الفصل التاسع

مقاومة المضادّات الحيوية بواسطة مضخات التدفق
ANTIBIOTIC RESISTANCE BY EFFLUX PUMPS

الطريقة الرئيسية الثانية التي تتجلى بها مقاومة الدواء في البكتيريا هي بواسطة التصدير النشط أو تدفق المضاد الحيوي للخارج بحيث إن التراكيز العلاجية لا يتم بلوغها في السيتوبلازم البكتيري. ويُركز الشكل في مقدمة الفصل على جزء من الشكل (٢,٢) الذي يتناول المقاومة بواسطة التدفق النشط للمضادّات الحيوية.

ويتواسط التدفق النشط بواسطة البروتينات عبر الغشاء، في كل من الأغشية السيتوبلازمية وكذلك في الغشية الخارجية للبكتيريا السالبة – لغرام، وتعمل البروتينات عبر الغشاء بمثابة مضخات تصدر المضادّات الحيوية، وفي كثير من الأحيان ضد تدرجات التركيز (الجدول ٩,١). ويمكن أن يكون التدفق النشط ذا صلة سريرياً بمضادّات بيتا لكتام الحيوية، الميكروليدات، ببتيدات بريستيناميسين، الفلوروكوينولونات، والتتراسيكلينات الأكثر كلاسيكية. وكما سنرى أدناه، بعض مضخات التدفق لها خصوصية (نوعية) ضيقة نسبياً مثال، مضخات التتراسيكلين، في حين أن البعض الآخر له احتمال (tolerance) واسع ويضفي الأنماط الظاهرة للمقاومة المتعدِّدة الأدوية (Mdr). وللبكتيريا أعداد كبيرة من مضخات التدفق، وتستعمل فسيولوجياً لتصدير الأيضات ولتضخ للخارج المواد السامة الغريبة. ومجموعة المضخات المتكاملة ذات الأنشطة المتداخلة يمكن أن تؤدي إلى قدرة (سعة) ملحوظة لضخ المضادّات الحيوية إما كقدرة أيضية مشفرة صبغوياً والتي تجعل الزائفة الزنجارية غير حساسة داخلياً للمضاد الحيوي، وإما بواسطة إكتساب جينات ضخ محمولة على البلازميدات والترانسبوزونات (الينقولات).

أصناف مضخات تدفق الغشاء

من تحليل المعلوماتية الحيوية تم وصف أربعة من عائلات بروتينات مضخات التدفق التي يمكن أن تعمل في مقاومة المضادّات الحيوية (الشكل ٩,١). والثلاث الأولى تزاوج (تربط) تدفق الدواء نحو عكس اتجاه البروتونات، أو في بعض الأحيان نحو أيونات الصوديوم (Na^+ ions)، بينما تستعمل العائلة الرابعة التحلل المائي للـ ATP لتوفير الطاقة للتصدير النشط للمضاد الحيوي أو مركب آخر غريب خارج الخلية (بولسن وآخرون Paulsen *et al.*, 1996).

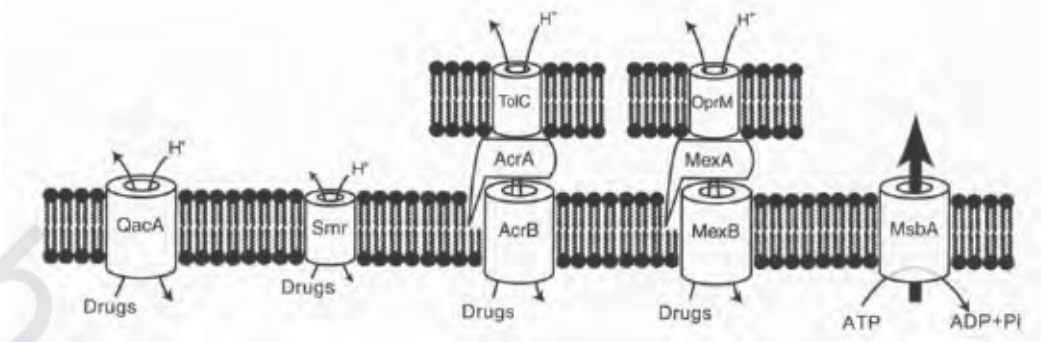
تصنف المضخات التي تدفعها قوة بروتون الحركية (proton motive force)(Δ pH) تحت العائلة الفرعية الكبيرة الميسرة (major facilitator subfamily (MFS)) والعائلة الصغيرة المنظمة للعديد من الأدوية (the small multidrug regulator family (SMR))، أو عائلة RND (المقاومة/ التعقد/ انقسام الخلية) (resistance/ nodulation/ cell division)، استناداً على الحجم البارز والحاجة لبروتينات شريكة ووحدات فرعية. والفئة الرئيسة الثانية من مضخات التدفق، تلك التي تحلل مائياً ATP، وتسمى عائلة الكاسيت الرابط-ATP (ATP-binding cassette (ABC) family). التوجه التخطيطي للأصناف الأربعة من مضخات التدفق في الغشاء السيتوبلازمي البكتيري يظهر في الشكل (٩,١)، مع تدفق معاكس لأيون الهيدروجين H^+ أو التحلل المائي لـ ATP كآلية اقتران إلزامية للتدفق. في حين أن المضخات المدفوعة بـATP هي السائدة في سويات النواة، ومضادّات الحِمال (الناقلين)- المشتقة من البروتون (the proton-driven antiporters) تسود في المجينات البكتيرية.

وعلى سبيل المثال، يتوقع أن يكون للإشريكية القولونية أعضاء 18MFS,3 to 4 SMR and 5 to 6 RND، ليصبح المجموع ٢٦ مضخات تدفق مدفوعة بواسطة التدفق المعاكس للبروتونات، مقارنة فقط ٣ - ٦ مضخات ABC-type ATPase (بورجيز - والمسلي ووالمسلي Borges-Walmsley and Walmsley, 2001، ساير وآخرون Saier *et al.*, 1998). والمزيد من الحواشي (annotation) قد رفع الإجمالي المعروض من ٣١ - ٣٧ جينات متوقعة ناقلة للدواء للإشريكية القولونية (نيشينو وياماجوتشي Nishino and Yamaguchi, 2001).

الجدول (٩,١). موجز لجوانب مقاومة الدواء التي قررت للمقاومة-متعدّدة الدواء-الحفّازة لمضخات التدفق (عدلت من بوتمان وآخرون Putman *et al.*, 2000).

	MFS						SMR	RND						ABC
	12-TMS cluster				14-TMS cluster									
Drug	Blt	Bmr	EmrD	NorA	EmrB	VceB	EmrE	AcrB	AcrF	MexB	MexD	MexF	MexY	LmrA
Aminoglycosides		−					−	−		−	−	−	+	+
β-Lactams														
Carbapenems							−			+		−		−
Cephalosporins							−			+				+
Penicillins								+	+	+	−			+
Chloramphenicol		+	−	+	−	+	−	+		+	+	+		+
Glycopeptides							−	−	+					−
Lincosamides														−
Macrolides														
14-Membered		−		−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+
15-Membered										−	+			+
16-Membered														
Novobiocin						−		+	−	+				
Quinolones														
Hydrophilic	+	+	−	+	−	−		+		−	+	+	+	+
Hydrophobic		−	−	+	+	+		+		−	+		+	+
Rifampin						−		+	+					
Sulfonamides										−				
Tetracyclines		−		−	−	−	+	+	+	+	+	+		+
Trimethoprim										+		+		−

بالإذن من بوتمان وآخرون Putman *et al.*, 2000.

