



Enzymatyczna degradacja laktonów acylo-L-homoseryny i jej potencjalne wykorzystanie w biokontroli i hamowaniu rozwoju infekcji

Robert Czajkowski, Sylwia Jafra

Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański i Akademia Medyczna, Gdańsk

Enzymatic degradation of acyl-homoserine lactones and its possible use in biocontrol and suppression of infection development

Summary

A large number of different bacteria populations control diverse metabolic processes through production and distribution of specific signal molecules, which concentration in the environment depends on bacteria cell density and rise when bacteria population expands. This strategy is known as quorum sensing (QS), and was first described in Gram-negative, marine bacterium *Vibrio fischeri*. QS, a mechanism of gene expression regulation dependent on bacteria cell density, is widely distributed in Gram-negative bacteria; and controls different physiological processes such as production of virulence factors, conjugal plasmid transfer, antibiotic production, replication, swarming or luminescence. QS functions *via* signal molecules: in Gram-negative bacteria, the signal molecules belong to the acyl-homoserine lactones (AHLs). It was found that many bacteria possess the ability to interfere in QS (strategy known as quorum quenching- QQ) by enzymatic degradation of AHLs. Till now, two classes of enzymes able to degrade AHLs have been described: AHL-lactonases and AHL-acylases. AHL-lactonases hydrolyze the ester bond in the lactone ring of AHLs. AHL-acylases hydrolyze the amide bond between the acyl side chain and the lactone ring in AHLs. Both reactions lead to the inhibition of signal transfer in QS as degradation products cannot act as signal molecules. QS plays a major role in pathogenesis and as such is deeply studied as a useful target for modern, antimicrobial therapy in human medicine and veterinary, as well as in biocontrol of plant diseases.

Adres do korespondencji

Sylwia Jafra,
Zakład Ochrony
i Biotechnologii Roślin,
Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii UG-AMG,
ul. Kładki 24,
80-822 Gdańsk;
e-mail:
jafra@biotech.univ.gda.pl

biotechnologia

2 (73) 49–64 2006

Key words:

acyl-homoserine lactones (AHL), biocontrol, quorum quenching (QQ), quorum sensing (QS).

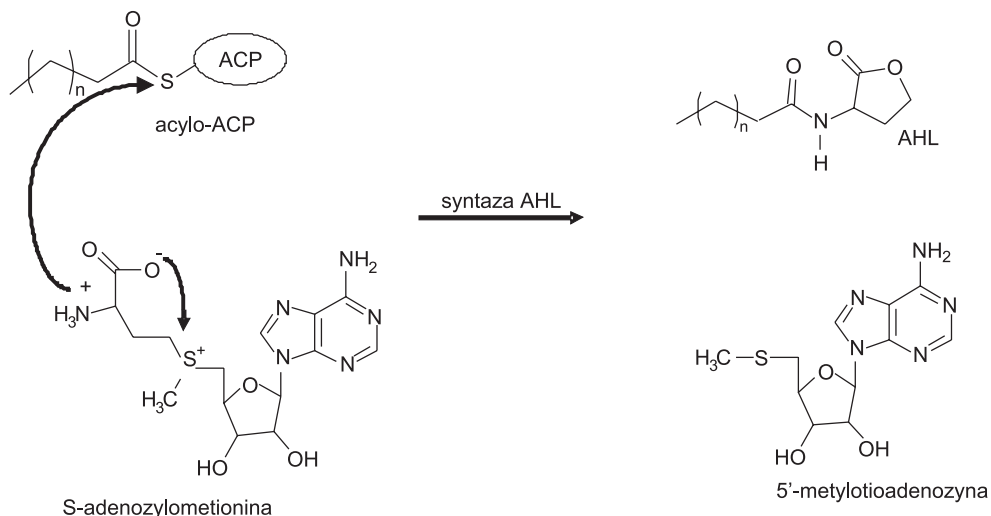
1. Wstęp

Sygnalizator zagęszczenia (QS, ang. *quorum sensing*) jest mechanizmem regulacji ekspresji genów zależnym od zagęszczenia komórek bakteryjnych w populacji. Mechanizm ten jest szeroko rozpowszechniony w świecie bakterii zarówno gramododatnich jak i gramujemnych. Bierze udział w tak różnych procesach jak: replikacja DNA bakteryjnego, bioluminescencja, produkcja enzymów i toksyn, produkcja antybiotyków, czy koniugacyjny transfer plazmidów (1). Można przypuszczać, że sygnalizator zagęszczenia bierze udział w wielu innych, jeszcze nie opisanych procesach. W mechanizmie sygnalizatora zagęszczenia, będącym formą chemicznej komunikacji pomiędzy komórkami bakterii, istotną rolę odgrywają cząsteczki sygnałowe, których stężenie zależne jest od zagęszczenia populacji bakterii. Cząsteczki sygnałowe, zwane również autoinduktorami, przemieszczają się do środowiska na drodze dyfuzji, albo są aktywnie transportowane przez błonę i ścianę komórkową z cytoplazmy do środowiska zewnętrznego. Wraz ze wzrostem liczby komórek bakterii w danym środowisku dochodzi do akumulacji autoinduktora. Wówczas gdy poziom cząsteczek sygnałowych przekroczy wartość progową tzw. „wartość kworum”, indukowana jest ekspresja genów i wywołwany jest efekt metaboliczny we wszystkich komórkach bakterii danej populacji. Najlepiej poznanymi cząsteczkami sygnałowymi mechanizmu QS są laktony acylo-L-homoseryny (AHLs, ang. *acyl homoserine lactones*), wytwarzane przez bakterie gramujemne (1).

W wielu badaniach potwierdza się, że mechanizm QS bierze udział w regulacji syntezy szeregu czynników warunkujących patogeniczność bakterii, takich jak np. pektynazy, produkowane przez bakterie z rodzaju *Pectobacterium* (dawniej *Erwinia*) czy ramnolipid, produkowany przez *Pseudomonas aeruginosa* (2-5). Ingerencja w mechanizm QS daje możliwość opracowywania nowych strategii zakłócania syntezy czynników patogeniczności, a tym samym zmniejszenia lub zahamowania infekcyjności wielu patogenów. W ostatnich latach opisano enzymy, posiadające zdolność degradacji AHL. Należą one do dwóch klas: laktonaz AHL i acylaz AHL. Białka te występują zarówno u bakterii gramododatnich (u licznych gatunków bakterii z rodzaju *Bacillus*), jak i gramujemnych (*Agrobacterium tumefaciens*, *Variovorax paradoxus*) (6-9). Enzymy te są przedmiotem wielu badań, gdyż stanowią potencjalne narzędzie przydatne w bio-kontroli patogenów roślinnych, leczeniu chorób człowieka i w weterynarii.

