

Çoğunluğu algılama yanıtlarının gösterilmesinde iki yöntemin karşılaştırılması

The comparison of two methods in order to show the quorum sensing responses

Vahide Bayrakal, Hüseyin Baskın, İ. Hakkı Bahar

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; İnciraltı, İzmir.

İletişim/ Correspondence: Hüseyin Baskın Adres / Address: Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, 35340, İzmir Tel: (232) 412 4511 GSM: 0533 334 3166 E-posta: huseyin.baskin@deu.edu.tr

ÖZET

Pseudomonas aeruginosa'da *rhl* ve *las* sistemi olmak üzere iki "quorum sensing" [çoğunluğu algılama, (ÇA)] sistemi tanımlanmıştır. *Rhl* ve *las* sistemlerinin kullandıkları sinyal molekülleri (*las*: 3-oxo-C12-HSL; *rhl*: C4-HSL), "reporter strain" olarak kullanılan bakteriler (*rhl* için *Chromobacterium violaceum*; *las* için *Agrobacterium tumefaciens*) ile gösterilmektedir. ÇA sistemlerinin gösterilmesinde mikro AHL, kuyucuktan yayılım, ince tabaka kromotografisi, zimografi gibi yöntemler kullanılabilir.

Bu çalışmada, yara yerinden izole edilen iki klinik (K1, K2) *P. aeruginosa* suşu ile standart ATCC 27853 suşunda ÇA sistemlerinin gösterilmesi için, mikro AHL ve kuyucuktan yayılım yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Sonuç olarak her iki yöntemin sonuçları birbirine paralel bulunmuştur. Mikro AHL yöntemi daha uzun sürede sonuç vermesine karşın, kuyucuktan yayılım yöntemine göre daha kolay uygulanabilmesi ve daha net sonuç vermesi, yinelenmesinin kolaylığı gibi nedenler ile ÇA sistemlerinin belirlenmesinde daha pratik bir yöntem olarak tercih edilebilir.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, çoğunluğu algılama, açillenmiş homoserin laktone.

SUMMARY

Two different "quorum sensing" (QS) systems were defined in *Pseudomonas aeruginosa*: *rhl* and *las*. The signal molecules of the *las* (3-oxo-C12-HSL) and *rhl* (C4-HSL) systems are visualized by two different reporter strains (*Chromobacterium violaceum* for *rhl*, and *Agrobacterium tumefaciens* for *las*).

In order to show the existence of QS systems, micro AHL, thin layer chromatography, zymography, and diffusion methods are used.

In this study, QS responses of two clinical isolates and standart *P. aeruginosa* strain (ATCC 27853) were compared by diffusion and micro AHL methods. As a result, micro AHL method was much easier to apply and to visualize, and was easier to repeat when compared to diffusion method. This may be the reason for widely applying this method while showing QS.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Quorum sensing, acylated homoserine lactone.

GİRİŞ

Bakteriler pH, osmolarite, besin azlığı, antibiyotik madde varlığı v.b. değişen mikroçevre koşullarına çeşitli mekanizmalar ile uyum sağlayabilirler. Bu uyum sağlamada oldukça önemli olan popülasyon yoğunluğunu iletişim sinyalleri ile belirleyip değişen yoğunluğa göre davranışlarını değiştirirler ki, bu çoğunluğu algılama (quorum sensing) (ÇA) olarak adlandırılmaktadır (1, 2).

Pseudomonas aeruginosa'da tanımlanan iki sistem ile çalışan hücreden hücreye sinyal iletiminin ekstrasellüler virulans faktörlerinin ekspresyonunu (elastaz, alkalen proteaz, piyosiyanın, ramnolipid gibi) düzenlediği gösterilmiştir. Birincil sistem olan "*las* sistemi", *Las I* ("3-oxo-C12-HSL" nin sentezinden sorumlu autoinducer sentaz geni) ve *Las R* ("transcriptional activator" proteinini kodlayan gen) olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır. *Las B* elastazın ekspresyonunu düzenlediği

için las sistemi olarak adlandırılan bu sistem; *Las A* proteaz, alkalin proteaz, biyofilm oluşumunu ve eksotoksin A gibi çeşitli hücre dışı enzimlerin sentezlenmesini düzenler. “*rhl* sistemi” ise; *rhl I* (C4- HSL, “autoinducer sentaz”) ve *rhl R* (“transcriptional activator” proteinin kodlayan gen) ' den oluşmaktadır. *Rhl AB* operonunun ekspresyonunu kontrol eden *rhl* sistemi; ramnolipid üretimi için “rhamnositransferaz” ın sentezlenmesini düzenlemesinin yanı sıra *Las A/B* elastaz, piyosyanin, siyanid ve alkalin proteazın optimal miktarda üretimi için gereklidir (3).

