

# PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. SAVASTANOI'DE “QUORUM-SENSING” DEN SORUMLU N-(3-OKZO-HEKZANOİL)- L-HOMOSERİN LAKTON (OHHL) ÜRETİMİ PRODUCTION OF N-(3-OKZO-HEXANOYL)-L-HOMOSERINE LACTONES (OHHL) RESPONSIBLE FOR “QUORUM-SENSING” IN PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. SAVASTANOI

Filiz GÜREL<sup>1</sup>, Tuba ŞERBETÇİ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul

<sup>2</sup> İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Farmakognози Anabilim Dalı, İstanbul

İletişim / Correspondence:

Filiz GÜREL

İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul

E-mail: filiz@istanbul.edu.tr

## ÖZET

*Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* zeytin yetiştirilen bölgelerde “dal-kanseri” hastalığını yaparak verim kayıplarına neden olmaktadır. Bu hastalığın gelişimine ilişkin hücresel ve moleküler mekanizmalar iyi bilinmemektedir. Diğer yandan, bazı bitki-patojeni bakterilerde enfeksiyonun quorum-sensing'e (QS) bağlı olarak başladığı gösterilmiştir. Bu çalışmada Akdeniz bölgesinden elde edilen *P. syringae* pv. *savastanoi* izolatlarında quorum-sensing'den sorumlu Açıl-homoserin lakton (AHL) moleküllü biyosensör ırklar ve HPLC ile incelenmiştir. Bakterinin sentezlediği bu molekülün bir N-(3-okzo-hekzanoil)-L-homoserin lakton (OHHL) olduğu saptanmıştır. *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* bakterileri kendi popülasyon yoğunluklarını algılamada ve –belkide- enfeksiyonu başlatmada bu molekülü kullanıyor olabilir.

**Anahtar kelimeler:** quorum-sensing, *Pseudomonas syringae*, OHHL

## SUMMARY

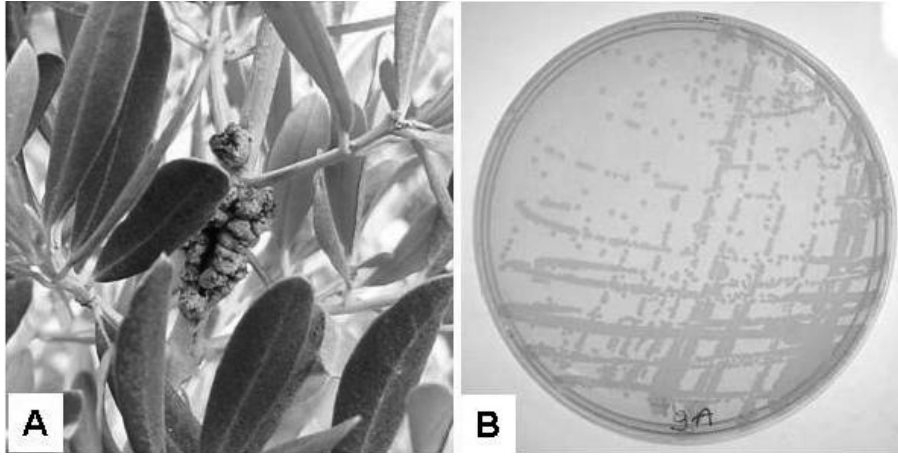
*Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* causes yield loss by “olive-knot” disease in the olive breeding locations. There are no sufficient information related to cellular and molecular mechanisms of disease development. The role of quorum-sensing in pathogenicity has been demonstrated in several plant pathogenic bacteria. In this work, Acyl-homoserine lactone (AHL) molecules responsible for quorum-sensing were investigated by using biosensor strains and HPLC in *P. syringae* pv. *savastanoi* isolates originated from Mediterranean region. As a result, synthesis of N-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone (OHHL) was demonstrated in bacterial cultures. *P. syringae* pv. *savastanoi* cells may use this molecule for sensing the population density which probably leads to the infection process.

