التحري عن دور إنزيم تحلل الالجنيت Alginate lyase في انتاج الالجنيت في جرثومة *Pseudomonas aeruginosa*

غادة عبد الرزاق محمد الطائي ، اميرة محمود محمد الراوي

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

(تاريخ الاستلام: ١٨ / ٤ / ٢٠١٠ ---- **تاريخ القبول:** ١٣ / ١٢ / ٢٠١٠ **)**

الملخص:

استهدف البحث الكشف عن دور انزيم محلل الالجنيت Alginate Lyase في جرثومة *P.aeruginosa* ذات النمط المظهري المخاطي المعزولة من حالات سريرية مختلفة باستخدام مادة Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) بتركيز ٥ ملي مولر وبالاستعانة بالمجهر الالكتروني النافذ ، و اظهرت الصور المجهرية أن خلايا جرثومة *P.aeruginosa* في وقت الصفر أي لحظة التعرض لمادة IPTG كانت ذات تركيب مظهري خلوي طبيعي وبعد مرور ساعتين من التعرض بدت مناطق انفصال بين الغشاءين الداخلي والخارجي وازدادت منطقة الانفصال بعد اربع ساعات ثم تحللت معظم الخلايا بعد ست ساعات من التعرض حيث تراكم الالجنيت في البريبلازم في السلالات الفاقدة لهذا الانزيم مما ادي بالنهاية الى انفجار الخلية.

المقدمة

تقع جميع جينات البناء الحيوي للالجنيت على الكروموسوم، اذ يسهم ٢٤ جيناً على الاقل في البناء الحيوي للالجنيت فضلا عن جينات تنظيمية تشفر لبروتينات مثل عامل سكما البديل (1) وعلى اية حال فان معظم الجينات تنتظم في ثلاث عناقيد رئيسة واقعة تقريباً عند الدقائق ٩ و ٣٤ و ٦٨ على كروموسوم جرثومة *P.aeruginosa* (2).

تقع كل الجينات المشفرة لعملية البناء الحيوي الفعلي للالجنيت عند الدقيقة ٣٤ مشكلة منظومة البناء مكونة من اثني عشرة جيناً وترتيبها حسب اتجاه الاستنساخ مبتدئاً بالجين *alg*D ومنتهية بالجين *alg*A ويكون التعبير تحت سيطرة الممهد *alg*D promoter وتعمل بشكل منظومة وهذه الجينات هي : *algD* ، *alg8* ، *alg44* ، *algK* ، *algE* ، *algG* ، *algX* ، *algL* ، *algI* ، *algJ* ، *algF* ، *algA* . (4 , 3)

تشفر هذه الجينات التركيبية للالجنيت لبروتينات تركيبية وأنزيمية متعددة إذ يشفر الجين *alg*D لأنزيم Guanosine diphosphate (GDP)-mannose dehydrogenase (5).

ويشفر الجين *alg*8 لبروتين غشائي يفترض على انه انزيم البوليمريز ، كما يشفر الجين *alg*44 لبروتين غشائي ضروري لانتاج الالجنيت(6). فيما يشفر الجين *alg*K لبروتين بيربلازمي مطلوب لتكوين متعدد تام صحيح (7). ويعد الجين *alg*E مشفراً لبروتين الغشاء الخارجي AlgE الذي من خلاله يحدث الافراز للبوليمر (8). بينما يكون ناتج *algG* مرتبطاً بيربلازمياً ويشفر لأنزيم C_5-mannuronan epimerase ويحمي متعدد الالجنيت من فعالية الأنزيم الحال alginate lyase (AlgL) (9).

ويشابهه ناتج الجين *algX* الذي يكون بروتين بيربلازمي مطلوب لتكوين متعدد تام . وكان من المفاجئ ما وجده Schiller وآخرون (١٩٩٣) حول دراسة عن *algL* المشفر لأنزيم Alginate lyase (AlgL) وهو الأنزيم المحلل للالجنيت وهو وقوعه خلال المنظومة الجينية للبناء الحيوي للالجنيت ، وتسهم نواتج الجينات الثلاث *algI* و *algJ* و *algF* في عملية أستلة O-actylation الالجنيت (10) .