2. Synteza i dystrybucja AHL w komórkach bakterii gramujemnych

Substratami w syntezie AHL są: S-adenozylometionina (SAM) i grupa acylowa przenoszona przez białko ACP (ang. *acyl carrier protein*) (10,11). Boczny łańcuch cząsteczki AHL (acyłowy podstawnik) pochodzi z przemian kwasów tłuszczowych, natomiast pierścień laktonu homoseryny jest dostarczany przez S-adenozylometioninę (12,13). SAM przyłącza się do centrum aktywnego enzymu syntazy AHL. Grupa acylo-



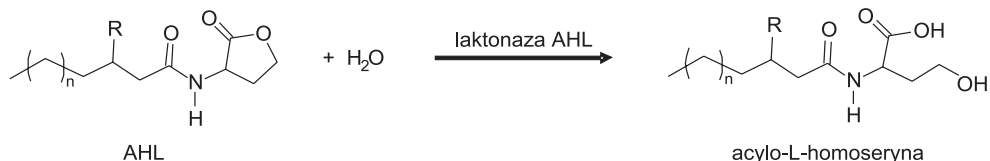
Rys. 1. Schemat syntezy AHL.

wa zostaje przeniesiona z białka acylo-ACP na kompleks enzym-SAM, gdzie tworzy wiązanie amidowe z grupą aminową SAM (11,14). W kolejnym etapie utworzone zostaje wiązanie estrowe w cząsteczce homoseryny, w wyniku czego powstaje lakton acylo-L-homoseryny. Produktem ubocznym reakcji syntezy AHL jest 5'-metylotioadenozyna (MTA) (rys. 1). Długość acylowego łańcucha bocznego cząsteczki AHL jest zależna od rodzaju i długości grupy acylowej przenoszonej przez acylo-ACP w reakcji syntezy AHL (15). Dotychczas wyizolowano i opisano 14 rodzajów AHL, różniących się długością acylowego łańcucha bocznego i obecnością podstawników (16-18).

W przeprowadzonych badaniach wykazuje się, że cząsteczki AHL, zawierające krótkie łańcuchy boczne, mogą swobodnie dyfundować przez błonę i ścianę komórkową z cytoplazmy komórek do zewnętrznego środowiska na zasadzie dyfuzji prostej (19). AHL o długich acylowych łańcuchach bocznych (dłuższych niż osiem atomów węgla) są transportowane do środowiska zewnętrznego przez specyficzne systemy transportu (np. pompę MexAB-OprM u *P. aeruginosa*) z wykorzystaniem energii pochodzącej z hydrolizy ATP (20).

3. Laktonazy AHL

Laktonazy AHL są enzymami, które hydrolizują pierścień laktonu homoseryny (rys. 2), nie naruszając przy tym wiązania pomiędzy laktonem a podstawnikiem bocznym. Rozkład pierścienia laktonu powoduje nawet 1000-krotny spadek aktywności cząsteczki sygnałowej w mechanizmie QS (7,21).



Rys. 2. Enzymatyczna hydroliza AHL przeprowadzana przez laktonazy AHL.

Do chwili obecnej wyizolowano, z różnych gatunków bakterii, szereg enzymów o charakterze laktonaz (21-25). Stwierdzono, że zarówno bakterie gramdodatnie (np. z rodzaju *Bacillus*) jak i gramujemne, takie jak *A. tumefaciens* wytwarzają laktonazy AHL (6,26). Geny, kodujące laktonazy występują przede wszystkim na chromosomie bakteryjnym (6), ale mogą także występować na plazmidach, jak opisano w przypadku *A. tumefaciens* (26). W wyniku analizy sekwencji aminokwasowych enzymów, pochodzących z różnych gatunków bakterii gramdodatnich i gramujemnych wykazano, że wzajemne podobieństwo tych sekwencji jest różne i sięga od 31,3 do 91,2% (6,7,21).

3.1. Produkt genu *aiiA* *Bacillus* sp. i jego homologi u innych bakterii rodzaju *Bacillus*

Po raz pierwszy enzym hydrolizujący AHL został wyizolowany z komórek glebowej bakterii z rodzaju *Bacillus* sp. (6). Enzym ten, produkt genu *aiiA*, zdolny do rozkładu pierścienia laktonu homoseryny, scharakteryzowano jako laktonazę AHL (enzym AiiA). Oczyszczone białko AiiA inaktywuje 3-oxo-C₆-HSL, 3-oxo-C₈-HSL i 3-oxo-C₁₀-HSL (6). Białko to zbudowane jest z 250 aminokwasów, a jego przewidywana masa cząsteczkowa wynosi około 28 kDa. Przypuszcza się, że laktonaza AiiA, jest enzymem cytoplazmatycznym, gdyż nie znaleziono hydrofobowego peptydu sygnałowego, kierującego enzym do błony komórkowej (6).

Laktonaza AiiA wykazuje małe podobieństwo do innych znanych enzymów (mniejsze niż 28%), jednakże zawiera dwa motywy aminokwasowe spotykane dość powszechnie (6). Pierwszy, ¹⁰⁴HLHFDHAG¹¹¹ jest charakterystyczny dla glikozylazy II, arylosulfataz i metalo-β-laktamaz. Drugi, ¹⁶⁵HTPGHTPGH¹⁷³ jest motywem wiązania jonu Zn²⁺, występującym w tych enzymach. Obie sekwencje aminokwasowe są niezbędne do przeprowadzania reakcji hydrolizy laktonu homoseryny przez laktonazę AiiA. Jednocześnie w innych przeprowadzonych badaniach wykazano, że aktywność laktonazy AiiA nie jest zależna od obecności jonów Zn²⁺ i innych metali (25), dlatego Wang i in. (2004) zasugerowali, by laktonazy AHL wydzielić jako zupełnie nową rodzinę enzymów. Wcześniej proponował to również Dong i in. (2002). Produkt genu *aiiA* oraz jego homologów, posiadają charakterystyczny motyw ¹⁰⁴HxHxDH¹⁰⁹, dlatego Wang i in. (2004) zaproponowali, aby motyw

$^{106}\text{HxDH}^{109}\sim\text{H}^{169}$ scharakteryzować jako nową klasę motywów katalitycznych, specyficznych tylko dla laktonaz AHL.

Wykorzystując metody molekularne takie jak: analiza sekwencji nukleotydowej genu *aiiA*, hybrydyzacja Southern'a i klonowanie sekwencji genu *aiiA* do wektorów plazmidowych, stwierdzono występowanie sekwencji DNA homologicznych do sekwencji genu *aiiA* u innych gatunków bakterii rodzaju *Bacillus*: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis* (27). Wiele izolatów należących do tych gatunków było w stanie degradować AHL. Tylko dwa gatunki: *B. fusiformis* i *B. sphaericus* nie wykazały aktywności laktonazy AHL. Ponieważ badane szczepy *B. thuringiensis* nie posiadały plazmidów, a w uzyskanych wynikach wskazywano, że geny kodujące laktonazy z tych gatunków zlokalizowane są na chromosomie bakteryjnym (27).

