

Các hệ thống tiết và tiềm năng ứng dụng biểu hiện bề mặt ở vi khuẩn Gram âm

Lê Hoàng Khôi Nguyên^{1,2}, Nguyễn Thanh Tấn^{1,2,3}, Trần Văn Hiếu^{1,2,3,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

TÓM TẮT

Sự phát triển mạnh mẽ của ngành Công nghệ Sinh học trong việc biểu hiện protein mới đang được đẩy mạnh, đặc biệt là biểu hiện protein tái tổ hợp ở vi khuẩn. Hiện nay, ở vi khuẩn sẽ có các dạng biểu hiện protein như, nội bào, tiết, và đính ở bề mặt. Nhưng đối với việc biểu hiện protein ở bề mặt ở nhóm vi khuẩn Gram âm còn nhiều hạn chế. Khó khăn khi biểu hiện protein trên bề mặt vi khuẩn Gram âm nằm ở cấu trúc phần vách của nhóm vi khuẩn này do được cấu tạo khá phức tạp cũng việc hạn chế về số lượng các motif có thể đính trên màng. Các nghiên cứu trước đây cho thấy, các hệ thống tiết qua màng ở vi khuẩn đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh tồn của vi khuẩn. Ở vi khuẩn Gram âm, các hệ thống tiết được phân loại thành hệ thống tiết qua một màng và hệ thống tiết qua hai màng. Trong khi Sec và Tat là hai hệ thống tiết qua một màng thì hệ thống tiết loại I-T1SS (Type I secret system), hệ thống tiết loại II-T2SS (Type II secret system), hệ thống tiết loại III-T3SS (Type III secret system), hệ thống tiết loại IV-T4SS (Type IV secret system), hệ thống tiết loại V-T5SS (Type V secret system) và hệ thống tiết loại VI-T6SS (Type VI secret system) là các hệ thống tiết qua hai màng cho phép chuỗi polypeptide sau khi được tổng hợp được tiết ra bên ngoài. Trong bài tổng quan này, các đặc điểm của từng hệ thống tiết sẽ được đề cập cũng như khả năng ứng dụng tiềm năng để chuyển protein tái tổ hợp lên màng của các hệ thống này.

Từ khoá: Biểu hiện protein trên bề mặt, vi khuẩn Gram âm, protein tái tổ hợp, hệ thống tiết qua một màng, hệ thống tiết qua hai màng

¹Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử và Môi trường, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Việt Nam

²Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Phòng Thí Nghiệm Cầm biến Sinh học, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Việt Nam

Liên hệ

Trần Văn Hiếu, Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử và Môi trường, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Việt Nam

Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Phòng Thí Nghiệm Cầm biến Sinh học, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Việt Nam

Email: tvhieu@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 28-8-2023
- Ngày sửa đổi: 11-2-2025
- Ngày chấp nhận: 21-02-2025
- Ngày đăng: 31-03-2025

DOI:

<https://doi.org/10.32508/stdjns.v9i1.1311>



GIỚI THIỆU

Vi khuẩn là sinh vật cổ xưa còn tồn tại đến ngày hôm nay. Để có thể tồn tại, vi khuẩn đã phát triển các bộ máy chuyên hóa đặc biệt (ở mức độ phân tử) có vai trò tiết một loạt các phân tử đa dạng từ DNA cho đến protein. Các phân tử có vai trò quan trọng này không chỉ giúp vi khuẩn tồn tại với các điều kiện môi trường khác nhau mà còn giúp vi khuẩn thích nghi thông qua các vai trò sinh lý của các phân tử này như bám dính vào tế bào vật chủ, yếu tố độc lực hoặc bất hoạt hệ miễn dịch của vật chủ. Dựa vào trạng thái của các phân tử sau khi tiết, chúng được chia làm hai loại gồm phân tử được tiết trực tiếp ra môi trường bên ngoài và phân tử sau khi tiết sẽ được neo lại trên màng ngoài của vi khuẩn. Quá trình tiết các phân tử này thường do các hệ thống tiết đảm nhiệm, tuy nhiên, do có sự khác biệt ở cấu trúc thành tế bào nên đòi hỏi vi khuẩn Gram dương và vi khuẩn Gram âm phát triển các hệ thống tiết cũng như một hệ thống neo chuyên biệt. Cụ thể, cấu trúc thành của vi khuẩn Gram dương bao gồm lớp màng trong và lớp peptidoglycan dày bao quanh¹. Trong khi đó, lớp thành của vi khuẩn Gram âm được cấu tạo từ lớp màng trong, lớp peptidoglycan và lớp màng ngoài có chứa lipopolysaccharide. Về hệ thống tiết, một nghiên cứu

đã chỉ ra rằng, hầu hết vi khuẩn Gram dương sử dụng phức hợp chuyển vị Sec cho quá trình tiết protein ra môi trường bên ngoài². Đối với việc neo protein trên màng ngoài, ở vi khuẩn Gram dương có bốn cấu trúc đính trên bề mặt đã được nghiên cứu gồm cấu trúc neo trên màng có domain xuyên màng, cấu trúc neo nhờ sự tương tác cộng hóa trị giữa lipoprotein và màng, cấu trúc chứa motif LPxTG, và cuối cùng là cấu trúc đính màng phụ thuộc vào các vị trí đặc biệt của màng³. Chính vì có sự đa dạng ở cấu trúc đính màng, nên vi khuẩn Gram dương được biết đến như một hệ thống biểu hiện protein tái tổ hợp trên bề mặt phổ biến. Ngược lại, vi khuẩn Gram âm lại không được xem như một đối tượng thích hợp dùng cho việc biểu hiện protein tái tổ hợp trên bề mặt. Lý do là vì vi khuẩn Gram âm không có các cấu trúc đính màng chuyên biệt như ở vi khuẩn Gram dương. Tuy nhiên, ở vi khuẩn Gram âm có các hệ thống tiết khá đặc biệt, nằm ở chỗ các hệ thống tiết protein không chỉ tiết mà còn có thể neo giữ protein ở màng ngoài. Do đó, các hệ thống tiết ở vi khuẩn Gram âm được xem như chìa khóa quan trọng trong việc biểu hiện protein trên bề mặt vi khuẩn Gram âm. Vì vi khuẩn Gram âm có đến hai lớp màng nên các hệ thống tiết ở nhóm vi khuẩn này được chia thành hệ thống tiết qua

Trích dẫn bài báo này: Nguyễn L H K, Tấn N T, Hiếu T V. **Các hệ thống tiết và tiềm năng ứng dụng biểu hiện bề mặt ở vi khuẩn Gram âm**. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2025; 9(1):3296-3306.

Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



màng trong và hệ thống tiết qua màng ngoài. Hiện tại, các hệ thống tiết qua màng trong đã được xác định là phức hợp chuyển vị - SecYEG (The SecYEG translocon complex) tương tự như ở vi khuẩn Gram dương và hệ thống chuyển vị arginine kép - Tat (The twin-arginine translocation system)⁴. Tuy vai trò của hệ thống tiết qua màng trong ở vi khuẩn Gram âm đều tiết chuỗi polypeptide ra chu chất nhưng phức hợp chuyển vị SecYEG lại tiết chuỗi polypeptide ở dạng chưa được gấp cuộn, trong khi con đường chuyển vị arginine kép lại tiết chuỗi polypeptide đã được gấp cuộn hoàn chỉnh. Đối với các hệ thống tiết qua màng ngoài, các hệ thống này được xác định và phân loại thành các hệ thống như hệ thống tiết loại I – T1SS (Type I secret system), hệ thống tiết loại II – T2SS (Type II secret system), hệ thống tiết loại III – T3SS (Type III secret system), hệ thống tiết loại IV – T4SS (Type IV secret system), hệ thống tiết loại V – T5SS (Type V secret system) và hệ thống tiết loại VI – T6SS (Type VI secret system). Mặc dù tất cả các hệ thống tiết màng ngoài đều có thể tiết các phân tử đa dạng từ DNA đến protein ra bên ngoài màng nhưng xét về các thành phần cấu tạo thì các hệ thống tiết màng ngoài được phân loại thành hệ thống tiết qua hai màng và hệ thống tiết qua một màng (tiết từ chu chất qua màng ngoài). T1SS, T2SS, T3SS, T4SS và T6SS là các hệ thống tiết được phân loại vào nhóm các hệ thống tiết qua hai màng. Điều này có nghĩa rằng các phân tử được tiết theo cơ chế tiết một bước, sẽ được tiết trực tiếp từ tế bào chất ra bên ngoài màng. Ngược lại, hệ thống tiết qua một màng sử dụng cơ chế tiết hai bước để tiết các phân tử sinh học ra màng ngoài, thì các phân tử này cần được chuyển từ tế bào chất ra đến chu chất trước khi được T5SS tiết ra bên ngoài màng. Mặc dù có cơ chế tiết khác nhau nhưng hầu hết các hệ thống tiết này ở vi khuẩn Gram âm đều liên quan đến quá trình tạo một yếu tố độc lực ngoại bào, yếu tố bám dính hoặc liên quan đến một yếu tố sinh trưởng của vi khuẩn.. Trong bài viết này, chúng tôi sẽ cung cấp kiến thức tổng quan về các hệ thống tiết ở vi khuẩn Gram âm và các hệ thống tiết tiềm năng được ứng dụng trong biểu hiện protein trên bề mặt.

CÁC HỆ THỐNG TIẾT Ở VI KHUẨN GRAM ÂM

Hệ thống tiết qua một màng

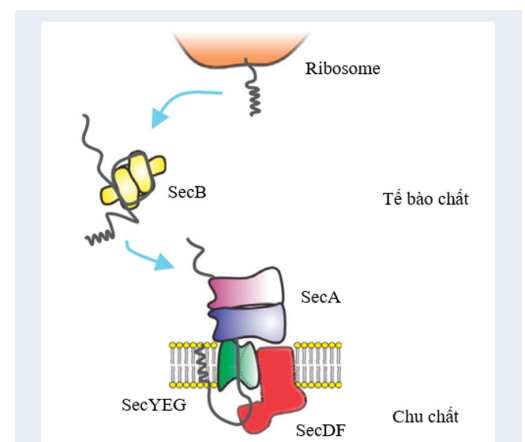
Phức hợp chuyển vị SecYEG – SecYEG (The SecYEG translocon complex)

Nếu phân loại theo cơ chế tiết thì phức hợp chuyển vị SecYEG được phân loại vào hệ thống có cơ chế tiết một bước. Tuy nhiên, thay vì tiết phân tử từ tế bào chất ra bên ngoài màng như các hệ thống tiết qua

màng ngoài thì phức hợp chuyển vị SecYEG chỉ có thể tiết chuỗi polypeptide từ tế bào chất ra đến chu chất, và các chuỗi polypeptide này thường ở dạng chưa gấp cuộn.

Thành phần của phức hợp chuyển vị SecYEG gồm phân tử SecB, phân tử động cơ SecA, kênh SecYEG, và phân tử hỗ trợ SecDF. SecB hoạt động như một chaperone giúp chuỗi polypeptide tồn tại ở trạng thái chưa gấp cuộn sau khi được dịch mã. Phân tử động cơ SecA có vai trò như một bơm ATPase sử dụng năng lượng để đẩy chuỗi polypeptide qua kênh SecYEG⁵. Kênh SecYEG và phân tử hỗ trợ SecDF là hai thành phần tồn tại trên màng bên cạnh phân tử động cơ SecA trong đó kênh SecYEG có vai trò như một kênh cho phép chuỗi polypeptide đi qua còn phân tử hỗ trợ SecDF⁶ hoạt động như một “máy kéo” giúp kéo chuỗi polypeptide qua màng.

Cơ chế hoạt động của phức hợp chuyển vị SecYEG được mô tả như là domain có vai trò làm tín hiệu tiết sau khi được tổng hợp bởi ribosome sẽ được các chaperone SecB bám vào. Sau khi chuỗi polypeptide được tổng hợp hoàn toàn, phức hợp được tạo bởi chuỗi polypeptide và SecB sẽ được nhận biết bởi phân tử động cơ SecA. Phân tử SecA sau khi nhận diện tín hiệu chuyển màng nằm ở đầu N của chuỗi polypeptide sẽ kích hoạt quá trình tiết bằng cách phân hủy ATP. Lúc này SecA hoạt động như một động cơ đẩy chuỗi polypeptide dần dần qua kênh SecYEG. Sau khi chuỗi polypeptide được đẩy lên mặt trên của màng, phân tử hỗ trợ SecDF có vai trò kéo chuỗi polypeptide qua màng trong (Hình 1).



Hình 1: Cấu trúc của phức hợp chuyển vị SecYEG-SecYEG⁷

Hệ thống chuyển vị arginine kép – Tat (The twin-arginine translocation system)

Hệ thống chuyển vị arginine kép – Tat (The twin-arginine translocation system) tồn tại ở một số vi khuẩn, cổ vi khuẩn và đôi khi xuất hiện ở lục lạp⁸. Tương tự với phức hợp chuyển vị SecYEG, con đường chuyển vị arginine kép cũng tiết chuỗi polypeptide từ tế bào chất ra đến chu chất. Tuy nhiên, khác với chuỗi polypeptide được tiết bởi phức hợp chuyển vị Sec, chuỗi polypeptide được tiết bởi hệ thống chuyển vị arginine kép sẽ tồn tại ở trạng thái gấp cuộn hoàn toàn sau khi được chuyển ra chu chất.

Cấu trúc của hệ thống chuyển vị kép gồm protein TatA, TatB và TatC⁹. Trong đó, TatA và TatB là các protein có cấu trúc giống nhau và được cấu tạo bởi ba domain, một domain xuyên màng, một domain đầu N hướng về phía chu chất, và một domain đầu C hướng về tế bào chất. TatA có vai trò quan trọng trong việc hình thành cấu trúc “cổng xuyên màng”. TatB có vai trò bám vào tín hiệu tiết của chuỗi polypeptide và đồng thời giúp chuỗi polypeptide này gấp cuộn hoàn chỉnh. Cấu trúc của TatC là một protein tích hợp xuyên màng được cấu tạo bởi sáu chuỗi a-helix xuyên màng. TatC sẽ kết hợp với TatB để hình thành phức hợp TatBC¹⁰. Phức hợp TatBC có vai trò như một receptor nhận diện tín hiệu tiết của protein mục tiêu. Cơ chế tiết của hệ thống chuyển vị kép được mô tả như sau. TatC sẽ tương tác với tín hiệu tiết ở đầu N có chứa arginine kép của chuỗi polypeptide. TatA lúc này sẽ kết hợp với phức hợp TatBC để hình thành cấu trúc “cổng xuyên màng”. Chuỗi polypeptide lúc này sẽ được đẩy ra chu chất thông qua phức hợp Tat, lúc này tín hiệu đầu N vẫn còn bám vào phức hợp TatBC. Sau khi, protein được tiết ra chu chất, một peptidase ở chu chất sẽ cắt phần tín hiệu đầu N và cuối cùng toàn bộ protein được tiết hoàn toàn ra chu chất.

