



Pseudomonas aeruginosa'da Fosfat Eksikliğinin Ramnolipid Üretimine ve İlişkili Quorum Sensing Sinyal Moleküllerine Etkisi

The Effect of Phosphate Limitation on Rhamnolipid Production and Related Quorum Sensing Signal Molecules in *Pseudomonas aeruginosa*

Şebnem BUKAVAZ¹

¹Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

Makale atfı: Bukavaz Ş. *Pseudomonas aeruginosa*'da fosfat eksikliğinin ramnolipid üretimine ve ilişkili Quorum Sensing sinyal moleküllerine etkisi. FLORA 2019;24(2):93-100.

ÖZET

Giriş: Ramnolipid *Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonlarının oluşması ve devamlılığı için gerekli olan bir virülans faktördür. Ramnolipid üretiminin kontrolü hücre yoğunluğuna bağlı düzenleme (quorum sensing) altındadır. Ayrıca, çevre/besin seviyelerine bağlı olarak da pek çok faktörden etkilenir. Bu çalışmada, fosfat eksikliğinin quorum sensing moleküllerine etkisi ramnolipid üretimi altında incelenmiştir.

Materyal ve Metod: Çalışmada fosfatın ramnolipid üretimine etkisi, *P. aeruginosa* PAO1 (kontrol suşu) ve ramnolipid mutant suşlarının "Luria-Bertani (LB)", Proteose Pepton Glukoz Amonyum Tuzu (PPGAS) ve PPGAS besiyerine fosfat eklenerek hazırlanmış (50 mM final konsantrasyon) besiyerlerindeki kültürlerinden elde edilen örnekler, orcinol ve ince tabaka kromatografi (TLC) yapılarak gösterildi. Ayrıca, ramnolipid üretimiyle ilişkili quorum sensing oto uyarıcıları 16, 24 ve 48 saatlik bakteri kültürlerinden izole edilerek kantitatif "High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS)" analizi ile ölçüldü.

Bulgular: Orcinol test ile yapılan ramnolipid tayininde, *P. aeruginosa* PAO1 suşunun PPGAS besiyerinde 48 saatlik örneklerde, LB'ye göre 20 kat daha fazla ramnolipid ürettiği gözlemlendi. PPGAS besiyerine fosfatın (final konsantrasyon; 50 mM) eklenmesi ramnolipid miktarında 48 ve 72 saatlik örneklerde sırasıyla; %54 ve %64 oranlarında azalmaya sebep oldu. Quorum sensing sinyal molekülleri arasında en fazla miktarda C4-HSL ve PQS bulunurken, bunu HHQ ve 3-oxo-C12-HSL takip etti.

Sonuç: *P. aeruginosa* PAO1'de fosfat eksikliği, quorum sensing'in RhIR ve PQS sistemlerini aktifleştirerek ramnolipid üretimini artırır. Ramnolipid üretimi artarken, aynı yolakla diğer virülans faktörlerinin de aktifleştiği düşünüldüğünde, fosfat eksikliği *P. aeruginosa*'nın virülansının artmasına sebep olur.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*; Ramnolipid; Quorum sensing sinyal molekülleri; Fosfat eksikliği; C4-HSL; 3-oxo-C12-HSL; HHQ; PQS

SUMMARY

The Effect of Phosphate Limitation on Rhamnolipid Production and Related Quorum Sensing Signal Molecules in *Pseudomonas aeruginosa*

Şebnem BUKAVAZ¹

¹Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, University of Trakya, Edirne, Turkey

Introduction: Rhamnolipid (RL) is one of the virulence factor secreted from *Pseudomonas aeruginosa* and is required to establish and persist the infection. The control of RL production is under control of Quorum Sensing System, and it is influenced by numerous factors of environmental/nutritional levels. In this study, it was aimed to investigate the phosphate depletion effect on selected Quorum Sensing Signal Molecules (QSSMs) under condition of rhamnolipid production.

Materials and Methods: The effect of phosphate on RL production was examined in *P. aeruginosa* PAO1 and RL mutant strains by Orcinol and TLC plate test. Additionally, HPLC/MS quantification for QSSMs related to rhamnolipid production was carried out using the samples isolated from 16, 24 and 48 h cultures grown in Luria-Bertani (LB) and Proteose Peptone Glucose Amonium Salt (PPGAS) medium.

Results: The increase in rhamnolipid production in PPGAS medium, for the wild type strain (48 h) amounted up to 20 fold was achieved compared to LB media by Orcinol assay. The cultures from PPGAS medium supplemented with 50 mM phosphate displayed significantly lower amount of rhamnolipid in 48 and 72 h cultures by 54% and 64%, respectively. The highest concentration of QSSMs were the C4-HSL and PQS for all strains. Then, the QSSM profile was followed by 3-oxo-C12-HSL and HHQ.