Klonowanie i porównanie sekwencji aminokwasowych w cząsteczkach izolowanych laktonaz z różnych gatunków bakterii pozwoliło na określenie podobieństwa tych enzymów (27). Dziesięć genów *aiiA*: pochodzących z 8 szczepów *B. thuringiensis*, jednego szczepu *Bacillus* sp. i jednego szczepu *Bacillus* sp. COT1 wykazywało wysokie podobieństwo sekwencji nukleotydowej, a podobieństwo sekwencji aminokwasowych wynosiło od 90,4 do 94,0%. Podobna sekwencja aminokwasowa i obecność charakterystycznych motywów u wszystkich badanych enzymów pozwoliło na zaklasyfikowanie ich do laktonaz AHL (27). Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono, że powinowactwo laktonazy AHL do laktonów homoseryny, pozbawionych acylowego podstawnika bocznego i niecyklicznych estrów (które nie posiadają struktury laktonu) jest niewielkie (obecność acylowego podstawnika bocznego i pierścienia laktonu jest niezbędne do aktywności tego enzymu). Laktonaza AiiA wykazuje wysoką zdolność do hydrolizy AHL, bez względu na długość acylowego łańcucha bocznego i obecność podstawników przy C3 laktonu homoseryny (25). Enzym ten jest wrażliwy na zmiany pH, a obniżenie pH do wartości 5,0 i niższych powoduje drastyczny spadek aktywności. Laktonaza AHL jest stabilna w temperaturze niższej niż 37°C, ale jej labilność rośnie wraz ze wzrostem temperatury powyżej 37°C, co w efekcie prowadzi do inaktywacji enzymu (25).

Na podstawie sekwencji nukleotydowej genu *aiiA* określono sekwencje homologiczne do sekwencji genu *aiiA* w komórkach różnych podgatunków *B. thuringiensis*. Porównanie tych sekwencji z sekwencjami genu *aiiA* z *Bacillus* sp. pozwoliło na ustalenie wysokiego podobieństwa, sięgającego od 89 do 95% sekwencji nukleotydydowych i od 90 do 96% sekwencji aminokwasowych (24). Podgatunki *B. thuringiensis* wykazywały zróżnicowaną zdolność do degradowania AHL – od bardzo słabej obserwowanej u *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni*, *B. thuringiensis* subsp. *alestii*, do porównywalnej z *Bacillus* sp. w przypadku *B. thuringiensis* subsp. *subtoxicus* oraz *B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis* (24).

Białko wytwarzane przez *B. thuringiensis* jest powszechnie wykorzystywane jako środek ochronny upraw roślinnych. Jest to δ -endotoksyna, białko krystaliczne, silnie toksyczne dla owadów, a nieszkodliwe dla człowieka (28-30). Obecność funkcjonalnego homologu genu *aiiA* z *Bacillus* sp. u gatunku *B. thuringiensis*, stwarza szansę lep-

sze go wykorzystania tej bakterii w biokontroli nie tylko szkodników, ale także w zwalczaniu bakteryjnych patogenów roślin.

3.2. Produkt genu *ahlD* *Arthrobacter* sp.

Kolejnym rodzajem bakterii, z którego komórek wyizolowano enzym o aktywności laktonazy AHL, jest *Arthrobacter* sp. (9). Bakterie te są w stanie degradować 3-oxo-C₆-HSL oraz inne AHL (nie posiadające podstawników w acylowym łańcuchu bocznym: C₄-HSL, C₆-HSL, C₁₀-HSL) (9). Stwierdzono, że *Arthrobacter* sp. wykorzystuje AHL jako źródło węgla i azotu. Enzym, degradujący AHL – laktonaza AhlD, podobnie jak laktonaza AiiA, jest białkiem cytoplazmatycznym, gdyż nie zaobserwowano aktywności enzymatycznej poza komórką bakterii (9).

Laktonaza AHL z *Arthrobacter* sp. jest enzymem zbudowanym z 273 aminokwasów, o masie cząsteczkowej około 31 kDa (9). Sekwencje aminokwasowe tego enzymu, opisywane przez Dong i in. (2000) oraz Carlier i in. (2003), wykazują niewielkie podobieństwo do sekwencji aminokwasowych innych znanych laktonaz AHL. Podobieństwo nie przekracza 25% w przypadku AiiA z *Bacillus* sp. (6) oraz 26% w przypadku *B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis* (9). Pomimo tak małego podobieństwa sekwencji aminokwasów, AhlD zawiera charakterystyczny motyw ¹⁰⁶HxDH¹⁰⁹~H¹⁶⁹ (6,25, 27). Wykorzystując sekwencje aminokwasowe zgromadzone w komputerowych bazach danych znaleziono sześć homologów AhlD u różnych gatunków bakterii (9), we wszystkich przypadkach sekwencje aminokwasowe zawierają motyw ¹⁰⁶HxDH¹⁰⁹~H¹⁶⁹. Dwie najbardziej podobne do omawianej, występują u *Bacillus stearothermophilus* (27%) oraz *Klebsiella pneumoniae* (od 20 do 23%) (9). Stwierdzono, że zarówno *K. pneumoniae* jak i *B. stearothermophilus* wykazywały zdolność do degradacji AHL w warunkach *in vitro*.

3.3. Produkt genu *attM* *Agrobacterium tumefaciens*

W komórkach *A. tumefaciens* zidentyfikowano gen *attM*, kodujący homolog laktonazy AiiA z *Bacillus* sp. (23). Ekspresja genu *attM* jest zależna od fazy wzrostu bakterii i znajduje się pod kontrolą inhibitora transkrypcyjnego, produktu genu *attJ*. Ekspresja genu *attJ* regulowana jest przez niepoznane czynniki komórkowe i środowiskowe (23). Ilość produktu genu *attM* – laktonazy AHL wzrasta w fazie stacjonarnej, a jej aktywność w komórkach bakterii hamuje koniugacyjny transfer plazmidu Ti.

Produkt genu *attM* zbudowany jest z 264 aminokwasów, jego masa cząsteczkowa wynosi około 29 kDa (23). Porównanie sekwencji nukleotydu *attM* i *attJ* pozwoliło na stwierdzenie podobieństwa sięgającego 24,8%, a w przypadku sekwencji aminokwasowej 31,3%. Podobnie jak u innych laktonaz AHL występuje tu motyw

$^{106}\text{HxDH}^{109}\sim\text{H}^{169}$ (23). Gen *attM* zlokalizowany jest na katabolicznym plazmidzie pAt – jest to pierwszy udokumentowany przypadek umiejscowienia genu kodującego laktonazę poza chromosomem bakteryjnym (26).

