

KALSIYUM İYONLARININ ESCHERICHIA COLI HEMOLİZİN AKTİVASYONUNDAKİ YERİ

THE EFFECT OF CALCIUM IONS ON THE ACTIVATION OF ESCHERICHIA COLI HEMOLYSIN

Hakan ABACIOĞLU*, Nuran YULUĞ**

Özet: Escherichia coli hemolizinin aktivasyonunda kalsiyumun yeri tartışmalıdır. Bu çalışmada kalsiyuma bağımlı ve bağımsız hemolitik aktivite in vitro koşullarda incelenmiştir. Besiyeri içindeki serbest kalsiyumun hemolizini aktive edebildiği ve bir kez aktive olduktan sonra hemolitik aktivitenin kalsiyum kelatörü EGTA ile inhibe edilemediği bulunmuştur. Buna karşın, bakteri inokülasyonundan önce, besiyeri içindeki serbest kalsiyum EGTA ile kelate edildiğinde, hemolitik aktivitenin hemen tümüyle dışarıdan ortama eklenen kalsiyum iyonlarına bağlı olduğu görülmüştür. Kalsiyum iyonlarının yalnızca hemolizin aktivasyonunda değil, molekülün stabilizasyonunda da etkili olabildiğini gösteren bulgular elde edilmiştir.

Summary: The calcium requirement for hemolytic activity Escherichia coli hemolysin is controversial. Thus, we aimed to study the calcium-dependent and independent hemolytic activity in a in vitro system. It was found that the free calcium in the cultivation medium might activate the hemolysin and once activated the hemolytic activity could not be inhibited by calcium chelator, EGTA. However, when the free calcium in the medium was chelated by EGTA before the inoculation of bacteria, the hemolytic activity was found to be almost entirely dependent upon the exogenous calcium supply to the test system. We also obtained some evidence showing that the calcium ions could take part in stabilization of this protein.

G İ R İ Ő

Hemolizin, ekstra-intestinal enfeksiyonlar oluşturan Escherichia coli (E. coli) suşları için önemli bir virülans faktörüdür (1). Hemolitik E. coli suşlarının daha virlan olması, hemolizinin granlsitler ve diğer hücreler üzerine sitotoksik etkili

* Uzm. Dr., Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.

** Prof. Dr., Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.

olmasına bağlı olabilir (2, 3, 4). Ayrıca, parçalanmış eritrositlerden açığa çıkan demir, bu suşların *in vivo* daha iyi üremelerine katkıda bulunabilir (5).

Hemolizin, hedef hücrelerde 2-3 mm çapında transmembranöz porlar oluşturur (6). Gram pozitif bakteri sitolizininin ve komplemanın aksine bu porlar monomeriktir (7).

Hemolizine bağlı sitolitik etkiyi açıklamaya yönelik ilk çalışmalar kalsiyumun aktivasyon için gerekli olduğunu göstermiştir (8). Buna karşın, daha sonra yapılan bazı çalışmalarda kalsiyumun hemolitik aktivite için gerekli olmadığı öne sürülmüştür (6, 9). Bu sonuçlar hemolitik aktivitenin EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) ya da EGTA (ethylene glycol-bis [β-aminoethyl ether]-N, N, N', N'-tetraacetic acid) ile inhibe edilmediği gözlemlerine dayanmaktadır. Bu çalışmanın amacı, tartışmalı olan kalsiyumun hemolizin aktivasyonundaki yerini irdelemektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri ve besiyerleri. Deneylerde kullanılan hemolitik *E. coli* suşu CFT 073 ve non hemolitik suş FN 414, Dr. Harry Mobley (Dept. of Medicine, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, ABD) tarafından sağlanmıştır. Suşlar, Luria-Bertoni (LB) broth içinde 37°C'de rotatuar çalkalayıcıda 200 rpm'de $A_{660} = 0.1$ oluncaya kadar inkübe edildi. Bu aşamada kültürlerden yeterli miktar alınarak 200 ml ısıtılmış LB broth içine eklendi. Kültürler 37°C'de rotatuar çalkalayıcıda 200 rpm'de inkübe edildi. Bazı deneyler için besiyeri içine 0.2 µm por çaplı filtreler (Millipore Corp. Bedford, MA, ABD) kullanılarak sterilize edilmiş 1.0 M'lık $CaCl_2$ çözeltisinden son konsantrasyonu 10 mM olacak biçimde eklendi.

