Archive OF SID

مجله علمی – پژوهشی دانشگاه اصفهان (علوم پایه)
جلد سی و پنجم، شماره ٦، سال ١٣٨٧
صص٥٨-٥١

بررسی اثر مهاری ترشحات جوانۀ گیاه *Sorghum bicolor* (L.) Moench بر روی تولید پیگمان پیوسیانین باکتری *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1430

عاطفه علی پوریان* روحا کسری کرمانشاهی*

* دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم گروه زیست شناسی

چکیده

اکثر باکتری‌های گرم منفی، مولکول های سیگنالی به نام N-Acyl homoserine lactone تولید می کنند. این مولکول ها بر روی بیان بسیاری از ژن های باکتری ها اثر تنظیمی دارند. این مکانیسم تنظیمی را که به تراکم سلول وابسته است، حد نصاب احساس (Quorum sensing) می نامند. باکتری *Pseudomonas aeruginosa* یک پاتوژن فرصت طلب انسانی است که از این سیستم ها برای تنظیم بسیاری از اعمال سلولی خود، از جمله تولید عوامل حدت بیماری زایی استفاده می‌کند. یکی از این عوامل، پیگمان پیوسیانین است. نشان داده شده که این ترکیب در زنش مژک های تنفسی ایجاد اختلال کرده، مانع از تکثیر لمفوسیت ها می شود. گونه‌های متعددی از گیاهان عالی ترکیباتی ترشح می کنند که فعالیت تقلید از AHL را دارند. این ترکیبات قادر به مهار فنوتیپ های تحت کنترل سیستم های QS هستند. ما در این تحقیق، اثر مهاری جوانۀ ۷ روزۀ گیاه *Sorghum bicolor* (L.) Moench بر روی سنتز پیگمان پیوسیانین در باکتری *P.aeruginosa* PTCC 1430 را بررسی کردیم و پی بردیم که ترشحات جوانۀ این گیاه قادر به مهار سنتز پیوسیانین است، ولی بر روی رشد باکتری اثر مهاری ندارد.

واژه‌های کلیدی: حد نصاب احساس، پیوسیانین، مقلدین AHL

www.SID.ir

Archive OF SID

مقدمه

بسیاری از رفتارهای مهم باکتری ها، توسط تراکم جمعیت آنها کنترل می‌شود. باکتری‌ها مولکول های سیگنال کوچک قابل انتشاری به نام خود القاگر (AI)[1] تولید می کنند که قادرند از طریق غشاهای سلولی به داخل و خارج سلول و فضاهای بین سلولی منتشر شوند. این مولکول‌ها در خلال رشد باکتری، در محیط انباشته می شوند و در نتیجه، غلظت آنها در محیط بازتابی از تراکم جمعیت سلول‌هاست. هنگامی که این تراکم به یک حد آستانه رسید، نقش تنظیمی خود را در بیان ژن‌های هدف اعمال می‌کنند. این نوع ارتباط سلول به سلول که فرآیند های فیزیولوژیک متعددی را تنظیم می‌کند، حد نصاب احساس (QS)[2] خوانده می‌شود. سیستم‌های QS در کنترل بیان بسیاری از ژن‌ها نقش دارند، از جمله: ژن‌های دخیل درسنتز فاکتورهای حدت(ویرولانس) بیماریزایی، سنتز آنتی بیوتیک‌ها و ..... که برای کلونیزاسیون و حمله باکتری‌ها در میزبان های گیاهی، جانوری و میکروبی ضروری هستند (٤و۱۰) .

معمول ترین سیگنال در باکتری های گرم منفی از جنس هوموسرین، لاکتون های آسیله (AHL)[3] است (شکل ۱). باکتری‌های گرم منفی انواع مختلفی از مولکول های AHL را می سازند که این مولکول‌ها با هم از نظر طول زنجیرهٔ آسیل (٤-۱٤کربن)، حضور یا عدم حضور باندهای دو گانه و استخلاف‌های جانبی تفاوت دارند.

به طور کلی، سیستم های QS در باکتری های گرم منفی از چهار جزء اصلی تشکیل شده است: مولکول سیگنال، ژن های همولوگ با (luxI که پروتئین LuxI را که یک آنزیم سیگنال سنتاز است، می سازند)، ژن های همولوگ با luxR فعال کنندهٔ نسخه برداری در باکتری *Vibrio fischeri* و ژن‌های هدف سیستم های QS .