وأخيراً يشفر جين *alg*A لأنزيم ثنائي الوظيفة إذ يعمل كأنزيم Phosphomannose isomerase وأنزيم GDP-mannose pyrophosphorylase (11) .

ويعد *alg*C أحد جينات البناء الحيوي للالجنيت ويكون واقعاً عند الدقيقة ١٠ في خريطة *P.aeruginosa* PAO ويتم استنساخه بشكل مستقل عن منطقة الدقيقة ٣٤ (12) .

يشفر جين *alg*D لأنزيم GDP-mannose (GMD) dehydrogenase الذي يعمل كأنزيم محدد للنمو في السلالات المخاطية عن طريق تحفيز تحويل الـ GDP-mannose إلى GDP-mannuronic acid لذلك تلزم الخلية لانتاج الالجنيت (13) .

وبذلك تكون قد شفرت الجينات A و C و D للأنزيمات المطلوبة لبناء الوحدات الاولية للالجنيت وهو GDP-mannuronic و حالما يتكون GDP-mannuronic acid فإنه يتبلمر وينتقل عبر الغشاء الداخلي عن طريق اتحاد مُفترض لنواتج الجينات *alg8* و *alg44* . ويحدث بعد البلمرة تناظر pimerization لبعض وحدات Mannuronate لتتحول إلى وحدات Guluronate عن طريق الأنزيم C-5- (AlgG) epimerase (14, 15).

وقد اقترح نموذج مكوك (Scaffold) في موقع تداخل بروتين AlgG في البربلازم بشكل مباشر مع بروتين AlgK من أجل حماية متعدد الالجنيت النامي من الانحلال بأنزيم تحلل الالجنيت Alginate lyase(AlgL) (16) .

واقترحت دلائل حديثة بأن AlgX احتمال أن يكون جزءاً من النموذج المكوك Scaffold البيربلازمي (7) .

ويعد دور أنزيم تحلل الالجنيت غير واضحٍ على الرغم من وجود دليل ان الالجنيت سرعان ما يتحلل ويختلف في الحجم في السلالات المخاطية التي تعبّر بدرجة عالية عن AlgL معطية دعماً للفرضية

بان هذا الأنزيم المحلل قد يجهز قطعاً منقوصة قصيرة Oligomers التي قد تُبدئ عملية البلمرة Epimerization (14) .

بعد التناظر تحدث عملية الأسئلة لبعض وحدات mannuronate عند الموقع الثاني أو الثالث لذرة الأوكسجين عن طريق نواتج الجينات الثلاث *algF* و *algJ* و *algI* التي قد تشكل معقداً من الغشاء وتخدم كمركز تفاعلي لعملية الأسئلة O-acetylation (10). وبعد الانتهاء من هذه العملية فإن البوليمر يُنقل خارج الخلية من خلال بروتين الغشاء الخارجي AlgE البروتين المشابه للبورين (17) .

المواد و طرائق العمل

الكشف عن دور إنزيم تحلل لالجنيت Alginate lyase(AlgL) في انتاج الالجنيت :

من اجل ابراز دور انزيم Alginate lyase في انتاج الالجنيت اجري ما يأتي اعتماداً على طريقة الباحثين (١٨) :

- حُضر وسط مرق Luria-Bertani (LB) (المحضر من تربتون ١ % ، مستخلص الخميرة ٠,٥ %، كلوريد الصوديوم ٠,٥ %) ، وُزع في انابيب بلاستيكية وعُقمت بالموصدة
- أُضيف محلول من مادة Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) التي تم الحصول عليها من شركة US Biological الامريكية وهي مادة كربوهيدراتية بشكل مسحوق بلوري ابيض تم اضافتها لغرض حث انتاج الالجنيت والتحري عن دور انزيم تحلل الالجنيتAlgL ،بحيث يكون تركيزها النهائي ٥ ملي مولر في الوسط .
- لُقحت مكررات من انابيب وسط مرق LB الحاوية على مادة IPTG بمزارع حديثة لجرثومة *P.aeruginosa* المخاطية النامية في الطور اللوغارتمي ،حُضنت المزارع بدرجة ٣٧ م وأُخذت نماذج من المكررات بفترات زمنية مختلفة هي بداية التلقيح وقت الصفر Zero time وبعد ساعتين وبعد اربع ساعات وبعد ست ساعات من التعرض لمادة IPTG .
- رُسبت بجهاز الطرد المركزي عند سرعة واطئة ٣٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٥ دقيقة ، أُهمل الراشح وغُسل الراسب بالمحلول الملحي الفسلجي، أُجريت بعدها خطوات التحضير للفحص بالمجهر الالكتروني النافذ Transmission Electron Mcroscopy-CM10 SEM515 نوع Philips هولندي المنشأ، في بغداد/ جامعة النهرين / وحدة المجهر الالكتروني . وكما موضح بالخطوات الآتية :