**Key Words:** quorum-sensing, *Pseudomonas syringae*, OHHL

## GİRİŞ

Zeytin (*Olea europaea* L.) yağı nedeniyle özellikle Akdeniz ülkelerinde yüksek ekonomik değeri olan bir bitkidir. Bu bitkide hastalık yapan en önemli patojenlerden biri Gram (-) bakterisi *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*'dir. Bu bakterinin kontrolü yaygın olduğu İtalya ve İspanya'da büyük önem taşımakta ve daha çok zirai mücadele yöntemleriyle yapılabilmektedir. *P. syringae* pv. *savastanoi*'nin dal, gövde ve

sürgünlerde epifitik olarak çoğalan popülasyonları özel çevresel koşullarda “dal kanseri” oluşturabilirler (Şekil 1A). Hastalığın gelişimi bakterideki 3-indol asetik asit (IAA) ve sitokinin hormonlarının senteziyle eşlik etmektedir (1). Son yıllarda bakteri-bakteri etkileşiminin (quorum-sensing:QS) patojen bakterilerin kontrolünde potansiyel olarak kullanılabileceği anlaşılmaktadır. Özellikle, QS inhibitörleri bakterilere karşı antimikrobiyal ilaç geliştirilmesinde



**Şekil 1.** A. *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* tarafından oluşturulan zeytin dal kanseri. B. Bakterinin PVF-1 seçici besiyerindeki üremesi.

umut vaat etmektedir. Bir diğer yaklaşım, bitkilerde QS'den sorumlu olan bakteriyel Açıl-homoserin-lakton (AHL) moleküllerini ürettirerek enfeksiyonun kontrol edilebilmesidir (2).

QS mekanizması temel olarak bakteri hücrelerinin çevrelerindeki popülasyon yoğunluğunu algılama özelliğidir. Bu süreç "otoindükleyici" adı verilen çeşitli tipte moleküllerin üretimine bağlıdır (3). Bu moleküllerin konsantrasyonu belli bir eşik değerine ulaştığında popülasyon gen anlatımında değişikliğe gider. Patogen bakterilerde bu genlerin kodladığı işlevler arasında virülans faktörlerin üretimi, biyofilm oluşturulması, konjugasyon, sporulasyon ve biyoluminesans bulunur. Gram (-) bakterilerde QS'den sorumlu sinyal grubu Açıl-homoserin-lakton (AHL)'lardır. AHL moleküllerinin belirlenmesinde kromatografik yöntemlerin yanı sıra belirli AHL tiplerini üretemeyen mutant ırklarda kullanılabilir (4). Bu biyosensör ırklar ve tanıdıkları AHL molekülleri Tablo 1'de gösterilmiştir. *C. violaceum*, mor renkli violasein üretimi sonucu pigmentasyonla, *E. coli* ırkları ise biyoluminesans fenotipiyle doğrudan gözlenebilmektedir.

Bu çalışmada, Akdeniz bölgesindeki zeytin ağaçlarından izole edilen *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* izolatlarında QS'den sorumlu sinyal molekülünün tanımlanması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

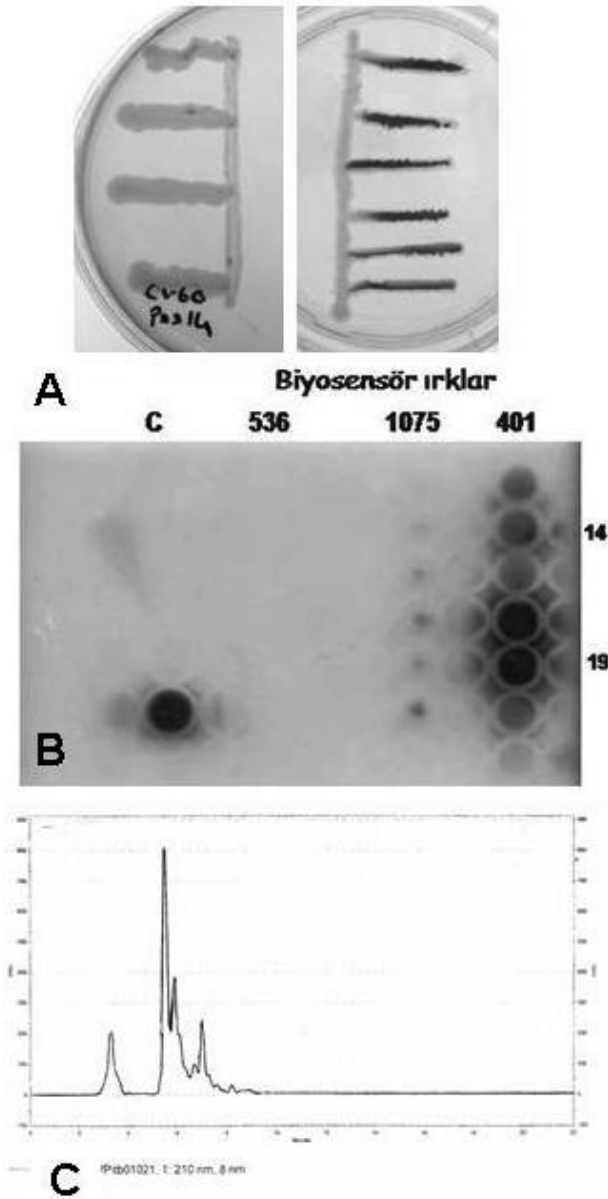
*P. syringae* pv. *savastanoi*'nin patojenik ırkları (Ps14 ve Ps19) Prof. Dr. Kemal Benlioğlu (Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi) tarafından sağlanmıştır. Kültürler King B (20g/L Proteaz pepton N3, 1.5g/L