HỆ THỐNG TIẾT QUA HAI MÀNG

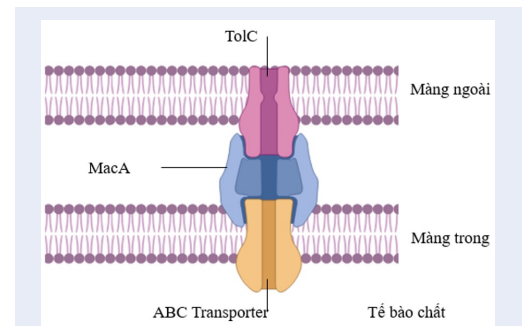
Hệ thống tiết loại I – T1SS (Type I secret system)

Ở vi khuẩn Gram âm, các sản phẩm tiết hệ thống tiết loại I – T1SS (Type I secret system) sẽ được tiết trực tiếp từ tế bào chất ra bên ngoài màng. Các sản phẩm tiết này thường liên quan đến quá trình thu nhận dinh dưỡng hoặc là yếu tố độc lực ở vi khuẩn Gram âm. Mô hình đầu tiên của T1SS được xác định là hệ thống tiết hemolysin ở vi khuẩn *Escherichia coli* được phát hiện vào năm 1983¹¹. Từ mô hình tiết hemolysin có thể xác định rằng hệ thống tiết loại I – T1SS được cấu tạo bởi ba thành phần gồm thành phần ở màng trong, thành phần kết nối màng trong và màng ngoài, và cuối cùng là TolC – một protein kênh tồn tại ở màng ngoài.

Các thành phần này kết hợp với nhau tạo nên một cấu trúc dạng đường hầm thông qua màng trong và màng ngoài cho phép T1SS tiết các sản phẩm trực tiếp từ tế bào chất ra bên ngoài màng.

Thành phần ở màng trong của T1SS là các protein thuộc họ protein vận chuyển ABC¹². Điều này có nghĩa rằng các protein ở màng trong của T1SS sử dụng ATP để hoạt động. Cấu trúc của protein này gồm bốn mô-dun, hai domain có vai trò xuyên màng – Transmembrane domain (TMD) và hai domain có vai trò làm vị trí bám cho nucleotide – Nucleotide binding domain (NBD). Các protein này được chia làm ba nhóm dựa trên sự xuất hiện của domain nằm ở đầu N, trong đó nhóm một và nhóm hai là hai nhóm có domain nằm ở đầu N là C39-ABC transporter và CLD-ABC transporter và nhóm còn lại không chứa domain C39 và CLD ở đầu N¹³.

Thành phần kết nối màng trong và màng ngoài là protein MacA, có cấu tạo gồm một cấu trúc dạng đường hầm với domain có cấu trúc kẹp tóc, domain “thùng beta” và domain lipoyl¹⁴. Trong đó, domain “thùng beta” và domain lipoyl có vai trò tương tác với các protein vận chuyển ABC ở màng trong, và domain có cấu trúc kẹp tóc sẽ kết hợp với protein màng ngoài TolC cũng có cấu trúc “thùng beta” để hình thành lỗ trên màng ngoài cho phép phân tử được tiết đi qua¹⁵.



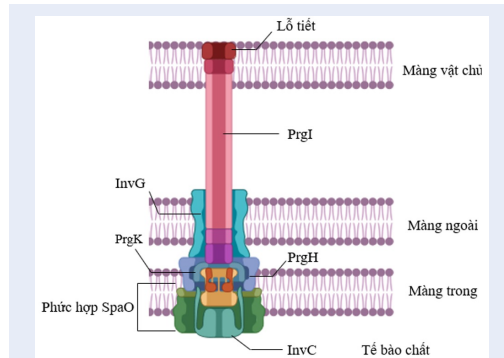
Hình 2: Cấu trúc của hệ thống tiết loại I-T1SS (Type I secret system)

Cơ chế tiết của T1SS được thực hiện từ việc phân tử được tiết sẽ bám vào thành phần màng trong là protein vận chuyển ABC. Lúc này, các protein vận chuyển sẽ tiến hành phân hủy ATP và vận chuyển các phân tử này thông qua cấu trúc đường hầm được tạo bởi protein MacA để đến TolC có vai trò như cổng màng ngoài (Hình 2).

Hệ thống tiết loại III – T3SS (Type III secret system)

Hệ thống tiết loại 3 – T3SS là hệ thống tiết đặc biệt do hệ thống này có khả năng chuyển protein trực tiếp

từ tế bào chất của vi khuẩn tới màng tế bào chất của vật chủ. T3SS tồn tại ở hầu hết vi khuẩn Gram âm gây bệnh như *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia coli*¹⁶ và có vai trò như một yếu tố chuyển độc tố tế bào. Trong đó, cấu trúc của hệ thống tiết protein ở vi khuẩn *Salmonella* là mô hình tiêu biểu được dùng để mô tả một cách tổng quát cấu trúc của hệ thống tiết loại III¹⁷.



Hình 3: Cấu trúc của hệ thống tiết loại III-T3SS (Type III secret system)

Cấu trúc của hệ thống tiết loại III ở vi khuẩn *Salmonella* được mô tả là có hình dáng giống với kim tiêm và được cấu thành bởi hai cấu trúc: cấu trúc xuyên màng có hình dáng như “ống tiêm”¹⁸ và cấu trúc giống “kim tiêm”^{19,20}. PrgK và PrgH là hai protein nằm ở màng trong kết hợp với protein InvG nằm ở chu chất đóng vai trò tạo nên cấu trúc xuyên hai màng có hình dáng giống ống tiêm²¹. Phức hợp SpaO gồm các protein OrgA, OrgB, SipB, SipC, SipD, và InvC nằm ở phần tế bào chất. InvC có vai trò như ATPase cung cấp năng lượng tiết²². Các protein SpaO gồm OrgA, OrgB, SipB, SipC, SipD kết nối với InvC đồng thời tạo nên một phức hợp diện các phân tử tiết. Cấu trúc giống kim tiêm được tạo nên bởi protein PrgI có vai trò tạo một lỗ trên màng của vật chủ và chuyển protein từ tế bào chất của vi khuẩn vào vật chủ. Cấu trúc hình kim tiêm này sẽ được bảo vệ bởi các thành phần cấu tạo nên cấu trúc hình dạng ống tiêm cụ thể là protein InvG¹⁶.

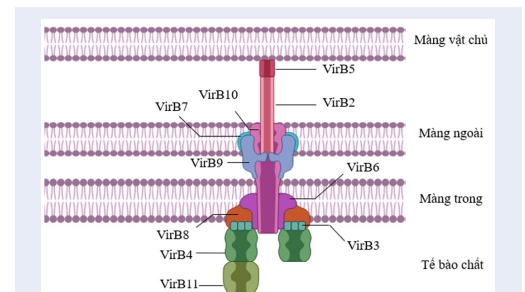
Cơ chế tiết của T3SS được thực hiện từ việc chuỗi polypeptide sau khi được dịch mã sẽ được nhận diện bởi phức hợp SpaO. Sau khi phức hợp SpaO nhận diện được chuỗi polypeptide sẽ kích hoạt InvC phân hủy ATP cung cấp năng lượng và đẩy chuỗi polypeptide thông qua cấu trúc “ống tiêm” và “kim tiêm” (Hình 3).