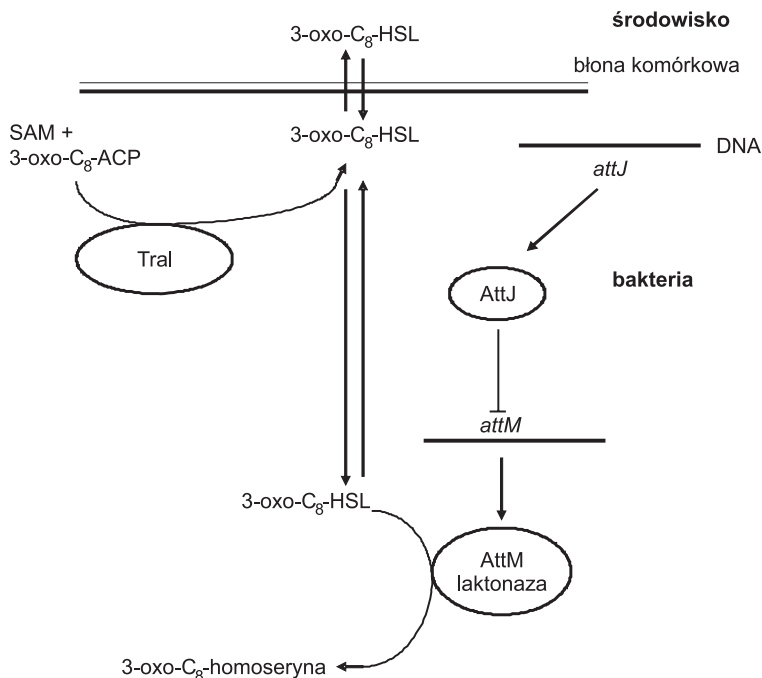
3.4. Rola laktonazy AttM w koniugacyjnym transferze plazmidu Ti u *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens jest gramujemnym patogenem roślin dwuliściennych, który powoduje wytworzenie guzowatych (tumorowych) narośli w miejscu infekcji. Narośla powstają jako efekt przeniesienia fragmentu T-DNA plazmidu Ti do komórek roślin z komórek bakterii, jego integracji z genomem roślinnym i ekspresji genów znajdujących się w tym fragmencie w tkance roślinnej (31). Transfer T-DNA do genomu komórek roślinnych jest procesem złożonym i wieloetapowym, zachodzi w wyniku wzajemnych interakcji bakteria – roślina (32). Tylko komórki *A. tumefaciens* posiadające plazmid Ti są zdolne do infekowania roślin.

Koniugacyjny transfer plazmidu Ti między komórkami *A. tumefaciens* zasiedlającymi guz, jest zależny od mechanizmu QS. Proces ten regulowany jest przez cząsteczki sygnałowe 3-oxo-C₈-HSL wytwarzane przez komórki *A. tumefaciens* oraz uwarunkowany obecnością opin (cukrowych pochodnych argininy) wytwarzanych przez zainfekowane komórki roślinne (33-35).

Transfer plazmidu Ti rozpoczyna się w fazie zastoju (lag-faza), największą intensywność uzyskuje w fazie wzrostu logarytmicznego (log-faza) i kończy się w fazie stacjonarnej (23). Natomiast stężenie autoinduktora (3-oxo-C₈-HSL) osiąga najwyższą wartość w fazie wzrostu logarytmicznego, później dramatycznie spada w fazie stacjonarnej i fazie zamierania populacji bakterii. Sugeruje to, że komórki bakterii mogą przerwać transfer plazmidu Ti poprzez zahamowanie syntezy nowych cząsteczek sygnałowych, albo poprzez rozkład już istniejących (23).

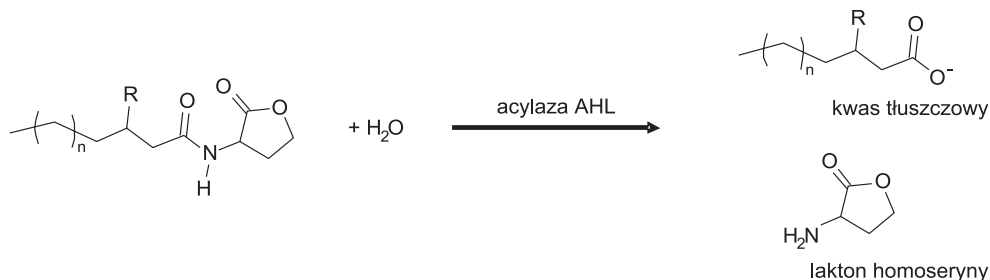
Synteza AttM jest hamowana przez białko represorowe AttJ, do czasu, w którym komórki *A. tumefaciens* wchodzi w fazę wzrostu stacjonarnego. Następuje wówczas odblokowanie genu *attM* i synteza laktonazy AHL, która hydrolizuje cząsteczki sygnałowe. Hydroliza AHL powoduje spadek ich stężenia w cytoplazmie komórek bakterii i w najbliższym środowisku, co z kolei sprawia, że koniugacyjny transfer plazmidu Ti zostaje zahamowany (rys. 3). Jednak biologiczna rola laktonazy AttM w komórkach *A. tumefaciens* jest wciąż dyskusyjna (26).



Rys. 3. Zależność koniugacyjnego transferu plazmidu Ti w komórkach *A. tumefaciens* od mechanizmu QS. Wysokie stężenie 3-oxo-C₈-HSL w środowisku jest niezbędne dla koniugacyjnego transferu plazmidu. Stężenie tego induktora może być regulowane poprzez rozkład cząsteczek sygnałowych (działanie laktonazy AHL – AttM). Ekspresja genu *attM* znajduje się pod kontrolą represora AttJ (produktu genu *attJ*) i niepoznanych czynników środowiskowych. W wyniku tej regulacji koniugacyjny transfer plazmidu Ti zachodzi tylko w fazie wzrostu logarytmicznego populacji *A. tumefaciens*.

3.5. Homologi genu *attM* w komórkach *Agrobacterium tumefaciens*

W genomie szczepu *A. tumefaciens* C85 znaleziono dwie sekwencje nukleotydowe homologiczne do sekwencji nukleotydowej genu *attM*. Produkty tych genów nazwano AiiB i AiiC. Funkcja biologiczna tych białek nie została dotychczas określona, jednak podobieństwo z sekwencjami nukleotydowymi *attM*, może sugerować, że posiadają one aktywność laktonaz AHL (26). Geny kodujące obie „hipotetyczne” laktonazy umiejscowione są na plazmidach. Gen *aiiC* znajduje się na plazmidzie pAt (podobnie jak gen *attM*). Natomiast gen *aiiB* jest umiejscowiony na plazmidzie Ti (26), który zawiera m.in. gen syntazy AHL *tral* i geny niezbędne w procesie infekcji roślin. Po wprowadzeniu genu *aiiB* do komórek *Pectobacterium carotovora*, produkt tego genu wykazywał aktywność laktonazy AHL i powodował znaczące zmniejszenie wirulencji tych bakterii. Produkt genu *aiiC* nie został dokładnie zbadany. Produkt genu *aiiC* wykazuje brak albo słabą zdolność do degradacji AHL po wprowadzeniu do genomu innych bakterii (26).



