layer در باکتری‌های مختلف، نشان دهندهٔ تشابهاتی در محتوای اسید آمینه‌ای موجود در آن‌ها می‌باشد. اسیدهای‌آمینه موجود در S-layer عمدتاً از نوع اسیدی (اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک) و آب‌گریز هستند و در میان سایر اسیدهای آمینه‌ی موجود در S-layer لیزین بیشترین مقدار و آرژنین، متیونین و هیستیدین کمترین مقادیر را به خود اختصاص داده‌اند، سیستئین به ندرت در ساختار S-layer مشاهده می‌شود.[۵،۱۹] ۱۵ درصد از اسیدهای آمینهٔ موجود در S-layer اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک و ۱۰ درصد اسیدهای آمینهٔ آن لیزین می‌باشد و ۲۵ درصد اسیدهای آمینهٔ S-layer از نوع قطبی و ۶۰-۴۰ درصد از اسیدهای آمینهٔ این ساختار از نوع هیدروفوب می‌باشند.[۱۰]

۲۰ درصد از اسیدهای آمینه‌ی S-layer از نوع پیچش‌های آلفا (α-helix)، ۴۰ درصد از نوع صفحات بتا (β-Sheet) و ۴۵-۵ درصد از نوع پیچش‌های نامنظم و پیچش‌های بتا می‌باشد. پیچش‌های آلفا عمدتاً در ناحیهٔ N ترمینال دیده می‌شوند و حدوداً ۷۰ درصد از اسیدهای آمینهٔ این ناحیه از نوع پیچش‌های آلفا می‌باشند.[۵] نقطهٔ ایزوالکتریک (pI) در انواع S-layer در دامنهٔ اسیدی ضعیف قرار دارد، دو استثناء در این مورد دیده می‌شود، S-layer در لاکتوباسیل‌ها که pI>۹/۵ دارند و S-layer در متانوترموس‌ها که pI=۸/۴ دارند.[۱۰]

روش‌های بررسی میکروسکوپی S-layer

برای بررسی و مشاهده S-layer از میکروسکوپ الکترونی استفاده می‌شود، آماده‌سازی نمونه برای بررسی با میکروسکوپ الکترونی با چند روش انجام می‌گیرد، از جمله روش Freeze etching: این روش بر روی سلول‌های شسته نشدهٔ حاصل از رسوب سانتریفوژی انجام می‌گیرد. بررسی نمونه‌هایی که با این روش آماده شده بودند مشخص کرد S-layer در تمامی مراحل رشد و تقسیم سلولی در باکتری‌ها و آرشی‌ها تمامیت خود را از دست نمی‌دهد و کاملاً تمامی سطح سلول را می‌پوشاند. روش رنگ‌آمیزی منفی: این روش روی سلول‌های حاوی S-layer یا روی S-layer جداسازی شده از باکتری که مجدداً در محلول‌ها یا سطوح جامد خودآرایی کرده‌اند انجام می‌گیرد. تصاویر حاصله با این روش از وضوح بالایی برخوردار می باشد. روش سایهٔ فلزی (Metal shadowing). روش تهیهٔ برش‌های بسیار نازک (Ultra thin section). بررسی میکروسکوپی S-layer روش مناسبی برای تعیین تقارن و ضخامت S-layer محسوب می‌شود.[۵،۱۰]

روش‌های بررسی شیمیایی S-layer

بررسی شیمیایی S-layer به روش‌های گوناگونی انجام می‌گیرد،که عبارتند از: ۱- بررسی محتوای اسیدآمینه‌ای ۲- بررسی نقطه ایزوالکتریک ۳- تعیین توالی ناحیهٔ N ترمینال ۴- تهیهٔ نقشه‌های پپتیدی ۵- الکتروفورز SDS PAGE.

الکتروفورز S-layer اطلاعات کمی و کیفی گسترده‌ای در ارتباط با این ساختار فراهم می‌آورد از جمله اطلاعاتی در مورد وزن مولکولی، درجهٔ خلوص و کمیت وکیفیت قندی شدن S-layer بدین جهت متداول‌ترین روش بررسی و مطالعهٔ S-layer می‌باشد.[۵]

نقش و عملکردهای S-layer

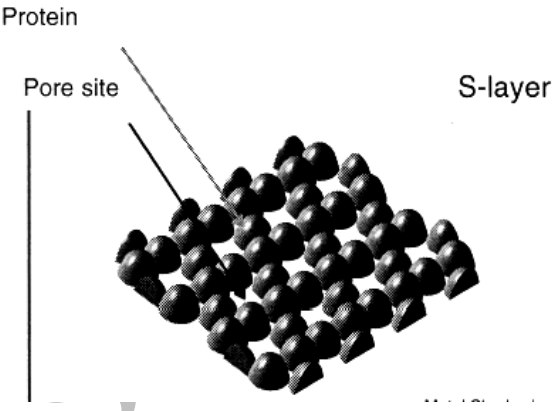
نقش S-layer در اتصال و چسبندگی: S-layer خاصیت اتصال و چسبندگی دارد و به این ترتیب می‌تواند به سلول‌های میزبان و سطوح محیطی متصل می‌شود. در واقع S-layer عامل کلونیزه شدن باکتری می‌باشد و از جدا شدن باکتری از سطوح ممانعت به عمل می‌آورد و به این ترتیب باعث تسهیل انجام واکنش‌های متقابل میان سلول و محیط می‌گردد.[۱،۱۱]