Las sistemini (3- oxo-C12-HSL) göstermek için “reporter strain” (gösterge suşu) olarak *Agrobacterium tumefaciens* ve *rhl* sistemini görüntülemek (C4- HSL) için ise *Chromobacterium violaceum* kullanılmaktadır. Bu iki toprak bakterisinin kolonileri, ilgili sinyal moleküllerinin (AHL molekülleri) varlığında mavi- yeşil renk almaktadır. Çoğunluğu algılama sistemlerinin varlığı; mikro AHL, kuyucuktan yayılım (difüzyon), ince tabaka kromatografisi, zimografi yöntemleri ile gösterilmektedir (4,5,6).

Bu çalışmada mikro AHL ve kuyucuktan yayılım yöntemleri, yara örneklerinden ayrıştırılmış iki klinik (K1, K2) suş ile ATCC 27853 suşunda, gentamisin minimum inhibitör konsantrasyonlarına (MİK) karşı oluşan çoğunluğu algılama yanıtları değerlendirilirken, laboratuvar ortamında kolay uygulanabilirlik, az malzeme kullanımı, yinelenbilirlik, gerekli zaman, değerlendirmede kolaylık gibi kriterler yönünden karşılaştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşların MİK değerlerinin belirlenmesi

Yara yerinden ayrıştırılmış iki klinik (K1, K2) suş ile ATCC 27853 suşu çalışmada kullanılmıştır. Her suş için gentamisin MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile NCCLS (yeni adı ile CLSI) 'e göre belirlenmiştir (7).

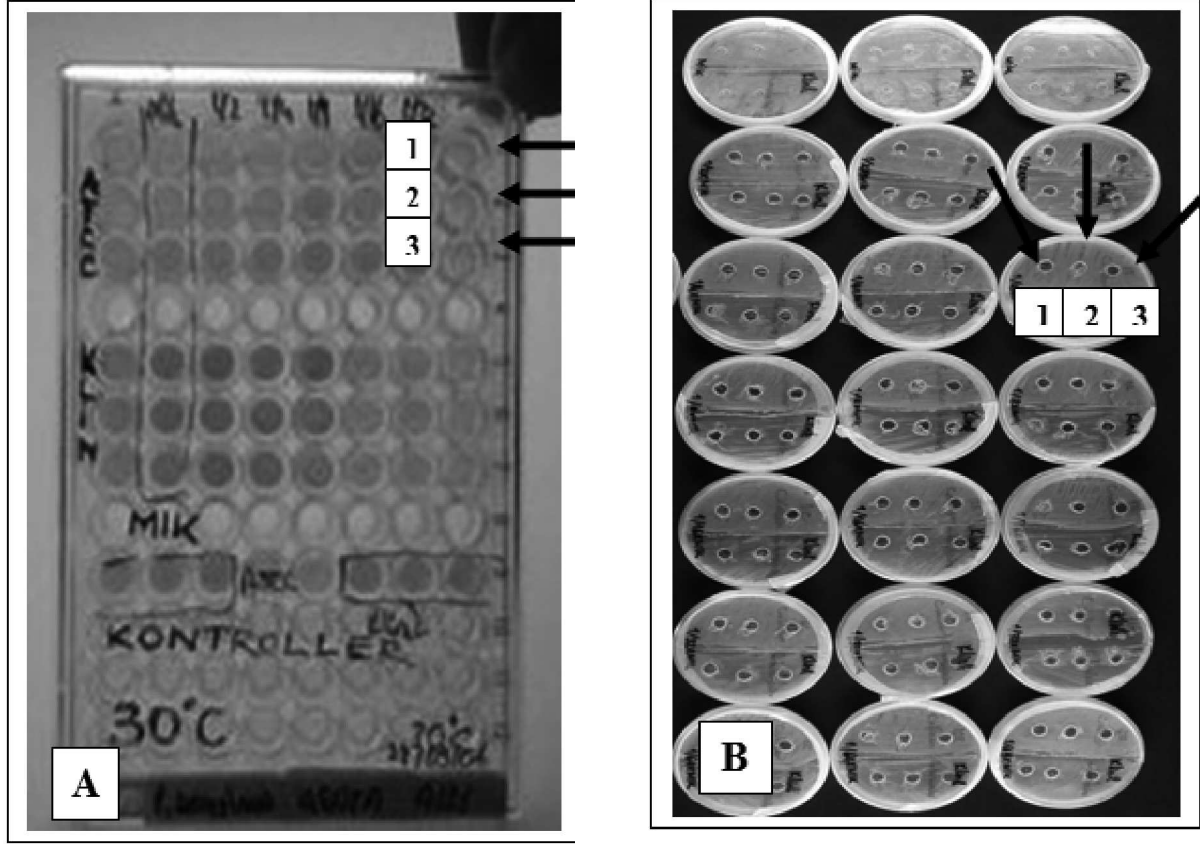
Mikro AHL yöntemi ile “Quorum Sensing” yanıtlarının Değerlendirilmesi