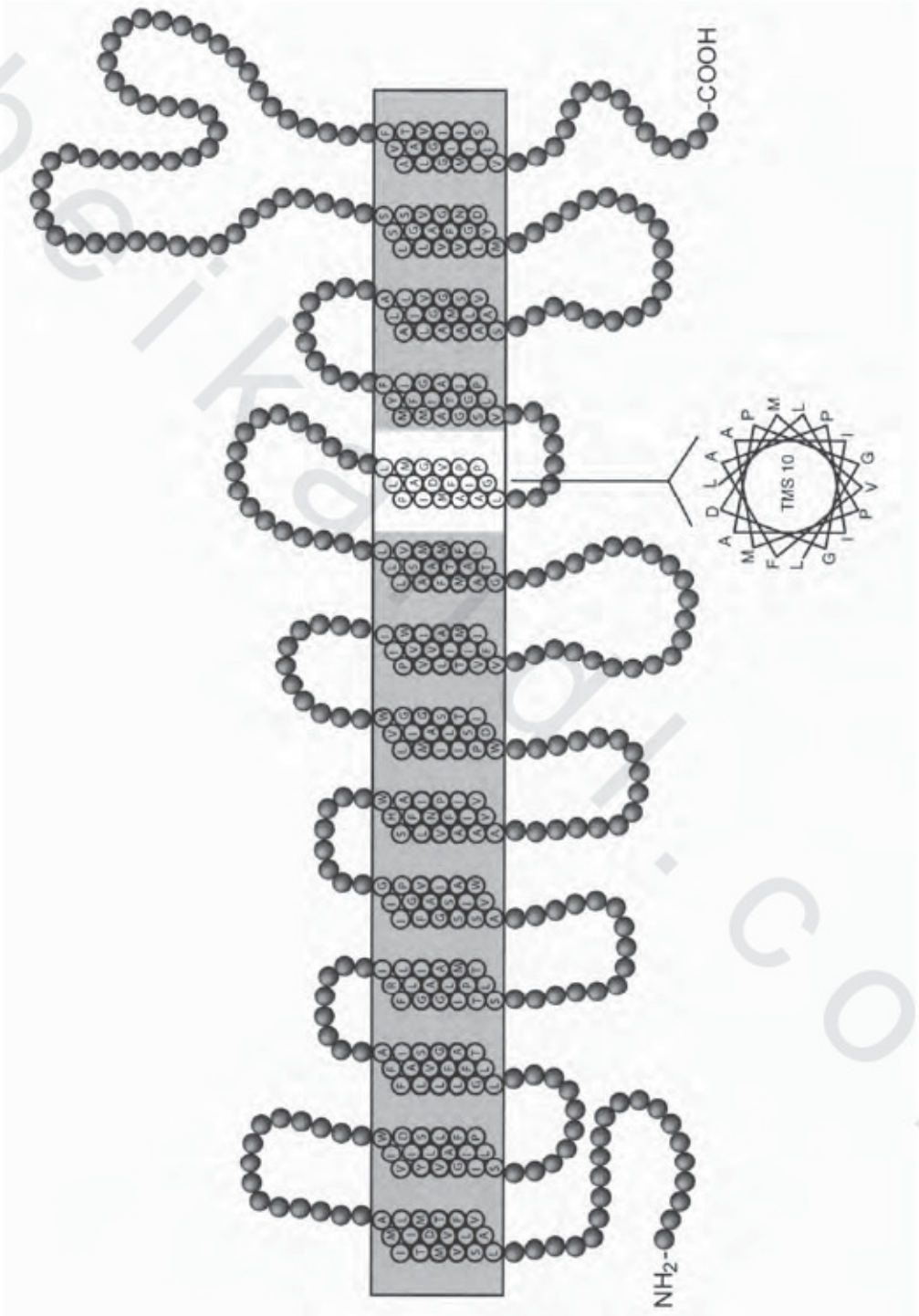


الشكل (٩,١). أربع عائلات بروتين فرعية للمضخات التدفق المعتمدة على–البروتون وعائلة ATPase لمضخة التدفق في المقاومة للمضاد الحيوي. (بالإذن من بولسن وآخرون Poulsen *et al.*, 1996).

العائلة الفرعية MFS، ممثلة بواسطة QacA (مركبات الأمونيوم الرباعية (quaternary) ammonium compounds (QAC)، التي تستعمل كمطهرات (disinfectants) ومانعة للعفونة (antiseptics)، كانت من بين أول المركبات الترابطية (ربيطة) التي تم الكشف عنها لتكون مواد لمضخة التدفق هذه) في الشكل (٩,١) لها أكثر من ٣٠٠ أعضاء محتملين في بدائيات النواة وسويات النواة ويشمل عائلة إنزيم لاكتوز النفوذي (lactose permease) البكتيري LacY وglut من نواقل الغلوكوز في الإنسان. ويحتمل أن يكون الإستعمال لبعض أعضاء العائلة البكتيرية لتدفق الدواء، تغيير طفيف لنطاق واسع من الوظائف الفسيولوجية. يظهر الشكل (٩,٢) أن كل من النهايات الطرفية N-and C-terminals لمضخات MFS يحتمل أن تكون على الوجه السيتوبلازمي، كما هو ممثل في هذا الإحتمال لبروتين QacA للمكورة العنقودية الذهبية. ويُعتقد بأن النهايات N لبروتينات الغشاء MFS تكون مشتملة في تنشيط النقل في حين أن النهاية C، الأكثر تغاير في التسلسل، قد تكون مشاركة في التمييز النوعي للربيطة للتصدير.

يتوقع أن يكون لبعض مضخات MFS ١٤ لفة حِلزية عبر الغشاء: QacA, EmrB في الإشريكية القولونية، TetK من المكورة العنقودية الذهبية، TetL من العصية أليفة الحرارة العالية (Bacillus sterothermophilus)، وTcmA من الكائن المنتج المتسلسلة جلوسينسيز *(Streptomyces glaucescens)* للتتراسينوميسين (tetracenomycin). وأُخر لها١٢حقول TM محتملة: Blt و Bmr من العصية الرقيقة، EmrD من الإشريكية القولونية، NorA من المكورة العنقودية الذهبية، والبروتينات TetA,TetG and TetH من سلسلة من البكتيريا السالبة– لغرام (لوموفيسكايا وآخرون Lomovskaya *et al.*, 2001). ولقد أنتجت بلورات ثنائية– الأبعاد لمضخة TetA، وأدت إلى نماذج (مجسمات) تركيبية ذات تمييز (تفريق)– منخفض (ين وآخرون Yin *et al.*, 2000). وأحد الفرضيات حول مصدر هذه العائلات الفرعية MFS هي النشوء بواسطة ازدواج الجين من طليعة جين ٦– عبر الغشاء شائع. وربما توظف مضخة QacA من تلقاء نفسها في سلالات المكورة العنقودية الذهبية الموجبة– لغرام، كما هو الحال مع مضخات التتراسيكلين TetK و TetL من السلالات الموجبة– لغرام. وللمضخات في السلالات السالبة– لغرام بروتينات شريكة في كل من الجبلة والغشاء

الخارجي، المبينة في الشكل (٩,١) لـ EmrB, EmrA، وشريك آخر في الغشاء الخارجي لم يحدد بعد، ربما يكون هو البروتين TolC.



الشكل (٩,٢). اتجاه مضخات MFS المحتملة في الغشاء السيتوبلازمي البكتيري. (بالإذن من بولسين وآخرون Paulsen *et al.*, 1996).

العائلة SMR هي بروتينات 12-kDa صغيرة، ولها أربع حقول عبر الغشاء محتملة، وربما تعمل كموحودات (oligomers). ويحتمل أن يكون لمضخات العائلة RND ١٢ حقول TM، ومرة أخرى ربما تنشأ بواسطة ازدواجية الجين من طليعة 6 -TM. وفي الإشريكية القولونية تشتمل هذه العائلة على مضخات AcrB و AcrF (ACR تُرمِّز لمقاومة الأكريدين acridine resistance)، وفي الزائفة الزنجارية تشمل MexB (الشكل ٩,١) و MixD، وفي العزل السريري للنيسيرية السيلانية *(Neisseria gonorrhoeae)* المضخة هي MtrD.

ولقد تم وصف جميع مضخات نقل الدواء الثلاثين المحتملة والمشتقة من بروتون- الإشريكية القولونية (أعضاء العائلة 20MFS, 3SMR,and 7RND) في بلازميدات متعدِّدة النسخ في طفرة الإشريكية القولونية التي تفتقر إلى مضخة التدفق AcrAB (نيشينو وياماجوتشي Nishino and Yamaguchi, 2001) وتم تقييمها لزيادة المقاومة لثلاثة عشر مضاد حيوي. انضمت ستة منتجات جين جديدة إلى ١٣ مضخة معروفة لتعطي ٢٠ من الجينات التي تضفي مقاومة دواء اثنين- طية أو أكثر لواحد على الأقل أو أكثر من المضادّات الحيوية. وهذا قد يصنع مجموعة مكتبة مفيدة للبحث عن مضادّات حيوية جديدة مرشحة لتكون حساسة لهذه المجموعة من المضخات.