نقش S-layer در اتصال به برخی از آنزیم‌های خارج سلولی و ماکرومولکول: برخی از آنزیم‌های خارج سلولی به S-layer متصل می‌شوند مانند آمیلاز که S-layer موجود در B.stearothermophilus SM2358 را به عنوان محل اتصال شناسایی می‌کند و این آنزیم نمی‌تواند به لایهٔ پپتیدوگلیکانی متصل شود، از جمله دیگر اگزوآنزیم‌ها یا اگزوپروتئین‌ها که به S-layer متصل می‌شوند پلولاناز تیپ II در Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum، OlpA و OlpB در کمپلکس سلولوزم در C.thermocellum می‌باشند.

نقش S-layer در ممانعت از تهاجم ارگانیسم‌های خارجی : S-layer منجر به ممانعت از تهاجم برخی از باکتری‌های انگل از جمله بدلو ویبریو (Bdellovibrio) و برخی از فاژها به سلول می‌گردد.[۷،۱۱]

Archive of SID
www.SID.ir

نقش S-layer به عنوان فیلتر مولکولی: از آن‌جا که S-layer شبکه‌ای حاوی منافذی هم اندازه و هم شکل است، می‌تواند به عنوان نوعی فیلتر مولکولی در سطح سلول عمل کند. S-layer شبکه‌ای با نفوذپذیری انتخابی است که اجازهٔ ورود مواد غذایی را به سلول می‌دهد اما جلو ورود برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌های مضر به سلول را مهار می‌کند (تصویر ۲).[۱۰،۱۱،۲۰]



تصویر ۲: منافذ موجود در S-layer[۴]

نقش S-layer در حفاظت باکتری در برابر سیستم ایمنی و عوامل محیطی: S-layer باعث حفاظت باکتری در برابر فاگوسیتوز و دفاع‌های غیراختصاصی میزبان می‌گردد و نوعی پوشش حفاظتی در برابر عوامل محیطی از جمله حرارت‌های زیاد، تغییرات pH، پروتئازهای خارج سلولی، استرس‌های مکانیکی ناشی از فشارهای اسمزی و تغییرات فشاری و فشار ناشی از محلول‌های یونی در باکتری محسوب می‌شود.[۱،۷،۲۰،۲۱] آرشی‌ها از جمله مقاوم‌ترین ارگانیسم‌ها در برابر تغییرات محیطی محسوب می‌شوند و S-layer در اکثر آرشی‌ها یافت شده است، حضور S-layer در آرشی‌ها دلیلی برای پایداری آن‌ها در برابر تغییرات فیزیکی محیط از جمله (دما، نمک و اسید) می‌باشد.[۲۱]

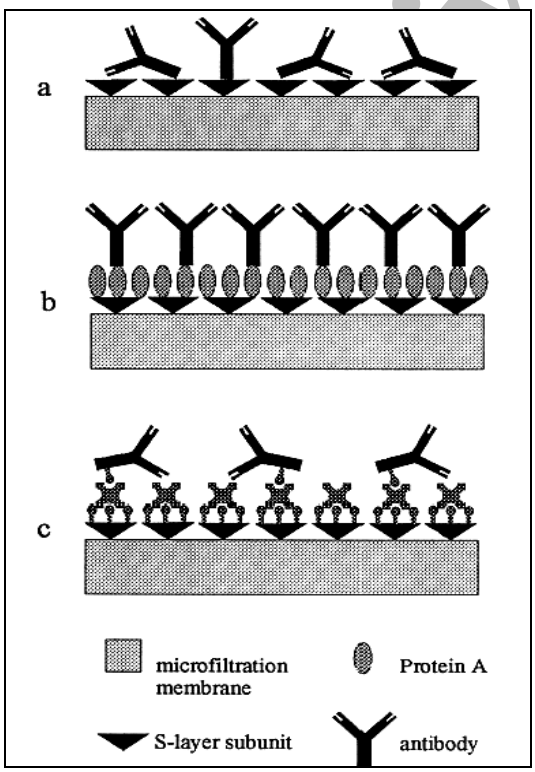
نقش S-layer در شکل‌دهی به سلول: S-layer باعث شکل‌دهی به سلول به‌ویژه در آرشی‌ها، هم‌چنین سبب پایداری و استحکام دیوارهٔ سلولی می‌گردد.[۱۱]

نقش S-layer در بیماریزایی: یکی از ویژگی‌های انحصاری S-layer حضور آن در باکتری‌های پاتوژن و نقش آن در مکانیسم‌های عفونت‌زایی باکتری می‌باشد.[۱۳،۲۰،۲۲،۲۳] S-layer در این باکتری‌ها یک عامل ویرولانس محسوب می‌شود و باعث حفاظت باکتری در برابر حملات اجزاء کمپلمان و فرایند فاگوسیتوز می‌گردد، فقدان S-layer در باکتری‌های بیماری‌زا سبب کاهش بیماریزایی در باکتری‌های پاتوژن می‌گردد. از جمله باکتری‌های پاتوژن تولید کننده S-layer عبارتند از: گونه‌های ریکتسیا، ترپونما، باکتریوئیدس، کلامیدیا، آئروموناس، کلستریدیوم، لاکتوباسیلوس، کمپیلوباکتر و باسیلوس.[۱۰،۱۱،۲۰]