التحضير للمجهر الالكتروني النافذ :

تمت عمليات التثبيت والتجفيف والطمر لخلايا جرثومة *P.aeruginosa* اعتمادا على (١٩) إذ تم عمل كرات Pellets واجراء خطوات متعددة تلتها عمليتي التقطيع والتصبيغ للعينات اعتمادا على (٢٠) وبعد الانتهاء منها فحصت بوساطة المجهر الالكتروني النافذ من نوع Philips EM 510 باستخدام فولتية عالية ٦٠ كيلو فولت .التقطت الصور على فلم خاص وتم تحميض الأفلام وطبع الصور في مختبرات المجهر الالكتروني في كلية الطب/جامعة النهرين/بغداد .

النتائج والمناقشة

نتائج الكشف عن دور انزيم تحلل الالجنيت Alginate Lyase (AlgL) في انتاج الالجنيت:

استخدمت مادة IPTG بمحلول تركيزه ٥ ملي مولر في وسط مرق LB من اجل حث انتاج الالجنيت والكشف عن دور انزيم AlgL في انتاجه وبعد تلقيح الجرثومة والتحضين لفترات زمنية تضمنت وقت الصفر وبعد ساعتين وبعد اربع ساعات وبعد ست ساعات وترسيب الخلايا بهدف تحضير نماذج منها للفحص بالمجهر الالكتروني النافذ اوضحت النتائج ان خلايا جرثومة *P.aeruginosa* في وقت الصفر. أي عند التعرض المباشر (الآني) للحث بمادة IPTG بدت ذات تركيب خلوي ومظهري طبيعي كما في الصورة (١)، وبعد مرور ساعتين من التعرض للحث بمادة IPTG توضح الصورة (٢) ان هناك مناطق من الانفصال ما بين الغشائين الداخلي والخارجي قد يدل على حدوث طفرة في الجين المشفر لانزيم AlgL، اما بعد اربع ساعات من المعاملة بمادة IPTG فيلاحظ انتفاخ منطقة البريبلازم بشكل ملحوظ وهذا ما توضحه الصورة (٣) اذ ان التراكم في مركب الالجنيت في منطقة البريبلازم سبب انفصالاً واضحاً ما بين الغشائين الداخلي والخارجي للخلايا فيما تظهر الصورة (٤) تحلل واضح لمعظم الخلايا بعد حثها بالمعاملة بمادة IPTG بعد ست ساعات.

جاءت هذه النتائج مطابقة لما حصل عليه الباحثان(١٨) واقترحا من خلال نتائجهما بان فقدان في وجود بروتين AlgL (انزيم تحلل الالجنيت Alginate lyase) في العزلة المخاطية منع متعددات الالجنيت المتكونة حديثا في البيربلازم من ان تنقل خلال الغشاء الخارجي والتي بالنهاية قادت الى تراكم الالجنيت في البيريبلازم وتسببت في انفجار للجدر الخلوية من شدة الضغط Pressure.

ان دور الانزيم المحطم للالجنيت خلال مسار البناء الحيوي – افراز الالجنيت Alginate biosynthesis – Secretion pathway ليس بديهيا ولهذا عدت وظيفته الى حد ما مثيرة للجدل فهو ربما يسيطر على طول البوليمر المنتج (21). او ربما يكون مهما كذلك في تسريع انتشار الجراثيم، وان التعبير المفرط من جين *algL* يقع في جرثومة *P.aeruginosa* المخاطية يؤدي الى نقصان في طول متعدد الالجنيت وازدياد في الانفصال الجرثومي من الاسطح اللاصقة adherent surface مع ان جين *algL* يقع في منظومة البناء الحيوي للالجنيت، لذلك فهو يساعد في التعبير مع انزيمات البناء الحيوي له، فقد بدا مسؤولاً من خلال ان بروتين AlgL البيربلازمي ربما يكون جزءاً من عملية البلمرة Polymerization او من معقد النقل في البيربلازم (22) .