العائلة الرابعة هي عائلة ABC من ATPase. وهي تمثل الأقلية من مضخات تدفق المضاد الحيوي ولكنها شائعة للغاية من نظام النقل عبر الغشاء. وعلى سبيل المثال، ويقدر أن يكون 70 ABC-type ATPase مشفر في مجين الإشريكية القولونية، وتمثل ما يقرب من ٥٪ من الجينات. التنظيم النموذجي لبروتينات ABC هو أن تكون جزءاً من أنظمة نقل الغشاء متعدِّدة المكونات، ويشمل مكونات البروتين الجبلّي. وفي الإشريكية القولونية، يتوقع أن تكون جينات ABC 44 جزء من أنظمة القبط (الامتصاص) من الجبلة في حين أن ١٣ يتوقع أن تكون مخصصة لتصدير الربيطة. ويشمل تنظيم الحقل النموذجي حقلين ذوي رهبة للماء (hydrophobic)، مطمورين كمسامات عبر الغشاء، وحقلين أليفين للماء (hydrophilic) على الوجه السيتويلازمي للغشاء اللذين يفيدا كربط لـ ATP ومواقع التحلل المائي. وتشاهد مختلف التشكيلات (configurations) للحقول، من أربعة-حقول عديد الببتيد مفرد إلى أربع وحدات فرعية منفصلة. ويحدث التشكيل الأخير في نظام مالتوز النفوذي (مالتوز بيرمياز) (maltose permease system) في الإشريكية القولونية MalG. MalF. $(Malk)_2$، حيث إن MalK هو الوحدة الفرعية ABC (الشكل ٩,٣). ولقد تم وصف تركيب أشعة -إكس لحقل ربط النيوكليوتيد ((nucleotide binding domain (NBD الخاص بمضخة MalK (هونج وآخرون Hung *et al.*, 1998)، معطياً صورة أساسية لحقل ATPase الحفّاز ولكن لا يظهر كيف يتفاعل NBD مع حقول عبر الغشاء (transmembrane domains) (TMDs)، وكيف أن رُسو معقد Malk-ATP مع وحدة الغشاء الفرعية MalF/MalG يثير التحلل المائي لـ ATP، أو كيف تستخدم الطاقة المخزنة للتغييرات التكوينية للبروتين لتفتح مؤقتاً مسام للمالتوز ليضخ للداخل.

الشكل (٩,٣). نظام نقل مالتوز الإشريكية القولونية: الشكل الهندسي لمثنوي MalK. (بالإذن من ديديريتشز وآخرون Diederichs *et al.*, 2000).

ولقد تم الحصول على حدث مهم في فهم التصميم الهندسي للناقل ABC-type بواسطة تبلور لبروتين MsbA من الإشريكية القولونية، عند تفريق- منخفض نسبياً (4.5 Å) (تشانج وروث Chang and Roth, 2001)، ولكنه كافي ليظهر توجه NBDs نحو TMDs ويسمح للنموذج لعمل الناقل. والـ MsbA مشابه لـ MDR-1 في البشر و MDR3 في الفئران، ونواقل المقاومة متعدِّدة الدواء واتي يعتقد بأنها تعمل فسيولوجياً كشحم (كدهن) وشحم فوسفوري (phospholipid) "فليبازات" "flippases"، لتنقل جزيئات الشحم الفسفوري من الطبقة الداخلية إلى الطبقة الخارجية لطبقة الغشاء الثنائية. وينقل MsbA الإشريكية القولونية الدهن (الشحم)A(lipid A) (انظر الفصل الخامس عشر) خلال الغشاء الداخلي إلى الغشاء الخارجي للغلاف السالب-لغرام، حيث يعدُّ الشحم A مكون تركيبي رئيس. ويقترح بأن MsbA وشبيهاته يعمل "كمكانس كهربائية راهبة للماء" " hydrophobic vacuum cleaners" لتزيل الدهن والدوية الراهبة للماء من وريقة الغشاء الداخلي (تشانج وروث Chang and Roth, 2001، رافيف وآخرون Raviv *et al.*, 1990). يتبلور Msba كمثنوي متجانس (homodimer)، مع حقل اللفات الحِلزية عبر الغشاء (بطولÅ 52) لتمد الغشاء عند ميلان ٣٠ – ٤٠° من المستوى الطبيعي للغشاء، لتوجد حجرة (غرفة) بين المثنويات تكون كبيرة بشكل كاف لترتبط بربيطة الدهن A (lipid A ligand A) (الشكل ٩,٤). ويعتقد بأن المنطقة التي تربط بين TMD و NBD، المعششة في الموقع المائي على الجانب السيتوبلازمي من الغشاء، بأنها تقترن بالتغييرات التكوينية من ربط ATP والتحلل المائي في NBD نحو TMD في الغشاء. والنماذج المقترحة بواسطة تشانج وروث Chang and Roth, 2001) تسمح بتوظيف الدهن أو الدواء من الوريقة (السيتوبلازمية) السفلى من الطبقة الثنائية للغشاء إلى داخل الحجرة كخطوة ربط/وفصل (عزل) (الشكل ٩,٤ B). ويستشعر ربط ATP إلى NBD بواسطة TMDs التي تتناوب لتغلق الحجرة وتجلب مجموعة من الشحنات من اللفات الحِلزية TM إلى داخل الحجرة المغلقة. وهذا سوف يزعزع ثبات

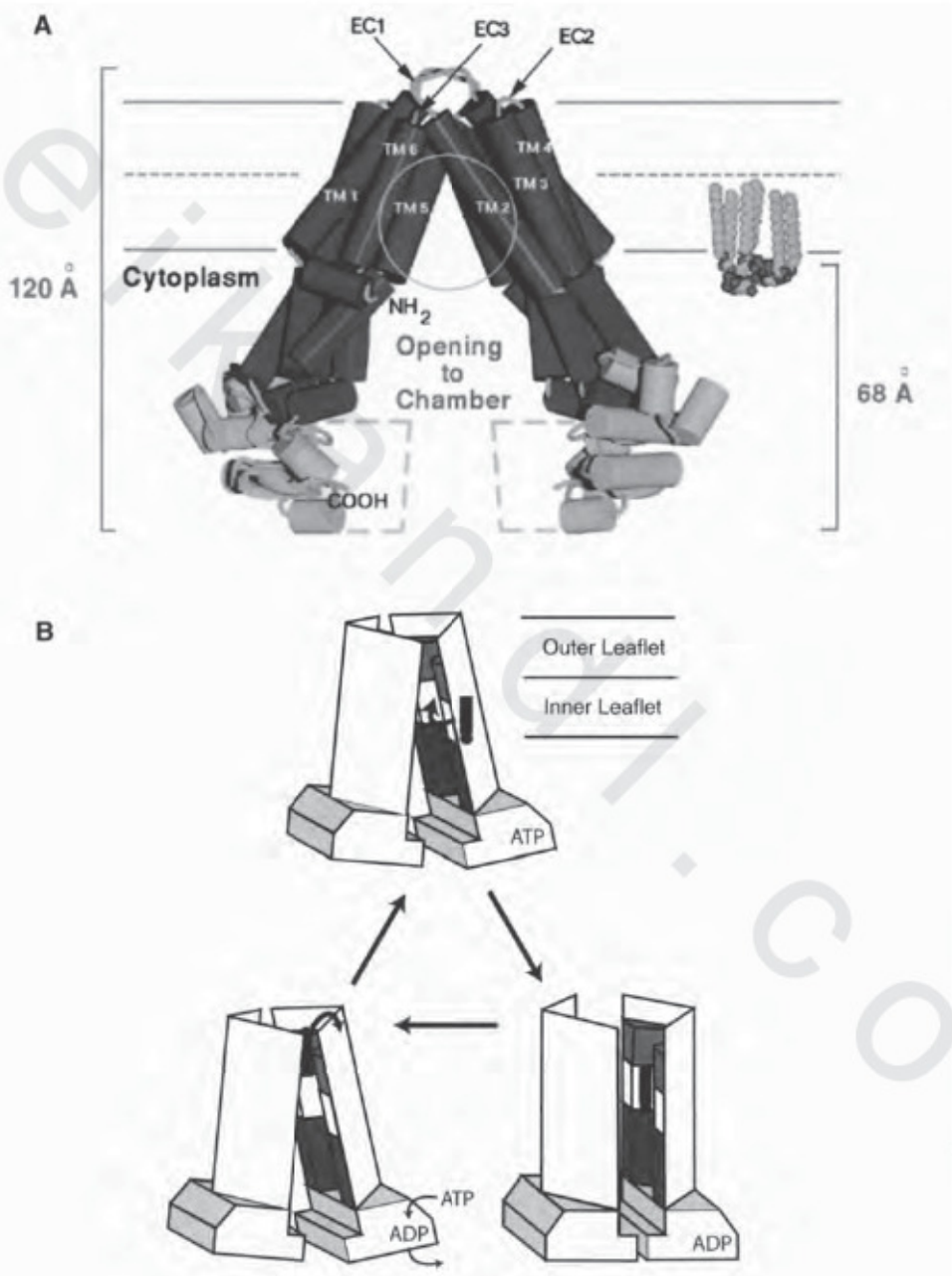
البيئة الدقيقة للربيطة الراهبة للماء، والسماح بالتقليب نحو الموضع النشط الأكثر ملاءمة في الجزء العلوي من الحجرة استعداداً لدخول الوريقة الخارجية للغشاء (تشنج وروث Chang and Roth, 2001). وفي حين أنه قد لا يكون MsbA النموذج الجيد للنواقل التي تحرك الربيطات الراهبة أليفة الماء، فمن الأرجح أن يكون نموذجاً لنواقل ABC التي تحرك تلك الراهبة للماء، ويشمل المضادّات الحيوية. ولاحظ تشانج وروث ،(Chang and Roth, 2001) بأن الحجرة يمكن أن تستوعب وتنقل تشكيلة واسعة من الجزيئات، متطابقة مع الانتقائية المنخفضة للنواقل من النوع- MDR، وأيضاً أن MsbA (والنواقل ذات العلاقة) لا تعمل كمضخة ولكن "كماكينة جزيئية تمسح وريقة الطبقة الثنائية السفلى للركائز، وتقبلهم جانبياً، وتقلبهم إلى وريقة الغشاء الخارجي".

