



Derleme

www.ziraat.selcuk.edu.tr/ojs
Selçuk Üniversitesi
Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi
24 (3): (2010) 118-124
ISSN:1309-0550



FUNGUSLARDA SİDEROFOR OLUŞUMU

Sirel OZAN^{1,3}, Salih MADEN²

¹Ankara Ziraat Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü, Ankara/Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ankara/Türkiye

(Geliş Tarihi: 24.08.2009, Kabul Tarihi: 26.03.2010)

ÖZET

Demir, yeryüzünde en çok bulunan dördüncü elementtir ancak doğada başka atomlarla kimyasal bağ kurarak bileşikler halinde bulunur. Dolayısıyla demirin hücrede çeşitli görevlerde kullanılmak üzere hücre içine alınması kompleks bir sistem gerektirir. Fungusların hücre dışında bulunan demiri almaları için son derece ilginç siderofor olarak bilinen moleküller yaratılmıştır. Demir eksikliği ve toksisitesi arasındaki dengeyi uygun şekilde sürdürülebilmesi için demir alımı ve depolanması sistemlerinin ince ayarlı bir kontrolü gereklidir. Hem fungus türleri arasında hem de bir fungus türü içinde demir kazanımı, depolanması ve düzenlenmesi için farklı sistemler vardır. Son zamanlarda sideroforların bitki patojeni fungusların patojenisitesinde olduğu kadar hayvanların patojenisitesinde ve fungus-bitki ortak yaşamının sürdürülmesinde de çok önemli olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Fungus, siderofor, demir

FORMATION OF SIDEROPHORE IN FUNGI

ABSTRACT

Iron, is the fourth most available element in the world, however it is found as chemical compounds with other atoms. For this reason, in plants a complex system is needed for iron uptake to use it for various duties. Fungi have developed so interesting molecules that named as siderophores. in order to uptake extracellular iron. For proper maintaining the balance with iron deficiency and toxicity a fine adjustment of systems for iron uptake and storage is needed. There are different systems for iron uptake, storage and regulation both in a fungal species and and between fungal species. Recently, siderophores have been considered very important not only for pathogenicity of fungi on plants and animals but also to maintain fungus-plant symbiotism.

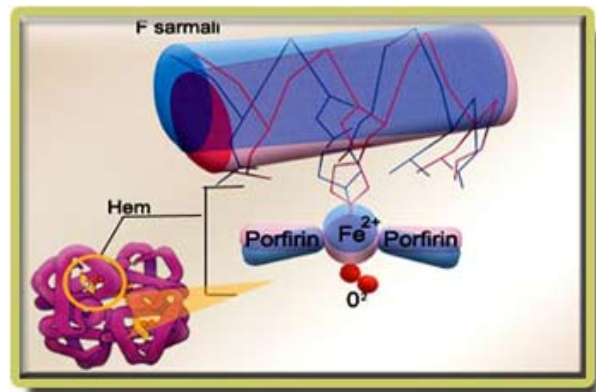
Keywords: Fungi, siderophore, iron

GİRİŞ

Demir tüm Eukaryotlar ve hemen hemen tüm Prokaryotlar için en önemli besin elementidir. Geçişli bir element olarak demir her iki iyonik forma (Fe^{+2} , Fe^{+3}) adapte olabilir. Demir ya tek başına ya da demir-kükürt bağları içinde yada heme molekülü (Şekil 1,2) içine yerleştirilmiş olarak; solunum, trikarboksilik asit döngüsü, oksidatif stres azaltılmasında, aminoasitlerin, DNA'nın, yağların ve sterollerin sentezinde vazgeçilmez bir elementtir. Bunun yanı sıra Fe^{+2} Fenton/Haber Weiss reaksiyonu aracılığıyla hücreye zarar veren hidroksil radikallerinin oluşumunu sağlama potansiyeline de sahiptir (Halliwell and Gutteridge 1984).

Demir yeryüzünde en çok bulunan elementlerden biridir. Mikrobiyal demir dengesi, yeterli demir sağlanmasını ve demirin yol açtığı toksisiteyi engellemekte; demir alımı, depolanması ve demir toksisitesini azaltmayı düzenleyerek entegrasyon yapmaktadır. Demir bağımlı mikroorganizmalar, biyolojik var olma problemini çözmek için farklı stratejiler geliştirmişlerdir. Serbest demiri konukçu bitkiler ve memelilerden almak çok zor bir olay iken, patojenik mikroorganizmalar konukçularında genellikle serbest olarak bulunmayan demiri çalmak için farklı stratejiler geliştir-

mişlerdir. Örneğin fungusların hücre dışında bulunan demirleri almaları için son derece ilginç moleküller yaratılmıştır. Bunlar bilimsel adı siderofor olarak bilinen moleküllerdir.