Conclusion: Phosphate limitation increased rhamnolipid production via RhlR and PQS systems in *P. aeruginosa* PAO1. Considering the fact that other virulence factors are activated while rhamnolipid production is increased, phosphate limitation leads to an increase in the virulence of *P. aeruginosa*.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*; Rhamnolipid; Quorum sensing signal molecules; Phosphate limitation; C4-HSL; 3-oxo-C12-HSL; HHQ; PQS

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa zorlayıcı metabolik ihtiyaçları olmaması ve değişik ortamlara kısa sürede uyum sağlayabilmesi nedeniyle toprakta, bataklıklarda, su kıyıları gibi çeşitli ekolojik alanlarda ve bitki, hayvan dokularında üreyebilen, özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde infeksiyonlar oluşturan fırsatçı bir patojendir^[1,2]. *P. aeruginosa* genomunun genetik çeşitliliği düşünüldüğünde, bilinen düzenleyici genlerin tüm bakteri genomunun %8.4'ü olması şaşırtıcı değildir^[3]. *P. aeruginosa*'nın virülansı çok sayıda hücre yüzey ilişkili ve hücre dışı faktörlere bağlıdır. İki farklı düzenleyici sistem bu virülans faktörlerinin ekspresyonunu kontrol eder; ikili komponent transkripsiyon düzenleyici sistem ve Quorum Sensing sistem. Bu iki sistem bakterinin yaşaması ve konakta çoğalması için gereklidir^[4].

P. aeruginosa'nın hücre yüzeyine tutunmasını sağlayan bir ya da iki ramnoz ve yağ asidi zincirinden oluşan glikolipid yapısında biosürfaktan

ramnolipid ürettiği gösterilmiştir^[5]. Ramnolipidin biyosentezi Quorum Sensing (QS)'e bağlı olarak, geç logaritmik ya da durağan üreme fazında başlar. Biyosentezinde üç adet gen görevlidir; *rhlA*, *rhlB* ve *rhlC*. Yağ asit biyosentezinde oluşturulan β -hidroksidekanoil-ACP, *rhlA* tarafından 3-(3-hidroksialkanoiloksi) alkanolik asit moleküllerine dönüştürülür. *RhlA* ile aynı operonda bulunan *rhlB*'nin, ramnoziltransferaz-1'i katalizlemesiyle, α -L-ramnopiranozil-3-hidroksidekanoil-3-hidroksidekanoat; (Rha-C10-C10) monoramnolipid oluşur. Bu oluşan ramnolipide, *rhlC* tarafından katalizlenen ramnoziltransferaz-2 enzimi ile bir dTDP-L-ramnoz şekeri daha eklenip, α -L-ramnopiranozil-(1-2)- α -L-ramnopiranozil-3-hidroksidekanoil-3-hidroksidekanoat; (Rha-Rha-C10-C10) diramnolipid üretilir^[6,7].

P. aeruginosa'da QS; LasR, RhlR ve PqsR sistemlerinden oluşur. N-(3-oksododekanoil)-L-homoserin lakton (3-okso-C12-HSL) oto uyarını, LasI protein tarafından sentez edilir. 3-okso-C12-HSL, LasR'a bağlanır ve *rhlABRI* operonunu uyarır. Rhl

sistemin oto uyarıcısı C4-HSL, RhlI'dan da sentez edilir ve RhlR'ye bağlanır. RhlR/C4-HSL kompleksi *rhlAB*'de spesifik diziye bağlanarak transkripsiyonu aktive eder^[8-10]. RhlC tarafından eksprese edilen ramnoziltransferaz-2 aynı QS aktive edici yolakla, *rhlAB* ile koordineli olarak regüle edilir. PqsR; transkripsiyonel aktive edici farklı üçüncü QS sistemi, 4-hidroksi-2-alkil kinolon; (HAQ) oto uyarıların sentezini yönetir. HAQ oto uyarılardan 4-hidroksi-2-heptilkinolon (HHQ) ve 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon (PQS), PqsR'a bağlanarak, aktivasyonu başlatır^[11-13].

P. aeruginosa'da QS çalışmaları, bakterinin çevre stres faktörlerini yanıtlayarak değişik ortam şartlarına oldukça kolay adapte olduğunu ve bunun da virülans gen ifade kontrolünde, patojenitede esneklik sağladığını göstermiştir^[14]. Örneğin, zengin besiyeri ortamında ramnolipid regülatör geni *rhlR* ekspresyonu, *lasR*'ye bağlıyken, fosfat kısıtlandığında sinyal molekülü henüz bilinmeyen Entegre QS sistem (IQS)'i devreye girer ve RhlR ve PqsR sistemleri aktive edilir^[15].