Bakterilerin üreme eğrisinin çizimi. Yukarıda anlatılan koşullarda yapılan kültürlerden, besiyeri içine bakteri eklendiği an sıfır dakika olarak kabul edilerek, otuz dakikalık aralıklarla 3 ml örnek alındı. Örnekler steril iki tüpe eşit olarak dağıtıldı. Tüplerden biri 660 nm'de absorbansı okunarak üreme eğrisinin çiziminde kullanıldı. Üreme eğrisi, zamana karşı elde edilen A_{660} değerlerinin grafiği çizilerek elde edildi. Diğer tüp ise hemolitik aktivitenin incelenmesinde kullanıldı. Spektrofotometrik ölçümlerin tümü Beckman DU-80 dijital spektrofotometrede 1 cm'lik ışık yollu kuvvetler kullanılarak yapıldı.

Hemolizin sentezinin izlenmesi ve niceliksel hemolizin deneyi. Hemolitik aktivitenin izlenmesi için ayrılan tüpler 4°C'de 12000 rpm'de 5 dakika santrifüje edilip, süpernatantları 0.2 µm por çaplı filtrelerden süzülerek tümüyle bakterilerden arındırıldı. Elde edilen steril süpernatantlardan 0.2 ml alınıp, Eppendorf tüpleri içinde 0.8 ml. % 2 defibrine, üç kez yıkanmış koyun eritrositleri içeren TSK çözeltisi (Tris. Cl [pH 7.4] 10 mM, NaCl 160 mM, $CaCl_2$ 20 mM) ile karıştırıldı. Tüpler 37°C'lik su banyosunda 30 dakika tutulup, bu süre sonunda parçalanmayan eritrositler oda ısısında 12000 rpm'de 3 dakika santrifüje edilerek çöktürüldü.

Süpernatanın absorbanansı 415 nm'de okundu. Deneylerde kör olarak TSK; negatif kontrol olarak non hemolitik suşun kültür süpernatantları kullanıldı. Kalsiyuma bağımlı ve bağımsız hemolitik aktivitenin incelendiği deneylerde TSK ve TS-EGTA (Tris. Cl [pH 7.4] 10 mM, NaCl 160 mM, EGTA 10 mM) çözeltileri karşılaştırılmalı olarak çalışıldı.

Hemolitik ünitenin tanımlanması. Yukarıda anlatılan deney koşulları altında bir saatte eritrositlerden açığa çıkan 1 nanomol hemoglobin miktarı 1 hemolitik ünite (HU) olarak tanımlandı.