Rys. 4. Enzymatyczna hydroliza AHL przeprowadzana przez acylazy AHL.

4. Acylazy AHL

Acylazy AHL są enzymami, które hydrolizują wiązanie amidowe pomiędzy laktonem L-homoseryny a acylowym podstawnikiem bocznym w cząsteczce AHL. Struktura chemiczna laktonu homoseryny pozostaje zachowana (rys. 4) (36). Do chwili obecnej z komórek bakterii gramujemnych (*P. aeruginosa*, *Ralstonia solanacearum*, *V. paradoxus*) wyizolowano kilka enzymów o aktywności acylaz AHL (8,36,37). Sekwencje genów kodujących acylazy są słabo poznane.

4.1. Acylaza AHL z *Variovorax paradoxus*

Pierwszym organizmem, u którego wykryto aktywność acylazy AHL była bakteria glebowa *V. paradoxus* (36). Bakteria ta wykorzystuje produkty degradacji AHL jako źródła węgla, azotu i energii (36). W wyniku działania acylazy AHL powstaje lakton homoseryny i kwas tłuszczowy o długości acylowego podstawnika bocznego cząsteczki AHL (23). Zaobserwowano, że tylko acylowy podstawnik boczny jest wykorzystywany jako źródło energii, natomiast lakton homoseryny nie jest bezpośrednio metabolizowany. Leadbetter i Greenberg (2000) zaproponowali hipotetyczną drogę degradacji AHL, w której kwas tłuszczowy ulega β -oksydacji, a lakton homoseryny zostaje rozłożony do kwasu 2-keto-butanowego, który następnie zostaje przekształcony do kwasu propionowego z wydzieleniem dwutlenku węgla. Końcowe produkty tych reakcji mogłyby być wykorzystywane w metabolizmie bakterii.

4.2. Produkt genu *aiiD* *Ralstonia eutropha*

Innym gatunkiem bakterii, u którego stwierdzono aktywność acylazy AHL jest *R. eutropha* (8). Wyizolowano z komórek tej bakterii enzym, produkt genu *aiiD*, odpowiedzialny za degradację AHL. Gen *aiiD* koduje białko o długości około 794 aminokwasów i przewidywanej masie cząsteczkowej około 86 kDa (8). W wyniku po-

równania sekwencji aminokwasowej białka AiiD, z sekwencjami innych znanych enzymów wykazano, że acylaza AiiD jest najbardziej podobna do acylazy aceuleacyny A z gramodatniej bakterii *Actinoplanes utahensis* (40% podobieństwa). Występuje także, sięgające około 22-24%, podobieństwo pomiędzy AiiD i acylazami penicyliny i cefalosporyny. Natomiast zgodność sekwencji nukleotydowych pomiędzy *aiiD* a genami kodującymi enzymy o nieznannej funkcji, wyizolowanych z bakterii *Ralstonia metallidurans* i *R. solanacearum* jest wyższe i sięga odpowiednio około 69 i 83%. Może to sugerować, że bakterie te również posiadają enzymy degradujące AHL (8).

Enzym AiiD degraduje AHL o długich acylowych łańcuchach bocznych: 3-oxo-C₈-HSL, 3-oxo-C₁₀-HSL, 3-oxo-C₁₂-HSL, ale wykazuje także aktywność w przypadku AHL o krótszych łańcuchach (np. 3-oxo-C₆-HSL) (8). Produktami degradacji są: lakton homoseryny i kwas tłuszczowy, długości takiej samej jak łańcuch boczny AHL.

Acylaza AiiD, podobnie jak inne, znane acylazy, wykazuje wysoką specyficzność substratową, to znaczy, degraduje wyłącznie AHL. Nie posiada zdolności do hydrolizy innych związków zawierających wiązanie amidowe (8).

4.3. Produkt genu *pvdQ* *Pseudomonas aeruginosa*

Huang i in. (2003) wyizolowali i scharakteryzowali homologa acylazy AiiD (podobieństwo na poziomie sekwencji aminokwasowej wynosi od 38 do 40%), produkt genu *pvdQ* z bakterii *P. aeruginosa*. Enzym ten posiada aktywność acylazy AHL, rozkłada wiązanie amidowe w C₁₄-HSL, C₁₂-HSL, C₁₀-HSL i C₈-HSL. Nie wykazuje natomiast aktywności w przypadku AHL o krótkich acylowych łańcuchach bocznych (krótszych niż osiem atomów węgla), dlatego nie rozkłada: 3-oxo-C₆-HSL i C₆-HSL. Jest to istotna różnica w porównaniu z acylazą AiiD, która ma zdolność do hydrolizy AHL, niezależnie od długości łańcucha acylowego (8). Kwas tłuszczowy powstający po degradacji AHL jest wykorzystywany jako źródło energii. Zastanawia fakt, że lakton homoseryny i powstająca homoseryna, nie są bezpośrednio wykorzystywane jako źródło azotu i energii. Lakton homoseryny, powstający po odłączeniu od części AHL acylowego łańcucha bocznego, ulega dalszym procesom degradacji (37). Lakton homoseryny i homoseryna, są toksyczne dla *P. aeruginosa*, dlatego ich degradacja przez bakterie ma istotne znaczenie w detoksykacji. W procesie degradacji lakton homoseryny ulega hydrolizie, a powstająca w efekcie tej reakcji homoseryna jest enzymatycznie degradowana do dwutlenku węgla, amoniaku i wody.

5. Rola enzymów degradujących AHL w biokontroli patogenów roślinnych

Patogeny roślinne takie jak *Pectobacterium carotovorum* (syn. *Erwinia carotovora*), *Pectobacterium chrysanthemi* (syn. *Erwinia chrysanthemi*) czy *A. tumefaciens* są istotnym zagrożeniem upraw rolniczych i ogrodniczych na całym świecie. Wywołują choroby

u wielu gatunków roślin istotnych gospodarczo. *A. tumefaciens* jest czynnikiem wywołującym powstawanie narośli guzowatych na roślinach dwuliściennych. Patogeniczność bakterii z rodzaju *Pectobacterium* jest zależna m.in. od produkcji wielu czynników takich jak enzymy pektynolityczne, degradujące ściany komórkowe roślin. U wielu gatunków bakteryjnych patogenów roślinnych (w tym u *P. carotovorum*, *P. chrysanthemi* i *A. tumefaciens*) synteza czynników niezbędnych w procesie patogenyzy znajduje się pod kontrolą mechanizmu QS i zachodzi tylko wtedy gdy liczebność populacji bakterii jest wystarczająca do zainfekowania rośliny i rozwoju procesu chorobowego (38).