کاربردهای S-layer

کاربرد S-layer در تولید غشاءهای فوق فیلتری: تولید غشاهای فوق فیلتری (ابرفیلترها) توسط S-layer به‌واسطه وجود منافذ هم اندازه در سطح این ساختار می‌باشد.[۴]

کاربرد S-layer در تثبیت مولکول‌های مختلف، از جمله ماکرومولکول‌های بیولوژیکی: بررسی S-layer با میکروسکوپ الکترونی اثبات کرده است، برخی از ماکرومولکول‌ها روی زیرواحدهای S-layer تثبیت می‌شوند. تثبیت ماکرومولکول‌ها روی S-layer به‌دلیل وجود گروه‌های عملکردی در سطح S-layer است.[۳،۴] از جمله ماکرومولکول‌هایی که روی S-layer تثبیت می‌شوند عبارتند از: الف: آنزیم‌ها (اینورتاز، گلوکز اکسیداز، گلوکورنیداز، بتاگلوکوزیداز، نارینژیناز، پراکسیداز) ب: لیگاندها (پروتئین A و استرپتاویدین) ج: مونوکلونال آنتی‌بادی‌ها و پلی‌کلونال آنتی‌بادی‌ها. از آن‌جا که ماکرومولکول‌های خاص روی S-layer تثبیت می‌گردند از این ساختار می‌توان برای جداسازی آنتی‌بادی‌ها و تولید حسگرهای زیستی استفاده کرد.[۳،۴] اتصال بیومولکول‌ها به زیر واحدهای S-layer توسط پیوند کووالانسی و پیوندهای غیرکووالانسی از جمله پیوندهای هیدروژنی، یونی و غیرقطبی انجام می‌گیرد. پیوند میان زیرواحدهای S-layer و ماکرومولکول‌ها به‌واسطه وجود گروه‌های عملکردی (کربوکسیل و آمینو در پلی‌پپتید S-layer و گروه‌های هیدروکسیل در زنجیره‌های کربوهیدراتی، S-layer گلیکوپروتئینی) در سطح S-layer انجام می‌گیرد (تصویر ۳).[۴] تثبیت ماکرومولکول‌ها روی S-layer دو پیامد به دنبال خواهد داشت، جلوگیری از انتشار آن ماده در محیط و جلوگیری از اتصال و جذب شدن‌های غیراختصاصی آن ماده به سایر مولکول‌های موجود در محیط.[۴]



تصویر ۳: اتصال بیومولکول‌ها به زیرواحدهای S-layer[۴]

www.SID.ir

کاربرد S-layer در جداسازی آنتی‌بادی‌ها: از S-layer کنژوگه شده با پروتئین A می‌توان برای جداسازی و خالص‌سازی IgG انسانی از سرم یا جداسازی مونو یا پلی‌کلونال آنتی‌بادی‌ها استفاده می‌گردد.[۴]

کاربرد S-layer در تولید حسگرهای زیستی: از آن جهت که برخی از ماکرومولکول‌ها به زیرواحدهای S-layer متصل می‌شوند، می‌توان از این ساختار در تولید حسگرهای زیستی (در روش‌های ایمونوآسی) در ساخت کروماتوگرافی جذبی استفاده کرد.[۳]

کاربرد S-layer در شبیه‌سازی زیستی (Biomimetic): زیرواحدهای S-layer می‌توانند در سطح لیپوزوم‌ها، گردهمایی کنند و ساختاری مشابه با آن‌چه روی باکتری دارند، به‌وجود آورند هم‌چنین از S-layer می‌توان به عنوان حامل ادجوانت یا هاپتن، برای ساخت واکسن استفاده کرد.[۴]

مصرف S-layer به‌عنوان حامل، باعث ایجاد تروما یا اثرات جانبی در مصرف‌کننده نمی‌شود و آنتی‌ژن همراه با S-layer باعث تحریک سیستم ایمنی خونی و سلولی می‌گردد. پاسخ‌های ایمنی برعلیه کمپلکس S-layer هاپتن، حتی به‌دنبال مصرف خوراکی و تنفسی این کمپلکس نیز مشاهده می‌شود.[۴]

کاربرد S-layer به‌عنوان حامل در ایمونوتراپی (S-layer کنژوگه شده با ماکرومولکول‌های خاص): کاربرد S-layer به عنوان حامل در ایمونوتراپی در سه بخش بررسی می‌گردد: ایمونوتراپی سرطان، ایمونوتراپی آلرژی، تولید واکسن.[۴]

