

# Pseudomonas aeruginosa'da virülans faktörleri ve quorum sensing

## Virulence factors of Pseudomonas aeruginosa and quorum sensing

Onur Karatuna, Ayşegül Yağcı

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

İletişim / Correspondence: Ayşegül Yağcı Adres / Address: Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Haydarpaşa, 81326, İstanbul Tel: 0216 414 47 32 E-mail: ateyagci@superonline.com

### ÖZET

*Pseudomonas aeruginosa* ağır seyirli hastane enfeksiyonları, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda hayatı tehdit eden enfeksiyonlar, kistik fibroz hastalarında kronik enfeksiyonlar oluşturan bir fırsatçı patojendir. Konağa kolonizasyon sonrasında çeşitli virülans faktörleriyle (elastaz, alkali proteaz, piyosiyenin, fosfolipaz, ekzotoksin A, vb) doku hasarına yol açan bakteri, kan dolaşımına karışarak vücutta yayılabilir. Virülans faktörlerinin sentezinin düzenlenmesiyle çevre koşullarına ve özellikle konak savunmasına karşı korunma sağlanmakta ve bu düzenleme sistemleri arasında Quorum Sensing (QS) ön plana çıkmaktadır. *P. aeruginosa*' da detaylı olarak incelenmiş iki QS sistemi bulunmaktadır; las ve rhl QS sistemleri. Açıl homoserin lakton yapıda sinyal moleküllerinin görev aldığı bu sistemlerde sinyal molekülünün eşik değeri aşmasını takiben bakterilerde eşgüdümlü olarak belirli genlerin ifadesini düzenlenir. *P. aeruginosa*' da biyofilm oluşumunu da içeren birçok virülans faktörü üretiminin düzenlenmesinde QS'nin görev aldığı gösterilmiştir. *P. aeruginosa*' da gözlenen yüksek antibiyotik direnci yeni tedavi seçenekleri arayışına yol açmış ve bu amaca hizmet edebilecek QS sisteminin inhibisyonu mercek altına alınmıştır. Bakterinin virülansında azalmaya yol açacak, biyofilm oluşumunu engelleyecek QS inhibitörü ajanların bulunmasıyla, özellikle kistik fibroz gibi kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonları tedavisinde yeni yaklaşımlar geliştirilebilir.

**Anahtar kelimeler:** *Pseudomonas aeruginosa*, virülans faktörü, Quorum Sensing

### SUMMARY

*P. aeruginosa* is an opportunistic human pathogen causing life threatening infections in immunocompromised patients, severe nosocomial infections in hospital settings and chronic infections in cystic fibrosis patients. Following the colonization of the host, by producing several virulence factors (elastase, alkaline protease, pyocyanin, phospholipase, exotoxin A, etc.) the bacterium causes tissue damage and enters the blood stream thus disseminates in the host. A mechanism called Quorum Sensing(QS) responsible for the regulation of many virulence factors produced by *P. aeruginosa* which is triggered with a cell density dependent fashion and helps the bacteria to act as a quorum and to overcome the host defense mechanisms. Two QS systems have been described in details: las and rhl. Two N- acylhomoserine lacton signal molecules regulate gene expression of bacteria when they reach a density sufficient level. QS systems regulate expression of virulence factors including bio-film formation of *P. aeruginosa*. Due to high antimicrobial resistance rate to antimicrobials of this bacteria alternative therapeutic approaches, especially related with QS systems have been searched. QS inhibitors which prevent virulence factor production of *P. aeruginosa* may prevent chronic colonization especially in cystic fibrosis patients and could be a novel strategy to control infections.

**Anahtar kelimeler:** *Pseudomonas aeruginosa*, virulence factor, Quorum Sensing

### GİRİŞ

*P. aeruginosa* son yıllarda artan insidansı, ürettiği virülans faktörlerinin çeşitliliği ve sürekli yükselen antibiyotik direnç oranlarıyla sık rastlanan, mortalite ve morbiditesi yüksek, tedavisi güç enfeksiyonların etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının patogeneğinde

konağa ve bakteriye ait faktörler rol oynar. Enfeksiyonların ilk basamağı kolonizasyondur, konak savunmasının bozulduğu ve bağışık yanıtın yetersiz kaldığı durumlarda kolonizasyon genellikle enfeksiyona ilerler. Bakterinin virülans faktörlerini hücre ile ilişkili ve hücre dışına salınan faktörler olarak inceleyebiliriz.

### **Bakteri Hücre Yüzeyi İle İlişkili Virülans Faktörleri**

**Kirpik.** *P. aeruginosa*'nın yüzme şeklindeki hareketinden sorumlu yapıdır. Epitel hücresi membranını bileşeni olan asialo-GM1'e bağlanarak bakterinin adezyonunu sağlar. Kirpik Toll-benzeri reseptörler (TLR5 ve TLR2) ile etkileşerek NF $\kappa$ B bağımlı inflamatuvar yanıtı uyarır ve kalsiyum bağımlı kinaz yolağının aktivasyonu ile IL-8 sentezinin başlatılmasına yol açar. Kirpiğin güçlü immunojen olması sebebiyle, kronik *P. aeruginosa* infeksiyonlarında konak bağışık yanıtından kaçmak için kirpiksiz mutantlar seçilmektedir (1).