Wprowadzenie genów kodujących laktonazy AHL i acylazy AHL do genomu roślin i ich ekspresja w tkankach roślinnych mogłoby stać się nową formą ochrony roślin, uzupełniającą lub konkurencyjną dla obecnie stosowanych metod chemicznych.

Dong i in. (2001) wprowadzili za pomocą transformacji z wykorzystaniem *A. tumefaciens* gen *aiiA* z *Bacillus* sp. do komórek tytoniu i ziemniaka. W ten sposób uzyskano 38 linii transgenicznych tytoniu i 35 transgenicznych linii ziemniaka. Ekstrakty z różnych organów roślin transgenicznych (liście tytoniu i bulwy ziemniaka) wykazywały aktywność degradacyjną 3-oxo-C₆-HSL *in vitro*. Transgeniczne linie tytoniu i ziemniaka o wysokiej ekspresji i aktywności białka AiiA (od 3 do 6 pmol h⁻¹ μg⁻¹) wykazywały znaczną odporność na infekcję wywołaną przez *P. carotovorum* (zmniejszenie maceracji tkanki o około 95% w stosunku do roślin kontrolnych), co sugeruje, że występuje zależność pomiędzy aktywnością laktonazy AiiA a odpornością roślin na zakażenia powodowane przez *P. carotovorum* (21).

Stwierdzono także, że odporność transgenicznych roślin tytoniu (z ekspresją genu *aiiA*) jest uwarunkowana wielkością populacji patogena infekującego roślinę. Inokulum 6 × 10² jtk (jtk – jednostki tworzące kolonie)/miejsce inokulacji nie powodowało występowania zmian chorobowych w czasie 20 godzin po inokulacji, a 6 × 10⁴ jtk/miejsce inokulacji powodowało słabszą macerację tkanki roślin transgenicznych w porównaniu do roślin kontrolnych nawet po długim czasie inkubacji (20 godzin) (21). Zahamowanie mechanizmu QS, regulującego w komórkach *P. carotovorum* produkcję enzymów pektynolitycznych, degradujących ściany komórkowe roślin, powodowało wolniejszy rozwój symptomów chorobowych i umożliwiło aktywację roślinnych mechanizmów obronnych, zanim populacja patogena osiągnęła wielkość umożliwiającą skuteczną infekcję (21,39).

Do tej pory nie ma informacji o wprowadzeniu genu kodującego acylazę AHL do genomu roślin.

6. Rola enzymów degradujących AHL w hamowaniu rozwoju infekcji

P. aeruginosa jest oportunistycznym patogenem człowieka, wywołującym różnego rodzaju infekcje, zwłaszcza u ludzi z obniżoną odpornością, np. chorych na mukowiscydozę, AIDS, czy po przeprowadzonych przeszczepach. Bakterie te wytwa-

rzają szereg czynników ułatwiających zasiedlanie komórek gospodarza takich jak, proteazy czy hemolityczne biosurfaktanty (ramnolipid), a także produkują toksyny bezpośrednio uszkodzające te komórki. Synteza czynników wirulencji zachodzi w określonych fazach wzrostu (późna faza logarytmiczna i wczesna faza stacjonarna) i znajduje się pod kontrolą mechanizmu QS (40). *P. aeruginosa* wykazuje wysoką oporność na większość stosowanych antybiotyków. W tkankach gospodarza tworzy rozległe i zróżnicowane biofilmy. Oba te czynniki znacząco utrudniają lub uniemożliwiają skuteczną terapię.

P. aeruginosa produkuje i wydziela dwie cząsteczki sygnałowe: 3-oxo-C₁₂-HSL i C₄-HSL, które regulują syntezę czynników wirulencji, a także kontrolują powstawanie biofilmu. W mechanizmie QS u *P. aeruginosa* uczestniczą dwa hierarchiczne systemy: pierwszy zależny od stężenia 3-oxo-C₁₂-HSL i drugi, podrzędny, zależny od stężenia C₄-HSL i kontrolowany przez pierwszy system.

Wysoki poziom 3-oxo-C₁₂-HSL jest wymagany do syntezy elastazy, egzotoksyny A, alkalicznej proteazy i hemolizyny. Jednocześnie system ten aktywuje syntezę drugiego autoinduktora – C₄-HSL, kontrolującego powstawanie ramnolipidu. Aktywacja obu systemów nadrzędnego i podrzędnego umożliwia indukcję syntezy czynników wirulencji i przeprowadzenie infekcji gospodarza. Jakkolwiek aktywność systemu nadrzędnego wystarcza do infekowania gospodarza, tylko działanie obu systemów umożliwia rozwój biofilmu i utrzymanie zmian chorobowych w tkankach (35,41).

Chun i in. (2004) zaobserwowali, że ludzkie komórki nabłonka górnych dróg oddechowych posiadają zdolność do specyficznej hydrolizy 3-oxo-C₁₂-HSL jednego z dwóch autoinduktorów produkowanych przez *P. aeruginosa*, jednocześnie nie degradując C₄-HSL. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że niektóre komórki eukariotyczne (np. komórki nabłonka) posiadają mechanizmy degradujące bakteryjne cząsteczki sygnałowe. Mechanizm degradacji AHL przez komórki nabłonka może ochraniać organizm przed rozwojem infekcji spowodowanej przez *P. aeruginosa*, uniemożliwiając syntezę czynników wirulencji, uszkodzających komórki gospodarza (42).

Jakkolwiek mechanizm degradacji nie został dokładnie poznany, Chun i in. (2004) sugerują, że inaktywacja cząsteczek sygnałowych jest zależna od działania enzymów. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że inaktywacja AHL zachodzi wewnątrz komórek nabłonka, a wywołujący ją enzym wykazuje specyficzność substratową, hydrolizuje wyłącznie cząsteczki sygnałowe o długich acylowych łańcuchach bocznych z podstawnikami 3-oxo. Testy *in vitro* pozwoliły ponadto na ustalenie, że aktywność enzymatyczna zależy od rodzaju komórek nabłonka i ustaje pod wpływem działania wysokiej temperatury.

Greenberg i in. (2004) potwierdzili, że działanie enzymu degradującego AHL w ssaczych komórkach nabłonka jest analogiczne do działania bakteryjnych laktonez AHL i przebiega w podobny sposób: 3-oxo-C₁₂-HSL ulega hydrolizie w wyniku czego powstaje 3-oxo-C₁₂-homoseryna. 3-oxo-C₁₂-homoseryna nie pełni funkcji au-

toinduktora w mechanizmie QS u *P. aeruginosa* (43). Laktonaza AHL z komórek nabłonka ssaków w odróżnieniu od laktonaz AHL wytwarzanych przez bakterie, wykazuje wysoką specyficzność substratową. Enzym ten inaktywuje tylko AHL o długich acylowych podstawnikach bocznych. Dotychczas nie wyizolowano laktonazy AHL z komórek nabłonka ani nie zsekwencionowano genu odpowiedzialnego za jej syntezę.