Bu çalışmanın amacı; fosfat eksikliğinin, *P. aeruginosa* PAO1 ve *rhl* mutantları tarafından üretilen ramnolipide etkisini ve Quorum Sensing Sinyal (QSS) yollarını incelemektir.

MATERYAL ve METOD

Çalışmada *P. aeruginosa* PAO1 standart suşundan moleküler genetik yöntemlerle hazırlanan ramnolipid *rhlA* geni içermeyen $\Delta rhlA$ (ramnolipid üretemeyen suş) ve diramnolipid üretimi için gerekli olan *rhlC* geni içermeyen $\Delta rhlC$ mutant (sadece monoramnolipid üretme yeteneğinde), kontrol olarak da *P. aeruginosa* PAO1 standart suşu kullanıldı.

Bakteri Kültürleri

Bakteriler öncelikle -80°C'den LB (Luria-Bertani) agara ekilip, gece boyunca 30°C'de inkübe edildi. Ertesi gün bakteri kültürleri OD₅₈₀'de (optik dansite) 0.5 olacak şekilde 1 L'lik erlenmayerde 200 mL PPGAS (Phosphate-limited-Peptone-Glucose-Ammonium Salt) besiyerine ekilerek 30°C ve 200 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 72 saat boyunca inkübe edildi^[16]. Orcinol ve TLC testleri; 16, 24 ve 48. saatlerde kültürlerden 5'er mL örnek yapıldı. QS oto uyarıların izolasyonu için aynı şekilde 100 mL'lik kültürler hazırlandı.

Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

LB agar: 10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L maya özütü, 15 g/L agar.

PPGAS (Phosphate-limited-Peptone-Glucose-Ammonium Salt) besiyeri: 5 g/L glukoz, 10 g/L pepton, 1.8 g/L NH₄Cl; amonyum klorür, 1.48 g/L KCl; potasyum klorür, 14.6 g/L Tris-HCl; Tris hidroklorür, 0.36 g/L MgSO₄ x 7 H₂O; magnezyum sülfat heptahidrat, pH: 7.2.

PPGAS/Pi besiyeri: PPGAS/inorganik fosfat; final konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde fosfat tamponu (36 g Na₂HPO₄; Sodyum fosfat dibazik, 15 g K₂HPO₄; dipotasyum hidrojen fosfat; 500 mL distile suda pH: 7.2) eklenerek hazırlandı.

Örneklerden süpernatant hazırlanması:

Kültürlerden alınan örnekler 3500 xg'de 10 dakika santrifüj edilip, üst kısım yeni bir tüpe aktararak hazırlandı.

Ramnolipid tayini: Orcinol test, ramnolipid ölçümünü ramnoz tayini üzerinden yapan indirekt bir testtir. Orcinol test için, kültür süpernatantı 300 µL olacak şekilde (gerekirse distile su ile dilüe edilir ve hesaplamada dilüsyon kat sayısı ile çarpılır) ve 600 µL etil asetat ile iki kez izole edildi ve tüpte toplanan kısım vakum santrifüjde tamamen kurutuldu. Kurutma işleminden sonra tüpün dibinde görülen kahverengimsi-yeşilimsi ramnolipid, 100 µL distile su, 100 µL %1.6 Orcinol ve 800 µL %60'lık sülfirik asit (H₂SO₄) eklendi ve 80°C'de 175 rpm'de çalkalanarak 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örneklerin soğuması için beş dakika oda ısısında beklendikten sonra örnekler %0.01 ramnolipid standardına karşı 421 nm'de spektrofotometrede okundu. Sonuçlar kaydedilerek, ramnolipid konsantrasyonu 1 µg ramnozun yaklaşık 2.5 µg ramnolipide eş değer olduğu bilinerek hesaplandı^[17].

İnce tabaka kromatografisi (TLC-Thin-Layer-Chromatography):

Orcinol testte olduğu gibi ramnolipid izole edildi. İzolasyon sonunda tüpün dibinde kalan ramnolipid, 10 µL metanolde çözüldü ve TLC plak (silica gel 60 F₂₅₄; Merck, Darmstadt, Almanya) üzerine damlatıldı. Plak, kloroform-metanol-asetik asit (65:15:2) solvent içeren kaba yerleştirilerek örnekler son 2 cm kalıncaya kadar koşuruldu ve oda ısısında kurutuldu. Ardından etanolde hazırlanan %15'lik H₂SO₄ ile sprey-

lenerek ısı tabancasıyla kurutuldu^[18]. TLC plak kurudukça mono ve diramnolipidi temsil eden noktalar görüldü ve görüntü fotoğraf çekilerek kaydedildi.