Hệ thống tiết loại IV – T4SS (Type IV secret system)

Hệ thống tiết loại IV – T4SS, được tìm thấy ở vi khuẩn Gram âm, vi khuẩn Gram dương, và đôi khi được tìm thấy ở một số loại vi khuẩn cổ²³. Khác với các hệ thống tiết khác, bên cạnh khả năng tiết protein thì hệ thống tiết loại IV – T4SS có khả năng đặc biệt duy nhất đó chính là tiết DNA vào tế bào prokaryote hoặc eukaryote mục tiêu²⁴. Quá trình chuyển DNA mạch đôi từ tế bào này sang tế bào khác được gọi là quá trình giao nạp. Giao nạp là cơ chế chủ yếu đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành các quần thể vi khuẩn kháng kháng sinh bằng cách chuyển các gen kháng sinh giữa vi khuẩn và vi khuẩn.

Hiện tại, T4SS được phân loại thành ba nhóm chức năng như T4SS liên quan đến quá trình giao nạp, T4SS liên quan đến quá trình tiếp nhận DNA, và T4SS liên quan đến quá trình tiết các protein có vai trò yếu tố độc lực ở nhóm vi khuẩn Gram âm gây bệnh²⁴. Tuy được phân loại thành ba nhóm chức năng, nhưng hiện tại duy chỉ có cấu trúc của T4SS liên quan đến quá trình giao nạp là được xác định cụ thể. Cấu trúc này được cấu tạo từ 12 protein là VirB1, VirB2, VirB3, VirB4, VirB5, VirB6, VirB7, VirB8, VirB9, VirB10, VirB11, VirD5 tạo thành hai phức hợp: phức hợp lõi ở màng ngoài và phức hợp ở màng trong²⁵.

Protein VirB4, VirB11 và VirD5 là các ATPase tồn tại ở phức hợp màng trong hướng về phía tế bào chất có vai trò cung cấp năng lượng cho quá trình tiết. Phức hợp lõi gồm hai lớp được cấu tạo bởi VirB7, VirB9 và VirB10²⁶, trong đó lớp ngoài được cấu thành bởi VirB7 và domain đầu C của VirB9 còn lớp trong được cấu thành bởi domain đầu N của VirB9 và VirB10. Phức hợp lõi và phức hợp màng trong được kết nối bởi VirB1, VirB2, VirB5, VirB6 và VirB8 nhằm tạo một kênh giúp chuyển DNA ra bên ngoài (Hình 4).



Hình 4: Cấu trúc của hệ thống tiết loại IV-T4SS (Type IV secret system)

Hệ thống tiết loại VI – T6SS (Type VI secret system)

Hệ thống tiết loại VI – T6SS được xác định vào năm 2006²⁷ và được mô tả như một hệ thống “vũ khí” của vi khuẩn vì T6SS có khả năng tiết các protein đóng vai trò giúp vi khuẩn đối kháng với các chủng vi khuẩn khác trong môi trường. Cấu trúc của hệ thống tiết này được cấu tạo bởi hai thành phần gồm thành phần nằm ở vách và phức hợp đuôi tồn tại ở tế bào chất.

Phức hợp vách được cấu tạo bởi thành phần màng trong và thành phần màng ngoài. Protein TssM, TssL, và TagJ là các protein nằm ở màng trong²⁸. TssJ là protein nằm ở màng ngoài và được kết nối với thành phần màng trong bởi domain nằm ở chu chất của protein TssM. Đối với cấu trúc của phức hợp đuôi tồn tại ở tế bào chất được cấu tạo bởi protein ClpV, TssB, TssC, TssE, TssK, VgrV và cấu trúc dạng ống Hcp²⁹. Trong đó, TssK là protein ở tế bào chất có vai trò kết nối phức hợp vỏ và phức hợp đuôi bằng cách kết nối với domain nằm ở phía tế bào chất của TssJ. TssE và VgrV kết hợp tạo nên một phức hợp gai có phần đế là protein TssE nằm bên trong khoảng trống được tạo bởi sự kết hợp TssK và TssJ. Phức hợp TssB-TssC hình thành nên một lớp bảo vệ cấu trúc ống Hcp trong khi ClpV hoạt động như một ATPase cung cấp năng lượng cho quá trình tiết của T6SS.

Cơ chế tiết của T6SS được thực hiện từ sự thay đổi cấu trạng của phần đế của phức hợp TssE và VgrV sẽ thúc đẩy quá trình co của phức hợp TssB – TssC dẫn sự tiết của phần gai từ tế bào chất ra chu chất. Sau khi ra đến chu chất, phức hợp ống Hcp và phần gai sẽ tiếp hành quá trình nhận diện các yếu tố cần tiết đã tồn tại ở chu chất và tiếp tục tiết ra bên ngoài màng. Quá trình tiết trên sẽ không được diễn ra nếu như ClpV có vai trò ATPase thực hiện quá “giãn co” phức hợp TssB-TssC (Hình 5).

HỆ THỐNG TIẾT QUA MỘT MÀNG

Hệ thống tiết loại V – T5SS (Type V secret system)

Ở vi khuẩn Gram âm, hệ thống tiết loại V – T5SS (Type V secret system) thường đảm nhiệm vai trò tiết các yếu tố độc lực hoặc tiết yếu tố bám giúp vi khuẩn bám vào vật chủ. T5SS còn được biết đến với cái tên khác là hệ thống tự tiết (The autotransporter system). Gọi T5SS là hệ thống tự tiết là bởi vì hệ thống tự tiết này được cấu tạo chỉ bởi một chuỗi polypeptide duy nhất và chính chuỗi polypeptide này sẽ tự tiết chính nó qua màng ngoài. Do chỉ có thể tiết được các phân tử từ chu chất ra đến màng ngoài, nên các phân tử phải phụ thuộc vào phức hợp chuyển vị SecYEG để