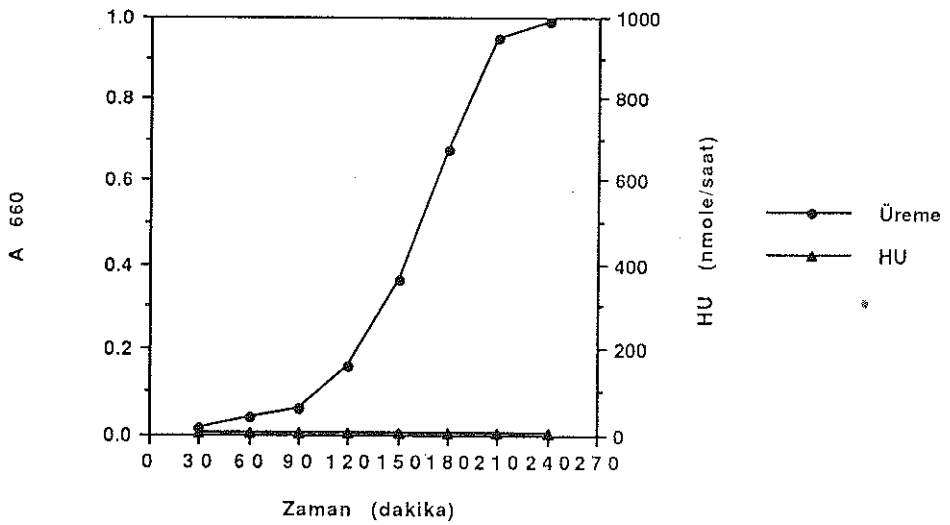
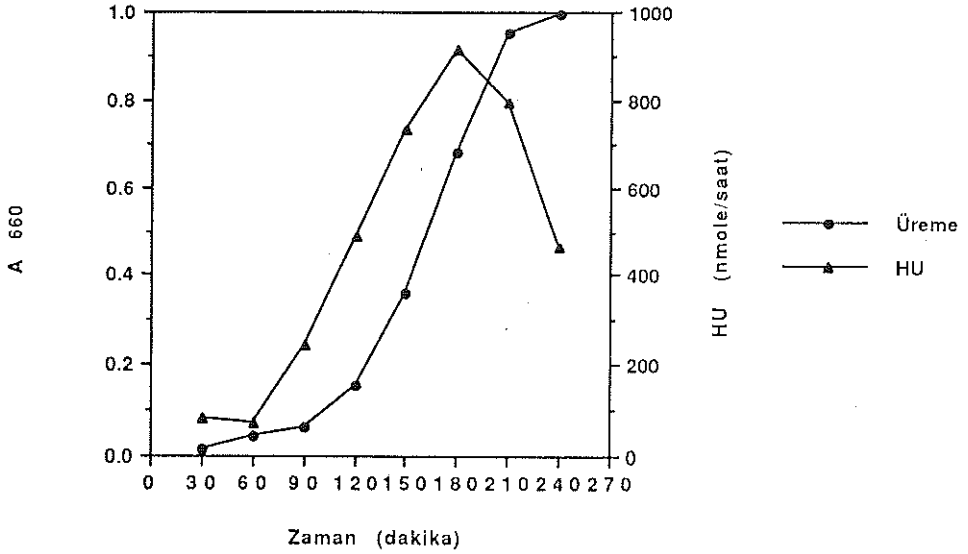
Kalsiyumun hemolizin aktivasyonu ve stabilizasyonundaki yeri. Hemolitik CFT 073 suşunun, LB broth ve içine 10 mM CaCl₂ ya da 1 mM EGTA eklenmiş LB broth içindeki üreme eğrileri ile hemolizin sentezi zamana bağlı olarak ve hemolitik aktivite TSK ve TS-EGTA içinde karşılaştırmalı olarak çalışıldı.

B U L G U L A R

LB broth içinde üretilen CFT 073, geç logaritmik faza 180. dakikada girmiş ve bölünme zamanı yaklaşık 30 dakika olarak saptanmıştır (Şekil 1-a). TSK içinde saptanan maksimum hemolitik aktivite (MHA) 921 HU bulunurken, TS-EGTA ile bu 96 HU olarak bulunmuştur (Şekil 1-b). EGTA varlığına karşın elde edilen 96 HU'lık aktivitenin LB broth içindeki serbest kalsiyumdan kaynaklanabileceği düşünülerek, besiyeri içine 1 nM EGTA katılarak serbest kalsiyum kelasyonu amaçlanmıştır (10). Bu deneylerde, besiyeri içine EGTA eklemesinin bakteri üremesi üzerine etkisi olmadığı görülmüştür. Bakterinin bölünme ve geç logaritmik faza giriş zamanı LB broth ile benzer bulunmuştur (Şekil 2-a). TSK içinde MHA 640 HU iken TS-EGTA içinde MHA 7 HU olarak saptanmıştır (Şekil 2-b). Bu, kalsiyumun varlığında hemolitik aktivitede 91.4 kat bir artışı göstermektedir. Ancak asıl dikkati çeken nokta besiyeri içine EGTA eklenmesi ile TS-EGTA içindeki MHA'nin 96 HU'den 7 HU'ye düşmesidir. Bu sonuçlar, LB broth içindeki serbest kalsiyumun hemolizin aktivasyonuna neden olduğunu ve bunun toplam aktivitenin yaklaşık % 10'undan sorumlu olduğunu göstermektedir. LB broth içindeki serbest kalsiyum EGTA ile kelate edildiğinde, ortamdaki hemolizin hemen tümüyle kalsiyuma bağımlı bir aktivasyon göstermiştir (7 HU'ye karşılık 640 HU). LB broth içindeki kalsiyuma bağımlı hemolitik aktivite referans olarak alınır (921 HU), EGTA eklenmiş LB broth kültür süpernatantlarında bulunan hemolizinin yaklaşık % 70'nin ortama kalsiyum eklenmesi ile aktive olduğu $[(640/921) \times 100]$ sonucu çıkartılabilir. Ortamdaki hemolizinin % 100'ünün aktive olmaması bu proteinin stabil olmadığını düşündürmektedir. Bu sonuçlar, kalsiyum iyonlarının yalnızca hemolizin aktivasyonunda değil, stabilizasyonunda da etkili olduğunu düşündürmektedir.

