

SRİNGOMİSİN VE SRİNGOPEPTİNLERİN KISMEN SAFLAŞTIRILMASI *

Meral ÖZALP¹, Burçin ŞENER², N. Leyla AÇAN³

PARTIAL PURIFICATION OF SYRINGOMYCINS AND SYRINGOPEPTINS

Summary: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is a bacterial pathogen for several plants. B359 strain of this bacteria produces syringomycins and syringopeptins. These substances are lipodepsipeptides consisting of hydroxy fatty acids and peptide moieties which contain several unusual amino acids. In this study partial purification of syringomycins and syringopeptins is presented. The purification included ammonium sulphate precipitation, acetone extraction and CM32 cellulose chromatography steps. Antifungal activity and thin layer chromatography was used to identify these products.

Key Words: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, Lipodepsipeptides, Purification

Özet: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* birçok bitki için patojen olan bir bakteridir. Bu bakterinin B359 suşu sringomisinler ve sringopeptinler olarak adlandırılan bileşikler üretir. Bu bileşikler yapılarında bir takım az rastlanan amino asitler bulunduran peptidler içeren lipodepsipeptidlerdir. Bu çalışmada sringomisin ve sringopeptinlerin kısmen saflaştırılması sunulmaktadır. Saflaştırma, amonyum sülfat kesiti, aseton ekstraksiyonu ve CM 32 selüloz kromatografisi yöntemlerini içerir. Kısmen saflaştırılan bu toksinlerin tanımlanmasında ince tabaka kromatografisi ve antifungal aktivite ölçüm tekniklerinden yararlanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, Lipodepsipeptidler, Saflaştırma

GİRİŞ

Sringomisinler (SR) bir fitopatogenik suş olan *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B359 tarafından üretilirler (1). Aynı organizma sringopeptinleri de sentezler. Sringomisinler ve sringopeptinler, hidroksi yağ asiti ve çeşitli sıra dışı amino asitler içeren peptid kısmına sahip olan lipodepsipeptidler grubunda yer alırlar (2). Yapılarında 4-klorotreonin, D-serin, 2,4-diaminobutirik asit ve 2,3-dehidrobutirik asit gibi sık rastlanmayan amino asitler bulundurlar. Sringomisinlerin peptid kısmı dokuz amino asitten oluşmuştur. N ucundaki serin, bir hidroksi yağ asiti ile N-asetil, ve C ucundaki 4-klorotreoninin karboksil grubu ile O-asetil bağı yapmıştır (Şekil 1a). Başlıca sringomisin tipleri olan SRE, SRA ve

SRG, yağ asiti içeriği bakımından farklılıklar gösterir. Bu SR'lerdeki yağ asitleri sırasıyla, 3-hidroksi dodekanoik asit, 3-hidroksi dekanoik asit ve 3-hidroksi tetradekanoik asittir. Sringomisinler, bitki dokularında nekroza neden olur. Amfipatik yapıdaki molekül başlıca hedefi olan konakçı hücrenin zarında K⁺, H⁺ ve Ca⁺ gibi katyonların serbestçe geçebileceği kanallar açar. SR, amfipatik yapısı nedeniyle aynı zamanda biosurfaktan aktiviteye de sahiptir. SR ve benzeri lipodepsinonapeptidler antifungal aktivite de gösterirler.

Sringopeptinler (SP) ise 22 veya 25 amino asit içeren lipodepsipeptidlerdir (Şekil 1b). Bu bileşikler de fitopatogenik olmalarına rağmen antifungal aktiviteye sahip değildirler (3).

¹ Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

³ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

* Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenen TBAG-AY/133 sayılı projenin bir kısmıdır



Şekil 1. Sringomisin ve Sringopeptinlerin Yapıları

Son yıllarda fungal enfeksiyonlardaki artış nedeniyle antifungal ilaçların geliştirilmesi çalışmaları önem kazanmıştır. Bu çalışmanın amacı, elimizdeki suşun ürettiği toksinleri kısmen saflaştırmak ve biyolojik aktivitelerini incelemektir.

ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER

Kullanılan bütün kimyasallar analitik saflıktadır. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B359 suşu, *Geothricum candidum*, sringomisin E ve sringopeptin 22A Berlin Teknik Üniversitesi, Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Enstitüsünden sağlanmıştır.

Besi Yerleri (2):

Maya ekstresi-tripton sıvı besi yeri: % 0.8 tripton, % 0.5 maya ekstresi, % 0.25 NaCl içerir.

Maya ekstresi-tripton katı besi yeri: Maya ekstresi sıvı besi yerine % 1.5 agar eklenerek hazırlanır.

Patates dekstroaz agar: % 2.5 patates, % 1 dekstroaz, % 0.15 agar içerir.

Minimal besi yeri: 10 mM fosfat tamponu, pH 7.0, % 1 mannitol, % 0.4 L-histidin, % 0.02 MgSO₄, % 0.002 FeSO₄.7H₂O, % 0.001 CaCl₂.2H₂O içerir.

Organizmanın üretilmesi:

Pseudomonas syringae pv. *syringae* B359 suşu enzim kaynağı olarak kullanılmış, maya ekstresi-tripton katı besi yerinde üretilmiştir. Toksin

üretimi için, hücreler maya ekstresi-tripton sıvı besiyerinde 24 saat ön kültür yapıldıktan sonra 200 ml minimal besi yeri içeren 500 ml'lik yanaklı erlenmeyer kaplarında 26°C'de, 150 rpm'deki çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Ön çalışmalarda, bu şartlarda 40 saate kadar hücrelerin çoğaldığı ve antibiyotik ürettiği görüldüğünden SR ve SP'nin kısmen saflaştırılması amacıyla hücreler bu şekilde 30-40 saat inkübe edilmiştir.

Antifungal Aktivite Çalışmaları:

Antibiyogram: Patates dekstroaz agara karıştırılmış *Geothricum candidum* petri kabına dökülmüş, örnekler disklerle emdirilip petri kaplarının üzerine yerleştirilmiş ve 24 saat sonra büyüme inhibisyonu gözlenmiştir (1).

Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK): Çalışılan maddelerin antifungal aktivitesi NCCLS önerilerine göre mikrodifüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Referans ve kalite kontrol suşları olarak *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ve *Candida krusei* ATCC 6258 kullanılmıştır (4).

Candida suşları Sabouraud Dekstroaz agarda 35°C'de 24 saat inkübe edilmiş, 0.5 Mc Farland süspansiyonuna eşdeğer bulanıklığa ayarlanmış ve 3-[N-morfolino]-propansulfonik asit tamponu içeren RPMI-1640 besiyerinde final inokulum konsantrasyonu 0.5-2.5x10³ cfu/ml olacak şekilde ileri seyreltmeler yapılmıştır. Standart antifungal bileşik olarak flukonazol kullanılmıştır.

35°C'de 48 saat inkübasyondan sonra, bu süre sonunda minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri belirlenmiştir.

Protein ve peptid ölçümü: Protein ve lipodepsipeptidlerin konsantrasyonu Bradford metoduna göre ölçülmüştür (5). Standart olarak sığır serum albumini kullanılmıştır.

Tablo 1. CM32 Kromatografisi Zirvelerinin MİK Değerleri ve TLC Bulguları

CM32 kromatografisi:	Hacim ml	Protein (µg/ml)	MİK (µg/ml)		TLC fraksiyonları
			CP	CK	
bağlanmayan fraksiyon	84.8	23.2	0.18	1.50	1,2,3,4,5,6
asitle elüe olan 1. zirve	1.1	2.4	>2.40	>2.40	2
" " " 2. zirve	1.1	1.6	0.05	0.10	2,3
" " " 3. zirve	1.1	5.6	0.18	0.35	3,5
" " " 4. zirve	1.1	2.4	0.15	0.30	3,5
" " " 5. zirve	1.1	9.6	0.15	0.60	4,6
" " " 6. zirve	1.1	7.2	0.45	0.20	1,4,6