**Pili (Fimbriae):** Bakterinin kısa, filamentöz yüzey yapılarıdır. Genelde prokaryot hücrelerde pili hareketten sorumlu değil iken *P. aeruginosa*'da pili seğirme (twitching) şeklinde hareketten sorumludur. Hava yollarında hızla yayılmaya ve kolonizasyona yardımcı olur. Kirpik gibi pilus da kolonizasyonun adezyon fazında epitel hücre membranlarının asialo-GM1 bölgesine bağlanarak patogeneizde kritik önem taşır (2, 3).

**Lipopolisakkarit (LPS):** Bakteri duvarı dış membranının dış yüzeyinde yer alan LPS; fosfolipid ikili-katman içine yerleşen lipid A ve buna bağlı kor polisakkaridi ve O-özümlü polisakkaridi içeren hidrofilik kuyruktan oluşur. *P. aeruginosa* serotiplerinin antijenik özelliklerine dayanılarak tanımlanmasında O-özümlü polisakkarid zincirleri tanımlanmıştır. LPS'nin lipid A bileşeni birçok inflamatuvar öncü hücreyi aktive eder ve asialoGM1'e bağlanarak adezyonda etkin rol oynar, TLR4/CD14 veya TLR4/MD-2 reseptörlerini tanıma özellikleri ile ve CFTR'ye bağlanarak virülansla önemli etki gösterir. Kistik fibroz hastalarında *P. aeruginosa*'nın farklı lipid A mutantları bulunur ve bunlardan bazıları konağın antimikrobiyal peptidlerine karşı direnç gösterir ve TLR4 aktivasyonunun artmasına neden olurlar (4).

**Aljinat.** Aljinat mannuronik ve glukuronik asidin tekrarlayan polimerlerinden meydana gelen mukoid bir ekzopolisakkarittir. Her ne kadar aljinat hücre dışına salınan bir ekzopolisakkarit olsa da, hücre ile ilişkili kalması sebebiyle bakteri hücre yüzeyi ile ilişkili virülans faktörleri arasında in-

celenmiştir. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu solunum yolu infeksiyonlarında aljinat üretimi çok önemli rol oynar. Aljinat üretimi olmayan kökenlerin sıçan akciğerine verildiğinde hızla aljinat üreten kökenlere dönüşmesi bunun göstergesidir (4). Aljinat da bakterinin adezyonunda rol oynar ve bakteriyi kolonize ettiği solunum yolu epiteli üzerine sabitler. Aljinat biyosentezinde görev alan genler kromozomun bir bölgesinde kümelenmiş ve operon olarak organize olmuşlardır. Kistik fibroz hastalarının solunum yollarında gözlenen kökenler genellikle aljinat aşırı üretimine bağlı mukoid fenotipe kökenlerdir. Ortamda nitrojen miktarının azalması ve yüksek ozmolarite aljinat üretimini tetikleyen faktörlerdir. Mukoid fenotipten, mukoid olmayan fenotipe dönüşüm (genetik dönüşüm, faz değişimi) algS ve algT genleri yardımıyla gerçekleşir (4). Fenotipik dönüşümün LPS yapısı üzerinde de etkileri bulunmaktadır; mukoid olmayan kökenlerde LPS uzun O zincirine sahiptir ve negatif yüklüdür (B form), mukoid kökenlerde ise O zinciri kısadır ve yapısındaki şekerlerin yerleşimi LPS'yi nötral hale getirir (A form). Aljinatın aşırı üretimi bakteriyi fagositozdan ve antibiyotiklerden koruduğu gibi konağın bakteriye karşı yanıtını da zayıflatır. Her ne kadar kistik fibroz hastalarındaki biyofilm yapısında yer aldığı kabul edilse de yakın tarihli çalışmalarda aljinatın biyofilm gelişimi için şart olmadığı gösterilmiştir (5).

### **Hücre Dışına Salgılanan Virülans Faktörleri**

**Elastaz.** Elastin akciğerlerin genişleyip, daralmasına olanak sağlayan bir proteindir ve akciğerlerde bulunan proteinin yaklaşık %30'u elastindir. *P. aeruginosa*'nın elastolitik etkisinden LasA proteaz ve LasB elastaz sorumludur. Enzimler sinerjistik etki göstererek elastini parçalar. LasA bir serin metalloproteinazdır ve *Staphylococcus aureus*'un hücre duvarında bulunan pentaglisin-peptidoglikan köprülerini yıkar. LasA proteaz, elastini yıkamaz ancak LasB elastazın elastolitik aktivitesini artırır. LasB 33 kDa ağırlığında bir çinko metalloproteinazdır, LasA proteazın yıpratığı elastini parçalar. LasB elastazın proteolitik gücü oldukça fazladır (*P. aeruginosa* alkali pro-

teazının yaklaşık 10 katı). Hücre dışına tip 2 salgı sistemi ile salgılanan elastaz enfeksiyonun başlangıç fazında akciğerde hasara yol açarak, kompleman bileşenlerini ve serum  $\alpha$ 1-proteinaz inhibitörünü parçalayarak patogeneizde önemli rol oynar (4). Damar duvar yapısında da bol miktarda elastin bulunduğundan, elastinin parçalanması hemorajilere neden olur. IgG'yi, fibrini, kolajeni, sürfaktan proteinleri A ve D'yi parçalar. Ayrıca solunum yolu epitellerindeki sıkı-bağlantıları parçayarak epitel geçirgenliğini artırır ve enfeksiyon bölgesinde nötrofil sayısının çoğalmasına yol açar (4). Elastaz IL-8 üretimini uyararak pro-inflamatuvar etki gösterir.