N-acil-homoserin laktonların izolasyonu (AHLs): Ölçüm yapılacak kültür örneklerinden alınan 400 µL süpernatant, üç kez etil asetat ile izole edildi. Organik fazlar toplanarak vakum santirifüjde tamamen kurutuldu ve dipte kalan kısım 50 µL metanolde çözüldü^[19]. QS oto uyarınları için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi (High-performance liquid chromatography-mass spectrometry- HPLC-MS) (High Waters 625 HPLC, Milford, MA, USA) analizi, QS oto uyarınları standartlarıyla uygun kalibrasyonlar yapılarak gerçekleştirildi.

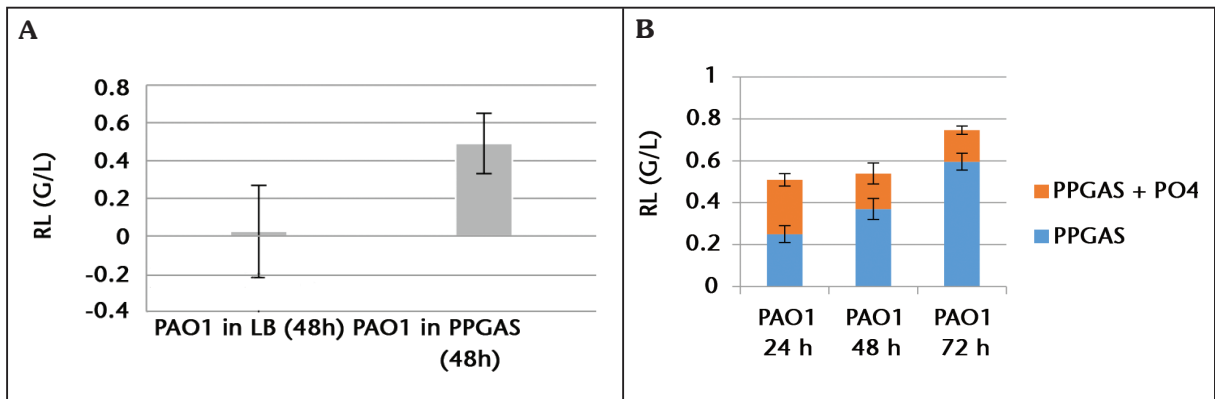
BULGULAR

P. aeruginosa PAO1 suşunun, LB ve PPGAS besiyerlerindeki ramnolipid üretim miktarını karşılaştırmak amacıyla öncelikle, 48 saatlik örneklerden Orcinol test ile ramnolipid konsantrasyonu ölçülmüştür. Sonuçlar değerlendirildiğinde; PAO1'in PPGAS kültür örneklerinde LB'dekilere oranla 20 kat fazla ramnolipid tayin edilmiştir (Şekil 1A). Fosfatın ramnolipid üretimine etkisini araştırmak için ise, *P. aeruginosa* PAO1 suşunun PPGAS ve PPGAS/Pi besiyerlerindeki 24, 48 ve 72. saatlerdeki örnekler kullanılarak Orcinol test yapılmıştır. Ramnolipid miktarında 24 saatlik örnekler arasın-

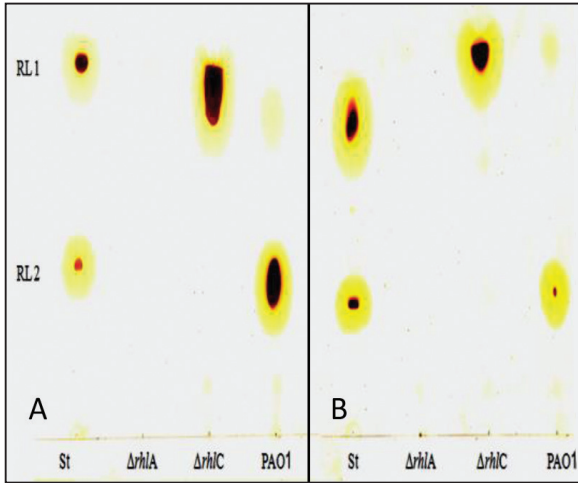
da önemli bir fark görülmezken, 48 saatliklerde %54, 72 saatliklerde %64 oranında azalma tespit edilmiştir (Şekil 1B).