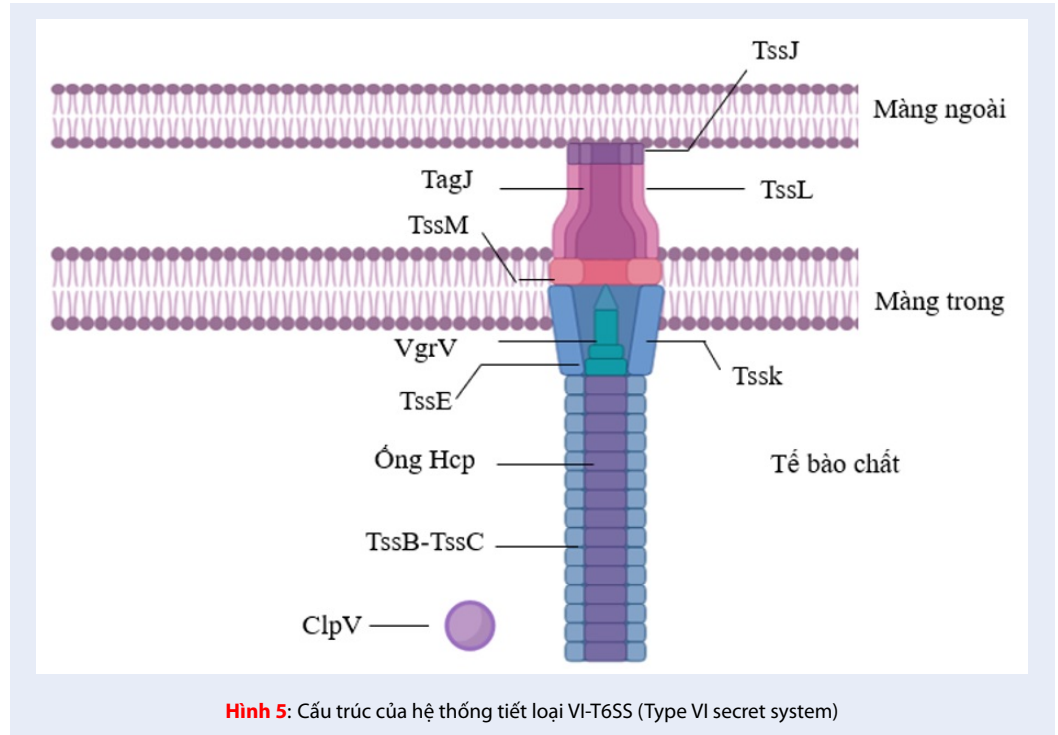
vận chuyển chuỗi polypeptide ra chu chất trước khi được T5SS tiết ra bên ngoài màng.

Hiện tại, T5SS được phân loại thành các hệ thống tiết từ a-e³⁰, tuy nhiên xét về cấu trúc tổng quát thì các hệ thống tiết thuộc T5SS luôn được cấu tạo duy nhất một chuỗi polypeptide được cấu thành bởi ba thành phần gồm domain vai trò tín hiệu tiết qua màng trong được nhận biết bởi phức hợp chuyển vị SecYEG, domain có hoạt tính hay domain thực sự được tiết ra bên ngoài màng thường ở trạng thái không gấp cuộn khi ở chu chất và domain tiết hay β – domain có vai trò dung hợp với phức hợp Bam màng ngoài để tạo thành cấu trúc “thùng beta” cho phép domain có hoạt tính được tiết qua cấu trúc này. Sau khi được tiết ra khỏi màng, domain hoạt tính được neo giữ lại trên màng thông qua một chuỗi a-helix có dạng hình kẹp tóc gắn với phần domain tiết (Hình 6A).

Cơ chế tiết ở T5SS được mô tả như sau: sau khi chuỗi polypeptide được tiết ra chu chất thông qua phức hợp chuyển vị SecYEG, một số chaperone ở chu chất sẽ giữ cho chuỗi polypeptide ở trạng thái không gấp cuộn. Lúc này, β – domain của chuỗi polypeptide sẽ được nhận diện bởi phức hợp Bam. Bam là một phức hợp tồn tại ở màng ngoài gồm protein màng BamA có cấu trúc “thùng beta” và bốn lipoprotein BamB, BamC, BamD và BamE có vai trò nhận diện β – domain của chuỗi polypeptide³². β – domain sau khi được nhận diện bởi phức hợp Bam sẽ tiến hành dung hợp vào màng ngoài. Quá trình gấp cuộn tạo cấu trúc “thùng beta” sẽ kéo và gấp cuộn domain hoạt tính của chuỗi polypeptide qua chính cổng “thùng beta” này. Sau khi toàn bộ chuỗi polypeptide được tiết ra bên ngoài màng thì quá trình gấp cuộn cấu trúc “thùng beta” kết thúc. Quá trình tự tiết này hoàn toàn không sử dụng năng lượng ATP mà chỉ phụ thuộc vào quá trình gấp cuộn tạo cấu trúc “thùng beta” của β – domain nên T5SS. Hơn thế nữa, chuỗi polypeptide sau khi tiết vẫn được neo lại trên màng, do đó, T5SS cho thấy đây là hệ thống tiết tiềm năng để ứng dụng vào việc biểu hiện protein trên bề mặt vi khuẩn Gram âm (Hình 6B).

Hệ thống tiết loại II – T2SS (Type II secret system)

Hệ thống tiết loại II – T2SS (Type II secret system) xuất hiện ở các chủng vi khuẩn gây bệnh không chỉ ở người mà còn ở thực vật. T2SS đóng vai trò quan trọng trong việc tiết một số protein độc tố tồn tại ở dạng gấp cuộn hoàn chỉnh. Dù có cơ chế tiết qua một màng nhưng cấu trúc của T2SS lại được cấu tạo bởi các protein thành phần nằm ở màng trong và màng ngoài. Các thành phần này gồm phức hợp màng ngoài, thành phần ở chu chất, thành phần ở màng trong và ATPase nằm ở tế bào chất.



Cấu trúc của thành phần màng trong được cấu tạo bởi bốn protein màng: GspC, GspF, GspL và GspM. Trong đó, GspE có vai trò kết nối với GspE – một ATPase cung cấp năng lượng cho quá trình tiết ở protein ở T2SS³³. Thành phần ở chu chất gồm các protein GspG, GspH, GspI, GspJ và GspK³⁴. Các protein này sẽ hình thành nên một phức hợp đẩy protein cần tiết. Phức hợp đẩy protein này có cấu trúc có hình dạng tương tự như “pít tông” có vai trò không chỉ đẩy protein mục tiêu trong quá trình tiết mà còn thu hút các protein mục tiêu vào thành phần chu chất của T2SS. Phức hợp màng ngoài được cấu tạo bởi protein GspD. Protein vừa có vai trò “cổng màng ngoài” vừa được kết nối với thành phần màng trong nhờ GspC liên kết với domain nằm ở chu chất của chính mình để tạo khoảng trống hoạt động cho phức hợp đẩy protein.