فيما سجلت احدى الدراسات ان بروتين AlgL في جرثومة *P.aeruginosa* لا يكون مطلوبا لانتاج الالجنيت من قبل الجرثومة

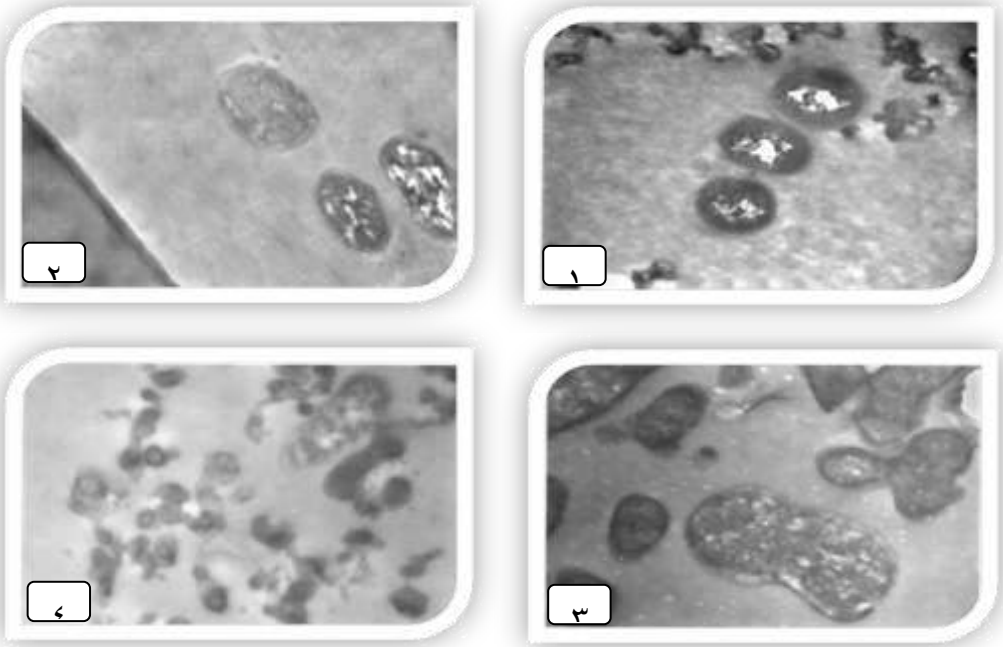
(23)، إلا انه في عزلة اخرى لجرثومة *P.aeruginosa* سالبة لانزيم تحلل الالجنيت lyase-negative فقد اظهرت عدم مخاطيتها وانتجت فقط كميات قليلة منه (14).

وفي دراسة للباحثان (١٨)اللذان اختبرا تأثير طفرة Δ*algL* غير القطبية nonpolor في سلالة FRD1، السلالة السريرية العائدة لجرثومة *P.aeruginosa* المعزولة من مرضى التليف الكيسي العالية المخاطية (+Alg)، لاحظا انه عندما اعيد تنشيط منظومة *algD* باستخدام مادة IPTG في طافرات *algL*، تحللت الخلايا خلال ساعات قليلة اذ اظهر المجهر الالكتروني النافذ بمرور الزمن انفصال تطوري للغشائين الخارجي والداخلي، مع تجمع الالجنيت في البيريبلازم والذي قاد بالنهاية الى تمزق الخلايا، كما قاما بالكشف عن الالجنيت في راشح خلايا مزارع FRD1300 المتحللة مما دل على ان AlgL لم يكن مطلوبا في انتاج الالجنيت. ولتفسير هذه النتائج فقد اقترحا أنموذجا للبناء الحيوي للالجنيت والذي فيه بروتين AlgL يمتلك وظيفة انزيمية كأنزيم محلل للالجنيت ودور تركيبي كمكون لجهاز النقل البيريبلازمي، او Scaffold في جرثومة *P.aeruginosa* المخاطية .