**Alkali Proteaz.** *P. aeruginosa*'nın fibrinoliz etkili metalloproteazıdır. 49-kDa ağırlığındaki enzim apr geni tarafından kodlanır, enzim en iyi alkali pH değerlerinde etkinlik gösterir. Akut akciğer hasarında erken dönemde alveoller içinde oluşan yoğun fibrinin alkali proteaz ile eritilmesinin enfeksiyonun ilerlemesine yol açtığı gösterilmiştir (6). Alkali proteazın doku invazyonu ve sistemik enfeksiyonlardaki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, kornea enfeksiyonlarının patogeneizinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (7).

**Piyosiyenin.** *P. aeruginosa*'nın mavi pigment metabolitidir. Öncü molekül olan korizmik asitten, son hali olan üç halkalı piyosiyanine sentezlenirken *phz*ABCDEFGF operonu ve *phzH*, *phzM*, *phzS* genleri görev alır (8). *P. aeruginosa* enfeksiyonları birçok virülans faktörünü içeren çok etkili süreçler olduğu için akciğer enfeksiyonlarında tek başına piyosiyenin etkilerinin saptanabilmesi için saflaştırılmış piyosiyenin ile in vitro hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda, piyosiyenin hücre solunumunu inhibe ettiği, silyer fonksiyonları bozduğu, epidermis çoğalmasını durdurduğu, prostasiklin salınımına yol açtığı, kalsiyum homeostazını bozduğu saptanmıştır. Piyosiyenin ayrıca  $\alpha$ 1-proteaz inhibitörünü de etkisizleştirerek, proteaz-antiproteaz dengesini bozar ve akciğerlerde hasara sebep olur. Piyosiyenin ve ara metaboliti fenazin-1-kar-

boksilik asit RANTES ve IL-8 seviyelerini değiştirerek konak bağışıklık yanıtını etkiler (9). Hem doğrudan etkiyle katalaz aktivitesini engeller, hem de katalazı kodlayan genin transkripsiyonunu azaltır (10). MnSOD eklenmesiyle katalaz aktivitesinin geri kazanımı piyosiyenin neden olduğu hasarda O<sub>2</sub>-radikallerinin rolünün büyük olduğunu gösterir. Piyosiyenin oksitlenmiş glutatyon seviyesini artırır, nötrofillerde apoptozisi uyarır (11).

**Piyoverdin.** Bir siderofordur. Çevredeki demiri bağlayarak *P. aeruginosa*'nın metabolizması için demir sağlar. Ekzotoksin A'nın üretimini düzenlediği gibi kendi üretimini de düzenleyerek virülansta rol oynar (12, 13).

**Proteaz IV.** Yakın zamana kadar özellikle *P. aeruginosa* keratiti patogeneizindeki rolüyle bilinirken, son çalışmalarla proteaz IV'ün sürfaktan proteinleri A, D ve B'yi yıktığı ve akciğer enfeksiyonları patogeneizinde de rol oynadığı gösterilmiştir (14, 15).

**Fosfolipaz C.** Hemolitik aktiviteleriyle ayrılan iki tipte fosfolipaz C vardır. Hemolitik fosfolipaz C, fosfatidilkolini ve sfigomyelini hidrolize eder. Hemolitik olmayan fosfolipaz C ise fosfatidilkolin ve fosfatidilserini hidrolize eder. Fosfolipaz C hücre dışına tip 2 salgı sistemi ile salınır. Ökaryotik hücre membranı bileşeni olan fosfolipidleri hedef alarak akut akciğer hasarı patogeneizinde rol oynar (16). Elastazda olduğu gibi patojenik etkisinin bir kısmını sürfaktan inaktivasyonuna borçludur. Ek olarak konağın nötrofil oksidatif yanıtını baskılar.

**Ramnoflipid.** Hemolitik etkisi olan hemolizindir. Yapısındaki ramnoz içeren glikolipid sayesinde biyosürfaktan etki gösterir. Deterjan benzeri etkisiyle akciğer sürfaktan fosfolipidlerini çözünür hale getirerek fosfolipaz C'nin etki etmesine yardımcı olur. Ayrıca mukosilyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eder (4).

**Ekzotoksin A (ExoA).** Enfeksiyon etkeni çoğu *P. aeruginosa* kökeni ekzotoksin A sentezler.

Hücre dışına tip 2 salgı sistemi ile salgılanan bir toksindir. ExoA *P. aeruginosa*'nın virülansında önemli rol oynar. Etkisini difteri toksinine benzer şekilde ADP-ribozil transferaz özelliği ile elongasyon faktörü 2'yi (EF-2) ve dolayısıyla protein sentezini inhibe edip hücre ölümüne yol açarak gösterir (17). İnvazyondan ve bölgesel doku hasarından sorumludur (18). Konak yanıtını baskılayıcı özelliği de gösterilmiştir (19). ExoA üretimi olmayan mutant ile sokak tipi *P. aeruginosa* kökeninin karşılaştırıldığı bir çalışmada toksin üretmeyen kökenin 20 kat daha az virülans olduğu hayvan deneyi ile gösterilmiştir.