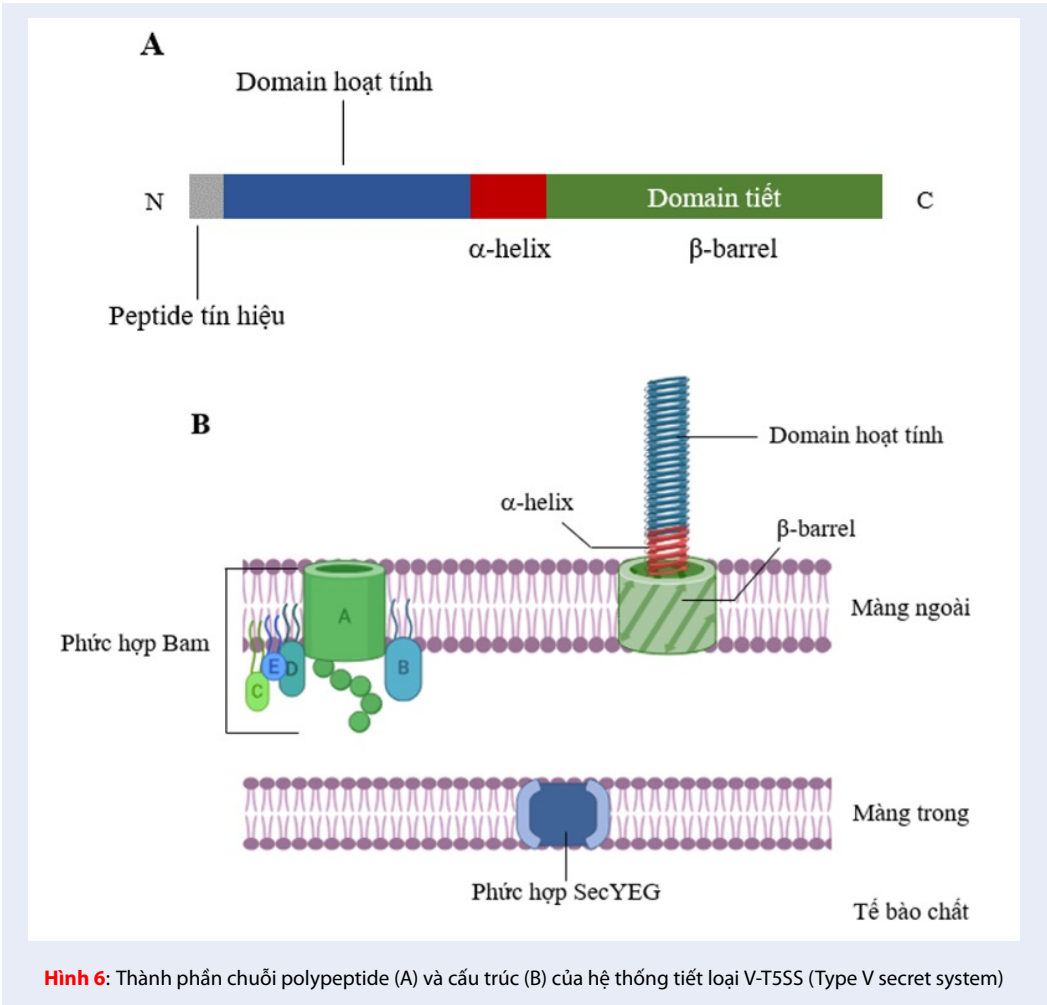
Cơ chế tiết của hệ thống tiết loại II-T2SS được mô tả như sau: ban đầu các protein mục tiêu được hệ thống chuyển vị arginine kép vận chuyển từ tế bào chất qua màng trong để vào vùng chu chất. Tại đây, phức hợp đẩy của thành phần chu chất sẽ thu hút các protein vào khoảng trống được tạo bởi domain nằm ở chu chất GspD và GspC. Lúc này, GspE sẽ tiến hành thủy phân ATP cung cấp năng lượng cho phức hợp “pít tông” đẩy protein mục tiêu qua khoảng không của thành phần chu chất ra bên ngoài màng (Hình 7).

Như vậy có thể thấy, hệ thống tiết của vi khuẩn Gram âm được tìm ra hiện nay rất đa dạng. Tuy nhiên, vẫn

có những cơ chế tiết chưa được hiểu rõ cụ thể. Việc nghiên cứu và ứng dụng vi khuẩn Gram âm làm “nhà máy sản xuất protein” đòi hỏi các nhà nghiên cứu cần phải hiểu rõ chi tiết các cơ chế trên.

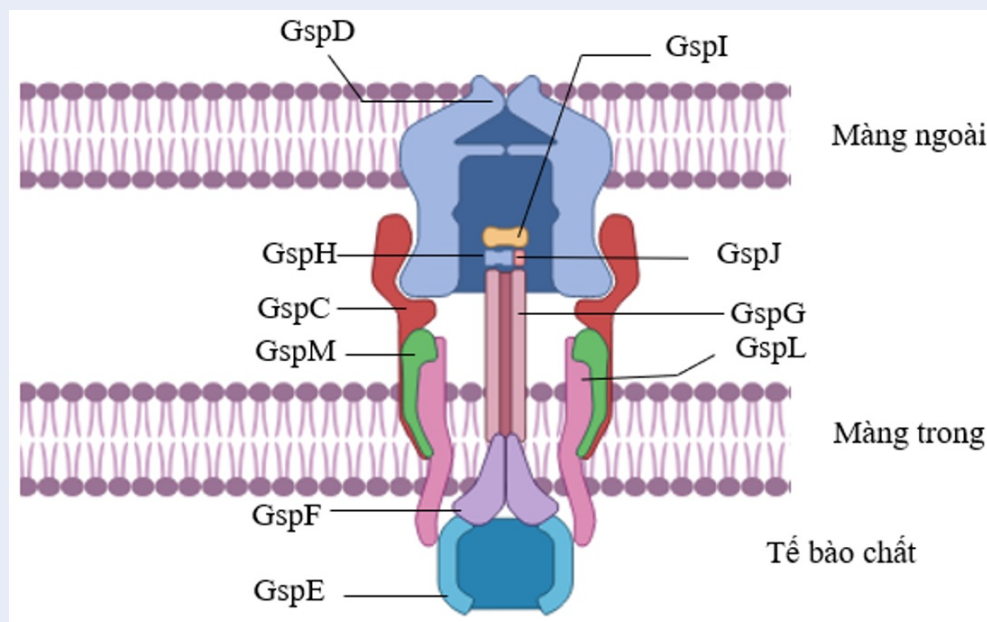
ỨNG DỤNG HỆ THỐNG TIẾT VÀO BIỂU HIỆN PROTEIN TRÊN BỀ MẶT VI KHUẨN GRAM ÂM

Việc ứng dụng các hệ thống tiết ở vi khuẩn Gram âm vào quá trình biểu hiện protein trên bề mặt cho thấy chỉ các hệ thống tiết qua hai màng và hệ thống tiết loại V là có tính khả thi vì đây là nhóm các hệ thống tiết duy nhất có thể đẩy chuỗi polypeptide ra màng ngoài. Tuy nhiên, các hệ thống tiết qua hai màng đều có cấu tạo phức tạp và đều cần năng lượng ATP cho quá trình tiết của chúng. Chính vì quá trình tiết cần sử dụng ATP nên cấu trúc của các hệ thống này rất phức tạp và khó có thể mô phỏng trong *in vitro*. Mặt khác, các protein được tiết bởi các hệ thống tiết này thường không được neo lại trên màng. Ngược lại, hệ thống tiết loại V – T5SS (type V secret system) hay hệ thống tự tiết (the autotransporter) cho thấy các ưu điểm như quá trình tiết của T5SS không sử dụng năng lượng ATP, protein sau khi tiết sẽ được neo lại ở màng (Bảng 1). Bên cạnh đó, cấu trúc của hệ thống này rất đơn giản – được cấu tạo chỉ bởi một chuỗi polypeptide. Bằng cách thiết kế plasmid tái tổ hợp có chứa trình tự mã hóa chuỗi polypeptide dung hợp



Bảng 1: Tóm tắt đặc điểm của các hệ thống tiết được biết hiện nay của vi khuẩn Gram âm

Tên hệ thống	Số bước	Vị trí	Cơ chế	Sử dụng năng lượng ATP
Sec	1	Màng trong	Tiết qua màng trong	Có
Tat				
T1SS	1	Vách	Tiết qua hai màng	
T2SS	2			
T3SS	1			
T4SS				
T5SS	2	Màng ngoài	Tiết qua màng ngoài	Không
T6SS	1	Vách	Tiết qua hai màng	Có



Hình 7: Cấu trúc của hệ thống tiết loại VI-T6SS (Type VI secret system)

với trình tự mã domain “thùng beta” của T5SS và tín hiệu tiết được nhận biết bởi hệ thống tiết qua màng trong (phức hợp chuyển vị SecYEG) thì có thể biểu hiện được chuỗi polypeptide mục tiêu trên bề mặt vi khuẩn Gram âm (Hình 8A). Hiện nay, T5SS đang được ứng dụng để sàng lọc các peptide. Các peptide này được biểu hiện trên bề mặt vi khuẩn Gram âm và sau đó được sàng lọc bằng một số kỹ thuật ví dụ như kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy – flow cytometry. Cụ thể, T5SS đã được sử dụng nhằm biểu hiện và sàng lọc IgG^{35,36}. Ở nghiên cứu này, các gen mã hóa cho IgG đã được dung hợp với một plasmid có chứa tín hiệu tiết và domain “thùng beta” để tạo plasmid tái tổ hợp và sau đó biểu hiện ở vi khuẩn *E. coli* (Hình 8B). Chính vì vậy, T5SS rất tiềm năng cho việc sử dụng như một hệ thống biểu hiện trên bề mặt vi khuẩn và đặc biệt là vi khuẩn Gram âm.