$K_2HPO_4$ , 1.5g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 15ml/L Gliserol) ve seçici besiyeri olan PVF-1 (30g/L Sukroz, 10ml/L Gliserol, 2.5g/L Difco-kazaminoasitler, 1.96g/L  $K_2HPO_4$ , 0.4g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.4g/L SDS)'de 28°C'de 2 gün süreyle üretilmişlerdir. Moleküler tanı için *ptz* ve *iaaL* genlerine özgü primerlerle koloni PCR yapılmıştır. *P. syringae* pv. *savastanoi* tarafından üretilen olası AHL molekülünün izolasyonu için bir ayırma hunisi yardımı ile %100(v/v) etil asetat kullanılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu ekstraksiyon hem bakteri kültürlerine hem de, AHL üretiminden sorumlu olan *LuxI* homolog dizisini taşıyan (*E. coli* DH5a+pBluescript KS+2-70) kültürlerine uygulanmıştır. Ekstraksiyon işlemi sonlandırıldıktan sonra organik faz ayrılarak alçak baskıda 30° de kuruluğa dek yoğunlaştırılmış elde edilen kuru ekstre 300µl metanolde çözülerek +4°C'de saklanmıştır.

Çalışmada Tablo 1'de gösterilen biyosensör bakterileri ırkları kullanılmıştır. *E. coli*'nin 3 farklı plazmid taşıyan JM109 ırkları LB+amfisilinde üretilmiş; 2. gün OD<sub>600</sub> absorbans değeri 0.2-0.3 olana dek LB besiyeri ile sulandırılmıştır. Bu bakteri kültürü 7000

**Tablo 1.** Açıl-homoserin laktonların tipini belirlemede kullanılan biyosensör bakterileri ırkları.

Biyosensörler	Tanıdığı AHL sinyali
<i>Chromobacterium violaceum</i> (CV026)	C <sub>6</sub> -homoserin lakton
<i>E. coli</i> JM109 pSB401	3-okzo-C <sub>6</sub> -homoserin lakton
<i>E. coli</i> JM109 pSB536	C <sub>4</sub> -homoserin lakton
<i>E. coli</i> JM109 pSB1075	3-okzo-C <sub>12</sub> -homoserin lakton



**Şekil 2.** A. *C. violaceum* mutant ırkıyla yapılan belirlemede *E. herbicola* ( $C_6$ -homoserin lakton üretimi) (sağda) ve *P. syringe* patovarında (solda) gözlenen fenotip. B. *E. coli* JM109 ırklarıyla yapılan testde Ps14 ve Ps19 (*P. syringe* pv. *savastanoi*) kolonilerinde biyoluminesansın varlığı (C: kontrol). C. HPLC analizi sonucu gözlenen kromatogram.