P. aeruginosa PAO1, $\Delta rhIC$ ve $\Delta rhIA$ 'nın hangi tip ramnolipidi (mono-di) ürettikleri ve fosfatın ramnolipid üretimindeki etkisini göstermek amacıyla, ince tabaka kromatografisi yapılmıştır. Bunun için, bakteri suslarının PPGAS ve PPGAS/Pi besiyerlerindeki 48 saatlik kültürleri kullanılmıştır. *P. aeruginosa* PAO1'den saflaştırılan ramnolipid standart olarak kullanılarak, kromatografide PAO1'in mono ve di ramnolipidi temsil eden iki spot, $\Delta rhIC$ 'nin ise mono ramnolipidi temsil eden bir spot oluşturduğu, $\Delta rhIA$ 'nın hiçbir spot oluşturmadığı gözlenmiştir (Şekil 2A). Ayrıca, kromatografi sonucu değerlendirildiğinde, standart miktarda bakteri konsantrasyonlarından hazırlanmış ve standart miktarda kromatografi plağına yüklenen örneklerin oluşturduğu spotlarda, PPGAS/Pi besiyerinde, PPGAS'da üreyenlere oranla önemli derecede küçülme kaydedilmiştir (Şekil 2B).

Ramnolipid üretiminde QS döngüsü ve çevresel stres faktörü olarak fosfatın, RL üretimi üzerindeki etkisinin ayrıntılı olarak anlaşılması için QS oto uyarınları izole edildi. Hassas HPLC-MS kantitatif analizleri, retansiyon zamanları ve pik aralıkları iyi belirlenmiş standartlarla, örneklerinkiler karşılaştırılarak yapılmıştır. Ramnolipid mutantları ve PAO1 suslarının LB ve PPGAS be-



Şekil 1. Fosfatın ramnolipid üretimine etkisi. A'daki grafikte *Pseudomonas aeruginosa* standart suşunun (PAO1), LB ve PPGAS besiyerinde üreyen 48 saatlik kültürlerinden alınan örneklerdeki ramnolipid konsantrasyonları gösterilmektedir. B'deki grafikte ise inorganik fosfatın ramnolipid üretimine etkisinin anlaşılması amacıyla, fosfat kısıtlanmış PPGAS ve ekzojen olarak fosfat eklenmiş PPGAS/Pi besiyerlerinde üreyen PAO1'in; 24, 48 ve 72 saatlik kültürlerinden alınan örneklerdeki ramnolipid konsantrasyonları gösterilmektedir. Her bir örnek OD₅₈₀'de standart bakteri konsantrasyonundan hazırlanmıştır. Hata çubukları en az üç farklı deneydeki standart sapmayı göstermektedir.