الناقل البكتيري الثاني من النوع ABC، في هذه الحالة هو زوج البروتين BtuCD للإشريكية القولونية، ينقل الربيط أليف الماء فيتامين B_{12}، تم كذلك حله مؤخراً بواسطة تحليل أشعة- إكس عند تفريق 3.2 Å (لوشر وآخرون Locher *et al.*, 2002). والناقل الوظيفي هو المربوع المغاير (heterotetramer) $BtuC_2BtuD_2$، حيث الوحدة الفرعية BtuC تعدُّ كصمولة للغشاء، ذات ١٠ لفات ألفا –حِلزية (α-helices) لكل وحدة الفرعية، وBtuD هو كاسيت ATPase. وفيتامين B_{12} على الوجه الجِبلُي يقدم نحو الوجه الخارجي لـ $BtuC_2$ بواسطة البروتين الرابط الجِبلي BtuF، ويبدأ إشارة عبر الغشاء التي تؤدي إلى التحلل المائي لـATP وضربة القوة المفترضة التي تفتح القناة بين الوحدات الفرعية BtuC ليسمح بمرور فيتامين B_{12}.

يعتبر توجيه حقول ATPase نحو جزء البروتين الممتد- للغشاء (membrane –spanning protein) وكذلك العدد وتوجيه اللفات الحِلزية في BtuC مختلف عن الناقل MsbA. وسوف توجد النواقل الاثنين المتغايرة ABC برنامج جديد لتصميم وتحليل الربيطات البديلة ومحصرات لوظيفة القناة.

وفيما يتعلق بمضخات المضاد الحيوي في عائلة ABC، المقاومة للإريثروميسين في العزل السريري للمكورة العنقودية البشروية *(Staphylococcus epidermidis)* (تشو وآخرون Chu *et al.*,1996) هي بسبب جين *msrA*، الذي يُرمِّز (يشفر) مثل الوحدة الفرعية ATPase لضخ الإريثروميسينات وبريستينوميسينات (pristinomycins) للخارج. وكذلك، مضخة LmrA من المكورة اللبنية لاكتيس *(Lactococcus lactis)* هي مضخة MDR واسعة-المدى. عندما أظهرت المرشحات الخمس من نوع -ABC أطر (هياكل) فتح القراءة من الإشريكية القولونية وحللت كمضخات تدفق للميكروليد إريثروميسين، تم العثور على زوج الجين *ybjYZ* لترميز مثل هذه المضخة ومن ثم تمت إعادة تسميته *macAB* (كوباياشي وآخرون Kobayashi *et al.*, 2001، انظر كذلك نيشينو وياماجوتشي Nishino and Yamaguchi, 2001). ويعتقد بأن MacA يمر خلال الغشاء السيتوبلازمي مرة واحدة ويكون معظمه في الجِبلَة، في حين يعتقد بأن MacB يكون بروتين داخل الغشاء الداخلي مع الحقل السيتوبلازمي ATPase. وكما لوحظ في الشكل

(٩,١) وشرح أدناه، هناك حاجة لبروتين خارج الغشاء لتكملة تدفق الربيطة عبر الغشاء الخارجي ويزود بواسطة البروتين TolC. ونظراً لتراكيب أشعة-إكس لـ MsbA (الشكل ٩,٤) و TolC (انظر الشكل ٩,٦)، فنحن نقترب من معرفة التصميم الهندسي الجزيء لمضخات تدفق المضاد الحيوي متعدِّدة المكونات.

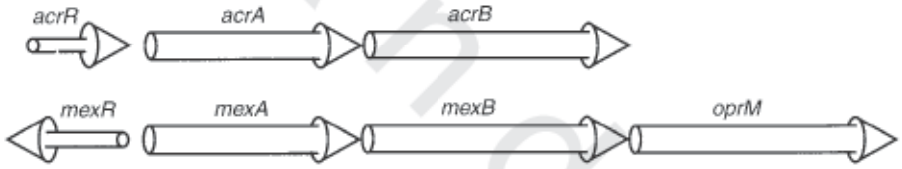


الشكل (٩,٤). رسم تخطيطي لنواقل ABC .(A) المثنوي MsbA وتوجيهه نحو وريقات الغشاء ثنائي الطبقة. (B) رسم لناقلة الدهن A بواسطة الإشريكية القولونية MsbA. (بالإذن من تشانج وروث Chang and. Roth, 2001).

وظيفة مضخات MFS وRND في التدفق الفسيولوجي والمضاد الحيوي

بدأ الدور الفسيولوجي لمختلف مضخات MFS و RND أن يُحل ليعطي بعض المفاتيح عن كيف يمكن أن يتكيفوا أو أن يَستولى عليهم لتدفق زينوبيوتك (xenobiotic) أو المضاد الحيوي. ويظهر أن مضخة Blt من العصية الرقيقة تستعمل لتدفق سبيرميدين (spermidine) وتنتسخ مع سبيرميدين أسيترانسفيريز (spermidine acyltranferase) (بولسين وآخرون Paulsen *et al.*, 1996). وهو محبوس لتصدير المضاد الحيوي. كما يظهر بأن مضخة Ptr من عائلة MFS في المتسلسلة بريستينيسبيراليز *(Streptomyces pristinaespiralis)* تكون مضخة مناعة ذاتية (autoimmunity pump) لهذا الكائن عندما تبدأ تشغيل إنتاج بريستيناميسينات I وII؛ لأن كل منهما يحرض إنتساخ ptr. ولقد لاحظنا مضخة تدفق OleB للغليكوزيل–أولياندوميسين في المنتجين المتسلسلة أنتيبيوتيكس *(Streptomyces antibioticus)* في الفصل السابع كجزء من آلية المناعة لمضادّاتها الخاصة.

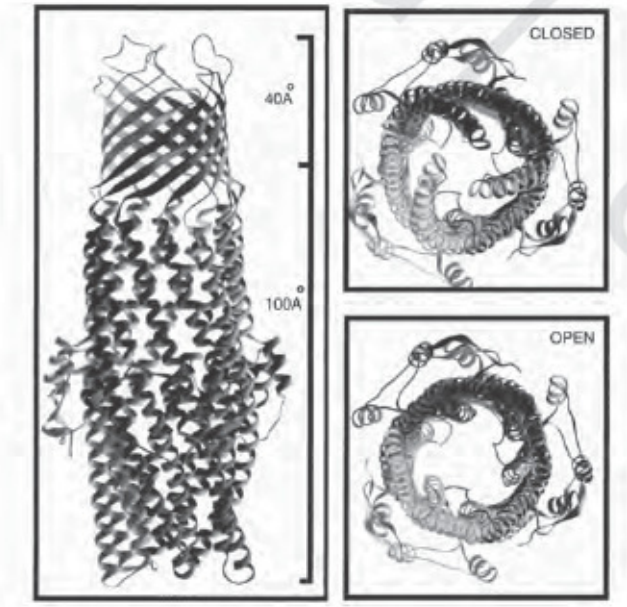
في مضخات العائلة الفرعية RND، افترض بأن المُشغِل الوراثي MexA-MexB-OprM (الشكل ٩,٥) يشارك في إفراز الببتيد غير الريبوسومي حامل الحديد بيوفيردين (siderophore pyoverdin) بواسطة الزائفة الزنجارية في البيئات الدقيقة ناقصة الحديد.



الشكل (٩,٥). تنظيم المشغل الوراثي للمكونات – الثلاث لمضخات التدفق Mex في ازائفة الزنجارية والمشغل الوراثي *acrA-acrB* في الإشريكية القولونية.