**Tip 3 Salgı Sistemi.** *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Pseudomonas* türlerinde saptanmıştır. Bakterinin hedef hücre üzerinde por açarak, pilus benzeri bir oluşumla iki hücre arasında köprü oluşturduğu ve bu köprü yardımıyla efektör proteinlerini ökaryot hücre sitoplazmasına ilettiği bir sistemdir. *P. aeruginosa*'nın tip 3 sekresyon sistemiyle salınan toksinleri ExoS, ExoT, ExoY ve ExoU'dur (3). Ekzoenzim S (ExoS): İki aktif bölgesi [C-terminal ADP-riboziltransferaz bölgesi ve N-terminal Rho GTPaz aktive edici protein (GAP) bölgesi] bulunan iki fonksiyonlu bir sitotoksindir. ExoS'nin patojenik etkilerinden esas olarak hücre iskelet organizasyonunu bozan ADP-riboziltransferaz aktivitesi sorumludur. Ek olarak C-terminal bölgesinin TLR2'ye, N-terminal bölgesinin de TLR4'e bağlandığı ve böylece konak bağışık yanıtını etkilediği ve inflamatuvar yanıtı düzenlediği gösterilmiştir. Akciğer infeksiyonlarında doğrudan doku hasarına yol açan ve bakterinin yayılmasında rol oynayan bir toksindir (20). Ekzoenzim T (ExoT): ExoT de ExoS gibi ikili etki gösterir. *Pseudomonas*'ın internalizasyonunu rol alan bir enzimdir. Yara iyileşmesini inhibe edici özelliği de gösterilmiş olan bu enzim minör virülans faktörleri arasında yer alır (21). Ekzoenzim Y (ExoY): ExoY bir adenilat siklazdır, konak sitozolüne verilince sitozolik cAMP'yi artırır. Bu artış pulmoner vasküler hücrelerde hücreler arası boşluk oluşumunun artmasına ve

dolayısıyla geçirgenliğin artmasına neden olur (22). Ekzoenzim U (ExoU): ExoU tip 3 salgı sistemi ile konak hücresi içine salındığında fosfolipaz/lizofosfolipaz aktiviteleriyle ökaryotik hücre membranını parçalar. ExoU majör virülans faktörü olarak kabul edilir. Hayvan deneylerinde tek başına ExoU salgılanmasının sepsise ilerleyen akciğer hasarına yol açtığı gösterilmiştir (23).

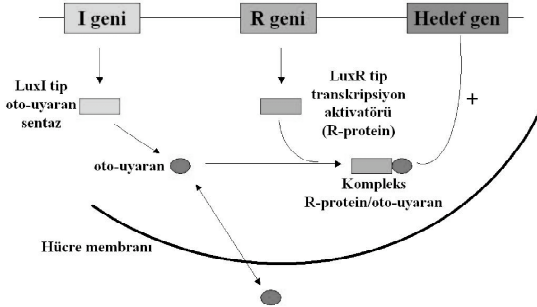
### Quorum Sensing ve *P. Aeruginosa* Patogenezindeki Önemi

*P. aeruginosa*'da birçok hücre dışı virülans faktörünün üretimi bakteri hücre yoğunluğunu izleyen ve bakteriler arasında iletişime olanak sağlayan bir mekanizma ile kontrol edilir. Bakteriler çevre koşullarını algılayabilir ve bu bilgiyi işleyerek uygun şekilde cevap verebilir. Hücreler arası iletişim, ya da QS olarak adlandırılan bu mekanizma birçok gram negatif ve gram pozitif bakteride tanımlanmıştır (24, 25). Gram pozitif bakterilerde QS sistemlerinin sinyal molekülleri peptid feromonlar iken, gram negatif bakterilerde oto-uyaran adı verilen küçük moleküllerdir. Oto-uyaranlar LuxI-tipinde oto-uyaran sentaz ve LuxR-tipinde transkripsiyonel aktive edici protein (R-protein) tarafından sentezlenir (26). Gram negatif bakterilerde tanımlanmış çeşitli oto-uyaranlar açıl homoserin lakton (AHL) yapıdadır ve birbirlerinden açıl yan zincir uzunlukları ve içerikleriyle ayrılırlar.

Düşük hücre yoğunluğunda oto-uyaran bazal seviyelerde sentezlenir ve bakteriyi çevreleyen ortama yayılır ve yayıldıkça yoğunluğu azalır. Hücre yoğunluğu arttıkça, hücre içi oto-uyaran yoğunluğu da belirli bir eşik değere dek artar, kritik konsantrasyona ulaşıldığında, oto-uyaran kendi özgül R-proteinine bağlanır. R-protein oto-uyaranı olmadığı sürece etkin değildir, R-protein/oto-uyaran kompleksi özgül DNA dizilerine bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonunu artırır (Şekil 1).

*P. aeruginosa*'da tanımlanmış iki ana QS sistemi vardır; birbirleriyle hiyerarşik ilişkileri olan bu sistemler *las* ve *rhl* sistemleridir.

**las QS Sistemi:** *P. aeruginosa*'da tanımlanan ilk QS sistemi ile LasB elastaz ifadesini düzenleyen sistem aydınlatıldığı için *las* QS sistemi olarak adlandırılmıştır. Sistemin bileşenleri; oto-uyaran sentaz geni olan *lasI*, sentaz geninin ürünü N-(3-okso-dodekanoyl)-L-homoserin lakton (3-okso-C12-HSL) ve transkripsiyonel aktive edici proteini kodlayan *lasR* genidir (28). Las sistemi *lasB* ifadesini düzenler ve diğer hücre dışı virülans faktörlerinden LasA elastaz ve ekzotoksin A sentezi için gereklidir. Las sistemi sinyal moleküllü olan 3-okso-C12-HSL'nin immunomodülatör olduğu ve konak yanıtını baskıladığı da gösterilmiştir (29).