Kalsiyumun hemolizin aktivasyonundaki yerini daha iyi irdeleyebilmek için bu kez bakteri, içine 10nM CaCl₂ eklenmiş LB broth içinde üretilmiştir. Ortama

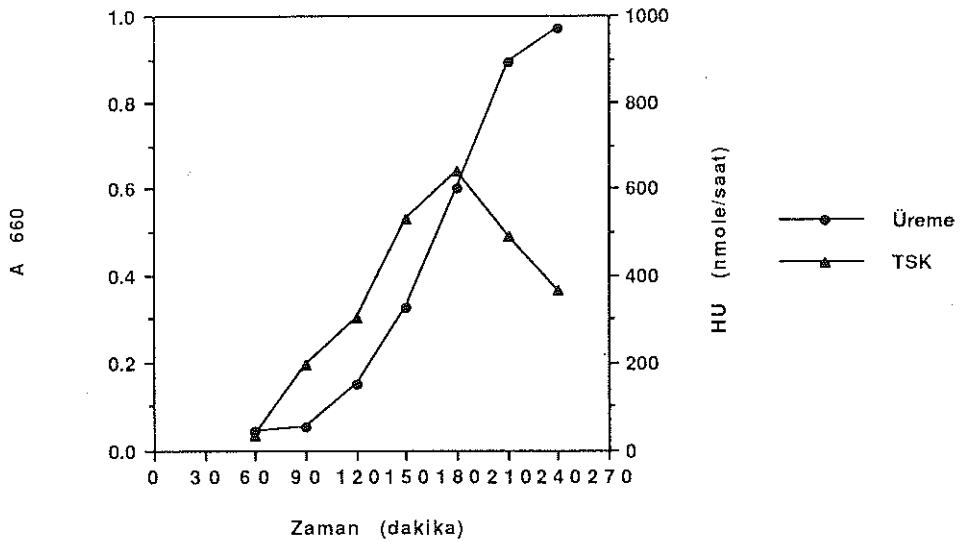
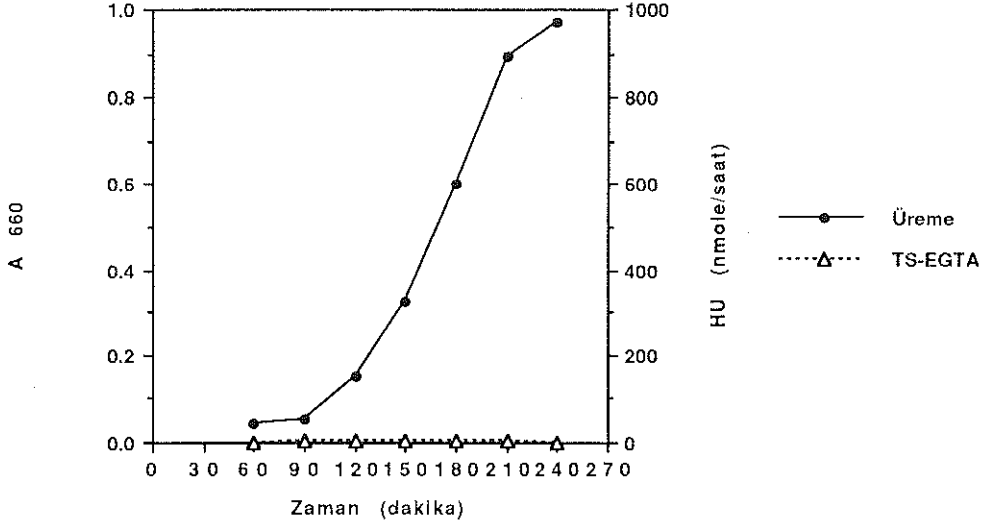
Şekil 1
CFT 073'ün (a) LB broth içindeki üreme eğrisi; (b) kalsiyuma bağımlı (TSK) ve bağımsız (TS-EGTA) hemolitik aktivitesi.