rpm.de 5 dak. (+4°C) santrifüj edilmiş ve pelet steril distile su ile yıkanmıştır. Pellet daha sonra 30ml LB'de sulandırılmıştır. Belirleme için 80µl biyosensör ile 5, 10 ve 20 µl bakteri ekstratları 96 kuyucuklu steril bir kabin kuyularına eklenmiştir. Oda ısısında yaklaşık 1 saat bekletilerek biyoluminesans saptanmış ve fotoğraf filmi üzerine yansıtılmıştır. *Chromobacterium* belirlemesi için *Chromobacterium violaceum* CV60 ve *Pseudomonas* ırkı (Ps19)

TSA besiyerinde çizgi ekim yapılarak 28°C'de inkübe edilmiştir. 12 saat sonra renk oluşumu kontrol bakteriyile (*Erwinia herbicola*, Ehg 824-1) karşılaştırılarak kontrol edilmiştir.

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) için SCL-10A Shimadzu (ECV-10 AL<sub>VP</sub> pompa, SIL-10 AD<sub>VP</sub> enjektör, SPD-M 10A<sub>VP</sub> dedektör) sistemi kullanılmıştır. Önceden bakteri kültürlerinden hazırlanan metanol ekstresi 0,20µm por genişliğindeki filtrelerden süzülerek, örnek C18-Nukleosil, 250 x 4.6 mm, 5-µm partikül büyüklüğüne sahip kolona enjekte edilmiştir. Analiz çalışmalarında gradient bir çalışma programı izlenmiştir. Buna göre asetonitril oranındaki artış; 0-8 dak. %15, 10-20 dak. %35, 22-30 dak. %60 olarak uygulanmıştır. Akış hızı 1ml/dak. olarak belirlenmiş ve spektrum 210 nm'de izlenmiştir.

## BULGULAR

Bitki tümörlerinden izole edilen *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* bakterileri zengin besiyerinin yanı sıra sadece bu patovara özgü seçicilikte olan PVF-1'de iki gün sonunda koloni oluşturmuşlardır (Şekil 1B). Bu kolonilerden yapılan PCR sonucu beklenen DNA bandları (*ptz* genine özgü 684bç ve *iaaL* genine özgü 454 bç.) saptanmıştır. Kolonilerden bakteri kültürleri hazırlanarak Tablo 1'de açıklanan biyosensör ırklar ile test edilmiştir. *C. violaceum* hücreleri ile yapılan denemede, kontrol bakteriyile (*E. herbicola*) pigment oluşumu gözlenmesine rağmen, *P. syringae* pv. *savastanoi* hücrelerinde renklenme oluşmamıştır (Şekil 2A). *E. coli*'nin farklı karbon yan zinciri uzunluğundaki sinyalleri tanıyan mutant ırklarıyla biyoluminesans verme özelliği test edildiğinde sadece JM109 pSB 401 hücrelerinde biyoluminesans varlığı gözlenmiştir (Şekil 2B). Bu nedenle bakteriden salgılanan molekülün 6 karbonlu yan zinciri olan N-(3-okzo-hekzanoil)-L-homoserin lakton (OHHL) olduğu saptanmıştır. Bakteri kültürlerinin etil asetat ile ekstraksiyona tabi tutularak hazırlanan ekstrenin HPLC'ye uygulanması sonucu elde edilen kromatogramda majör bileşen olan OHHL'ye ait pikin retansiyon zamanı 5.7 dakika olarak belirlenmiştir.

## TARTIŞMA

Quorum-sensing'e dair ilk bilgiler biyoluminesans özelliği gösteren deniz bakterilerinde ortaya çıkmıştır (5). *Vibrio fischeri*, QS moleküllerini üre-

terek bakteri-bakteri iletişimini sağlamakta ve popülasyon boyutu mililitrede yaklaşık  $10^{11}$  hücrenin üzerine çıktığında biyoluminesansı aktive etmektedirler. Açıl-Homoserin Lakton türevi olan N-(3-okzo-hekzanoil)-homoserin lakton (3-okzo-C6-HSL) ilk kez bu bakteriden izole edilerek tanımlanmıştır (6). Temel olarak, AHL molekülleri *LuxI* geninin kodladığı bir enzim aracılığıyla üretilir ve hücreden difüze olur. Bu sentezin gen anlatımına yansımaları LuxR adı verilen bir transkripsiyon faktörü aracılığıyla sağlanır. Önemli bitki patojenlerinde genomda bitişik bulunan *luxI* ve *luxR* genlerinin homologları dizilenmiştir.