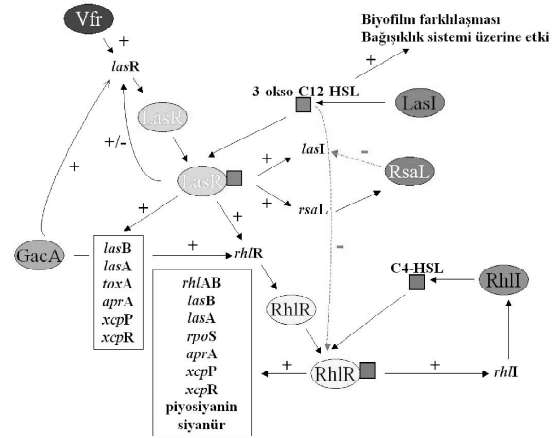


**Şekil 1.** *P. aeruginosa*'da Quorum Sensing sisteminin düzenlenmesi (şeklin çiziminde ve açıklamasında 27 no'lu kaynaktan yararlanılmıştır).

QS sistemi iki genden meydana gelir; I geni oto-uyaran sentaz enzimini, R geni transkripsiyonel aktive edici proteini (R-protein) kodlar. Oto-uyaran sentaz, hücre membranını iki yönlü geçebilen oto-uyaran molekülünün sentezinden sorumludur. Artan bakteri hücre yoğunluğu ile hücre içindeki oto-uyaran konsantrasyonu eşik değere ulaşır ve oto-uyaran transkripsiyonel aktivatöre bağlanır. R-protein/oto-uyaran kompleksi özgül hedef genlerin ifadesini uyarır.

**rhI QS Sistemi:** Ramnolipid sentezini kontrol ettiği için *rhI* adını alan bu ikinci QS sisteminde oto-uyaran sentaz geni *rhII*, sinyal moleküllü olan N-bütiril-L-homoserin lakton (C4-HSL) ve transkripsiyonel aktive edici proteini kodlayan *rhIR* geni rol alır (30). Bu sistem ramnolipid sentezi için gerekli bir enzim olan ramnoziltransferazı kodlayan *rhIAB* operonunun ifadesini düzenler. Sistem ayrıca LasB elastazın, LasA proteazın, piyosyaninin, siyanürün ve alkali proteazın üretimleri için de gereklidir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar *las* ve *rhI* sistemlerinin etkileşim içinde olduğunu göstermiştir. Her iki sistem de hayli özgüdür; sinyal molekülleri diğer sistemin düzenleyici proteinini uyaramaz (3-okso-C12-HSL *RhIR*'yi aktive edemez, C4-HSL *LasR*'yi aktive edemez) (31). R-protein/oto-uyaran komplekslerinin belli başlatıcı (promoter) bölgeleri tercih ettiği de gösterilmiştir; LasR/3-okso-C12-HSL kompleksi *lasB*'yi *rhIA*'ya tercih ederken, *RhR/C4-HSL* kompleksi *rhIA*'yı *lasB*'ye tercih eder. Sistemler birbirinden bağımsız değildir. *LasR/3-okso-C12-HSL* kompleksi *rhIR* ifadesini uyardığı için *las* sistemi hiyerarşik olarak *rhI* sisteminin üzerinde yer alır (32). Ayrıca 3-okso-C12-HSL *RhR*'ye bağlanabilir ve C4-HSL'nin transkripsiyonel aktive edici proteinine bağlanmasını engelleyebilir (32). Böylece *las* sistemi *rhI* sistemini hem transkripsiyonel seviyede, hem de translasyon sonrası aşamalarda kontrol eder (Şekil 2).



**Şekil 2.** *P. aeruginosa*'da Quorum Sensing sisteminin hiyerarşik yapısı (şeklin çiziminde ve açıklamasında 27 no'lu kaynaktan yararlanılmıştır).

*las* QS sisteminin *rhI* QS sistemi üzerinde düzenleyici rolü vardır. LasR/3-okso-C12-HSL kompleksi *rhIR*'nin transkripsiyonunu aktive eder, 3-okso-C12-HSL ise *RhIR*'nin C4-HSL ile etkileşime girmesini engeller. *las* sisteminin kendi kendini düzenleme özelliği global düzenleyici sistemlerden *Vfr* ve *GacA*'nın aktive edici, *RsaL*'nin inhibe edici özellikleri sayesinde gerçekleşir. (*lasB*: LasB elastaz, *lasA*: LasA elastaz, *toxA*: ekzotoksin A, *aprA*: alkali proteaz, *xcpP* ve *xcpR*: *xcp* salgı sistemi genleri, *rhIAB*: ramnolipid üretimi için gerekli ramnoziltransferaz geni, *rpoS*: durgun faz sigma faktörü)

Süregen *P. aeruginosa* infeksiyonlarının en göze çarpan özelliği aljinat üreten mukoid mutantları ve oluşturulmasıdır(33). Bu mutant kökenler biyofilm (ekzopolisakkarid ile çevrili mikrokoloniler) içerisinde ürerler. Biyofilm bakteriyi fagositozdan ve komplemanın etkilerinden koruduğu ve biyofilm içerisindeki bakteriler antibiyotiklere ve dezenfektanlara dirençli oldukları için, biyofilm üretimi bakterinin konaktaki sürekliliğinde kritik rol oynar.