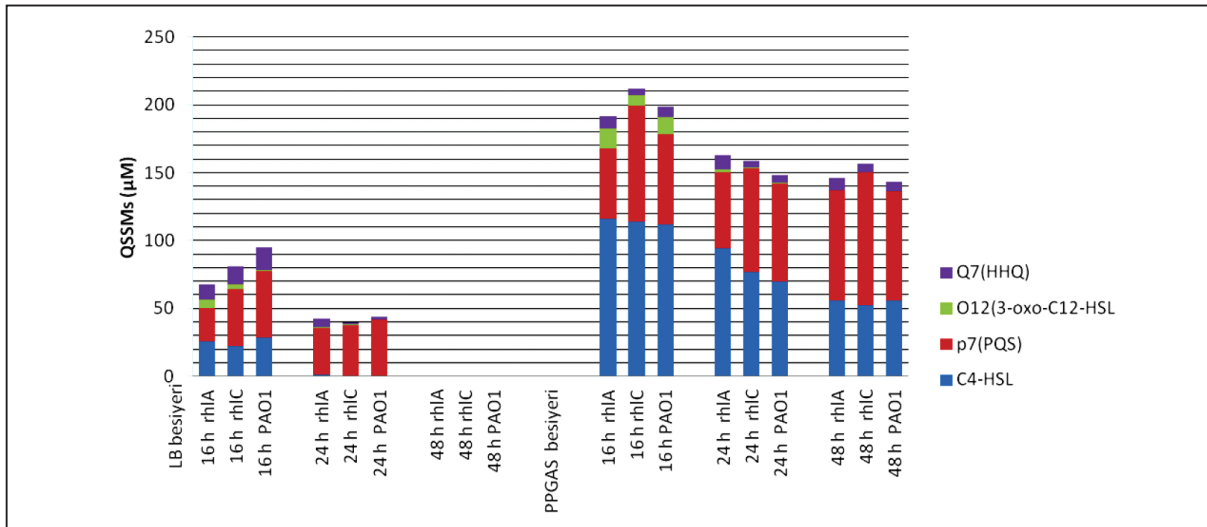


Şekil 2. Fosfatın ramnolipid üretimine etkisinin İnce Tabaka Kromatografisi ile gösterilmesi. *Pseudomonas aeruginosa* $\Delta rhIA$, $\Delta rhIC$ ramnolipid mutant ve PAO1 standart suşlarının fosfat kısıtlanmış PPGAS (A) ve ekzojen olarak fosfat eklenmiş PPGAS/Pi (B) besiyerinde üreyen 48 saatlik kültürlerinden alınan örneklerden izole edilen ramnolipidin TLC plaktaki görüntüsü. Plaktaki spotlar mono ve di-ramnolipidi temsil etmektedir. RL1: Mono-ramnolipid, RL2: Di-ramnolipid, St: standart; Standart ramnolipid PAO1'in PPGAS besiyerinde üretilerek kolon kromatografisi ile saflaştırılmasıyla elde edilmiştir. Kimyasal ve saflık analizi LC-ESI-TOF-MS (liquid chromatography-electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry) ile yapılmıştır.

siyerinde 16, 24 ve 48 saatlik kültürlerinden elde edilen örneklerde AHL profilinden; C4-HSL, 3-oxo-C12-HSL (O12) ve AQ (açıl kinolon) profilinden; HHQ (O7) ve PQS (p7) için HPLC-MS analizi yapılmıştır (Şekil 3).

HHQ (PQS öncü molekülü) hariç, diğer QS oto uyarıcıları, PPGAS besiyerindeki örneklerde LB'ye göre önemli derecede yüksek konsantrasyonlarda ölçülmüştür; tüm suşlar için C4-HSL, PPGAS besiyerinde 16 saatlik örneklerde, yaklaşık beş kat; PQS ise 16 ve 24 saatlik örneklerde yaklaşık iki kat fazla bulunmuştur. 3-oxo-C12-HSL oto uyarıcı, ramnolipid mutantlarının PPGAS'daki 16 saatlik örneklerinde, LB'ye göre yaklaşık iki kat fazlayken, PAO1'in PPGAS'daki örneklerinde yaklaşık 10 kat fazla bulunmuştur. 3-oxo-C12-HSL, 24 saatlik PPGAS örneklerinde, yalnızca $\Delta rhIA$ suşunda tespit edilirken 48 saatlik örneklerde bulunmamıştır. HHQ ise, 16 saatlik örneklerde LB'de, PPGAS'a göre yaklaşık iki kat fazlayken, 24 saatlik örneklerde önemli bir fark gözlenmemiştir.

LB besiyerinde üreyen tüm örneklerde en yüksek konsantrasyonda PQS tespit edilirken, PPGAS besiyerinde özellikle 16 saatlik örneklerde C4-HSL



Şekil 3. LB ve PPGAS besiyerlerinde üretilen *Pseudomonas aeruginosa* ramnolipid mutantları ve standart suşun ramnolipid üretimine ilişkili olarak seçilmiş quorum sensing oto uyarıcılarının (QSSM) konsantrasyonları. Grafikte $\Delta rhIA$, $\Delta rhIC$ ve PAO1 suşlarının LB ve PPGAS besiyerinde üreyen 16, 24 ve 48 saatlik kültürlerinden alınan örneklerin süpermatantlarından izole edilen, ramnolipid üretimine ilişkili quorum sensing oto uyarıcılarının; O12 (3-oxo-C12HSL), C4-HSL, Q7 (HHQ), P7 (PQS), HPLC-MS ile analiz edilen konsantrasyonları yer almaktadır. Her bir örnek OD₅₈₀'de standart bakteri konsantrasyonundan hazırlanmıştır ve ölçülen her bir molekülün konsantrasyon miktarı, kullanılan standardın pik aralığına göre hesaplanmıştır. Ölçümler en az üç bağımsız kültürden izole edilen örneklerle yapılmıştır.

en yüksek konsantrasyonda bulunmuştur. LB'de 24 saatlik örneklerde tüm QS oto uyarınlarının azaldığı ve 48 saatlik örneklerde hiç tespit edilemediği gözlenmiştir.