ويتطلب وجود اثنين من حواجز الغشاء في البكتيريا السالبة –لغرام مكوَن مضخة في كل من الإغشية الداخلية والخارجية وبعض بروتينات التوصيل لتكون جسراً للجبلَة أو لتجعل الغشائين في اتصال مؤقت (الشكل ٩,١). هذا الثلاثي من البروتينات جند لتدفق التتراسيكلينات، سبروفلوكساسين، كلورامفينيكول، وبيتالكتامات. وفي الحقيقة توجد أربعة من مثل مضخات التدفق من عائلة RND متعدِّدة المكونات في الزائفة الزنجارية، مع نطاقات متداخلة لضخ المضادّات الحيوية للخارج بحيث إن المجموع يجعل المرض غير حساس داخلياً لمعظم المضادّات الحيوية. وربما يكون لنظام Acr في الإشريكية القولونية دور فسيولوجي لضخ حمض الصفراء والأحماض الدهنية للخارج لتقليل سميتها (بولسين وآخرون Paulsen *et al.*,1996). AcrB هو مركب بروتين الغشاء الداخلي، بينما AcrA يعتقد بأنه يمد الجبلَة (الشكل ٩,١) ويتفاعل مع المسام العام للغشاء الخارجي/ بروتين القناة، المقترح على الخلفية الوراثية لأن يكون البروتين TolC (فراليك Fralick, 1996). TolC كما لوحظ أدناه كعنصر (مركب) لقناة الغشاء الخارجي لنظام إفراز الحال الدموي (hemolysin secretion system).

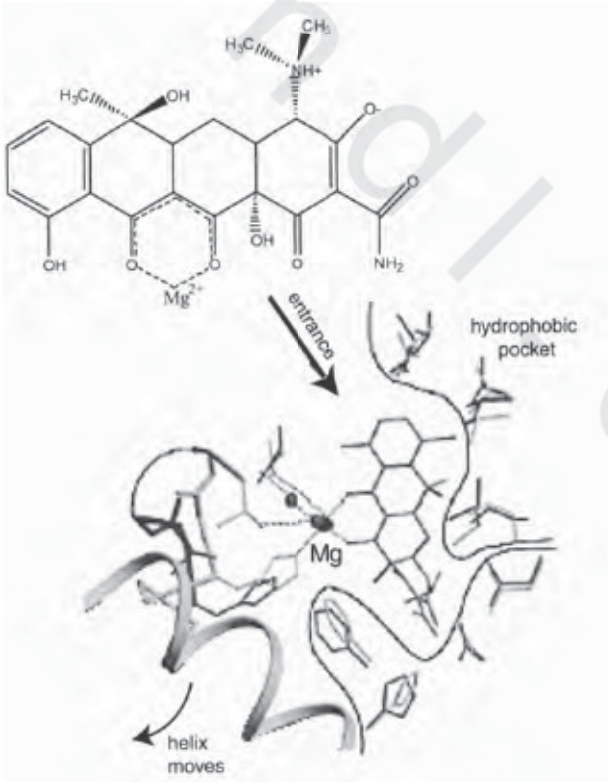
باستطاعة بروتين الغشاء الخارجي للإشريكية القولونية TolC (الشكل ٩,٦) أن يتفاعل مع العديد من مختلف إنزيمات نقل الموضع ترانسلوكازات (translocases) للغشاء الداخلي لتكوّن قنوات عبر كلا الغشائين لتنتج نفق من السيتوبلازم إلى البيئة الخارجية التي يمكن أن تجتاز بواسطة كل من الجزيئات الصغيرة والبروتينات الكبيرة التي تم تصديرها (انظر " آلية إفراز البروتين في الممرضات السالبة- لغرام وعلاقتها بالمرض": أسفل) (كوروناكيس وآخرون Koronakis *et al.*, 2000). وهكذا فيعدُّ TolC النموذج لبروتين الغشاء الخارجي الشريك لمضخات تدفق السالبة-لغرام. وأظهر تحليل أشعة -إكس (كوروناكيس وآخرون Koronakis *et al.*, 2000) للمثلوث (trimer) الوظيفي لكل من حقل ١٢- الخيطي بيتا- باريل (برميل- بيتا) (12-stranded β-barrel) (أربعة لكل موحود) وحقل ألفا -الحلزوني (α helical) (الشكل ٩,٦ اللوح الأيسر) المجاور لحقل باريل. وهناك جدل بأن الحقل بيتا باريل، النوعي لتراكيب مسام الغشاء الخارجي (كويبنيك وآخرون Koebnik *et al.*, 2000) يحد جزء الغشاء الخارجي ومن ثم الموضع الحلزوني ينتأ إلى داخل ومن خلال الجبلة ليكون تفاعلات، عن طريق تفاعلات ملف-ملف (coil-coil interactions) مع حقول الملف- الملفوف لزوج ترانسلوكاز الغشاء الداخلي، مثال، AcrAB. وبمجرد عزله، تغلق القناة في برميل ألفا-الحلزوني لـ TolC، كما يظهر في المنظر العلوي للشكل (٩,٦) (اللوحات اليمنى). ويفترض بأنه أثناء تدفق الجزيء الصغير والبروتين خلال هذه القناة، تتوسع القناة الداخلية بدوران اللفات الملفوفة، وفك التلولب التباين التجسمي، المُحرِض بواسطة تفاعل البروتين-البروتين مع مكونات الغشاء الداخلي للمضخة (كوروناكيس وآخرون Koronakis *et al.*,2000). يستطيع الشكل المفتوح أن ينتج قطر نفق في TolC (اللوح الأسفل) بمقدار Å 30. وعندما ينفصل TolC مرة أخرى من شركائه في الغشاء الداخلي مثال AcrAB، فسوف يعود للحالة المغلقة ليتجنب تسرب المكونات الجِبلَية.



الشكل (٩,٦). (اليسار) التصميم الهندسي لـ TolC، (اليمين) نماذج لـ TolC في الحالات المفتوحة والمغلقة. (معدلة من كوروناكيس وآخرون Koronakis *et al.*, 2000)، بالإذن).

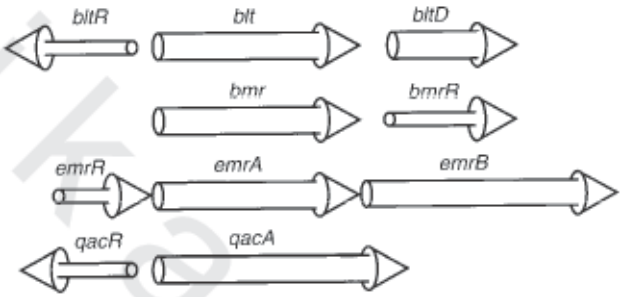
تنظيم مضخات التدفق

من أفضل مضخات تدفق المضاد الحيوي التي تمت دراستها ربما تكون مضخات التتراسيكلين، مع TetA-L التي ذكرت أعلاه كأعضاء عائلة MFS في كل من البكتيريا السالبة والموجبة–لغرام . وعندما يدخل التتراسيكلين مثل هذه الخلية البكتيرية، فإنه يرتبط بانجذاب عالٍ مع البروتين، TetR، الذي يعمل ككابت لجين مضخة Tet، *tetA* في الإشريكية القولونية. ويخلص معقد Tet·TetR الكبت السالب (negative repression) المرتاح لإظهار جين مضخة Tet. وتركيب TetR مع وبدون ربيطة التتراسيكلين، المرتبط مع Tet المشغل دنا أظهر أن الربط لمعقد ماغنيسيوم (Mg^{2+})-تتراسيكلين يجعل TetR يفقد الانجذاب لموقع دنا الخاص به (أورث وآخرون Orth *et al.*, 2000) (الشكل ٩,٧). يبلغ K_d لربط معقد الماغنيسيوم – والتتراسيكلين مع TetR حوالي 10^{-9} M، بعض ألف – طية أضيق من 10^{-6} للربط مع الريبوسوم 30S، وبذلك فالتخلص من الكبت الانتساخي لـ*tetA* يرتد عند مستويات منخفضة للدواء في الخلية البكتيريا. وعندما يرتبط Mg^{2+}- التتراسيكلين مع TetR، يهبط انجذابه ضد تيار دنا لـtetA ويقدر بحجم تسعة درجات (أورث وآخرون Orth *et al.*, 2000)، بواسطة الربيطة – المُحرضة، بحركة – تشبه عقرب الساعة لأحد اللفات الحِلزية في TetR التي تبعد حقول ربط دنا.



الشكل (٩,٧). التركيب الأساسي للتخليص من الكبح لإنتساخ *tetA* عندما يرتبط الماغنيسيوم– التتراسيكلين مع TetR. (بالإذن من أورث وآخرون Orth *et al.*, 2000).