Las QS sisteminin *P. aeruginosa* biyofilminin farklılaşmasında rol oynadığı belirlenmiştir (34). Yapılan bir çalışmada 3-okso-C12-HSL üretimi olmayan mutant kökenin farklı yapıda bir biyofilm oluşturduğu ve oluşan biyofilmin sodyum dodesil sülfatın (SDS) düşük konsantrasyonlarına duyarlı olduğu gösterilmiş, buna karşın besiyerine 3-okso-C12-HSL eklendiğinde farklılaşmış ve SDS'ye dirençli biyofilmin oluştuğu gözlenmiştir (34).

Bakterinin patogenezinde çok önemli görev üstlenen QS sisteminde bir eksikliğin bakterinin virülansında önemli azalmaya neden olacağı açıktır. Bu hipotezi destekleyen hayvan çalışmalarında; Iglewski ve Howe(7) alkali proteaz üretimi belirgin olarak azalmış mutant kökenlerin, farelerde geliştirilen travmatize göz modelinde korneayı kolonize edemediklerini ve kornea hasarına yol açamadıklarını, alkali proteazın dışarıdan eklenmesiyle ise alkali proteaz üreten kökenlerin oluşturduğu enfeksiyondan ayırt edilemeyecek bir tablo geliştiğini gözlemlemiştir(35). Wu ve ark *P. aeruginosa* kökenlerini ve ancak ekzojen AHL varlığında yeşil floresan protein (YFP) üreten *E. coli* kökenlerini aljinat boncukları içerisinde farelere intratrakeal yoldan uygulayarak bir pnömoni modeli geliştirmişlerdir. Fareler farklı günlerde öldürülerek, akciğer dokularındaki YFP ifade eden *E. coli* kökenleri konfokal taramalı lazer mikroskopisi yöntemiyle araştırılmış ve bu kökenlerin ciddi derecede hasar görmüş akciğer dokusunda yoğunlaşmaları enfeksiyon sırasında *P. aeruginosa* tarafından AHL moleküllerinin üretilip ortama salındığını, ve AHL üretiminin, dolayısıyla QS'in, *P. aeruginosa*'nın akciğer infek-

siyonları patogenezinde önemli rol oynadığını düşündürmüştür. Tang ve ark. (36) lasR geni mutasyona uğratılmış *P. aeruginosa* kökeninin fare akut pnömoni modelinde daha az virülans olduğunu göstermişlerdir. Wu ve ark. (37) sokak tipi *P. aeruginosa* kökeni PAO-1 ile, QS sisteminin sinyal molekülü üreten genleri (lasI ve rhlII) mutasyona uğratılmış *P. aeruginosa* PAO-JP2 kökenleriyle sıçanda *P. aeruginosa*'ya pnömonisi geliştirmiş, enfeksiyonun erken evrelerinde mutant PAO-JP2 kökenine karşı daha hızlı ve güçlü bağışık yanıt sağlandığını, daha fazla pulmoner INF-Á üretildiğini ve daha güçlü polimorfonüveli lökosit cevabı ortaya çıktığını, ve antikor yanıtının daha hızlı geliştiğini saptamışlar ve fonksiyonel lasI ve rhlII genlerinin *P. aeruginosa* akciğer enfeksiyonlarının şiddetinde belirgin rol oynadığı sonucuna varmışlardır. Rumbaugh ve ark. (38) farelerde geliştirdikleri yanık modelinde QS sistemi mutant kökenler kullanarak *P. aeruginosa*'nın vücutta yayılım göstermesi, cilt üzerinde yayılması ve sağkalım oranı kriterlerine göre kıyaslamalar yapmışlardır. PAO-1'e kıyasla, lasI, lasR, rhlII mutant kökenlerin virülansının belirgin olarak azaldığını belirlemişler, ve en göze çarpan azalmanın lasI- rhlII çifte mutantında gözlendiğini saptamışlardır. QS'in yanık ciltte horizontal yayılıma ve yanık yaraları oluşturulmuş farede bakterinin uzak organlara yayılmasından sorumlu olduğunu belirtmişlerdir.

QS sisteminin *P. aeruginosa* patogenezindeki önemi ortaya konduktan sonra çalışmalar özellikle kistik fibroz (KF) hastaları üzerinde yoğunlaşmıştır. KF hastalarının solunum yolları hemen her zaman *P. aeruginosa* ile kolonizedir ve dönem dönem gözlenen akut alevlenmeler morbidite ve mortalite oranlarını arttırmaktadır. KF hastalarındaki akciğer enfeksiyonları *P. aeruginosa* QS sisteminin incelemek için oldukça uygun bir alandır, akciğerlerin kapalı ve sınırlı bir hacimde olması, *P. aeruginosa*'nın çok yüksek yoğunluklara dek üreyebilmesi (balgamda  $10^7$  -  $10^8$  kob/ml) KF hastası akciğerlerinde QS ile düzenlenen genlerin uyarılması için yeterlidir (39). Erickson ve ark.

(40) KF hastalarının akciğerlerindeki *P. aeruginosa* kökenlerinin ürettiği AHL molekül seviyesini ve transkript birikimini ölçmüşler, balgamda yüksek AHL molekül düzeylerini saptamışlar ve bu moleküllerle ifadesi düzenlenen virulans genlerinin KF hastaları akciğerinde aktif olduğunu ve virülansın düzenlenmesinde rol oynadığını savunmuşlardır.