Do tej pory również nie ma informacji o wykorzystaniu enzymów degradujących AHL w terapii chorób człowieka, jakkolwiek użycie takich enzymów mogłoby mieć korzystne i konkurencyjne dla terapii antybiotykowej efekty.

7. Podsumowanie

Enzymy degradujące AHL (laktonazy AHL i acylazy AHL) występują u różnych gatunków bakterii gramdodatnich i gramujemnych (tab. 1). Aktywność tych enzymów prowadzi do zahamowania przekazywania sygnału warunkującego mechanizm QS. Pośrednie i bezpośrednie produkty degradacji AHL są wykorzystywane przez bakterie jako źródło węgla, azotu lub jako źródło energii. U niektórych gatunków bakterii są degradowane jako toksyczne produkty przemian materii.

Tabela

Charakterystyka laktonaz i acylaz AHL izolowanych z komórek bakterii gramdodatnich i gramujemnych

Gatunek bakterii	Zidentyfikowany gen/enzym	Wielkość cząsteczki białka (kDa / ilość aa)	Aktywność enzymatyczna	Rodzaj degradowanych AHL	Literatura
1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus</i> sp.	<i>aiiA</i> / AiiA	28 kDa / 250 aa	laktonaza AHL	3-oxo-C ₆ -HSL 3-oxo-C ₈ -HSL 3-oxo-C ₁₀ -HSL	(6,25,27)
<i>B. thuringiensis</i>	<i>aiiA</i> / AiiA	28 kDa / 250 aa	laktonaza AHL	3-oxo-C ₆ -HSL 3-oxo-C ₈ -HSL 3-oxo-C ₁₀ -HSL	(24,27)
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>ablD</i> / AhlD	31 kDa / 273 aa	laktonaza AHL	C ₄ -HSL C ₆ -HSL 3-oxo-C ₆ -HSL C ₁₀ -HSL	(9)
<i>A. tumefaciens</i>	<i>attM</i> / AttM	29 kDa / 264 aa	laktonaza AHL	3-oxo-C ₈ -HSL	(23)
<i>A. tumefaciens</i>	<i>aiiB</i> / AiiB	bd.	laktonaza AHL	C ₆ -HSL 3-oxo-C ₆ -HSL C ₇ -HSL C ₈ -HSL	(23,26)

1	2	3	4	5	6
<i>V. paradoxus</i>	bd.	bd.	acylaza AHL	C ₆ -HSL 3-oxo-C ₆ -HSL C ₈ -HSL C ₁₀ -HSL C ₁₂ -HSL	(23,36)
<i>R. eutropha</i>	<i>aiiD</i> / AiiD	84 kDa / 794 aa	acylaza AHL	3-oxo-C ₆ -HSL 3-oxo-C ₈ -HSL 3-oxo-C ₁₀ -HSL 3-oxo-C ₁₂ -HSL	(8)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>pvdQ</i> / PvdQ	80 kDa / bd.	acylaza AHL	C ₈ -HSL C ₁₀ -HSL C ₁₂ -HSL C ₁₄ -HSL	(37)

(bd. – brak danych)

Enzymy degradujące cząsteczki sygnałowe bakterii patogennych mogą stanowić alternatywę dla antybiotykowej terapii leczenia chorób człowieka i środków powszechnie stosowanych w ochronie roślin. Przypuszcza się, że enzymy te występują dość powszechnie w środowisku, a obecność genów kodujących enzymy hydrolizujące AHL na plazmidach (np. u *A. tumefaciens*) sugeruje, możliwość rozprzestrzeniania się ich pomiędzy różnymi gatunkami bakterii na zasadzie horyzontalnego transferu genów.

Do chwili obecnej opisano kilka strategii zakłócania przekazywania sygnału w mechanizmie QS wykorzystujących enzymatyczną hydrolizę cząsteczek sygnałowych. Strategie te polegają na hydrolizie cząsteczek sygnałowych z wykorzystaniem bakterii degradujących AHL albo wykorzystaniu wyizolowanych i oczyszczonych z tych bakterii enzymów (laktonaz AHL i acylaz AHL) do biokontroli patogenów roślinnych, zapobiegania tworzenia biofilmów i w leczeniu chorób człowieka.

Jakkolwiek tego typu działania posiadają wiele zalet, nie można zapominać o potencjalnych efektach niekorzystnych. Enzymatyczna degradacja cząsteczek sygnałowych wytwarzanych przez bakterie fitopatogenne może wywierać niekorzystne efekty na mikroflorę gleby i ryzosfery. Degradacja AHL w glebie może przyczyniać się do nadmiernego rozwoju grzybów z rodzaju *Fusarium*, których wzrost i rozwój hamowany jest np. przez zależną od AHL produkcję fenazy w komórkach bakterii glebowej *Pseudomonas aureofaciens*, albo spadku zdolności zasiedlania korzeni roślin motylkowych przez bakterie z rodzajów *Rhizobium* i *Sinorhizobium* – proces zależny od stężenia AHL i w efekcie ograniczenie wiązania azotu atmosferycznego. Do tej pory nie poznano, zależnych od mechanizmu QS i stężenia AHL, interakcji bakterii symbiotycznych, zasiedlających przewody pokarmowe zwierząt i człowieka, dlatego nie wiadomo jakie mogą być efekty uboczne stosowania terapii wykorzystujących enzymy hydrolizujące AHL.

Lepsze poznanie roli cząsteczek sygnałowych i procesów zależnych od zagęszczenia bakterii i mechanizmu QS, a także wpływu enzymatycznej degradacji cząsteczek sygnałowych na interakcję między komórkami gospodarza i patogena będzie miało podstawowe znaczenie dla rozwoju nowych terapii i biokontroli patogenów.

Stosowane skróty: AHL – laktony acylo-L-homoseryny, ACP – białko przenoszące grupy acylowe, HS – homoseryna, C₄-HSL – lakton *N*-butyrylo-homoseryny, C₆-HSL – lakton *N*-heksonylo-homoseryny, C₇-HSL – lakton *N*-heptynylo-homoseryny, C₈-HSL – lakton *N*-oktanylo-homoseryny, C₁₀-HSL – lakton *N*-dekanylo-homoseryny, C₁₂-HSL – lakton *N*-dodekanylo-homoseryny, C₁₄-HSL – lakton *N*-tetradekanylo-homoseryny, 3-oxo-C₆-HSL – lakton *N*-3-oxo-heksonylo-homoseryny, 3-oxo-C₈-HSL – lakton *N*-3-oxo-oktanylo-homoseryny, 3-oxo-C₁₀-HSL – lakton *N*-3-oxo-dekanylo-homoseryny, 3-oxo-C₁₂-HSL – lakton *N*-3-oxo-dodekanylo-homoseryny, jtk – jednostki tworzące kolonie, SAM – S-adenozylometionina.