KẾT LUẬN

Biểu hiện protein ở vi khuẩn là nền tảng của việc tạo protein tái tổ hợp. Tuy nhiên, đối với biểu hiện protein ở bề mặt vi khuẩn, cụ thể là vi khuẩn Gram âm còn hạn chế vì cấu tạo màng ở nhóm vi khuẩn này rất phức tạp. Thông qua hệ thống tiết có vai trò trong quá trình hình thành yếu tố độc lực ở nhóm vi khuẩn này, ta thấy được tiềm năng lớn trong việc sử dụng chính các hệ thống tiết này đặc biệt là hệ thống tiết loại V – T5SS như một công cụ sinh học phân tử dùng để biểu hiện protein trên bề mặt tế bào.

DANH MỤC VIẾT TẮT

Gsp: General secret protein;
T1SS: Type 1 secret system;
T2SS: Type 2 secret system;
T3SS: Type 3 secret system;
T4SS: Type 4 secret system;
T5SS: Type 5 secret system;
T6SS: Type 6 secret system.

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả cam kết không có xung đột lợi ích

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Lê Hoàng Khôi Nguyên: tổng hợp, viết, và chỉnh sửa bản thảo

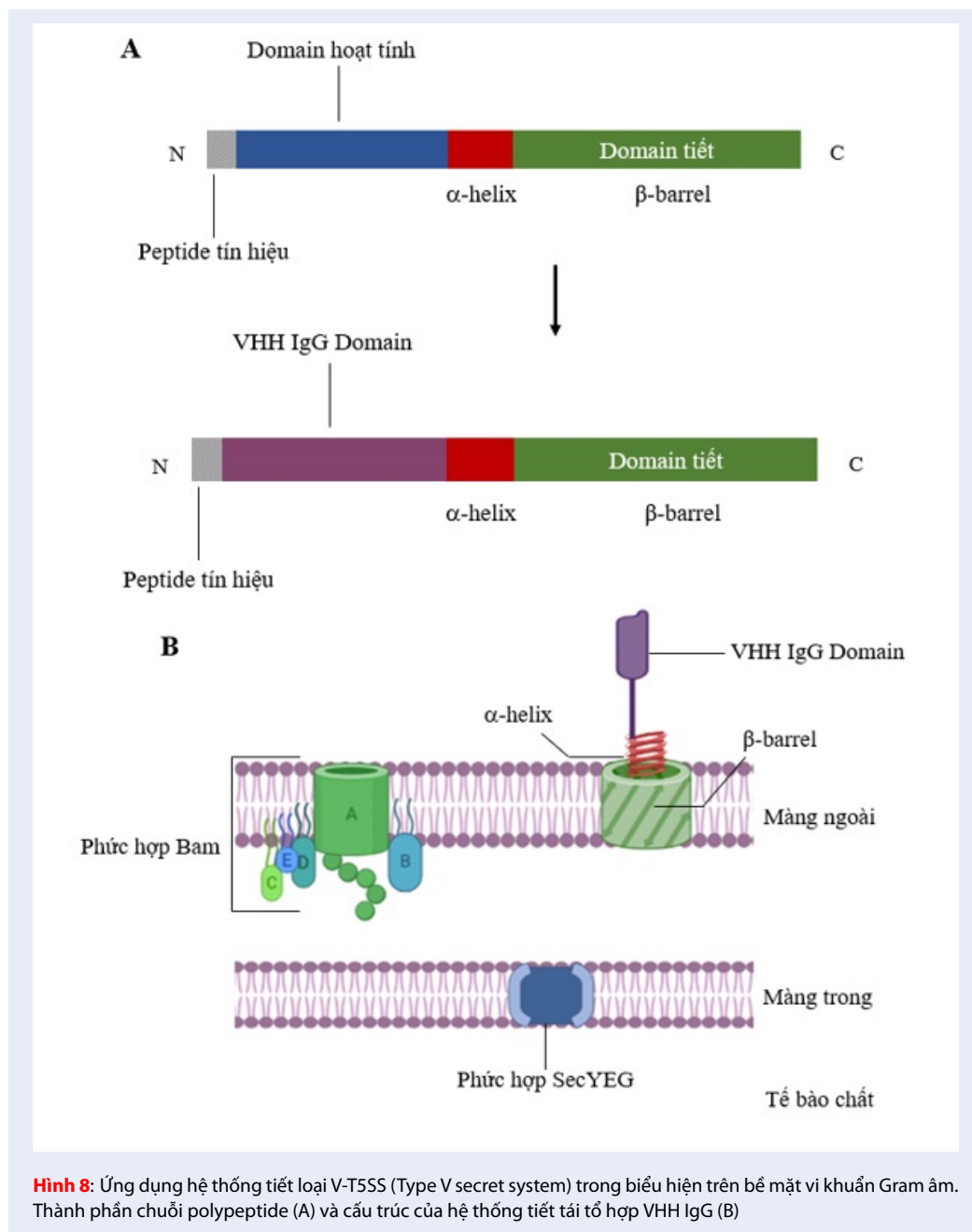
Nguyễn Thanh Tấn: góp ý, chỉnh sửa bản thảo

Trần Văn Hiếu: lên ý tưởng, góp ý, chỉnh sửa, và chấp thuận bản thảo

Tất cả tác giả đồng ý với nội dung bản thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The Bacterial Cell Envelope. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010 May;2(5):a000414;.
2. Sibbald MJJB, Ziebandt AK, Engelmann S, Hecker M, de Jong A, Harmsen HJM, et al. Mapping the Pathways to Staphylococcal Pathogenesis by Comparative Secretomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2006 Sep;70(3):755–88;.
3. Desvaux M, Dumas E, Chafsey I, Hébraud M. Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. FEMS Microbiology Letters. 2006 Mar 1;256(1):1–15;.