### **P. aeruginosa İnfeksiyonlarının Tedavisinde Potansiyel Hedef Olarak Quorum Sensing**

Çoklu ilaç direncine sahip kökenlerin artışı infeksiyonların tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. *P. aeruginosa*'da biyofilm üretimini de kapsayan birçok virülans faktörünün QS ile düzenlenmesi, yeni antimikrobiyal gelişirilebilmesi amacıyla ilginin QS üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur. QS'nin doğrudan bakteri üremesi üzerine etkisinin olmaması, QS inhibisyonunun antibiyotiklerde gözlenen direnç gelişimine benzer şekilde dirençli kökenlerin seçilmesine neden olmamasıyla bir avantajdır (41).

QS inhibitörlerinin (QSI) tanımlanabilmesi amacıyla doğal ve sentetik çok sayıda kimyasal madde taranarak inhibitör etkili birçok bileşik saptanmıştır. Bu bileşikler etkilerini üç farklı seviyede göstermektedirler: (i) AHL sentezinin engellenmesi, (ii) AHL sinyal molekülünün etkisizleştirilmesi ve (iii) AHL reseptör proteininin engellenmesi (41, 42).

Üzerinde en az araştırma yürütülen yaklaşım sinyal üretiminin blokajı olmuştur. Her ne kadar holo-ACP, L/D-S-adenozilhomosistein, sinefungin, bütiril-S-adenozilmetiyonin (bütiril-SAM) gibi bazı maddelerin AHL üretimini engelledikleri gösterilmişse de (43), bakteri üzerine etkileri in vivo çalışılmamıştır. Ayrıca bakteri metabolizmasında önemli görevler alan bu moleküllerin diğer hücre fonksiyonlarını nasıl etkileyeceği bilinmemektedir.

Bir diğer yaklaşım sinyal moleküllerinin etkisizleştirilmesi olabilir. AHL molekülündeki lakton halkasının dayanıklılığı ortamın pH değerine ba-

ğımlıdır ve pH 7'den yüksek değerlerde lakton halkası açılır (laktonoliz) (44). Bir bitki patojeni olan *Erwinia carotovora*'nın patolojik etkilerinden korunmak amacıyla bu bakteri ile karşılaşan bitkilerin pH değerini artırarak bakteriye karşı korunma sağladıkları gösterilmiştir (45). Laktonoliz enzimler yardımıyla da gerçekleştirilebilir, örneğin *Bacillus* türlerinin AiiA adında bir enzim üreterek AHL'yi parçaladığı gösterilmiştir (46), bunun yanısıra *P. aeruginosa* PAI-A, *Arthrobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Agglolobacterium tumefaciens* ve *Rhodococcus sp.*'de de AiiA homologu enzim üretimi gösterilmiştir (47-50). İnsan solunum yolu epitel hücrelerinde de benzer bir enzimatik aktivite ile AHL moleküllerinin parçalandığı gösterilmiştir. 3-okso-C12-HSL'yi etkileyen bu aktiviteden C4-HSL etkilenmemektedir (51).

Son olarak QS sistemini durdurmak için bir diğer yaklaşım, sinyalin bakteri tarafından algılanmasını engellemek olabilir. Bu amaçla reseptör proteinin (LuxR homologu) AHL sinyal molekülü analogu ile bloke edilmesini amaçlayan çalışmalar yürütülmüştür.

Rasmussen ve ark. (52) rasgele çok sayıda molekülü tarayarak QSI etkili moleküller tanımlamış, bunların içinde en etkili bulunan 4-nitro-piridin-N-oksit'in (4-NPO), *P. aeruginosa*' da QS ile düzenlenen genlerin ifadesinde %37'lik bir azalma sağladığını göstermişlerdir.

Aynı etkiyi gösterecek doğal bileşiklerin saptanması amacıyla bitkiler ve mantarlar tarandığında, araştırılan 50 *Penicillium* türünün %66'sında QSI aktivitesi gösteren ikincil metabolitler olduğu belirlenmiştir. Bunlardan penisilik asit *P. aeruginosa*'da QS ile düzenlenen genlerin ifadesinde %60'lık, patulin ise %45'lik bir azalma sağlamıştır (53). Ayrıca birçok bitkide (renkli burçak, havuç, soya fasulyesi, nilüfer çiçeği, domates, bezelye, kırmızı biber ve sarımsak gibi) QSI özelliği olduğu belirlenmiştir (52). Yapılan kısıtlı sayıdaki in vivo çalışmalarda fare akciğer infeksiyonu modelinde furanon 30 (54), sarımsak özü-