Praca finansowana z projektu KBN 2P04B 02 26.

Autorzy dziękują Pani prof. Ewie Łojkowskiej za pomoc w przygotowaniu publikacji.

Literatura

1. Whitehead N. A., Barnard A. M. L., Slater H., Simpson N. J. L., Salmond G. P. C., (2001), *FEMS Microbiol. Rev.*, 25, 365-404.
2. Parsek M. R., Greenberg E. P., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 8789-8793.
3. Suga H., Smith K. M., (2003), *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7, 586-591.
4. Mathesius U., Mulders S., Gao M., Teplinski M., Caetano-Anollés G., Rolfe B. G., Bauer W. D., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 1444-1449.
5. Newton J. A., Fray R. G., (2004), *Cell. Microbiol.*, 6, 213-224.
6. Dong Y. H., Xu J. L., Li X. Z., Zhang L. H., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 3526-3531.
7. Leadbetter J. R., (2001), *Nature*, 411, 748-749.
8. Lin Y. H., Xu J. L., Hu J., Wang L. H., Ong S. L., Leadbetter J. R., Zhang L. H., (2003), *Mol. Microbiol.*, 47, 849-860.
9. Park S. Y., Lee S. J., Oh T. K., Oh J. W., Koo B. T., Yum D. Y., Lee J. K., (2003), *Microbiology*, 149, 1541-1550.
10. Moré M. I., Finger D. L., Stryker J. L., Fuqua C., Eberhard A., Winans S. C., (1996), *Science*, 272, 1655-1658.
11. Schaefer A. L., Val D. L., Hanzelka B. L., Cronan J. E., Greenberg E. P., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 9505-9509.
12. Hanzelka B. L., Greenberg E. P., (1996), *J. Bacteriol.*, 178, 5291-5294.
13. Watson W. T., Minogue T. D., Val D. L., Bodman von S. B., Churchill M. E., (2002), *Mol. Cell*, 9, 685-694.
14. Parsek M. P., Val D. L., Hanzelka B. L., Cronan J. E., Greenberg E. P., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 4360-4365.
15. Fuqua V., Parsek M. R., Greenberg E. P., (2001), *Ann. Rev. Genet.*, 35, 439-468.
16. Lithgow J. K., Wilkinson A., Hardman., Rodelas B., Wiśniewski-Dye F., Williams P., Downie J. A., (2000), *Mol. Microbiol.*, 37, 81-97.
17. Taminiou B., Daykin M., Swift S., Boschirolì M. L., Tibor A., Lestrade P., de Bolle X., O'Callaghan D., Williams P., Letesson J. J., (2002), *Infect. Immun.*, 70, 3004-3011.
18. Ulrich R. L., Hines H. B., Parthasarathy N., Jeddloh J. A., (2004), *J. Bacteriol.*, 186, 4350-4360.
19. Kaplan H. B., Greenberg E. P., (1985), *J. Bacteriol.*, 163, 1210-1214.

20. Evans K., Passador L., Srikumar R., Tsang E., Nezezon J., Poole K., (1998), *J. Bacteriol.*, 180, 5443-5447.
21. Dong Y. H., Wang L. H., Xu J. L., Zhang H. B., Zhang X. F., Zhang L. H., (2001), *Nature*, 411, 813-817.
22. de La Cruz J., Handelsman J., Borlee B., (2001), Wisconsin Madison University The McNair Scholars (Program Summer).
23. Zhang H. B., Wang L. H., Zhang L. H., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 4638-4643.
24. Lee S. J., Park S. Y., Yum D. Y., Koo B. T., Lee J. K., (2002), *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3919-3924.
25. Wang L. H., Weng L. X., Dong Y. H., Zhang L. H., (2004), *J. Biol. Chem.*, 279, 13645-13651.
26. Carlier A., Uroz S., Smadja B., Fray R., Latour X., Dessaux Y., Faure D., (2003), *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 4989-4993.
27. Dong Y. H., Gusti A. R., Zhang Q., Xu J. L., Zhang L. H., (2002), *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1754-1759.
28. Regev A., Keller M., Strizhov N., Sneh B., Prudowsky E., Chet I., Ginzberg I., Koncz-Kalman Z., Koncz C., Schell J., Zilberstein A., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3581-3586.
29. Hellmich R. L., Siegfried B. D., Sears M. K., Stanley-Horn D. E., Daniels M. J., Mattia H. R., Spencer T., Bidne K. G., Lewis L. C., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 11925-11930.
30. Peng R., Xiong A., Li X., Fuan H., Yao Q., (2003), *Appl. Environ. Biotechnol.*, 63, 300-306.
31. Rakoczy-Trojanowska M., (2001), *Biotechnologia roślin*, red. Malepszy S., 233-238, PWN, Warszawa.
32. Ziemienowicz A., (2000), *Biotechnologia*, 4, 24-31.
33. Fuqua C. W., Winans S. C., Greenberg E. P., (1994), *J. Bacteriol.*, 176, 269-275.
34. Luo Z. Q., Su S., Farrand S. K., (2003), *J. Bacteriol.*, 185, 5665-5672.
35. Bodman von S. B., Bauer W. D., Coplin D. L., (2003), *Ann. Rev. Phytopathol.*, 41, 455-482.
36. Leadbetter J. R., Greenberg E. P., (2000), *J. Bacteriol.*, 182, 6921-6926.
37. Huang J. J., Han J. I., Zhang L. H., Leadbetter J. R., (2003), *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5941-5949.
38. Andersson R. A., Eriksson A. R., Heikinheimo R., Mae A., Pirhonen M., Koiv V., Hyytiäinen H., Tuikka A., Palva E. T., (2000), *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, 13, 384-393.
39. Mae A., Montesano M., Koiv V., Palva E. T., (2001), *Mol. Plant Microbe Interact.*, 14, 1035-1042.
40. Kievit de T. R., Iglewski B. H., (2000), *Infect. Immun.*, 68, 4839-4849.
41. Smith R. S., Iglewski B. H., (2003), *J. Clin. Invest.*, 112, 1460-1465.
42. Chun C. K., Ozer E. A., Welsh M. J., Zabner J., Greenberg E. P., (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 3587-3590.
43. Greenberg E. P., Chun C. K., Ozer E. A., Welsh J., Zabner J., (2004), *ASM Conferences Cell-Cell Communication in Bacteria*, Banff, Alberta, Canada.