مولکول های سیگنال توسط ژن های همولوگ با luxI سنتز می شوند. در غلظت های بالا (آستانه) از مولکول‌های سیگنال، این مولکول‌ها به پروتئین‌های LuxR متصل شده، آنها را فعال می‌کنند. پروتئین LuxR از دو دامین اصلی تشکیل شده است: دامین اتصال به AHL و دامین اتصال به DNA. در غیاب AHL ، مولکول LuxR غیر فعال است، ولی در حضور آن و با تشکیل کمپلکس LuxR-AHL ، این مولکول فعال می‌شود و با اتصال به DNA به صورت فعال کنندهٔ رونویسی عمل کرده، رونویسی از ژن‌های هدف را فعال می‌کند. علاوه بر آن، خود ژن luxI (AHL سنتاز) نیز توسط این پروتئین فعال شده (خاصیت خود القایی)، در نتیجه با تولید بیشتر مولکول سیگنال ، بیان ژن‌های هدف نیز افزایش می یابد (۷و٤).

علاوه بر این، سیستم QS سومی نیز به نام PQS[4] در این باکتری شناسایی شده است. این سیستم مولکول سیگنالی به نام 2- heptyl-3- hydroxy- 4- quinolone تولید می کند. این مولکول به عنوان رابط بین سیستم های las و rhl عمل کرده، نقش مهمی در رونویسی از ژن‌های ویرولانس تحت کنترل rhl دارد. از مهمترین این ژن‌ها می‌توان به ژن هایی اشاره کرد که در سنتز پیوسیانین و رامنولیپید نقش دارند (۱۱).

1. Autoinducer
2. Quorum sensing
3. N-Acyl homoserine lactone
4. Pseudomonas quinolone signal

www.SID.ir

Archive OF SID

باکتری *Pseudomonas aeruginosa* یک پاتوژن فرصت طلب انسانی است که رونویسی از بیش از ۲۵۰ ژن در آن تحت کنترل سیستم‌های QS است. سیستم‌های las I/R و rhl I/R از مهمترین سیستم‌های QS در این باکتری هستند که به ترتیب توسط سیگنال‌های 3-oxo C12 HSL[1] و C4-HSL[2] کنترل می شوند. این باکتری معمول‌ترین پاتوژن در خلال عفونت در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیز و افراد با نقص سیستم ایمنی است. دامنهٔ وسیع میزبان و پیچیدگی آسیب های فیزیولوژیک حاصل از عفونت های این باکتری، به علت توانایی آن در تولید انواع مختلفی از شاخص‌های حدت بیماری زایی است. بسیاری از فاکتورهای حدت بیماری زایی در این باکتری تحت کنترل دو سیستم las I/R و rhl I/R است، از جمله: سنتز رامنولیپید، پروتئاز و پیوسیانین (۸و۱۰).

پیگمان پیوسیانین، یک ترکیب سبز- آبی حل شونده در کلروفرم و از اعضای خانوادهٔ ترکیبات سه حلقه‌ای فنازین هاست. این ترکیب نقش مهمی در توانایی *P. aeruginosa* برای پایداری در ریهٔ افراد مبتلا به بیماری سیستیک فیبروزیز و افراد با نقص سیستم ایمنی دارد. این ترکیب در زنش مژک‌های تنفسی، تولید ایمونوگلوبولین‌ها توسط لمفوسیت‌های B، رشد سلول‌های اپی تلیال و... ایجاد اختلال می‌کند. همچنین با تولید رادیکال‌های آزاد، بر روی رشد سایر باکتری‌ها و قارچ‌ها اثر ممانعتی داشته، به این ترتیب، قادر به کلونیزاسیون در ریهٔ افراد بیمار می‌شود (۵و۹).

درمان معمول بیماری‌های عفونی بر اساس ترکیباتی است که هدف اصلی آنها کشتن یا مهار رشد باکتری ها باشد. مشکل اصلی این درمان، گسترش سویه های مقاوم به ترکیبات آنتی باکتریال است. تلاش های جدید در راستای کاهش ویرولانس باکتری- بدون کشتن آن – انجام شده؛ به طوری که باکتری قادر به ایجاد عفونت فعال نباشد. با توجه به این که باکتری ها برای تولید بسیاری از فاکتور های حدت بیماری زایی خود از سیستم های تنظیمی QS استفاده می کنند، این سیستم ها می‌توانند به عنوان اهداف درمانی جدید مد نظر قرار گیرند.