TARTIŞMA

Ramnolipid uzun yıllardan beri çalışılan bir konu olmasına rağmen, çalışmalar daha çok endüstride kullanımı nedeniyle, kısa inkübasyonda yüksek miktarlarda üretimini sağlayacak kültür şartlarının araştırılmasına yöneliktir. Ancak son yıllarda virülansla ilişkisi ortaya konmuş, bakteride üretimi ve etkileri araştırılmaya devam etmektedir^[20]. Ramnolipid biyosentezindeki karmaşık gen düzenlenmesi, gerçek işlevlerinin anlaşılmasını daha zor hale getirmektedir^[21]. *P. aeruginosa*'da virülans ve transport gibi işlevler normal şartlarda birbirleriyle bağlantılı üçlü QS sisteminin en üstünde yer alan *las*'ın, *rhl* ve *pqs* sistemini kontrol etmesiyle düzenlenir^[22,23]. İnfeksiyon oluşumu esnasında sık görülen fosfat eksikliği, bakteri için bir stres ortamı oluşturmaktadır^[24,25]. Bu da doğrudan sepsis infeksiyonlarında toksik fenazinin, piyosiyenin, ramnolipid gibi sekonder metabolitlerin üretiminde ve antibiyotik direncinin gelişmesinde etkili yolların aktifleşmesine yol açar^[26]. Çalışmamızda fosfat eksikliğini temsil eden PPGAS besiyeri kullanılarak, ramnolipidin üretimini arttırmada etkili QS oto uyarınları belirlenmiştir. Ekzojen olarak fosfatın eklenmesiyle de, ramnolipid üretiminin azaldığı gösterilmiştir. Besin kısıtlamasının olmadığı, normal şartları temsil eden LB besiyerinde, bakteri herhangi bir strese maruz kalmadığı için QS sisteminin ilgili yolları minimum aktive edilmiş ve buna bağlı olarak ramnolipid üretimi de minimum düzeyde kalmıştır. Bu iki üreme ortamındaki ramnolipid miktarları arasındaki farkın, QS oto uyarınlarına bağlı olduğunu sonuçlarımız doğrulamaktadır. Fosfat kısıtlanması ya da yokluğunun, PhoB'yi uyararak, *las*'tan bağımsız olarak *pqs* ve *rhl* sistemlerini aktive ettiği bilinmektedir^[27,28]. PPGAS besiyerinde PQS ve C4-HSL oto uyarınlarının, LB'ye göre sırasıyla yaklaşık iki ve beş kat fazla bulunması, bu sistemler üzerindeki uyarıyı arttırmış ve doğrudan ramnolipid sentezinin artmasına yol açmıştır. Örneklerde, *las* sisteminin oto uyarını olan 3-oxo-C12-HSL'nin 16 saatlik kültürlerde ölçülebilir seviyede olması fakat daha sonraki saatlerde test edilen örneklerde

negatif bulunması, QS sisteminin işlevine başladığı ilk saatlerde, *pqs* ve *rhl* sistemlerinin *las* sistemi tarafından düzenlendiğini, fakat daha sonra *las*'ın devre dışı bırakıldığını düşündürmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada, C4-HLS, PQS, HHQ ve 3-oxo-C12-HSL molekülleri PAO1'in LB besiyerindeki logaritmik faz esnasında alınan örneklerde analiz edilmiş ve bu QS oto uyarınlarının konsantrasyonları, bizim çalışmamızdaki miktarlardan daha düşük bulunmuştur^[29]. Bizim çalışmamızdaki oto uyarınlarının konsantrasyonlarının yüksek miktarda bulunmasının sebebi, çalışılan örneklerin kültür ve analiz hacimlerinin fazla olması, ayrıca, örneklerin ramnolipid üretimine bağlı olarak, geç üreme veya durağan faz sırasında alınarak ölçüm yapılmasından kaynaklanabilir.

Burada değinilmesi gereken bir nokta da ramnolipid mutant suşları ve PAO1 arasında test edilen QS oto uyarınları açısından, büyük farklılıkların görülmemesidir. Monoramnolipid üreten *ΔrhlC*'nin virülans ve hareket açısından olduğu kadar biyofilm tipinin de PAO1'e benzer olduğu fakat *ΔrhlA*'nın farklı bir fenotipe sahip olduğu bilinmektedir^[30]. Bu farklılıkların en bilineni "swarming" hareketidir. *P. aeruginosa*'da hem QS oto uyarınlarının uygun konsantrasyonuna hem de ramnolipid üretimine bağlıdır^[31]. *ΔrhlA* swarm hareketi açısından negatiftir, fakat *ΔrhlC* ve PAO1 birbirlerinden farklı olsa da ikisi de swarming hareketi açısından pozitifdir. Bu durumda ramnolipidin swarming hareketinin oluşması için elzem olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak; çalışmamızda, in vitro olarak oluşturulan fosfat eksikliğine bağlı stres ortamında, *P. aeruginosa*'nın virülans faktörlerinden olan ramnolipidin sentezlenmesi esnasında kullanılan QS yollarının zamana karşı değişimi gösterilerek, *P. aeruginosa* infeksiyonlarında bakterinin virülansı için ortam şartlarının önemi vurgulanmaktadır. Bu tür çalışmaların, virülans faktörlerinin üretiminde etkili yolların durdurulması ya da yavaşlatılması için geliştirilecek projelere katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma doktora tezinden üretilmiştir. Tez danışmanım sayın Dr. Frank Rosenau'ya ve tezin QS oto uyarınlarıyla ilgili kısmını yöneten, sayın