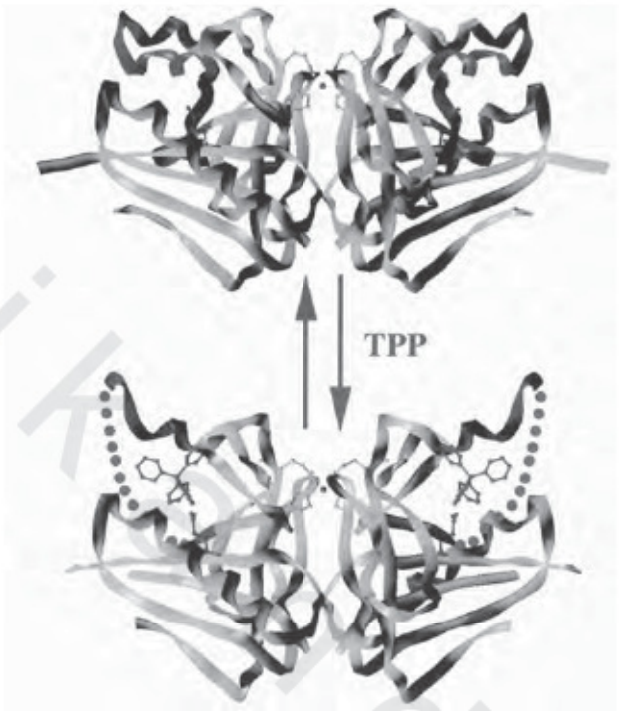
بعد ذلك يحدث فرط إنتاج بروتين المضخة 42-kDa TetA، ويغرس داخل الغشاء السيتوبلازمي، ويعمل في حالة ضد المنفذ مع دخول البروتونات لتضخ التتراسيكلين للخارج. وقد تكون مضخة تدفق Tet نشأت من مثل هذه المضخة في منتجي التتراسيكلين، مثال ذلك تلك التي ترمز بواسطة جين *otrB* في المتسلسلة ريموسس *(Streptomyces rimosus)* (ماكموري وآخرون McMurry *et al.*, 1998). ويبدو أن منطق دائرة التنظيم هذا مُعمماً للمُشغِلين (operons) في الزائفة الزنجارية لجينات *MexM, MexB and oprM*، والمحكم بواسطة الكابح *mexR* المستنسخ بشكل متباعد (متشعب)، لنظام جين *mtr* المقارن في النيسيرية السيلانية (الشكل ٩,٨)، وكذلك للمُشغَل *AcrF,E,S* في الإشريكية القولونية.



الشكل (٩,٨). منطق الدائرة التنظيمية لجينات مضخة التدفق.

وبالمثل فجين مضخة *bmr* في العصية الرقيقة هو تحت التحكم الانتساخي بواسطة جين *bmrR*، الذي يُرمِز الكابح. ويعمل Bmr كمضخة تدفق للكاتيونات أليفة الدهن، مثال أيونات ترايميثيل فوسفونيوم (trimethylphosphonium ions) وكذلك للكوينولونات، الكلورامفينيكول، ودوكسوروبيسين (doxorubicin). ولقد تم حل تركيب أشعة –إكس للكابح BmrR، الحر والمعقد مع ترايفينيل فوسفونيوم (triphenylphosphonium) (الشكل ٩,٩)، مشيراً بأن الربيطة أليفة الدهن تُحرض الكشف (التجلي) الانتقائي وإعادة تموضع الحلزون –ألفا. وهذا يكشف جيب ربط الداء الذي يتفاعل مع الربيطة بواسطة التراص الراهب للماء وبواسطة الاقتران الكهربائي الساكن (electrostatic pairing) مع أنيون غلوتامات كاربوكسيلات (glutamate carboxylate anion) المدفون (انظر الشكل ٤ و٥ في زيليزنوفا وآخرون Zheleznova *et al.*, 1999). يعتبر انتقال الحِلز إلى –اللفة وإعادة تعبئة الحقل الرابط BmrR متطلب لتمييز الانجذاب العالي. وقد استعمل برينان وزملائه (Bernnan and colleagues) هذه الملاحظة للاقتراح بأن هذا المنطق ربما يُستعمل لربط وتمييز الدواء بواسطة بروتينات مضخة تدفق الغشاء، مثال ذلك Bmr (زيليزنوفا وآخرون Zheleznova *et al.*, 2000)، EmrA and B,QacA وغيرهم من عائلة MFS، والعديد منها له غلوتامات محفوظ في الحقل عبر الغشاء، كما تفعل المضخات من عائلة SMR. ويقترحون بأن الأجزاء الراهبة للماء من المضادّات الحيوية تنقسم داخل الغشاء السيتوبلازمي عند الوريقة الداخلية. وإذا حدث لحقل ربط الربيطة لمضخة التدفق تغييرات تكوينية مؤقتة بواسطة

انتقالات الحِلز – إلى – اللفة، مع واحدة من التكوينات تكشف الغلوتامات المدفونة لترتبط بالربيطة، فسوف يجد المضاد الحيوي هذا الموقع بواسطة المواجهة الانتشارية ثنائية – الأبعاد (two-dimensional diffusional encounter).



الشكل (٩,٩). ربط الكاتيون أليف الدهن أيون ترايميثيل فوسفونيوم مع الكابح BmrR. (بالإذن من زيليزنوفا وآخرون Zheleznova *et al.*, 1999).

كيف يتعقد الدواء– والمضخة ثم يستشعر ΔpH عبر الغشاء ويطرد غير إتجاهياً المضاد الحيوي إلى الخارج في حالة انجذاب – منخفضة لا يزال يتعين تحليله.

يعتبر تنظيم جينات المسام والمضخة ذا أهمية إكلينيكية في معالجة عداوى الزائفة الزنجارية بالكاربابينيم (إيني وآخرون Enne *et al.*, 2001). وبإمكان طفرات النقطة (point mutations) في جين *mexR* أن تؤدي إلى أشكال طفرة MexR لهذا البروتين الكابح ذا الانجذاب المنخفض للأهداف المعززة، ليسمح بالتخلص من الكبح. وذلك طريق عام للتنظيم العالي لمُشغل *mexA- mexB-oprM* الذي ذكر سابقاً. ومضخة التدفق– ثلاثية المكونات، واسعة المدى هذه تتيح بوابة خروج الكوينولونات، التتراسيكلين، كلورامفينيكول، والبيتالاكتامات الطبيعية. ومن الكاربابينيمات الاثنين المصادق عليهما، الإميبينيم الذي يفتقر للسلاسل الجانبية أليفة الدهن، لا يتم تصديره. والميروبينيم، بسلسلته الجانبية الحلقية غير المتجانسة، يُضخ للخارج. وترتفع التراكيز الدنيا المثبطة (MICs) نموذجياً من ٠,١٢ –٠,٥ ملغم/ ليتر.

ومن ناحية أخرى، فاستعمال الإميبينيم ينتقي لطفرات الزائفة الزنجارية العديمة مسام الغشاء الخارجي OprD، وغياب ذلك المسام يحد من دخول الدواء، وترتفع قيم MICs للإميبينيم من ١ – ٢ ملغم / ليتر إلى ٨ – ٣٢

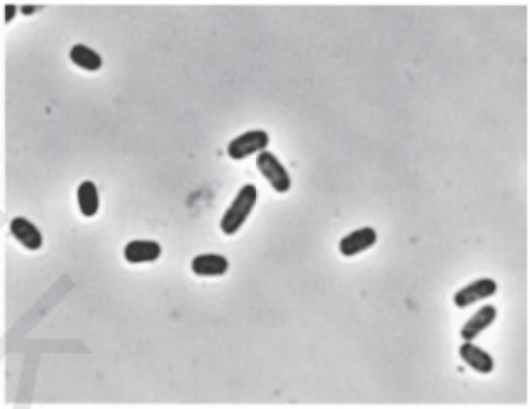
ملغم/ ليتر (إيني وآخرون Enne *et al.*, 2001). وللميروبينيم كذلك بعض العبور خلال OprD لأن التراكيز الدنيا المثبطة في السلالات في هذه الطفرات يرتفع بدرجة تصل إلى ٢ – ٤ ملغم/ليتر. ولاحظ ليفرمور Livermore, 2000 بأن هذه المشاهدات قد تفضل استخدام الميروبينيم؛ بسبب أن طفرتين اثنتين (*mexR* و*oprD*)، عند تضاعف قليل التردد، مطلوب لجعل قيم MIC للميروبينيم خارج النطاق المفيد. ولحظ الآلية الإضافية للبيتالاكتامازات المُعدنة والتي تعمل كإنزيمات كاربابينيمازات (carbapenemases) (الفصل الثامن) كمُحدد مقاومة إضافي.