Bitkilerde hastalık oluşturan bir çok Gram (-) bakteride virülans faktörlerin ve konak hücreleri yıkıcı enzimlerin sentezi quorum-sensing'e bağlı gen anlatım yolağıyla ilişkilidir. Bir toprak bakterisi olan ve çeşitli bitkilerde hastalık yapan *Pseudomonas syringae*'nin farklı patovarylarında üretilen QS molekülleri çoğunlukla AHL grubundandır (7). Ülkemizde zeytin üretiminde verim kaybına neden olan *P. syringae* patovary (*Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*)'nda enfeksiyonun mekanizması ve quorum-sensing sürecine ilişkin bilgiler yetersizdir. Özellikle AHL senteziyle virülans gen anlatımı bağlantısının çözümlenmesi gerekir. Bu nedenle, laboratuvarımızda daha önce bu bakterinin genom kitaplığı kurularak (8), AHL sentezinden sorumlu olduğu düşünülen bir gen dizisi klonlanmıştır. Bu çalışmada biyosensörlerle yapılan belirlemelerde bakteri kültürlerinin yanı sıra, bu gen dizisini taşıyan *E. coli* ırkları da kullanılmış ve paralel sonuçlar elde edilmiştir. Biyosensör kullanımı AHL moleküllerini tanımlamada en güvenilir yollardan biridir. Bazı patojen bakterilerde birden fazla tipte AHL'nin sentezlenebildiği biliniyorsa da, *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*'de ağırlıklı üretilen sinyalin N-(3-oxo-hexanoil)-L-homoserin lakton (OHHL) olduğu söylenebilir. OHHL molekülleri, verimli bir üreme gösteren bakteri kültürlerinin üst sıvısında bol miktarda bulunmaktadır. Bu sonuç, *Pseudomonas*'ın bitki ve toprak kökenli izolatlarında yapılan çalışmalarla paralellik gösterir. Elası ve ark. (7) zeytin, zakkum ve

*Fraxinus* türleriyle ilişkili toplam 13 *Pseudomonas syringae* ırkında biyosensör ve ince tabaka kromatografisi kullanarak AHL moleküllerinin HHL ya da OHHL tipinde olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca AHL üretimi bitki ilişkili izolatlarda toprak kökenli olanlara oranla daha fazla bulunmuştur.

Bu çalışmada *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* 'deki QS sürecinin önemli bir bileşeni olan OHHL molekülleri HPLC ile biyokimyasal olarak tanımlanmıştır. Özellikle, zeytin dal kanserinin gelişimini açıklamada AHL üretimine bağlı olarak hangi genlerin anlatımının düzenlendiği bir sonraki adım olabilir. Bu çalışma süreci aynı zamanda yakın patovarylarca oluşturulan enfeksiyonların aydınlatılmasına da katkı sağlayabilecektir.

## KAYNAKLAR

1. Smidt M, Kosuge T. The role of indole-3-acetic acid accumulation by alpha methyl tryptophan-resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation on oleanders. *Physiol. Plant Pathol.* 1978; 13:203-214.
2. Mae A ve ark. Transgenic plants producing the bacterial pheromone N-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact* 2001; 14(9):1035-42
3. Schauder S, Bassler BL. The languages of bacteria. *Genes & Development* 2001; 15:1468-1480
4. Winson MK, Swift S, Fish L, Throup JP, Jorgensen F, Chhabra, SR, Bycroft BW, Williams P and Stewart GSAB. Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acylhomoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiology Letters* 1998; 163: 193-202.
5. Eberhard A. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. Bacteriol.* 1972; 109, 1101-1105.
6. Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, Kenyon GL, Nealson KH, Oppenheimer NJ. Structural identification of auto-inducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochem.* 1981; 20, 2444-2449.
7. Elası M, Delorme S, Lemanceau P, Stewart G, Laue B, Glickmann E, Oger PM, Dessaux Y. Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(3):1198-1209
8. Gürel F, Barash I, Manulis S. Construction of a large insert library of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. In:10th International Congress on Pseudomonas. 27-31 August 2005, Marseille, France.