کاربرد S-layer در ایمونوتراپی سرطان: S-layer کنژوگه شده با الیگوساکاریدهای کوچک اختصاصی تومور، منجر به تحریک سیستم ایمنی می‌گردند. امروزه تلاش‌هایی جهت ساخت مولکول‌های سنتتیک شیمیایی و آنالوگ‌های شیمیایی مشابه با الیگوساکاریدهای اختصاصی تومور انجام گرفته است تا بتوان بدون صرف هزینه و وقت برای جداسازی و خالص‌سازی الیگوساکاریدهای اختصاصی تومور، این مولکول‌های سنتتیک را جایگزین آن‌ها کرد و در ساخت کمپلکس‌های "S-layer الیگوساکاریدهای اختصاصی تومور" از آن‌ها بهره برد. کمپلکس‌های مزبور منجر به تحریک سیستم ایمنی، تنظیم و تولید پاسخ‌های ایمنی سلولی می‌گردند.[۴]

کاربرد S-layer در ایمونوتراپی آلرژی: S-layer کنژوگه شده با آلرژن، منجر به مهار TH2 و کاهش تولید IgE می‌گردد.[۴]

کاربرد S-layer در ساخت واکسن: از S-layer کنژوگه شده با آنتی‌ژن برای ساخت واکسن استفاده می‌گردد. به‌عنوان مثال از الیگوساکاریدهای مشتق شده از پلی‌ساکارید کپسولی استرپتوکوکوس پنومونیه تیپ۸، به عنوان آنتی‌ژن برای کنژوگه کردن با S-layer استفاده می‌شود.[۴]

بررسی ویژگی‌های S-layer در برخی از باکتری‌ها

باکتروئیدس فورسیتوس (Bacteroides forsythus): باکتروئیدس‌ها، باسیل‌های گرم منفی بی‌هوازی می‌باشند و آرایش آن‌ها به‌صورت میله‌ای باریک یا کوکوباسیل است، باکتروئیدها فلور طبیعی روده می‌باشند و برخی از گونه‌های آن‌ها پاتوژن انسانی هستند، از جمله بیماری‌های باکتروئیدس می‌توان به آبسه‌های شکمی اشاره کرد، باکتروئیدس فورسیتوس واجد یک S-layer Like protein با وزن مولکولی ۲۷۰-۲۳۰ kDa می‌باشد. S-layer در باکتروئیدس فورسیتوس در بقاء و پایداری دیوارهٔ سلولی باکتری نقش موثری ایفا می‌کند.[۱۱،۲۴]

سراشیا مارسسنس (Serratia marcescens): سراشیا مارسسنس باسیل گرم منفی میله‌ای و بی‌هوازی اختیاری است و به خانوادهٔ انتروباکتریاسه تعلق دارد، این گونه از جمله باکتری‌های پاتوژن انسانی محسوب می‌شود، ژن کدکنندهٔ S-layer در سراشیا مارسسنس slaA نامیده می‌شود. محصول پروتئینی این ژن یک پروتئین ۱۰۰ kDa است.[۲۵]

کمپیلوباکتر فیتوس (Campylobacter fetus): کمپیلوباکترفیتوس باسیل گرم منفی میله‌ای یا خمیده و بی‌هوازی اختیاری است، این گونه پاتوژن حیوانی محسوب می‌شود و عامل سقط جنین در گاو و گوسفند است، این باکتری در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی باعث عفونت سیستمیک و گاهاً اسهال می‌شود. وزن مولکولی S-layer در سویه‌های مختلف این باکتری ۱۴۰-۹۰ kD است. ۴۱ درصد از اسیدهای آمینه به‌کار رفته در لایه سطحی کمپیلوباکترفیتوس از نوع اسیدهای آمینه هیدروفوبی و ۲۲ درصد اسیدی می‌باشد؛ سیستئین و هیستیدین در S-layer این گونه مشاهده نمی‌شود، نقطهٔ ایزوالکتریک S-layer در این باکتری ۶/۳۵: pI می‌باشد.[۲۶] توانایی کمپیلوباکترفیتوس در ایجاد بیماری‌های گوناگون از جمله سپتی سمی، مننژیت، آبسه، پریتونیت و... با حضور S-layer در سطح آن ارتباط دارد، بدین ترتیب که S-layer در این باکتری منجر به مقاومت باکتری در برابر حملات فاگوسیتوزی و ترکیبات باکتریوسیدی سرم می‌گردد.[۲۶]

از دیگر ویژگی‌های S-layer در این باکتری پایداری حرارتی آن است، بدین ترتیب که حضور S-layer باعث می‌شود باکتری به مدت ۱۰ دقیقه حرارت $100^{o}C$ را تحمل کند.[۲۶] از ویژگی خاص S-layer در این گونه؛ تفاوت وزن مولکولی S-layer در سویه‌های مختلف این باکتری می‌باشد و از آن‌جاکه S-layer نوعی آنتی‌ژن سطحی محسوب می‌گردد بنابراین می‌توان گفت سویه‌های مختلف این باکتری از نظر آنتی‌ژن‌های سطحی با یکدیگر تفاوت دارند و تغییر در آنتی‌ژن‌های سطحی کمپیلوباکترفیتوس، علاوه بر آن‌که منجر به تولید سویه‌های جدید می‌گردد منجر به فرار باکتری از سیستم ایمنی نیز می‌گردد.[۲۶]