KALSİYUM İYONLARI

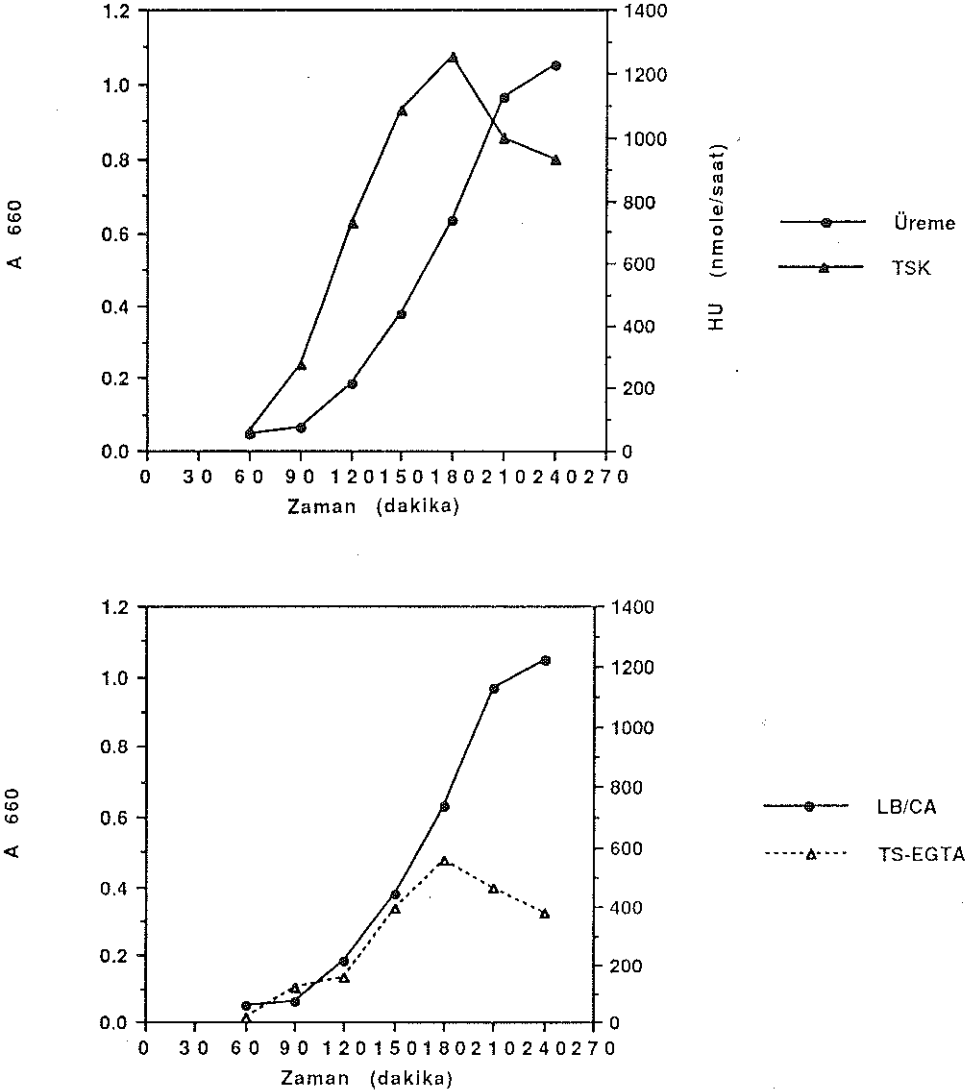
Şekil 2

CFT 073'ün (a) LB + 1 mM EGTA içindeki üreme eğrisi; (b) kalsiyuma bağımlı (TSK) ve bağımsız (TS-EGTA) hemolitik aktivitesi.



kalsiyum eklenmesinin bakteri bölünme zamanı ve geç logaritmik faza geçiş süresi üzerine etkili olmadığı bulunmuştur (Şekil 3-a). TSK içindeki MHA 1250 HU olarak bulunmuştur. Bu değer LB broth içinde elde edilenden 1.3 kat, LB + 1mM EGTA içinde elde edilenden de yaklaşık 2 kat fazladır. TS-EGTA ile deneyler yinlendiğinde MHA 555 HU olarak bulunmuştur (Şekil 3-b). Bu sonuçlar, LB

Şekil 3
CFT 073'ün (a) LB + 10 mM CaCl₂ içindeki üreme eğrisi; (b) kalsiyuma bağımlı (TSK) ve bağımsız (TS-EGTA) hemolitik aktivitesi.



broth içindeki kalsiyumun hemolizini aktive edebildiğini ve bir kez aktive olduktan sonra hemolitik aktivitenin EGTA ile inhibe edilemediğini göstermektedir.