tü (55), patulin (53) gibi bazı QSI molekülleri denenmiş ve moleküllerin akciğerlerdeki bakterilerin temizlenmesine, mortalitenin azalmasına yol açtığı gösterilmiştir. İnsan infeksiyonları tedavisinde QSI kullanımı için henüz erken olsa da, ümit vaat eden bulgulara erişilmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Mahenthiralingam E, Campbell ME, Speert DP. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* 1994;62:596–605.
2. Pier GB, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*. Ed: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Edition, pp. 2587-2615 Elsevier Inc., Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2005.
3. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* 2006;36:78-91.
4. Salyers AA, and D. D. Whitt. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. pp. 260-268, ASM Press, Washington, D.C., USA, 1994.
5. Wozniak DJ, Wyckoff TJ, Starkey M, et al. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7907-7912.
6. Kipnis E, Guery BP, Tournoy A, et al. Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa* - induced acute lung injury. *Shock* 2004;21(5):444–451.
7. Howe TR, Iglewski BH. Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model. *Infect Immun* 1984;43:1058-1063.
8. Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The Role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* 2004;10(12):599-606.
9. Denning, G.M, Iyer SS, Reszka KJ, O'Malley Y, Rasmussen GT, Britigan BE. Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L584–L592.
10. O'Malley YQ, Reszka KJ, Rasmussen GT, Abdalla MY, Denning GM, Britigan BE. The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285(3):L1077–L1086.
11. Usher, LR, Lawson RA, Geary I, et al . Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *J Immunol* 2002;168(4):1861–1868.
12. Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C, Holder IA. Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1996;64:518–523.
13. Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7072–7077.
14. Matsumoto K. Role of bacterial proteases in pseudomonad and serratial keratitis. *Biol Chem* 2004;385(11):1007–1016.
15. Malloy JL, Veldhuizen RA, Thibodeaux BA, O'Callaghan RJ, Wright JR. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:L409–L418.
16. Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh I, et al. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* 1993;75(4):1661–1669.
17. Wick MJ, Hamood AN, Iglewski BH. Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Mol Microbiol* 1990;4(4):527-535.
18. Woods DE, Iglewski BH. Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: new perspectives. *Rev Infect Dis* 1983;5(Suppl 4):S715-722.
19. Vidal DR, Garrone P, Banchereau J. Immunosuppressive effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on human B-lymphocytes. *Toxicon* 1993;31:27-34.
20. Nicas TI, Frank DW, Stenzel P, Lile JD, Iglewski BH. Role of exoenzyme S in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Eur J Clin Microbiol* 1985;4(2):175-179.
21. Shaver CM, Hauser AR. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun* 2004;72(12):6969–6977.
22. Sayner SL, Frank DW, King J, Chen H, VandeWaa J, Stevens T. Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ Res* 2004;95(2):196-203.
23. Allewelt M, Coleman FT, Grout M, Priebe GP, Pier GB. Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun* 2000;68:3998–4004.
24. Greenberg EP. Quorum sensing in gram-negative bacteria. *ASM News* 1997;63:371-377.
25. Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP, de Vos VM. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component



- signal-transduction systems in gram-positive bacteria *Mol Microbiol* 1997;24:895-904.
26. Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 1996;50:727-751.
  27. Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Emerg Infect Dis* 1998;4(4):551-560.
  28. Gambello MJ, Iglewski BH. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* 1991;173:3000-3009.
  29. Telford G, Wheeler D, Williams P, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* 1998;66(1):36-42.
  30. Pearson JP, Passador L, Iglewski BH, Greenberg EP. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1490-1494.
  31. Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. Role of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in the control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* 1997;179:5756-5767.
  32. Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1997;179:3127-3132.
  33. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996;60(3):539-574.
  34. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilm. *Science* 1998;280:295-298.
  35. Wu H, Song Z, Hentzer M, et al. Detection of N-acylhomoserine lactones in lung tissues of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol* 2000;146:2481-2493.
  36. Tang HB, DiMango E, Bryan R, et al. Contribution of Specific *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors to Pathogenesis of Pneumonia in a Neonatal Mouse Model of Infection. *Infect Immun* 1996;64(1):37-43.
  37. Wu H, Song Z, Givskov M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* mutations in lasI and rhlI quorum sensing systems result in milder chronic lung infection. *Microbiol* 2001;147:1105-1113.
  38. Rumbaugh KP, Griswold JA, Iglewski BH, Hamood AN. Contribution of Quorum Sensing to the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in Burn Wound Infections. *Infect Immun* 1999;67(11):5854-5862.
  39. Storey DG, Ujack EE, Rabin HR, Mitchell I. *Pseudomonas aeruginosa* lasR transcription correlates with the transcription of lasA, lasB, and toxA in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *Infect Immun* 1998;66:2521-2528.
  40. Erickson DL, Endersby R, Kirkham A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Systems May Control Virulence Factor Expression in the Lungs of Patients with Cystic Fibrosis. *Infect Immun* 2002;70(4):1783-1790.
  41. Rasmussen TB, Givskov M. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiol* 2006;152:895-904.
  42. Juhas M, Eberl L, Tümmler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* 2005;7(4):459-471.
  43. Parsek MR, Val, DL, Hanzelka BL, Cronan JE, Greenberg EP. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4360-4365.
  44. Yates EA, Philipp B, Buckley C, et al. N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 2002;70:5635-5646.
  45. Byers JT, Lucas C, Salmond GP, Welch M. Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. *J Bacteriol* 2002;184:1163-1171.
  46. Dong YH, Xu JL, Li XZ, Zhang LH. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3526-3531.
  47. Uroz S, D'Angelo-Picard C, Carlier A, et al. Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiol* 2003;149:1981-1989.
  48. Carlier A, Uroz S, Smadja B, et al. The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, aiiB, also encoding N-acyl homoserine lactonase activity. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:4989-4993.
  49. Park SY, Lee SJ, Oh TK, et al. AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiol* 2003;149:1541-1550.
  50. Huang JJ, Han JI, Zhang LH, Leadbetter JR. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:5941-5949.
  51. Chun CK, Ozer EA, Welsh MJ, Zabner J, Greenberg EP. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(10):3587-3590.
  52. Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, et al. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol* 2005;187:1799-1814.
  53. Rasmussen TB, Skindersoe ME, Bjarnsholt T, et al.

Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiol* 2005;151:1325–1340.

54. Hentzer M, Wu H, Andersen JB, et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* 2003;22:3803–3815.

55. Bjarnsholt T, Jensen PO, Rasmussen TB, et al. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiol* 2005;151:3873–3880.