واشارت دراسات سابقة ان بروتين AlgG البيريبلازمي هو ايضا يمتلك وظيفة مزدوجة اذ يمتلك نشاطاً انزيمياً (بمعنى اخر Polymers level C-5 mannuronan epimerase) ودوراً تركيبياً في حماية متعدد الالجنيت المتكون حديثا من الهجوم الانزيمي من قبل انزيم تحلل الالجنيت AlgL (24, 9) .ويعد بروتين Algk بروتين دهني افتراضي في البيريبلازم، الذي يكون مطلوبا لحماية المتعدد من الهجوم الانزيمي من قبل انزيم تحلل الالجنيت (16).

وتمتلك طافرات AlgX نمط مظهري مشابه لذلك فالطافرات الفاقدة لل AlgX, AlgK, AlgG تنتج بوليمرات تفشل لتفرز خارجا، الا انها سرعان ما تتحلل من قبل بروتين AlgL (7).

وجدت مستويات عالية من احماض اليورنك Uronic acids – الواطئة الوزن الجزيئي التي تعد نواتج تحلل الالجنيت – في راشح الزرع لهذه الطافرات. لذلك نموذج المكوك Scaffold للالجنيت يضم على الاقل AlgX, AlgK, AlgG وعلى الاغلب AlgL وان AlgL يلعب دوره الاساسي في تحطيم الالجنيت الذي يتراكم في البيريبلازم تحت ظروف مخاطية عالية كما يمتلك دوراً في نقل المتعدد عبر الغشاء الخارجي (18).



الصورة (١): خلايا جرثومة *P.aeruginosa* بالشكل الطبيعي قوة التكبير 24500X .

الصورة (٢): خلايا جرثومة *P.aeruginosa* بعد ساعتين من الحث باضافة مادة IPTG، حدوث انفاصل بين الغشائين الداخلي والخارجي قوة التكبير 24500X .

الصورة (٣): خلايا جرثومة *P.aeruginosa* بعد اربع ساعات من الحث باضافة مادة IPTG، حدوث انتفاخ منطقة البريبلازم. بقوة التكبير 41000X .

الصورة (٤): خلايا جرثومة *P.aeruginosa* بعد ست ساعات من الحث باضافة مادة IPTG، حدوث تحلل لمعظم الخلايا قوة التكبير 16000X.

المصادر

1- Yu, H., Schurr, M. J. & Deretic, V. (1995). Functional equivalence of *Escherichia coli* sigma(e) and *Pseudomonas aeruginosa* AlgU - *Escherichia coli* RpoE restores mucoidy and reduces sensitivity to reactive oxygen intermediates in AlgU mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 177: 3259-3268.

2- Schweizer, H. P., Po, C. & Bacic, M. K. (1995). Identification of *Pseudomonas aeruginosa glpM*, whose gene-product is required for efficient alginate biosynthesis from various carbon sources. J Bacteriol 177, 4801-4804.

3- Deretic, V., Gill, J. F. and Chakrabarty, A. M. (1987). Gene *algD* coding for GDP-mannose dehydrogenase is transcriptionally activated in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 169:249–257.

4- Chitnis, C. E. & Ohman, D. E. (1993). Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operonic structure. Mol Microbiol 8, 583-590.

5- Snook, C.F., Tipton, P.A., and Beamer, L.J. (2003) Crystal structure of GDP-mannose dehydrogenase: a key enzyme of alginate biosynthesis in *P. aeruginosa*. Bio. Chem. 42:4658–4668.

6- Maharaj, R., May, T. B., Wang, S.-K. & Chakrabarty, A. M. (1993). Sequence of the *alg8* and *alg44* genes involved in the synthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa.* Gene 136,267-269.

7- Robles-Price, A., Wong, T. Y. Sletta, H. Valla, S. and Schiller, N. L. (2004). AlgX is a periplasmic protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 186:7369-7377.