کمپیلوباکتر رکتوس (Campylobacter rectus): کمپیلوباکتررکتوس باسیل گرم منفی میله‌ای و بی‌هوازی می‌باشد، این گونه پاتوژن است و باعث التهاب لثه و افتادن دندان می‌شود، ژن کدکنندهٔ S-layer در کمپیلوباکتررکتوس، crsA نامیده می‌شود که یک ژن تک نسخه است. وزن مولکولی این لایه ۱۵۰ kDa می‌باشد.[۲۷] S-layer مهم‌ترین فاکتور ویرولانس این باکتری محسوب می‌گردد زیرا باکتری به واسطه این ساختار خود را به سلول‌های میزبان متصل می‌کند.[۲۷]

باسیلوس آنتراسیس (B. anthracis): باسیلوس آنتراسیس از جمله باکتری‌های پاتوژن انسانی و عامل سیاه زخم است. ژن کدکنندهٔ S-layer

Archive of SID
www.SID.ir

در باسیلوس آنتراسیس، sap نامیده می‌شود، وزن مولکولی S-layer در این باکتری ۹۴ kDa می‌باشد. در این باکتری دو ژن برای سنتز S-layer وجود دارد" sap و eag".[۱۲] eag و sap دو جزء ژن‌های کروموزومی باکتری هستند و در یک اپرون قرار دارند، به این ترتیب که eag پائین دست sap واقع شده و حد فاصل این دو ژن، یک قطعهٔ ۷۲۲ bp (غیرکدکننده) قرار گرفته است.[۳۰-۱۲،۲۸] sap پروتئین ناپایدار و شکننده‌ای می‌باشد و EA1 (محصول ژن eag) باعث پایداری آن می‌شود. EA1 پروتئینی است که کمتر به خارج سلول ترشح می‌شود و عمدتاً متصل به سلول باقی می‌ماند، این در حالی است که مقداری از زیرواحدهای sap به خارج از سلول ترشح می‌شود.[۱۲]

باسیلوس تورنجینسیس (B. thuringiensis): باسیلوس تورنجینسیس پاتوژن حشرات است و در کشاورزی از این باکتری به‌عنوان حشره‌کش بیولوژیک استفاده می‌شود، ژن کد کنندهٔ S-layer در این باکتری SlpA نامیده می‌شود. این ژن از ۶۲۰bp به‌وجود آمده است، وزن مولکولی آن KDa ۸۴/۴ می‌باشد. فراوردهٔ پروتئینی این ژن واجد ۸۲۱ اسید آمینه می‌باشد، امّا پروتئین بالغ (S-layer) ۷۹۲ اسید آمینه دارد.[۸]

باسیلوس سرئوس (B. cereus): باسیلوس سرئوس از جملهٔ پاتوژن‌های انسانی می‌باشد و در افرادی که دچار نقص سیستم ایمنی هستند به‌عنوان یک پاتوژن فرصت طلب رفتار می‌کند. وزن مولکولی S-layer در باسیلوس سرئوس ۸۵KDa-۹۷ می‌باشد، به این ترتیب که در سویه‌هایی از باکتری که روی محیط‌های جامد کشت داده شده‌اند وزن مولکولی S-layer، KDa ۹۷ و در سویه‌هایی که روی محیط‌های مایع کشت داده شوند وزن مولکولی KDa S-layer ۸۵ می‌باشد. کاهش وزن مولکولی S-layer باکتری‌های کشت داده شده روی محیط مایع در مقایسه با محیط‌های جامد به‌علت نقص در تشکیل زیرواحدهای S-layer تحت شرایط کشت مایع و جداشدگی قسمت‌هایی از S-layer در محیط‌های مایع می‌باشد.[۹،۲۳،۳۱]

S-layer در باسیلوس سرئوس منجر به اتصال باکتری به پروتئین‌های ماتریکس، آب‌گریز شدن سطح باکتری، مقاومت باکتری در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت در برابر اشعهٔ گاما می‌گردد. S-layer در این باکتری با جذب رادیکال‌های آزادی که توسط اشعهٔ گاما تولید می‌شود منجر به مقاومت سلول در برابر اشعه می‌گردد.[۳۲،۳۳]

لاکتوباسیلوس (Lactobacilli): لاکتوباسیل‌ها، باسیل‌های گرم مثبت و بی‌هوازی هستند. لاکتوباسیل‌ها عمده‌ترین باکتری‌های موجود در بدن انسان هستند و حدوداً ۱۰۱۰ لاکتوباسیل در هر گرم از مدفوع انسان وجود دارد، بسیاری از لاکتوباسیل‌ها فلور نرمال دستگاه گوارش انسان و حیوان محسوب می‌شوند. این باکتری‌ها در تولید فرآورده‌های غذایی- صنعتی اهمیت ویژه‌ای دارند، وزن مولکولی S-layer در گونه‌های لاکتوباسیلوس در دامنهٔ kDa ۴۶-۴۳ قرار دارد و بر خلاف S-layer موجود در باکتری‌ها، نقطه ایزوالکتریک در S-layer گونه‌های لاکتوباسیلوس و متانوترموس فرویدوس (Methanothermus fervidus) قلیایی می‌باشد.[۳۸-۳۴] S-layer در گونه‌های مختلف این جنس، عملکردهای گوناگونی دارد به‌عنوان مثال در لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس L. acidophilus باعث اتصال باکتری به سلول‌های اپیتلیال می‌شود، در لاکتوباسیلوس کریسپاتوس L. crispatus باعث اتصال باکتری به کلاژن می‌شود و در لاکتوباسیلوس برویس L. brevis ATCC 8287 باعث اتصال باکتری به فیبرونکتین (در شرایط in-vivo) می‌گردد.[۳۸-۳۶]