یکی از بهترین نمونه های مهار کننده های QS، فورانون های هالوژنهٔ تولید شده توسط جلبک دریایی قرمز رنگ *Delisea pulchra* است که به علت شباهت ساختاری با AHL ها به پروتئین رسپتور (پروتئین R) متصل شده، در تولید بسیاری از فنوتیپ های تحت کنترل QS ایجاد اختلال می کنند از جمله ممانعت از ایجاد پدیدهٔ بیولومینسنس در باکتری *Vibrio fischeri* این ترکیبات خاصیت تقلید از AHL را دارند و به آنها مقلدان AHL[3] می‌گویند (۷و۱۰). اهمیت این ترکیبات در خود جلبک ، ممانعت از کلونیزاسیون باکتری ها در سطح آنها است که بیشتر جنبهٔ دفاعی دارد. کشف مقلدان AHL در جلبک ها، احتمال وجود این ترکیبات را در گیاهان عالی نیز تقویت کرد که می تواند از جنبهٔ بر هم کنش باکتری با میزبان گیاهی اهمیت داشته باشد. در بین گیاهان عالی نیز وجود چنین ترکیباتی در ترشحات جوانهٔ نخود ، عصارهٔ گیاه وانیل (۳و۱۰) و ... به اثبات رسیده است.

1. oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone
2. N-butanoyl-L- homoserine lactone
3. AHL mimics

www.SID.ir

Archive OF SID

این ترکیبات قادرند آثار تحریکی یا مهاری بر روی فنوتیپ‌های تحت کنترل QS داشته باشند. به نظر می‌رسد گیاهان با گوش کردن به سیگنال‌های باکتریایی ،قادرند از آنها تقلید کرده، از دخالت در QS به سود خود بهره برداری کنند. این توانایی تشخیص و پاسخ دادن به AHL ها اهمیت زیادی در پاسخ های دفاعی گیاه دارد. به نظر می‌رسد گیاه قادر است با شناسایی AHL ها ، مقلدین آنها را تولید کرده و بر روی سنتز همان AHL اثر گذارد که احتمالا این کار را از طریق بر هم کنش با رسپتور انجام می دهد. در حال حاضر تنها وجود این ترکیبات به اثبات رسیده است، اما در مورد ترکیب شیمیایی و رسپتور هایی که آنها را شناسایی می‌کنند، اطلاعی در دست نیست. اما شناخت مقلدان مختلف در گیاهان مختلف، در شناسایی ترکیبات جدید مهار کنندهٔ QS اهمیت دارد.

گیاه *Sorghum bicolor* Moench (L.) از خانوادهٔ Poaceae، یک گیاه غله‌ای است که علاوه بر مصرف خوراکی آثار درمانی زیادی نیز در درمان بیماری‌های اسهالی، تنفسی و ... دارد. در این تحقیق، اثر مهاری این گیاه بر روی سنتز پیگمان پیوسیانین در باکتری *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1430 بررسی شده است.

طرز کار و مطالعه:

سویه های باکتریایی و شرایط رشد:

سویهٔ *P. aeruginosa* PTCC 1430 بر روی محیط کشت مایع LB کشت‌داده شد. از محیط‌های کشت LB آگار و LB با ۰/۵ درصد آگار برای بررسی اثر جوانهٔ *S.bicolor* Moench (L.) استفاده شد.

تهیهٔ جوانهٔ گیاه:

بذر گیاه سورگوم را به مدت ۳ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و سپس به مدت ۳ دقیقه در محلول ٤ درصد هیپوکلریت سدیم (NaOCl) قرار دادیم تا سطح آن استریل شود. بین هر مرحله ، ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. دانه های استریل شده برروی کاغذ واتمن استریل و یا بر روی محیط LB آگار و در تاریکی به مدت ۷ روز نگهداری شدند(۱و۱۰).