انخفاض نفاذية الغشاء الخارجي للإشريكية القولونية O157:H7

لقد ذكرنا مسبقاً في هذا الفصل وغيره في هذا الكتاب بأن بكتيريا معينة هي مُمْرضات أفضل من غيرها. تقوم البكتيريا الزائفة الزنجارية السالبة– لغرام بعمل جيد في المحافظة على تركيز المضاد الحيوي داخل الخلية منخفض بواسطة كل من تحريك العديد من مختلف مضخات التدفق، وكذلك بواسطة الحد من الامتصاص بواسطة إظهار بروتينات مسام الغشاء الخارجي، بورينات (porins) التي تحد من انتشار المضادّات الحيوية للداخل وغيرها من الجزيئات الصغيرة المضادة البكتيرية. وقد بينت الدراسات الحديثة (مارتينيز وآخرون Martinez *et al.*, 2001) بأن حاجز النفاذية الخارجي للسلالات الفوعية، السامة للإشريكية القولونية قد يكون أيضاً أكثر تقييداً لتخلل (لنفوذ) المضاد الحيوي. والإشريكية القولونية O157:H7 اكتشفت لأول مرة في ١٩٨٢م في اللحم البقري غير المطبوخ جيداً والتلوث– برازياً، الذي يسبب إلى نحو ٧٥,٠٠٠ حالة من العداوى سنوياً في الولايات المتحدة ، وفاشيات التهاب القولون الدموي التي يمكن أن تَتطوُّر إلى المتلازمة البولية الحالة للدم (hemolytic uremic syndrome) (ميد وآخرون Mead *et at.*, 1999) (الشكل ٩,١٠).

تدخل سلالة O157:H7 خلال المعدة وتستعمر الخلايا الظهارية في الأمعاء، وتتكاثر وتنتج السم. وأحد مكونات السم يتفاعل مع الدهن السكري (غليكوليبيد) (glycolipid) للغشاء وغيره ومن ثم يدخل الخلايا ويعرقل البناء الحيوي للبروتين (انظر كابر وأوبراين Kaper and O'Brien, 1998، كارمالي Karmali, 1989). تظهر الإشريكية القولونية O157:H7 مقاومة للستربتوميسين، التتراسيكلين، وأدوية السلفا وربما تفعل ذلك من خلال التقليل من نفاذية الغشاء الخارجي للامتصاص. وستعمل مارتينيز وآخرون Martinez *et al.*, 2001، الفحص (المقايسة) الحركي للكشف عن نشاط الفوسفاتيز القلوي الجِبلي (periplasmic alkaline phosphatase) لحساب ذلك، مقارنة بالكونترول السلالات غير الفوعية، للإشريكية القولونية O157:H7 6- أضعاف أقل نفوذية للجزئ الصغير المادة الأنيونية وإنقاص ألف–ضعف لتحول العاثية (phage transformation). والتسلسل الحديث لجين الإشريكية القولونية O157:H7 (بيرنا وآخرون Perna *et al.*, 2001) قد أظهر أعداد صغيرة من التغييرات في المسامات الرئيسة OmpC، OmpF ضمن ١,٣٨٧ جينات من ٣,٥٠٠ التي تعتبر مختلفة (متميزة) وفي مجموعات جين –نوعي السلالة في هذه

السلالة المرضة من الإشريكية القولونية. وبدون شك سيكون هناك العديد من العناصر المساهمة في سمية سلالة O157:H7، ذات ١٥ جزر جين تبلغ 15 kb< التي ترمز العناصر الفوعية المفترضة (بيرنا وآخرون Perna *et al.*, 2001)، ولكن فحص النفاذية قد يسمح بالبحث عن عوامل مضادّات حيوية ذات خواص امتصاص أفضل في هذه المُمْرضات.



الشكل (٩,١٠). مزرعة الإشريكية القولونية O157:H7.

آلية إفراز البروتين في المُمْرضات السالبة – لغرام وعلاقتها بالمرض

إضافة إلى الناقل – والتصدير المتواسط – بمضخة البروتين للجزيئات الصغيرة، ويشمل المضادّات الحيوية أليفة الدهن، فكل من البكتيريا الْمُمْرضة السالبة – لغرام والموجبة – لغرام تفرز بروتينات بواسطة آلية بروتين مخصصة (انظر لي وتشينويند Lee and Schneewind, 2001، للمراجعة). وإفراز البروتين الغشاء الداخلي هو مشابه في البكتيريا السالبة – لغرام والموجبة – لغرام باستعمال آلية سبيل (طريق) Sec. وللكائنات الموجبة– لغرام يسمح هذا للبروتينات، مثل السموم الخارجية (exotoxins) (انظر الفصل الخامس عشر لمجينات مختلف السموم الخارجية الموجودة في المكورة العنقودية الذهبية المقاومة للمثسيلين (MRSA))، العبور للوسط الخارجي بواسطة اجتياز شبكة الببتيدوغليكان. في الكائنات السالبة –لغرام، المرور عبر الغشاء الخارجي يشمل العديد من أنواع آليات تصدير البروتين المتخصصة، وتعرف بالنوع I-IV أنظمة الإفراز (type I-IV secretion systems)، وكذلك تجّمع الأهداب (pili assembly) عبر الغشاء يشارك في ارتباط الإشريكية القولونية مع خلايا المضيف. وهذه معقدات جزيئية عالية (supramolecular complexes) التي يتم تجمعها في الغشية الداخلية والخارجية.

تبدأ مختلف البكتيريا المعوية المُمْرضة المرض بواسطة التعبير عن الالتصاق وفي بعض الأحيان البروتينات الغزوية على الأغشية الخارجية، التي تتجمع بواسطة أنظمة الإفراز المذكورة أدناه. والمُمْرضات الملتصقة ولكن غير الغزوية مثال الضمة الكوليرية *(Vibrio cholerae)* والإشريكية القولونية المعوية الْمُمْرضة *(enteropathogenic E.coli)* (EPEC) والإشريكية القولونية النزفية المعوية (enterohemorrhagic *E.coli* (EHEC)) تصنع اتصالات بروتين– بروتين

(proetin-protein contacts) مع الخلايا الظهارية في الأمعاء الدقيقة ومن ثم تُشغل مسارات التأشير في خلايا المضيف التي تفعل قنوات أيونات الكلوريد لتدفق الكلوريد والماء لتحدث المتلازمات الإسهالية (نتارو وكابير Nataro and Kaper, 1998، برينتي وفينلاي Prente and Finlay, 2001). وتستطيع سلالات السالمونيلا والشيغيلة الزحارية *(Shigella dysenteriae)* تحريض الامتصاص (القبط) بواسطة الخلايا الظهارية (انظر الفصل الخامس عشر) والمرور الآحق إلى داخل المساحات الخارج الخلية، عبوراً بالحاجز الظهاري. وفي الحمى التيفية (typhoid fever) ينتج ذلك بكتيريا في الدم (تجرثم الدم وانسمام الدم) (bacteremia and septicemia)، في حين أن غزوات الشيغيلة تكون متمركزة في الغشاء المخاطي للقولوني والمستقيمي، مؤدياً إلى استجابات مدمرة والتهابية للأنسجة والزحار المُميز (سانسونيتي وآخرون Sansonetti *et al.*, 2001).

للبروتين المكون – للمسام الحال للدم (the pore-forming hemolysin protein) (HlyA) للإشريكية القولونية الممرضة للجهاز البولي التي تسبب ٨٠٪ من عداوى الجهاز البولي، تكرارات متعدِّدة (multuiple repeats) من تسلسلات ربط – الكالسيوم، وتُغرس في داخل الأغشية، وهي جزء من عائلة من السموم المتكررة (repeat toxins) (كووت Coote, 1992) التي تفرز بواسطة الماكينة (الآلية) من النوع I. وهناك ثلاثة منتجات جينات أخرى مطلوبة لإفراز HlyA. ويضيف HlyC مجموعات أسيل C_{14} أو C_{16} إلى اثنين من السلاسل الجانبية ليزين (lysine side chains) في HlyA لزيادة رهاب الماء. ويعدُّ HlyB و HlyD مكونات بروتين للغشاء الداخلي لماكينة الإفراز من النوع I و TolC المذكورة أعلاه في نظام تدفق Acr، البروتين الشريك للغشاء الخارجي الذي يسمح بإفراز HlyA خلال الغشاء الخارجي إلى الوسط الخارجي. ويعدُّ HlyA من نوع (ABC-type ATPase)، وربما له علاقة بالناقل MsbA المذكور أعلاه، ويربط إفراز البروتين النوع I إلى النوع -ABC نواقل المقاومة المتعدِّدة الدواء. و TolC هو حاجز غشاء خارجي ١٢– المجدول (الحبلي) (12-stranded) (كوروناكيز وآخرون Koronakis *et al.*, 2000) مع نهاية- C - ألفا –الحِلزية التي تملأ القناة الداخلية في حالة السكون لتمنع تسرب المكونات الجبلَية. ويفترض بأن القناة تفتح إلى كامل قطرها 3.4 –nm عندما تتعقد مع شركاء الإفراز من النوع I.