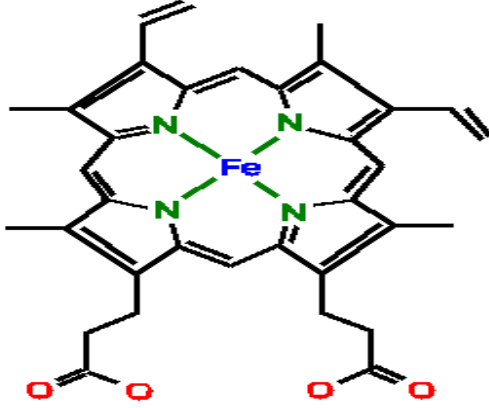
Şekil 1. Hememolekülü (metafizikbilgiler.com)

Sideroforlar

Sideroforlar (Yunanca demir taşıyıcı) mikroorganizmalar, pek çok bitki ve bazı yüksek organizmalar tarafından salgılanan, demir şelatlaması yapan moleküllerdir. Demir Fe^{+3} iyonlarının nötr pH' da çözünür-

³Sorumlu Yazar: sirelozan_18@hotmail.com

lükleri çok düşüktür ve dolayısıyla organizmalar tarafından kullanılamazlar. Sideroforlar şelatlama yoluyla bu iyonların çözünmesini sağlarlar (Şekil 2) ve bu çözülmüş kompleksler aktif taşıma ile hücre içine alınırlar (Kraemer 2005). Çoğu siderofor, non-ribozomal peptittir. Yapılan bilimsel araştırmalar neticesinde, 500 kadar farklı siderofor çeşidi tespit edilmiştir.



Şekil 2. Heme molekülü (demirli porfirin bileşik) (en.wikipedia.org)

Çeşitli bakteri ve funguslar tarafından üretilen sideroforlara örnek olarak ferrikrom (*Ustilago spheerogena*), enterobaktin (veya enterokelin) (*Escherichia coli*), mikobaktin (*Mycobacterium*), enterobaktin ve basillibaktin (*Bacillus subtilis*), ferrioksamin B (*Streptomyces pilosus*), fusarinine C (*Fusarium roseum*), yersiniabaktin (*Yersinia pestis*), vibriobaktin (*Vibrio cholerae*), azotobaktin (*Azotobacter vinelandii*), psödobaktin (*Pseudomonas B 10*), eritrobaktin (*Saccharopolyspora erythraea*) ve ornibaktin (*Burkholderia cepacia*) sayılabilir.

Anoksik şartlarda demir genelde +2 yükseltgenme halindedir ve suda çözünür. Ancak, oksik şartlarda, demir genelde +3 yükseltgenme halinde olur ve suda çözünmeyerek çeşitli mineraller oluşturur. Bu tür minerallerden de demir elde edebilmek için hücreler demire bağlanan ve onu hücre içine taşıyan sideroforlar üretirler. Sideroforların başlıca gruplarından biri hidroksamik asit türevleridir, bunlar ferrik iyonlarını kuvvetle şelatlarlar (Miller 2008).

Sideroforlar tarafından şelatlanan diğer metaller şunlardır: Alüminyum, Galyum, Krom, Bakır, Çinko, Kurşun, Manganez, Kadmiyum, Vanadyum, İndiyum, Plutonyum, Uranyum'dur.

Ortama demir sınırlanmasına tepki olarak patojenlerde siderofor üretimi üzerindeki baskılama kalkar ve funguslar sideroforları hücrenin dışına salgılar. Bu moleküller, ajan gibi davranarak organik moleküllerden ve minerallerden demirin çözünmesini sağlarlar (Kraemer ve ark., 2005, Kraemer ve ark., 2006). Demir ile oktahedral (düzgün sekizyüzlü) bir siderofor-

demir kompleksi oluşturarak ona kuvvetli bir şekilde bağlanır ve kendi bünyelerine katarlar. Ancak bu noktada bir problem vardır. Sideroforlar artık hücrenin dışındadırlar ve geri kazanılmaları da ayrı bir mekanizmadır. Hücrenin yüzeyinde, bu iş için yaratılmış özel alıcılar bulunur. Demir eklentili sideroforlar bu alıcılar tarafından tanınır ve bu alıcılara bağlanarak hücre zarının içinden çeşitli taşıma mekanizmaları ile hücre içine taşınırlar (Neilands 1995). Demir (III)'ün hücre içinde indirgenmesinin ardından oluşan Fe (II)'nin sideroforla zayıf kompleksleşmesi, demirin hücre içine salınmasını kolaylaştırır. Demir sideroforun parçalanması ve başka biyolojik mekanizmalarla da hücre içinde serbest kalabilir.