ELISA mikro plaklarının her kuyucuğuna eşit miktarlarda Luria Bertani Agar (LBA) dağıtılıp oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Mac Farland (MF) 0.5' e eşit bulanıklıkta hazırlanan *Chromobacterium violaceum* ve *Agrobacterium tumefaciens* (reporter strain) ile gentamisin mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen MİK, 1/2 X MİK, 1/4 X MİK, 1/8 X MİK, 1/16 X MİK, 1/32 X MİK konsantrasyonları ile karşılaşmış K1, K2 ve ATCC 27853 suşlarından ve kontrol olarak da antibiyotik ile karşılaşmamış suşlardan eşit miktarlarda dağıtılarak 30 °C' de 48 saat inkübe edilmiştir. “Açılennmiş homoserin lakton” (AHL) varlığı makroskopik olarak değerlendirilip “mavi- yeşil” renk görülmesi pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil: 1.A.) (4).

Kuyucuktan yayılım (Diffüzyon) yöntemi ile “Quorum Sensing” yanıtlarının değerlendirilmesi

Önceden ısıtılmış LBA içeren Petri kutuları, ikiye bölünerek bir tarafına MF 0. 5' e eşit bulanıkta hazırlanan *C. violaceum*, diğer tarafına da aynı şekilde hazırlanan *A. tumefaciens* bakterilerinin süspansiyonlarından eşit miktarda yayma ekimi yapılmıştır. Her iki bölüme de 3' er kuyucuk hazırlanmıştır. Her bir çukura gentamisin belirlenen MİK, 1/2 X MİK, 1/4 X MİK, 1/8 X MİK, 1/16 X MİK, 1/32 X MİK konsantrasyonları ile karşılaşmış K1, K2 ve ATCC 27853 suşlarından; kontrol olarak da antibiyotik ile karşılaşmamış suşlardan eşit miktarda konmuş, 30°C' de 18 saat inkübe edilmiştir. “Mavi-yeşil” renk oluşumu AHL varlığı açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. (Şekil: 1.B.) (5).

Bütün çalışmalarda her örnek 3' er kez değerlendirilmiş ve her deney 3' er kez yinelenmiştir.



Şekil 1: A. Mikro AHL Placı: MİK ve sub-MİK konsantrasyonları ile karşılaşan suşlar, soldan sağa pre -MİK, MİK, 1/2 X MİK, 1/4 X MİK, ...1/32 X MİK konsantrasyonlarında ve her örnek (antibiyotik + suş) 3' er sıra (1, 2, 3) çalışılmak üzere "reporter strain" ler ile karşılaştırılır. Bu yöntemde *Agrobacterium tumefaciens* bir plak, *Chromobacterium violaceum* için ayrı bir plak kullanılmıştır. Her deney 3 kez yinelenmiştir.

B. Kuyucuktan Yayılım Plakları: Her petri plağındaki besiyeri, karşı tarafa yayılımı engellemek için, ortadan ikiye kesilmiştir. Besiyerinin her iki tarafına yine her örnek (antibiyotik + suş) için 3'er kuyucuk (1, 2, 3) hazırlanmıştır. Besiyerinin soluna *Agrobacterium tumefaciens*, sağına *Chromobacterium violaceum* sürülmüş ve gentamisininin MİK, 1/2 X MİK, 1/4 X MİK, ...1/32 X MİK konsantrasyonları ile karşılaşan suşlar kuyucukların içine pipetlenmiştir. Her deney 3 kez yinelenmiştir

(Dikkat: Sub- MİK: Subminimal inhibitör konsantrasyon; iki doz arasında geçen zamanla, MİK' ten itibaren ters orantılı olarak azalan antibiyotik konsantrasyonunu temsil eder. MİK' i oluşturan konsantrasyonun yarısı 1/2 X MİK; dörde biri 1/4 X MİK; ... şeklinde devam eder).