لاکتوباسیلوس هلوتیکوس (Lactobacillus helveticus ATCC 12046): لاکتوباسیلوس هلوتیکوس کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی دارد از جمله در تولید پنیر از این باکتری استفاده می‌شود، دیوارهٔ سلولی این باکتری سه لایه دارد. آخرین لایهٔ دیوارهٔ سلولی لاکتوباسیلوس هلوتیکوس S-layer است، وزن مولکولی این لایه kDa ۵۲ می‌باشد. ۴۴ درصد از اسیدهای آمینه این ساختار از نوع آب گریز هستند و ناحیهٔ N- ترمینال این پروتئین غنی از اسیدهای آمینهٔ آلانین، ترئونین، آسپارژین و اسید آسپارتیک می‌باشد.[۱۰]

لاکتوباسیلوس کریسپاتوس (Lactobacillus crispatus): ژن کدکنندهٔ S-layer در لاکتوباسیلوس کریسپاتوس cbsA نامیده می‌شود، پلی‌پپتید S-layer در این باکتری حاوی ۴۱۰ اسید آمینه می‌باشد و پیش پروتئین S-layer حاوی پپتید نشانه‌ای متشکل از ۳۰ اسید آمینه‌ای می‌باشد.

S-layer در این باکتری باعث اتصال باکتری به کلاژن می‌گردد. اتصال مزبور از طریق ناحیهٔ N–ترمینال S-layer صورت می‌پذیرد، به عبارت دیگر S-layer در کلونیزاسیون لاکتوباسیل‌ها مؤثر است. در L. crispatus JCM5810 علاوه بر ژن cbsA، ژن دیگری به نام cbsB کدکنندهٔ S-layer در این باکتری می‌باشد. این دو ژن واجد ۴۴ درصد تشابه نوکلئوتیدی می‌باشند. وزن مولکولی S-layer کد شده توسط cbsA در L. crispatus JCM5810 ، kDa ۴۳ است و محتوای اسیدآمینه‌ای آن با S-layer موجود در سایر باکتری‌ها تشابه دارد. ۳۷درصد از اسیدهای آمینه این ساختار آب گریز هستند، به‌طوری‌که ۶ درصد سرین و ۱۳ درصد ترئونین در ساختار S-layer این باکتری به‌کار رفته است و سیستئین در ساختار آن مشاهده نمی‌شود.[۱۰]

نتیجه‌گیری

بررسی‌های به عمل آمده در ارتباط با انتشار باکتری‌های مولد S-layer و مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط بیمارستان، بیانگر انتشار وسیع سویه‌های مقاوم در برابر دارو در محیط‌های زیستی و غیر زیستی در بیمارستان بوده است.[۱۰،۳۹،۴۰] انتشار سویه‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در بیمارستان‌ها، نه تنها منجر به گسترش عفونت‌های بیمارستانی مقاوم در برابر دارو می‌گردد بلکه در نهایت منجر به انتشار باکتری‌های مقاوم به جامعه نیز می‌گردد.[۱۰،۳۹،۴۰] نظر به اهمیت S-layer و با توجه به انتشار گسترده این ساختار در اکثر گونه‌های پاتوژن انسانی و گسترش انتشار سویه‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در بیمارستان‌ها و با مدنظر قرار دادن این نکته که S-layer از جمله جدیدترین ساختارهای ویرولانس در پروکاریوت‌ها به شمار می‌رود و منجر به پایداری فیزیکی و شیمیایی و مهار ورود داروها به

Archive of SID
www.SID.ir

بـاکتری‌هـا مـی‌گـردد، شناسـایی و بررسـی مولکـولی ایـن سـاختار در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد.

سپاسگزاری

کمال تـشکر و قـدردانی خـود را از مـدیریت بیمارسـتان فـوق تخصـصی الزهـرا، مـدیریت آزمایـشگاه تحقیقـاتی دانـشکده علـوم دانـشگاه اصـفهان، مدیریت بخش مجلات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، کمیته کنترل عفونـت بیمارسـتان الزهـرا، خـانم‌هـا و آقایـان دکتـر اردشـیر طـالبی، دکتـر مهـرداد معمارزاده، دکتر کامیار مـصطفوی‌زاده، سـینا مباشـری‌زاده، فریبـرز کیـانپور، محسن حسینی بالام، کبری مقصودی، مهندس علی مهرابی و تمامی عزیزانی که در به ثمر رسیدن این پژوهش یارای ما بودند اعلام می‌دارم.