بررسی اثر جوانهٔ گیاه سورگوم بر روی تولید پیوسیانین :

سویهٔ *P.aeruginosa* PTCC 1430 به مدت یک شب بر روی شیکر و در ۲۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از کشت باکتریایی در ۵ میلی لیتر از محیط LB حاوی ۰/۵ درصد آگار (در حالی که گرم است) مخلوط شده و روی پلیت‌های حاوی محیط LB آگار استریل ریخته شد ، سپس جوانه‌های هفت روزهٔ گیاه بر روی آن قرار داده و به مدت ٢٤ ساعت در ۲۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد (۱۰).

بررسی اثر مهاری بر روی رشد:

با استفاده از لوپ استریل ، از نواحی کم رنگ اطراف جوانه به محیط LB agar استریل تلقیح شد.

نتایج :

بعد از طی مدت زمان انکوباسیون، باکتری‌ها به علت تولید پیوسیانین سطح محیط را سبز می‌کنند. مشاهدات نشان دادند که در محل تماس جوانه با سطح محیط و اطراف آن، هاله‌های روشن و کم رنگی ایجاد شده که در سایر قسمت‌های دور از

www.SID.ir

Archive OF SID

جوانه ها این حالت مشاهده نمی شود (شکل۲). این در حالی است که بر روی رشد باکتری‌ها این مهار صورت نگرفته، زیرا با تلقیح از قسمت‌های هاله به یک محیط کشت جدید، رشد باکتری مشاهده می‌شود.

بحث و نتیجه گیری:

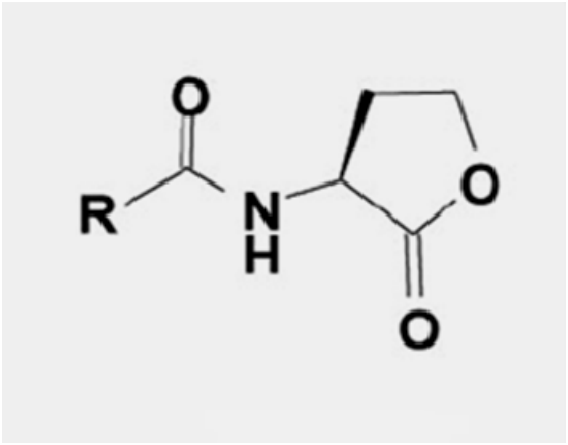
در سال های اخیر سیستم های تنظیمی حد نصاب احساس، به دلیل نقش مهمی که در سنتز فاکتورهای حدت بیماری زایی در باکتری‌ها دارند، اهمیت زیادی پیدا کرده‌اند؛ زیرا به علت داشتن نقش تنظیمی در بیماری زایی باکتری ها، این پتانسیل را دارند تا به عنوان اهداف درمانی جدیدی مورد مطالعه قرار گیرند. امروزه تلاش ها در جهت شناسایی ترکیبات طبیعی و سنتتیکی است که بتوانند به عنوان مهار کننده های سیستم های QS استفاده شوند. همان طور که مشاهده شد، پیگمان پیوسیانین نیز به عنوان یکی از فاکتور های مهم حدت بیماری زایی در باکتری *P.aeruginosa*، تحت کنترل سیستم‌های qs سنتز می گردد. در این تحقیق اثر جوانۀ هفت روزۀ گیاه سورگوم برروی سنتز این پیگمان بررسی گردید.