T A R T I Ş M A

Çalışmamızda yapılan deneyler, hemolizin aktivasyonunda ve stabilizasyonunda kalsiyumun önemli bir yeri olduğunu düşündürmektedir. Bu alanda ilk yapılan çalışmalar hemolitik aktivite için kalsiyumun gerekliliğinden söz ederken (8), daha sonra yapılan bazı çalışmalarda bunun aksi sonuçlar bildirilmiştir(6, 9). Bu sonuçlar, serbest kalsiyum içeren ortamlardan elde edilen hemolitik aktivitenin 5 nM EDTA ya da 3 mM EGTA ile inhibe edilemediği gözlemlerine dayanmaktadır (9, 10). Çalışmamızda 10mM CaCl₂ eklenmiş besiyerinden elde edilen hemolizinin TS-EGTA içinde denendiğinde çok az inhibe edilmiş olması bu gözlemleri destekler nitelikte olmasına karşın aynı deneyler, 1 mM EGTA eklenmiş LB broth ile yinlendiğinde, hemolizin aktivasyonunun hemen tümüyle kalsiyuma bağımlı olduğu görülmüştür. Hemolitik aktivite için kalsiyumun gerekli olmadığı öne sürülen çalışmalarda bakterinin ya serbest kalsiyum içeren ya da içine CaCl₂ eklenmiş besiyerlerinde üretilmiş olduğu görülmektedir (6, 8). Bu nedenle, kalsiyumun hemolitik aktivite için gerekli olmadığı sonucuna katılmak zordur. Nitekim, Boehm ve arkadaşları (10, 11) hemolizin molekülünün karboksi ucunda yer alan “yineleyen dokuz aminoasitlik dizilerin” kalsiyumun bağlanma bölgesi olduğunu bulmuşlardır. Ludwig ve arkadaşlarının (12) bulguları da bunu desteklemektedir. “Yineleyen dokuz aminoasitlik dizi”de yer alan iki komşu aspartat molekülünün kalsiyum iyonlarına bağlanma bölgesi olması büyük olasılıktır (13).

KAYNAKLAR

1. Welch RA, Dellinger P, Minshew B, Falkow S: Hemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. *Nature*, 294: 665-667, 1981.
2. Gadeberg OV, Ørskov I: In vitro cytotoxic effect of alpha-hemolytic *Escherichia coli* on human blood granulocytes. *Infect Immun*, 45: 255-260, 1984.
3. Keane WF, Welch R, Gekker G, Peterson PK: Mechanism of *Escherichia coli* alpha-hemolysin induced injury to isolated renal tubular cells. *Am J Pathol*, 126: 350-357, 1987.
4. Mobley HLT, Green DM, Trifillis AL, Johnson DE, Chippendale GR, Lockett CV, Jones BB, Warren JW: Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human proximal tubular epithelial cells: Role of hemolysin in some strains. *Infect Immun*, 58: 1281-1289, 1990.
5. Lebek MG, Gruenig HM: Relation between the hemolytic property and iron metabolism in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 50: 682-686, 1985.
6. Bhakdi S, Mackman N, Nicaud J-M, Holland IB: *Escherichia coli* may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect Immun*, 52: 63-69, 1986.
7. Eberspacher B, Hugo F, Bhakdi S: Quantitative study of binding and hemolytic efficiency of *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun*, 57: 983-988, 1989.
8. Rennie RP, Freer JH, Arbuthnot JP: The kinetics of erythrocyte lysis by *Escherichia coli* hemolysin. *J Med Microbiol*, 7: 189-195, 1974.

9. Van den Bosch JF, Postma P, De Graff J, Mac Laren DM: Determination of the alpha-hemolytic activity of hemolytic urinary *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol Lett*, 8: 75-77, 1980.
10. Boehm DF, Welch RA, Synder IS: Calcium is required for binding of *Escherichia coli* hemolysin (Hly A) to erythrocyte membranes. *Infect Immun*: 58: 1951-1958, 1990.
11. Boehm DF, Welch RA, Synder IS: Domains of *Escherichia coli* hemolysin (Hly A) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes. *Infect Immun*, 58: 1959-1964, 1990.
12. Ludwig A, Jarchau T, Benz R, Goebel W: The repeat domain of *Escherichia coli* hemolysin (Hly A) is responsible for its Ca^{2+} dependent binding to erythrocytes. *Mol Gen Genet*, 214: 553-561, 1988.
13. Vyas NK, Vyas MN, Quichio FA: A novel calcium binding site in the galactose binding protein of bacterial transport and chemotaxis. *Nature*, 327: 635-638, 1987.