- Natale P, Brüser T, Driessen AJM. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—Distinct translocases and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2008 Sep 1;1778(9):1735–56.
- SecA-Mediated Protein Translocation through the SecYEG Channel [Internet]. [cited 2023 Jul 27];Available from: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/microbiolspec.psib-0028-2019>.
- Tsukazaki T. Structure-based working model of SecDF, a proton-driven bacterial protein translocation factor. *FEMS Microbiol Lett*. 2018 Apr 27;365(12):fny112;.
- The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism - PMC [Internet]. [cited 2023 Aug 16];Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3297432/>.
- Palmer T, Stansfeld PJ. Targeting of proteins to the twin-arginine translocation pathway. *Molecular Microbiology*. 2020;113(5):861–71;.
- The Bacterial Twin-Arginine Translocation Pathway - PMC [Internet]. [cited 2023 Jul 27];Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2654714/#R9>.
- Behrendt J, Brüser T. The TatBC complex of the Tat protein translocase in *Escherichia coli* and its transition to the substrate-bound TatABC complex. *Biochemistry*. 2014 Apr 15;53(14):2344–54;.
- Härtlein M, Schiefl S, Wagner W, Rdest U, Kreft J, Goebel W. Transport of hemolysin by *Escherichia coli*. *Journal of Cellular*

- Biochemistry. 1983;22(2):87–97.
12. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (Review): Molecular Membrane Biology: Vol 22, No 1-2 [Internet]. [cited 2023 Jul 27];Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09687860500042013>.
13. Kanonenberg K, Schwarz CKW, Schmitt L. Type I secretion systems – a story of appendices. Research in Microbiology. 2013 Jul 1;164(6):596–604.
14. Balakrishnan L, Hughes C, Koronakis V. Substrate-triggered recruitment of the TolC channel-tunnel during type I export of hemolysin by Escherichia coli 11 Edited by I. B. Holland. Journal of Molecular Biology. 2001 Oct 26;313(3):501–10.
15. Yum S, Xu Y, Piao S, Sim SH, Kim HM, Jo WS, et al. Crystal Structure of the Periplasmic Component of a Tripartite Macrolide-Specific Efflux Pump. Journal of Molecular Biology. 2009 Apr 17;387(5):1286–97.
16. Costa TRD, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. Nat Rev Microbiol. 2015 Jun;13(6):343–59.
17. Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, et al. Supramolecular Structure of the Salmonella typhimurium Type III Protein Secretion System. Science. 1998 Apr 24;280(5363):602–5.
18. Worrall LJ, Lameignere E, Strynadka NC. Structural overview of the bacterial injectisome. Current Opinion in Microbiology. 2011 Feb 1;14(1):3–8.
19. Marlovits TC, Kubori T, Lara-Tejero M, Thomas D, Unger VM, Galán JE. Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. Nature. 2006 Jun;441(7093):637–40.
20. Structural Insights into the Assembly of the Type III Secretion Needle Complex | Science [Internet]. [cited 2023 Jul 27];Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1102610>.
21. Three-Dimensional Model of Salmonella's Needle Complex at Subnanometer Resolution | Science [Internet]. [cited 2023 Jul 27];Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1199358>.
22. Akeda Y, Galán JE. Genetic Analysis of the Salmonella enterica Type III Secretion-Associated ATPase InvC Defines Discrete Functional Domains. J Bacteriol. 2004 Apr;186(8):2402–12.
23. Biological Diversity of Prokaryotic Type IV Secretion Systems | Microbiology and Molecular Biology Reviews [Internet]. [cited 2023 Jul 27];Available from: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mmbr.00023-09>.
24. Wallden K, Rivera-Calzada A, Waksman G. Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. Cell Microbiol. 2010 Sep;12(9):1203–12.
25. Chandran V, Fronzes R, Duquerroy S, Cronin N, Navaza J, Waksman G. Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. Nature. 2009 Dec;462(7276):1011–5.
26. Structure of a type IV secretion system | Nature [Internet]. [cited 2023 Jul 27];Available from: <https://www.nature.com/articles/nature13081>.
27. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in Vibrio cholerae using the Dictyostelium host model system | PNAS [Internet]. [cited 2023 Jul 27];Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0510322103>.
28. Felisberto-Rodrigues C, Durand E, Aschtgen MS, Blangy S, Ortiz-Lombardia M, Douzi B, et al. Towards a Structural Comprehension of Bacterial Type VI Secretion Systems: Characterization of the TssJ-TssM Complex of an Escherichia coli Pathovar. PLOS Pathogens. 2011 thg 11;7(11):e1002386.
29. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure | Nature [Internet]. [cited 2023 Jul 27];Available from: <https://www.nature.com/articles/nature10846>.
30. Leo JC, Grin I, Linke D. Type V secretion: mechanism(s) of auto-transport through the bacterial outer membrane. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2012 Apr 19;367(1592):1088–101.
31. Fan E, Chauhan N, Udatha DBRKG, Leo JC, Linke D. Type V Secretion Systems in Bacteria. Microbiology Spectrum. 2016 Feb 19;4(1):10.1128/microbiolspec.vmbf-0009–2015.
32. BamA forms a translocation channel for polypeptide export across the bacterial outer membrane - PubMed [Internet]. [cited 2023 Jul 27];Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33705710/>.
33. Lu C, Turley S, Marionni ST, Park YJ, Lee KK, Patrick M, et al. Hexamers of the type II secretion ATPase GspE from Vibrio cholerae with increased ATPase activity. Structure. 2013 Sep 3;21(9):1707–17.
34. Naskar S, Hohl M, Tassinari M, Low HH. The structure and mechanism of the bacterial type II secretion system. Mol Microbiol. 2021 Mar;115(3):412–24.
35. Marín E, Bodelón G, Fernández LÁ. Comparative Analysis of the Biochemical and Functional Properties of C-Terminal Domains of Autotransporters. Journal of Bacteriology. 2010 Nov;192(21):5588–602.
36. Selection of Single Domain Antibodies from Immune Libraries Displayed on the Surface of E. coli Cells with Two β -Domains of Opposite Topologies | PLOS ONE [Internet]. [cited 2024 Aug 25];Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0075126>.

Secretion systems in Gram-negative bacteria

Nguyen Khoi Hoang Le^{1,2}, Tan Thanh Nguyen^{1,2,3}, Hieu Van Tran^{1,2,3,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹Department of Molecular and Environmental Biotechnology, Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Laboratory of Biosensor, Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

Correspondence

Hieu Van Tran, Department of Molecular and Environmental Biotechnology, Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

Laboratory of Biosensor, Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

Email: tvhieu@hcmus.edu.vn

History

- Received: 28-8-2023
- Revised: 11-2-2025
- Accepted: 21-02-2025
- Published Online: 31-03-2025

DOI :

<https://doi.org/10.32508/stdjns.v9i1.1311>



Check for updates

Copyright

© VNUHCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



ABSTRACT

Biotechnology's fast development in expressing novel proteins has been substantially facilitated, particularly in the context of recombinant protein expression in bacteria. Currently, intracellular, secretory, and surface-displayed modes of protein expression are utilized in bacteria. However, the surface display of proteins in Gram-negative bacterial species is still limited by several factors. The challenges in protein expression on the surface of Gram-negative bacteria stem from the complex structure of their cell wall, which is composed of two membrane layers. Therefore, a suitable transport system is required for recombinant protein surface expression. Previous research has indicated that bacterial secretion systems are vital to their survival. In Gram-negative bacteria, secretion systems are classified into those that translocate across a single membrane and those that translocate across both membranes. While Sec and Tat are single-membrane translocation systems, the Type I secretion system (T1SS), Type II secretion system (T2SS), Type III secretion system (T3SS), Type IV secretion system (T4SS), Type V secretion system (T5SS), and Type VI secretion system (T6SS) are double-membrane translocation systems that facilitate the export of polypeptide chains synthesized within the cell to the external environment. In this overview, the distinctive features of each secretion system will be discussed, along with their potential applications for directing recombinant proteins onto the membranes using these systems.

Key words: Gram-negative bacteria, protein surface display, recombinant protein, double-membrane translocation systems, single-membrane translocation systems

Cite this article : Le N K H, Nguyen T T, Tran H V. **Secretion systems in Gram-negative bacteria.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2025; 9(1):3296-3306.