BULGULAR

İncelenen suşlarda gentamisin varlığında belirlenen MİK değerleri; ATCC 27853 ve K1 suşlarında $4 \mu\text{g} / \text{mL}$, K2 suşunda ise $0,25 \mu\text{g} / \text{mL}$ olarak belirlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1: Çalışılan suşların gentamisin varlığında belirlenen MİK değerleri

MİK değerleri	ATCC 27853	K1	K2
Gentamisin	$4 \mu\text{g} / \text{ml}$	$4 \mu\text{g} / \text{mL}$	$0,25 \mu\text{g} / \text{mL}$

K2 suşunda sadece las sisteminin, ATCC 27853 suşunda ise sadece rhl sisteminin çalıştığı gözlemlenirken, K1 suşunda las ve rhl sisteminin çalıştığı görülmüştür (Tablo 2).

Tablo 2: Çalışılan suşlarda (S: ATCC 27853; K1: Klinik 1; K2: Klinik 2) çoğunluğu algılama ilişkilerinin mikro AHL ve kuyucuktan yayılım yöntemleri ile değerlendirilmesi

	MİK	1/2X MİK		1/4 X MİK		1/8 X MİK		1/16 X MİK		1/32 X MİK		Kontrol		
		S	K	S	K	S	K	S	K	S	K	S	K	
1	M	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
	D	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
2	M	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
	D	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+

1: *Chromobacterium violaceum* 026 (kısa zincirli AHL, rhl sistemi); 2: *Agrobacterium tumefaciens* 136 (3-oxo-C12-HSL, las sistemi); M: Mikro AHL; D: Yayılım; Kontrol: Antibiyotik uygulanmayan bakterilerden alınan sonuçlar.

AHL değerlendirmelerinde, yayılım yöntemi ile mikro AHL yöntemlerinin sonuçları, her 3 çalışmada da paralel bulunmuştur.

TARTIŞMA

Salgıladığı birçok ekstrasellüler enzimin kontrolü, hücreler arası iletişim sinyalleri ile sağlandığı için, çoğunluğu algılama (ÇA) sistemlerinin çözümünde üzerinde en çok çalışılan bakterilerden biri de *P. aeruginosa'* dır. İletişim sinyallerinin görüntülenmesi mikroçevre koşullarında *P. aeruginosa'* nın davranışları hakkında önemli ipuçları verir. Bu ipuçları

rı bu bakterinin tanısı ve infeksiyonun sağaltımında önemli açılımlar sağlayabilir (8).

P. aeruginosa' nın ÇA sistemlerinin yanıtlarını göstermek için kullanılan yöntemlerden biri mikro AHL, biri de kuyucuktan yayılım (difüzyon) yöntemidir. Bu çalışmada, laboratuvarında kolay uygulanabilirlik, malzeme kullanımı, yinelenebilirlik, deneyin sonuçlanması için gerekli zaman, değerlendirmede kolaylık kriterleri yönünden bu iki yöntem karşılaştırılmıştır. Bu amaçla yaradan izole edilen iki klinik suş ve ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşlarının; gentamisin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında ÇA yanıtları incelenmiştir.

Yinelenen deneylerde mikro AHL yönteminin, kuyucuktan yayılım yöntemine kıyasla daha uzun sürede sonuçlanmasına rağmen, daha kolay uygulanabilir ve daha az malzeme ile uygulanabilir olması sebebiyle, ÇA sistemlerinin belirlenmesinde daha pratik bir yöntem olarak tercih edilebileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and quorum quenching enzymes. J Microbiol 2005; 43: 101.
- Smith RS and Iglewski BH. Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing systems and virulence. Curr Opin Microbiol 2006; 6:56-60.
- Delden C V and Iglewski B H. Cell-to cell signalling and Pseudomonas aeruginosa infection. Emerg Infect Dis 1998; 4:551-60.
- Vivas J, Razquin BE, Lopez-Fierro P, Naharro G, Villena A. Correlation between production of acyl homoserine lactones and proteases in an Aeromonas hydrophila aro A live vaccine. Veter Microbiol 2004; 101: 167- 76.
- Zhu H, Thurutyil SJ, Willcox MDP. Production of N-acyl homoserine lactones by Gram-negative bacteria isolated from contact lens wearers. Clic Exoper Ophthal 2001;29: 150- 2.
- Liu M, Gray JM, Griffiths MW. Occurrence of proteolytic activity and N-acyl-homoserine lactone signals in the spoilage of aerobically chill-stored proteinaceous raw foods. J Food Prot 2006; 69:2729-37
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (Çeviri editörü Gür D): Aerop üreyen bakteriler için dilüsyon yöntemi ile antimikrobik duyarlılık testleri; Onaylanmış standart-altıncı baskı, M7- A6, Cilt 23, Sayı 2, Ocak (2003).
- Bertani I, Sevo M, Kojic M, Venturi V. Role of Gac A, Las I, Ppk, Psr A, Vfr and Clp XP in the regulation of stationary-phase sigma factor rpoS/ Rpo S in Pseudomonas. Arch Microbiol 2003; 180: 264-71.