8- Chu, L., T. B. May, Chakrabarty, A. M. and Misra, T. K. (1991). Nucleotide sequence and expression of the *algE* gene involved in alginate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. Gene 107:1–10.

9- Jain, S., M. J. Franklin, H. Ertesvag, S. Valla, and D. E. Ohman. (2003). The dual roles of AlgG in C-5-epimerization and secretion of alginate polymers in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 47:1123-1133.

10-Franklin, M.J., and Ohman, D.E. (2002). Mutant analysis and cellular localization of the AlgI, AlgJ, and AlgF proteins required for O acetylation of alginate in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 184: 3000–3007

11- Shinabarger, D., Berry, A. May, T. B. Rothmel, R. Fialho, A. and Chakrabarty. A. M. (1991). Purification and characterization of phosphomannose isomerase-guanosine diphospho -D- mannose pyrophosphorylase. J. Biol. Chem. 266:2080–2088.

12-Gacesa, P. (1998). Bacterial alginate biosynthesis-recent progress and future prospects. Microbiol. 144: 641-652.

13-Govan, J.R.W., and Deretic, V. (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev 60: 539–574.

14-Monday, S.R., and Schiller, N.L. (1996) Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: the role of AlgL (alginate lyase) and AlgX. J Bacteriol 178: 625–632.

15-Ramsey, D. M. & Wozniak, D. J. (2005). Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis.Mol. Microbiol. 56: 309-322.

16-Jain, S., and Ohman, D.E. (1998) Deletion of *algK* in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* blocks alginate polymer formation and results in uronic acid secretion. J Bacteriol 180: 634–641.

17-Rehm, B.H., and Valla, S. (1997) Bacterial alginates: biosynthesis and applications. Appl Microbiol Biotechnol 48: 281– 288.

18-Jain, S., Ohman, D. E. (2005). Role of an Alginate Lyase for Alginate Transport in Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. J. Infect. Immun. 73: 6429-6436.

19-Torikata, C. (1988). The Ciliary Necklace-Atransmission electron microscopic study using tannic acid-containing Fixation. J- Ultra & Mollec-Strus0 Res. 101:210-214.

20-Cruickshank, R., Duguid, J.P., Marmion, B.P., and Swain, R.H.A. (1975). Medical Microbiol., Vol.2, The Practice of Medical Microbiology.12th ed.,Churchill living stone, London.

21-May, T. B., and Chakrabarty, A. M. (1994). *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. Trends Microbiol. 2:151-157.

22-Boyd, A., and A. M. Chakrabarty. (1994). Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 60:2355-2359

23-Boyd, A., Gosh, M., May, T.B., Shinabarger, D., Keogh, R. and Chakrabarty, A.M. (1993). Sequence of the *algL* gene of *Pseudomonas aueroginosa* and purification of its alginate lyase product. Gene. 131: 1-8.

24-Franklin, M. J., Chitnis, C. E. Gacesa, P. Sonesson, A. White, D. C. and Ohman, D. E. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* AlgG is a polymer level alginate C5-mannuronan epimerase. J. Bacteriol. 176:1821-1830.

Detection of The role of enzyme alginate lyase in production of alginate in *Pseudomonas aeruginosa*

Ghada Abdul-Razzaq M. Al-Taee , Amera Mahmood M. Al-Rawi
Dept. Biology , College of scince , University of Mosul , Mosul , Iraq
(**Received:** 18 / 4 / 2010 ---- **Accepted:** 13 / 12 / 2010)

Abstract:
The role of enzyme alginate lyase in production of alginate was determined by using 5 mmol. of IPTG with Transmission EM. The photographs showed the *Pseudomonas aeruginosa* cells, at zero time of exposure were quite normal, after 2hrs. of exposure, separation of outer and inner membranes was observed, Gradually separation continued after 4 hrs. and was followed by lysis of most cell after 6 hrs. exposure.

شكر وتقدير:

نتقدم بجزيل الشكر للاستاذة الدكتورة كوكب سليم نجم لما ابدته من مساعدة في عمل خطوات التحضير للفحص بالمجهر الالكتوني النافذ وعمل كرات pellet ونتقدم بكامل التقدير لها لتيسيرها الصعوبات التي واجهتنا في هذا المجال.