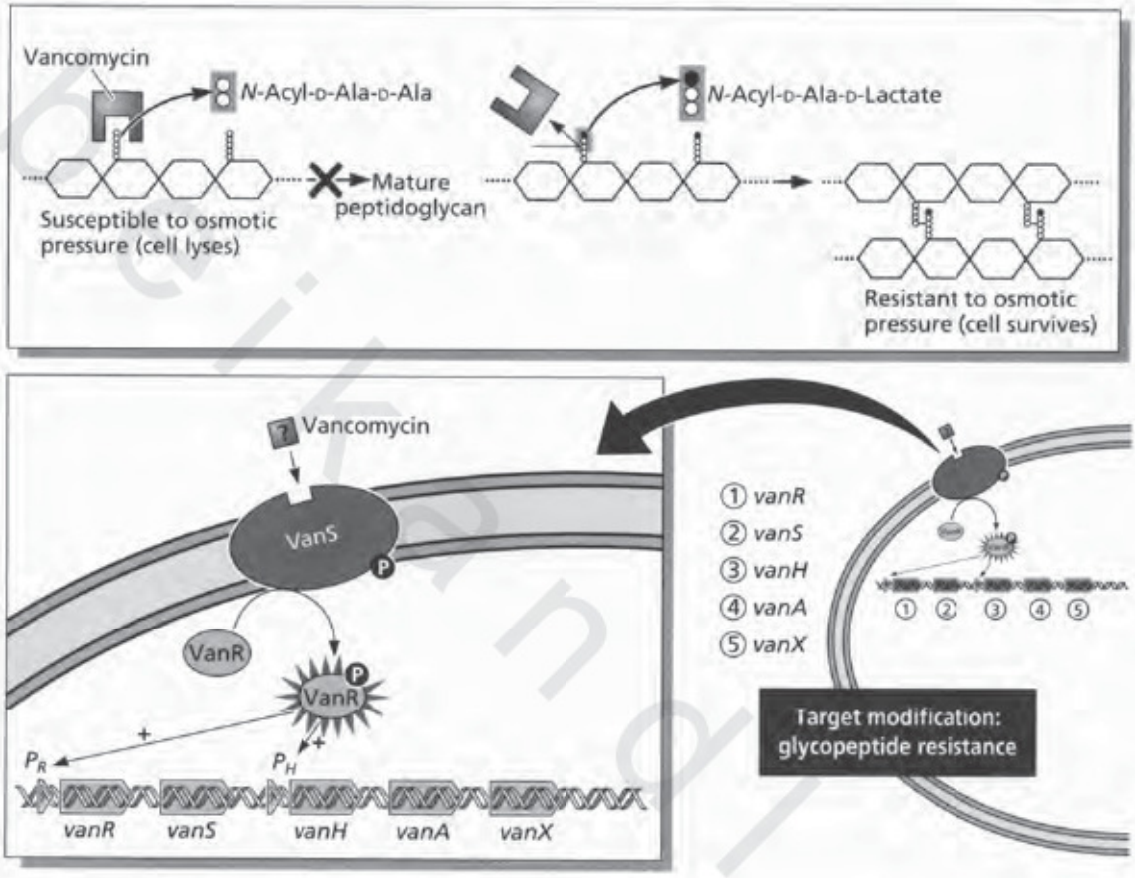
وتعرف ماكينة الإفراز من النوع II كذلك بالمسار الإفرازي العام (general secretory pathway) (ليي وتشنيوود Lee and Schneewind, 2001) وهو مسئول عن تصدير بعض السموم البكتيرية مثل سم الكوليرا، السم المعوي للإشريكية القولونية، وسم شيغا (shiga toxin) للشيغيلة الزحارية، وسم الإشريكية القولونية الشبيهة– بسموم شيغا (shiga-like toxins) (مثال، في السلالات O157:H7)، وجميعها لها تراكيب AB_5 منقوصة (oligmeric)، حيث الوحدة الفرعية A تنشط إنزيمياً عندما يتم أخذها بواسطة خلايا المضيف. والمكونات الخماسية B_5 تتجمع ذاتياً في غشاء المضيف وتستطيع أن تميز الدهون السكرية (glycolipids) المختلفة، جلوبوسيد (globoside Gb3) للسم للإشريكية القولونية السامة للأمعاء – المشابه – لشيغا (ETEC) وغانغليوسيد (ganglioside GM1) لسم الكوليرا (الضمة) . وبعد ذلك تتفرق مكونات A وتنضوي بواسطة خلية المضيف، حيث تنفذ بعض الخطوة الإنزيمية. كما

أن سم شيغا للشيغيلة والإشريكية القولونية O157:H7 هو N- غليكوسيداز (N-glycosidase) نوعي ينقي فضالة معينة في 23S rRNA وبذلك يعرقل البناء الحيوي للبروتين، في حين أن الوحدة الفرعية A التابعة لـ ETEC وسم الكوليرا من الضمة الكوليرية يؤديان إلى رفع AMP الحلقي وGMP الحلقي (cyclic AMP and cyclic GMP)، تنشيط قنوات أيون الكلوريد، والناتج الإسهالات (جرويسمان Groisman, 2001).

ويفرز كذلك الإنزيمات الخارجية بواسطة مسار II، وتشمل بروتيازات (الإنزيمات البروتينية) (proteases)، إيلاستاز (elastase) (إنزيم مرونة النسيج)، فوسفاتازات (phosphatases)، وبيكتيت ليسازات (pectate lysases) (الإنزيمات الحالة للبكتيت) بواسطة مُمْرضات النبات هذه مثل إروينيا كاروتوفورا *(Erwinia carotovora)*. وتوجد بقدر ١٢ بروتينات غشاء داخلي في ماكنة الإفراز هذا (روسل Russel,1998). ويعرف كذلك الـ ATPase عند الوجه السيتوبلازمي للغشاء الداخلي، تشابيرون الجِبلّي (periplasmic chaperone)، GspS، وبروتين غشاء خارجي آخر، GspD بالسكريتين (secretin).

وتزامر السكريتين تناقصياً (oligomerizes) إلى حلقة دوديكاميريك (dodecameric ring) مع قطر داخلي يبلغ 7.6nm (نووين وآخرون Nouwen *et al.*, 1999) الذي يعتقد بأن يكون القناة لمرور البروتين خلال الغشاء الخارجي.

أما الماكينة من النوع III فلها أهمية خاصة لدورها المركزي في الفوعية والإمراضية لعداوى اليرسينية *(Yersinia)* والإشريكية القولونية ولغزو السالمونيلا والشيغيلة إلى داخل خلايا المضيف (انظر ليي وتشينويند Lee and Schneewind, 2001، للمراجعة). ولقد تم شرح هذا الموضوع أكثر في الفصل الخامس عشر. ويفترض بأن الإفراز للبروتين من النوع III يحرض بواسطة الاحتكاك الفيزيائي (الطبيعي) بين البكتيريا وخلايا المضيف، على سبيل المثال، بواسطة تدرجات أيونية نوعية (specific ion gradients)، وتفيد بأنها تحقن البروتينات البكتيرية مباشرة إلى داخل سيتوبلازم خلايا الحيوان والإنسان. والتعطيل لأيض خلايا المضيف الناتج بإمكانه أن يؤدي إلى الدخول البكتيري (إلى الخلايا الظهارية بواسطة السالمونيلا)، إبطال قتل خلايا البلعمة الكبيرة (macrophage) (بواسطة اليريسنية الطاعونية *(Yersinia pestis)* الخارجية الخلوية)، أو تدمير الخلية (الخلايا الظهارية بواسطة EPEC). ومكونات بروتين الغشاء النوع III مشابهة للمكونات في تجميع السياط (flagella) وكذلك تبنى حول دوديكامر السكريتين (secretin dodecamer) في الغشاء الخارجي وبروتين الإبرة (الحبك) (needle protein) (SctF) الذي ينمو من السكريتين ويدخل غشاء خلية المضيف. والبروتينات التي تم إفرازها، وتشمل ١٤ بروتينات يرسينية خارجية (Yops)، تمر خلال قناة السيكريتين والإبرة إلى داخل الخلية مباشرة. وتعطي إشارة تمييز المادة لتحدد أي من البروتينات البكتيرية مُدمغة (مُعلّمة) للإفراز من النوع III التي لم حل شفرتها (انظر ليي وتشينوويند Lee, and Schneewind, 2001). وتقل عدوائية اليرسينية الطاعونية لتسبب الطاعون بشكل مثير عندما يعرقل إفراز النوع III، وهكذا فهذه الماكينة سوف تكون هدف جيد لتقليل الإمراضية في العداوى السالبة – لغرام.



مقاومة المضاد الحيوي بواسطة تعديل الهدف