TLC Fraksiyonlarının Rf Değerleri:

1: 0,058, 2: 0,176, 3: 0,279, 4: 0,297, 5: 0,435, 6: 0,536

(CP: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, CK: *Candida krusei* ATCC 6258)

BULGULAR VE TARTIŞMA

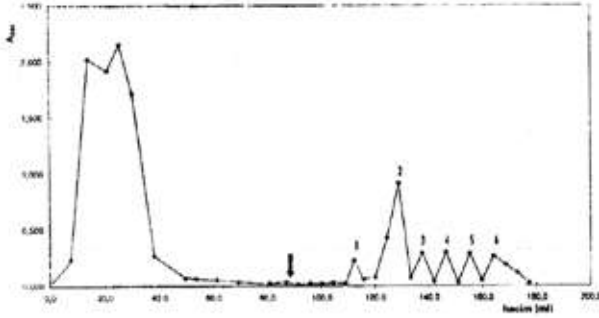
Sringomisinler ve sringopeptinlerin kısmen saflaştırılması:

Toplam 1 litre minimal besiyerinde aktif olarak antibiyotik sentezleyen hücreler 5000xg de santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Santrifüj üst sıvısı % 85 amonyum sülfat doygunluğuna getirilip çöktürüldü. Bu şekilde üst sıvıdaki peptid ve proteinlerin tamamının çökmesi sağlandı. Çökelti, 19 ml 50 mM potasyum fosfat tampon pH 7.0'de çözülüp, aynı tampona karşı bir gece diyaliz edildi. Toplam hacmi 22.0 ml olan dializatın protein içeriği 149.6 mg olarak ölçüldü. 6N HCl ile diyalizatın pH'sı 2 ye düşürüldü ve eşit hacimde aseton eklenip, bir gece soğukta bekletildi. Santrifüjleme ile çökelti uzaklaştırıldı. Süpernatanttaki asetonun buharlaşması sağlandıktan sonra 18.5 ml toplam hacimde, 14.6 mg protein kaldığı belirlendi. Bu kademedeki protein bakımından yaklaşık 10 kez saflaşma elde edildiği görüldü. Bu aseton ekstraktı örneğinin aktivitesini +4°C'de uzun süre koruduğu, amonyum sülfat kesiti sonrası dializ edilen örneğin ise aktivitesini çok kısa sürede kaybettiği görüldü. 16 ml aseton ekstraktı örneği, 1.6x5.5 cm boyutlarındaki CM 32 kolonuna 16ml/saat akış hızıyla uygulandı. Kolon, pH 3 HCl ile yıkanarak fraksiyonlar toplandı. Şekil 2'de CM 32 elüsyon

profili görülmektedir. Asit pH'da yıkanan kolondan, başlıca 6 zirve halinde peptidler elüe edildi. Kolon eluatlarında belirli aralıklarla *Geothricum candidum* kullanılarak büyüme inhibisyonunun gözlemlendiği biyolojik aktivite taraması yapıldı. CM 32 de elde edilen tepe noktaları ince tabaka kromatografisi (TLC) ile n-butanol:su:asetik asit (5:4:1) solvent sistemi kullanılarak ayrıldı ve ayrılan fraksiyonlar % 0.2 ninhidrin ile renklendirildi. Kolona uygulanan örnekte belli başlı 6 TLC fraksiyonunun bulunduğu, her bir zirvenin bir veya birden fazla TLC fraksiyonu içerdiği gözlemlendi. Kolona bağlanmadan elüe olan fraksiyonda da daha az yoğunlukta olmakla beraber, kolona giren bütün TLC fraksiyonları gözlemlendiğinden, kolona bağlanma kapasitesinin üzerinde protein uygulandığı düşünüldü. Sonuçlar tablo 1'de görülmektedir. Elimizde var olan standartların Rf değerleri ile karşılaştırıldığında birinci TLC fraksiyonunun SRE'ye ve ikinci fraksiyonun SP22A'ya ait olduğu görülmüştür. TLC sonuçları 1. zirve dışındaki zirvelerde peptidlerin birbirinden tam olarak ayrılmadıklarını göstermektedir. Bu sonuçlara bakarak, CM32 kolonundan elde edilen 1. zirvenin SP22A'ya ait olduğu; SRE'nin 6. zirvede elüe olmaya başladığı fakat, 4. ve 6. TLC fraksiyonlarından tamamen ayrılamadığı; 2. zirvenin 3 no.lu, 3. zirvenin 5 no.lu TLC