همان طور که مشاهده گردید، نتایج نشان می‌دهد که گیاه Moench *S. bicolor* (L.) اثر مهاری بر روی فنوتیپ تحت کنترل QS دارد ولی خاصیت آنتی باکتریال ندارد، زیرا با اینکه میزان سنتز پیگمان در مجاورت جوانه کاهش پیدا کرده بود، اما رشد باکتری مهار نشده بود. نتایج مشابهی نیز در بررسی اثر ترشحات جوانۀ هفت روزۀ گیاه نخود (*Pisum sativum*) به‌دست آمده است. این گیاه حداقل بر دو فنوتیپ تحت کنترل AHL، شامل سنتز پیگمان بنفش ویولاسئین در باکتری *Chromobacterium violaceum* و حرکت خزندگی در *Serratia liquefaciens* اثر مهاری دارد. به نظر می رسد در این گیاه دو یا تعداد بیشتری ترکیبات مقلد AHL وجود داشته باشد. علاوه براین، دیده شده که در بعضی موارد این ترشحات حتی قادر به القای فنوتیپ های تحت کنترل QS نیز هستند(۱۰). علاوه بر گیاه نخود ، اثر مهاری عصارۀ دانۀ گیاه وانیل (*Vanilla planifolia*) بر روی سنتز پیگمان ویولاسئین در باکتری *Chromobacterium violaceum* به اثبات رسیده است (۳). همچنین مشاهده گردیده است که عصارۀ گیاه سیر نیز در باکتری *P. aeruginosa* با مهار سیستم های QS، درکاهش حدت بیماری زایی این باکتری اثر دارد؛ به طوری که در مجاورت آن حساسیت بیوفیلم این باکتری به آنتی بیوتیک توبرامایسین افزایش یافته و پاتوژنیسیتی آن در مجاورت نماتود *Caenorhabditis elegans* کاهش می‌یابد (۲). ترکیب شیمیایی و مکانیسم عمل این ترکیبات هنوز شناسایی نشده است . مطالعات بیشتری - ترجیحاً با ترکیبات خالص مقلدان AHL – باید انجام شود تا مکانیسم مولکولی عمل این ترکیبات شناسایی شود. عملکرد این ترکیبات ممکن است به صورت کاذب(pseudo) ، از طریق دخالت در سنتز و یا انتقال مولکول AHL و یا به صورت حقیقی (real)، از طریق رقابت با AHL برای اتصال به پروتئین رسپتور باشد. در هر حال وجود چنین ترکیباتی می تواند در مهار عفونت‌های باکتری‌ها از طریق کاهش ویرولانس آنها نقش مهمی داشته باشد (۷). بررسی های بعدی برای شناسایی ترکیبات شیمیایی مهار کننده ی QS و همچنین شناسایی مکانیسم عمل این ترکیبات لازم است.

www.SID.ir

Archive OF SID

شکل ۱: هاله‌های کم رنگ اطراف جوانه



شکل ۲: مولکول AHL

Refrencecs:

O., O. Babalola, D. K. Berner, and N. A. Amusa. Evaluation of some bacterial isolates as germination stimulants of *Striga hermonthic*.African Journal of Agricultural Research. 2(1), 027-030. (2007)

T., Bjarnsholt, P. O. Jensen, T, B. Rasmussen, L. Christophersen, H. Calum, M. Hentzer, H. P. Hougen, J. Rygaard, C. Moser, L. Eberl, N. Høiby, and M. Givskov. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. Microbiology. 151, 3873-3880. (2005)

J., H. Choo, Y. Rukayadi, and J. K. Hwang. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. Letters in Applied Microbiology. 42, 637-641. (2006)

S., P. Diggle, K. Winzer, A. Lazdunski, P. Williams, and M. Camara. Advancing the quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. Journal of Bacteriology. 184(10), 2576-2586. (2002)

D., J. Hassett, L. Charniga, K. Bean, D. E. Ohman, and M. S. Cohen. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-co factored superoxide dismutase. Infection and Immunity. 60(2), 328-336. (1992)

M., R. Manefield, D. N. Kumar, R. Read, M. Givskov, P. Steinberg, and S. Kjelleberg. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL) – mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. Microbiology. 145, 283-291. (1999)

U,. Muh, M. Schuster, R. Heim, A. Singh, E. R. Olson, and E. P. Greenberg. Novel *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors identified in an ultra-high-throughput screen. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 50 (11), 3674-3679. (2006)

J., P. Pearson, E. C. Pesci, and B. H. Iglewski. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. Journal of Bacteriology. 179(18), 5756-5767.(1997)

H,. Ran, D. J. Hassett, and G. W. Lau. Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. PNAS. 100(24), 14315 -14320. (2003)

www.SID.ir

Archive OF SID

M,. Teplitski, J. B. Robinson, and W. D. Bauer. Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. MPMI. 13 (6),637-648.(2000)

M. D. P., Willcox, H. Zhu, T. C. R. Conibear, E. B. H. Hume, M. Givskov, S. Kjelleberg, and S. A. Rice. Role of quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* in microbial keratitis and cystic fibrosis. Microbiology. 154, 2184-2194. (2008)

www.SID.ir

Archive OF SID

www.SID.ir