References

1. Todor k. Bacterial structural in relationship to pathogenicity. Available at www.texbook of bacteriology.net (2005).
2. Dietmar Pum, Sleytr UB. The application of bacterial S-layer in molecular nanotechnology. Elsevier Science 1999.
3. Sleytr UB, Sara M. Bacterial and archaeal S-layer proteins: structure-function relationship and their biotechnological applications. Trends Biotechnol 1997; 15(1): 20-26.
4. Sleytr UB, Bayley H, Sara M, et al. Applications of S-layers. FEMS Microbiology Review 1995; 20: 151-175.
5. Sara M, Sleytr UB. S-Layer proteins. J Bacteriol 2000; 182(4): 859-868.
6. Schaffer C, Messner P. Glycobiology of surface layer proteins. Biochimie 2001; 83(7): 591-599.
7. Engelhardt H, Peters J. Structural research on surface layers: A focus on stability, surface layer homology domains, and surface layer cell wall interactions. J Struc Biol 1998; 124(2-3): 276-302.
8. Mesnage S, Haustant M, Foue A. A general strategy for identification of S-layer genes in the Bacillus cereus group: molecular characterization of such a gene in Bacillus thuringiensis subsp. Galleriae NRRL4045. Microbiology 2001; 147(5): 1343-1351.
9. Jalalpoor S, Kasra-Kermanshahi R, Nouhi AS and Zarkesh-Esfahani H. Prevalence of nano structure S-layer and β-lactamase in Bacillus cereus strains. J Med Sci Islamic Azad Univ 1389; 3. (In Press).
10. Jalalpoor S, Kasra-Kermanshahi R, Nouhi AS and Zarkesh-Esfahani H. [Study production of β-lactamase and surface layer, nano structure in some of isolated pathogen bacteria from clinical and environmental hospital samples] Persian [dissertation]. Tehran: Islamic Azad University; 2007.
11. Yoneda M, Hirofuji T, Motooka N. Humoral immune responses to S-layer-like proteins of Bacteroides forsythus. Clin Diag Lab Immun 2003; 10(3): 383-387.
12. Esnagem S, Couture ET, Mock M. Molecular characterization of the Bacillus anthracis main S-layer component: evidence that it is the major cell-associated antigen. Mol Microbiol 1997; 23(6): 1147-1155.
13. Schaffer CH, Messner P. The structure of secondary cell wall polymers: how Gram-positive bacteria stick their cell walls together. Microbiology 2005; 151(3): 643-651.
14. Jarosch M, Egelseer E M, Mattanovich D. The S-layer gene sbsC of Bacillus stearothermophilus ATCC 12980: molecular characterization and heterologous expression in Escherichia coli. Microbiology 2000; 146(2): 273-281.
15. Mader C, Huber C, Sleytr UB. Interaction of the crystalline bacterial cell surface layer protein sbsB and the secondary cell wall polymer of Geobacillus stearothermophilus PV72 assessed by real time surface plasmon resonance biosensor technology. J Bacteriol 2004; 186(6): 1758-68.
16. Ilk N, Kosma P, Puchberger M. Structural and functional analyses of the secondary cell wall polymer of Bacillus sphaericus CCM 2177 serving as an S-layer-specific anchor. J Bacteriol 1999; 181(24): 7643-7646.
17. Arteel GE, Franken S, Kappler J and Sies H. Binding of selenoprotein P to heparin: characterization with surface plasmon resonance. Biol Chem 2000; 381(3): 265-268.
18. Callegari ML, Riboli B, Sanders JW. The S-layer gene of Lactobacillus helveticus CNRZ 892: cloning, sequence and heterologous expression. Microbiology 1998; 144(3):719-726.
19. Messner P. Chemical composition and biosynthesis of S-layers. Austin, Texas: Academic Press, Landes Company; 1996: 35-76.
20. Jalalpoor S, Kasra-Kermanshahi R, Nouhi AS and Zarkesh-Isfahani H. The Prevalence of nano-structure surface layer in Bacillus cereus strains isolated from staff hands and hospital surfaces. J Isfahan Med Sch) 2009; 27(100): 632-645.
21. Eichler J. Facing extremes: Archaeal surface - layer (glyco) proteins. Microbiology 2003; 149(12): 3347-3351.
22. Navarre W, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol Mol Biol Rev 1999; 63(1): 174-229.
23. Kotiranta A, Haapasalo M, Kari K. Surface structure, hydrophobicity, phagocytosis, and adherence to matrix proteins of Bacillus cereus cells with and without the crystalline surface protein layer. Infect Immun 1998; 66(10): 4895-902.
24. Higuchi N, Murakami Y, Moriguchi K. Localization of major, high molecular weight proteins in Bacteroides forsythus. Microbiol Immunol 2000; 44(9): 777-780.
25. Kawai E, Akatsuka H, Idei A. Serratia marcescens S-layer protein is secreted extracellularly via an ATP binding cassette exporter, the Lip system. Mol Microbiol 1998; 27(5): 941-952.
26. Dubreuil JD, Logan SM, Cubbage S. Structural and biochemical analyses of a surface array protein of Campylobacter fetus. J Bacteriol 1998; 170 (9): 4165-4173.