fraksiyonlarına ait olduğu, bunların da birbirinden tamamen ayırlamadığı düşünülmüştür.



Şekil 2. CM32 Elüsyon Profili. Kolon boyutları: 1,6x5,5 cm, akış hızı: 16 ml/saat. PH3 HCl ile elüsyon başlangıcı ok ile gösterilmiştir. 1-6 no.lu zirvelerde antifungal aktivite araştırılmış ve ince tabaka kromatografisi yapılmıştır.

Bu örneklerde standart *Candida* suşlarından *Candida parapsilosis* (CP) ve *Candida krusei*'ye (CK) karşı antifungal aktiviteler incelenmiş ve MİK değerleri tesbit edilmiştir. Birinci zirve dışındaki bütün fraksiyonlarda antifungal aktivite bulunmuştur. Sringopeptinlerin antifungal aktivite göstermediği bilinmektedir. Bu bulgu da birinci zirvenin SP22A'ya ait olduğunu doğrulamaktadır. 3-6. Fraksiyonlar birbirinden ayırlamadığından ve hepsi de antifungal aktivite gösterdiğinden, bunlardan hangilerinin SR ve hangilerinin SP olduğunu tahmin etmek mümkün olamamıştır. Rf değerinden sringomisin E olduğu düşünülen 1. TLC fraksiyonunu içeren 6. zirve için MİK değerleri CP'ye karşı 0.45 mg/ml, CK'ya karşı ise 0.20 mg/ml olarak tesbit edilmiştir. MİK değeri bulgularından SRE'nin antifungal aktiviteye sahip

olduğu görülmektedir. Aynı bakterinin B301 suşundan elde edilmiş SRE ile yapılan bir çalışmada MİK değerleri CP için 2.5 ve CK için 10 mg/ml olarak belirtilmektedir (6). Bu bulgular bizim 6. zirve için elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Fraksiyonların birbirinden daha iyi bir şekilde ayrılması ve daha ileri saflaştırma eldesi için çalışmalar devam etmektedir.

KAYNAKLAR

1. GROSS, D.C.; & DEVAY, J.E. ; Chemical properties of syringomycin and syringotoxin:Toxicogenic peptides produced by *Pseudomonas syringae*. J. Appl. Bacteriol., 43:453*463, 1971
2. BALLIO, A; BARRA, D., BOSSA, F., DeVAY, J. E., GRGURINA, I., IACOBELLIS, N.S., MARINO, G., MONETI, G., PUCCI, P., SIMMACO, M. & SURICO, G. Multiple forms of syringomycin, *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 33: 493-496, 1988
3. BENDER, C.L., ALARCON-CHAÍDEZ, F., GROSS, D.C. ; *Pseudomonas syringae* Phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63: 266-291, 1999
4. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Tentative Standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M27-T. Vol.15, No.10, 1995, Villanova, BA
5. BRADFORD, M.M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248*254, 1976
6. SORENSEN, K.N., KIM, K-H, TAKEMOTO, J.Y; In vitro Antifungal and fungicidal activities and erythrocyte toxicities of cyclic lipodepsinonapeptides produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2710-2713