Prof. Dr. Miguel Camara'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Çalışma, MEST-CT-2006-020278 numaralı Antibiotarget Marie-Curie projesi tarafından desteklenmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

YAZAR KATKISI

Anafikir/Planlama: ŞB

Analiz/Yorum: ŞB

Veri Sağlama: ŞB

Yazım: ŞB

Gözden Geçirme ve Düzeltme: ŞB

Onaylama: ŞB

KAYNAKLAR

1. Stover CK, Pham PX, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000;406:959-64.
2. Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: A formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect* 2009;73:338-44.
3. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010;74:621-41.
4. Ben Haj Khalifa A, Vu Thien H, Khedher M. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and modes of regulation. *Ann Biol Clin (Paris)* 2011;69:393-403.
5. Leitermann F, Syldatk C, Hausmann R. Fast quantitative determination of microbial rhamnolipids from cultivation broths by ATR-FTIR Spectroscopy. *J Biol Eng* 2008;2:13-20.
6. Soberon-Chavez G, Lepine F, Deziel E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;68:718-25.
7. Deziel E, Lepine F, Milot S, Villemur R, *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 2003;149:2005-13.
8. Medina G, Juárez K, Díaz R, Soberón-Chávez G. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhlR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* 2003;149:3073-81.
9. Karatuna O, Yağcı A. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and quorum sensing. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2008;1:42-51.
10. Williams P, Camara M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: A tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* 2009;12:182-91.
11. Deziel E, Lépine F, Milot S, He J, Mindrinos MN, Tompkins RG, et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:1339-44.
12. Siehnel R, Traxler B, An DD, Parsek MR, Schaefer AL, Singh PK. A unique regulator controls the activation threshold of quorum-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:7916-21.
13. Gallagher LA, McKnight SL, Kuznetsova MS, Pesci EC, Manoil C. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2002;184:6472-80.
14. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 2015;6:26-41.
15. Lee J, Wu J, Deng Y, Wang J, Wang C, Wang J, et al. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat Chem Biol* 2013;9:339-43.
16. Wild M, Caro AD, Hernández AL, Miller RM, Soberón-Chávez G. Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant. *FEMS Microbiol Lett* 1997;153:279-85.
17. Ochsner UA, Hembach T, Fiechter A. Production of rhamnolipid biosurfactants. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 1996;53:89-118.
18. Koch AK, Käppeli O, Fiechter A, Reiser J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J Bacteriol* 1991;173:4212-9.
19. Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Cámara M, Williams P. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of *LasR*. *Molecular Microbiology* 2003;50:29-43.
20. Frisk A, Ison CA, Lagergard T. GroEL heat shock protein of *Haemophilus ducreyi*: Association with cell surface and capacity to bind to eukaryotic cells. *Infect Immun* 1998;66:1252-7.
21. Reis RS, Pereira AG, Neves BC, Freire DM. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*-a review. *Bioresour Technol* 2011;102:6377-84.
22. Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, et al. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:11229-34.
23. Gilbert KB, Kim TH, Gupta R, Greenberg EP, Schuster M. Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor *LasR*. *Mol Microbiol* 2009;73:1072-85.

24. Shor R, Kim TH, Gupta R, Greenberg EP, Schuster M. Severe hypophosphatemia in sepsis as a mortality predictor. *Ann Clin Lab Sci* 2006;36:67-72.
25. Long J, Zaborina O, Holbrook C, Zaborin A, Alverdy J. Depletion of intestinal phosphate after operative injury activates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* causing lethal gut-derived sepsis. *Surgery* 2008;144:189-97.
26. Jensen V, Löns D, Zaoui C, Bredenbruch F, Meissner A, Dieterich G, et al. RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and -independent pathways. *J Bacteriol* 2006;188:8601-6.
27. Dekimpe V, Deziel E. Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: The transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* 2009;155:712-23.
28. Chekabab SM, Harel J, Dozois CM. Interplay between genetic regulation of phosphate homeostasis and bacterial virulence. *Virulence* 2014;5:786-93.
29. Ortori CA, Dubern JF, Chhabra SR, Cámara M, Hardie K, Williams P, et al. Simultaneous quantitative profiling of N-acyl-L-homoserine lactone and 2-alkyl-4(1H)-quinolone families of quorum-sensing signaling molecules using LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 2011;399:839-50.
30. Bukavaz S. The effect of rhamnolipid production on *Pseudomonas aeruginosa* physiology (doktora). Ulm: Ulm Üniversitesi, 2015.
31. Xavier JB. Social interaction in synthetic and natural microbial communities. *Mol Syst Biol* 2011;7:483.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Şebnem BUKAVAZ

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Edirne-Türkiye

E-posta: sbukavaz@hotmail.com