Archive of SID
www.SID.ir

27. Wang B, Kraig E, Kolodrubetz D. Use of defined mutants to assess the role of the Campylobacter rectus S-Layer in bacterium-epithelial cell interactions. Infect Immun 2000; 68(3): 1465-1473.
28. Iuga M, Awram P, Nomellini JF and Smit J. Comparison of S-layer secretion genes in freshwater caulobacters. Can J Microbiol 2004; 50(9): 751-766.
29. Ilk N, Kosma P, Puchberger M. Structural and functional analyses of the secondary cell wall polymer of Bacillus sphaericus CCM 2177 that serves as an S-layer-specific anchor. J Bacteriol 1999; 181(24): 7643-7646.
30. Ries W, Hotzy C, Schocher I. Evidence that the N-terminal part of the S-layer protein from Bacillus stearothermophilus PV72/p2 recognizes a secondary cell wall polymer. J Bacteriol 1997; 179(12): 3892-3898.
31. Washington C, Winn JR, Stephen D, editors. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. New York: Lippincott Williams& Wilkins; 2006.
32. Jalalpoor S, Kasra-Kermanshahi R, Nouhi AS and Zarkesh-Isfahani H. Survey effect of in-vivo and in-vitro condition on expression of surface layer genes in bacteria. J Iran Chem Soci 2009; 6(suppl): S11.
33. Jalalpoor S, Kasra-Kermanshahi R, Nouhi AS and Zarkesh-Esfahani H. The role of nanostructured surface layer and production of β–lactamase in penicillin resistant Bacillus cereus strains. Iran J Med Microbiol 2010; 4(1): 18-26.
34. Gilmour R, Messner P, Guffanti A. Two-dimensional gel electrophoresis analyses of pH-dependent protein expression in facultatively alkaliphilic Bacillus pseudofirmus OF4 lead to characterization of an S-layer protein with a role in alkaliphily. J Bacteriol 2000; 182(21): 5969-5981.
35. Avall Jaaskelainen S, Kyla-Nikkila K, Kahala M. Surface display of foreign epitopes on the Lactobacillus brevis S-layer. Appl Environ Microbiol 2002; 68(12): 5943-5951.
36. Hynonen U, Westerlund-Wikstrom B, Palva A and Korhonen T. Identification by flagellum display of an epithelial cell and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of Lactobacillus brevis. J Bacteriol 2002; 184(12): 3360-3367.
37. Sillanpaa J, Martinez B, Antikainen J. Characterization of the collagen-binding S-layer protein cbsA of Lactobacillus crispatus. J Bacteriol 2000; 182(22): 6440-6450.
38. Smith E, Oling F, Demel R. The S-layer protein of Lactobacillus acidophilus ATCC 4356: identification and characterisation of domains responsible for S-layer protein assembly and cell wall binding. J Mol Biol 2001; 305(2): 245-257.
39. Jalalpoor S, Kasra-Kermanshahi R, Nouhi AS and Zarkesh-Esfahani. Comparison of the frequency β-lactamase enzyme in isolated nosocomial infectious bacteria. J Rafsanjan Univ Med Sci 1388; 8(3): 203-214.
40. Jalalpoor S, Kasra-Kermanshahi R, Nouhi AS and Zarkesh-Esfahani. Survey frequence of β-lactamase enzyme and antibiotic sensitivity pattern in isolated pathogen bacteria from low and high hospital contact surfaces. Pajuhandeh J 1389; 15(2): 77-82.

Archive of SID

www.SID.ir

The specificationof nano-structure superficial layers in some of the pathogen bacteria

Shilla Jalalpoor, [1] **Rooha Kasra-Kermanshahi,** [2] **Ashraf Sadat Noohi,** [3] **Hamid Zarkesh-Isfahani** [4]

Received: 15/May/2010
Accepted: 26/Jul/2010

***Background*:** The superficial layer is a part of the cellular envelop that is seen in bacteria and archaea. This superficial layer is a single layer structure composed of subordinate proteins or glycoproteins. The superficial layer is the outer most cellular structure that is in the exchange and reaction around environment with bacteria. This structure has very diversity in bacteria different types.

***Materials and Method*:** The related articles to superficial layer were extracted of these articles: Pubmed, Elsevier Science, and Yahoo, from 1995 to 2010 years. For this purpose keywords were searched including superficial layer, pathogenesis, pathogen bacteria,

Results: There is consensus in the case of the superficial layer and about the existence of this superficial structure lead to increased pathogenesis in bacteria, in all of the research articles.

***Conclusion*:** S-layers in pathogen bacteria with bacteria protection against bacteriophages and phagocytosis, resistance against low pH, adhesion, stabilisation of the membrane and providing adhesion sites for exoproteins caused pathogenesis, infection resistant and antibiotic resistant in host.

The result of this study shows the prevalence of considerable S-layer in pathogen bacteria and this matter identified the bacteria generator importance of this structure in the laboratory. [ZJRMS, 12(4): 3-10]

***Keywords*:** Superficial layer, pathogenesis, pathogen bacteria

1. MSc of Microbiology, Membership of Young Researchers Club, Islamic Azad University Shahreza Branch, Isfahan, Iran.
2. Professor of Biology, School of Basic Sciences, University of Alzahra, Tehran, Iran.
3. Professor of Biology, School of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.
4. Assistant Professor of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

Archive of SID

www.SID.ir