Siderofordan elde edilen demir;

- elektron taşınmasında,
- DNA daki genlerin kontrolünde,
- DNA sentezinde,
- oksijen taşınmasında,
- bir çok enzimin işlevinde gereklidir.

Mikroorganizmalarda ve bitkilerde bulunan demir molekülünün büyük bir kısmı porfirinlerle (dört metilen (-CH=) köprüsüyle birbirine bağlı dört pirol halkasından ibaret olan porfirin halka sistemi ihtiva eden molekül sistemidir) birlikte bulunur. Hayvanların, bakterilerin ve fungusların demir porfirinleri heme molekülüdür; bitkilerde sitokromlara daha fazla rastlanır. Sitokromların, fotosentez sisteminde ve solunum olayında görevleri vardır fakat en önemli görevleri redoks fonksiyonudur. Yani demirin, Fe⁺³ formundan Fe⁺² formuna çevrilmesi olayında görev alır (Miller 2008).

Funguslarda demir eksikliği ve toksisitesi arasındaki dengenin uygun şekilde sürdürülebilmesi için demir alınımı ve depolanması sistemlerinin ince ayarlı kontrolü gereklidir. Hem fungus türleri arasında hem de bir fungus türü içinde demir kazanımı, depolanması ve düzenlenmesi için farklı sistemler vardır. Son zamanlarda sideroforların bitki patojeni fungusların patojenitesinde olduğu kadar hayvanların patojenitesinde ve fungus-bitki ortak yaşamının sürdürülmesinde de çok önemli olduğu ortaya konmuştur (Hubertus ve ark., 2008).

Fungal demir metabolizmaları en detaylı şekilde bir prototip olan *Saccharomyces cerevisiae*'de çalışılmıştır. *Schizosaccharomyces pombe*'de (Schrettl 2007) olduğu gibi, birçok iplikimsi fungus ve birkaç mayanın aksine *S. cerevisiae* (ve diğer model mayalar *Candida albicans* ve *Cryptococcus neoformans*) siderofor sentez edebilme yeteneğinde değildir ama *S. cerevisiae* diğer mikrobiyal türler (xenosideroforlar) tarafından oluşturulan sideroforlara bağlı demiri kullanabilmektedir. Bu maya birçok fungustan farklı olan bir demir düzenleme mekanizması kullanmaktadır. Sideroforların işlevi, biyosentezi, düzenlenmesi ve fizyolojik yapısı moleküler düzeyde en iyi *Aspergillus* spp. türlerinde ortaya konmuştur.

Saprofit *A. nidulans* ve insanlarda patojen olan *A. fumigatus* demir elde etmek için aynı sideroforları salgırlar. Demir depolanması için hücre içi sideroforlara sahiptirler (Hubertus ve ark., 2008). Son yapılan çalışmalarla sideroforların bitki ve hayvan patojeni fungusların virülensliklerinde de ciddi rol oynadıkları bulunmuştur.

Fungal Demir Kazanım Sistemleri

Funguslarda moleküler düzeyde demir alımında 4 farklı mekanizma vardır. Bunlar:

1. Siderofor aracılığıyla Fe⁺³ alımı
2. RIA (hücre zarında hücre dışı Fe⁺³ ü Fe⁺² ye indirgeyen sistem) ile demir alımı
3. Heme molekülüyle demir alımı
4. Doğrudan Fe⁺² alımı

Siderofor ve RIA mekanizmaları kolayca alınabilen demir bağlanma sistemleridir. Heme molekülü mekanizması tipik olarak konukçu içinde bulunan özel demir kaynağının kullanımını temsil eder. Doğrudan demir Fe+2 alımı mekanizması ise kolayca alınamayan zor algılanan demir elde etme sistemidir. Birçok fungus türü bu sistemlerin birden fazlasına aynı anda yer verebilirken nadiren bu 4 stratejinin hepsi aynı türde bulunabilmektedir.

Siderofor Yardımıyla Fe⁺³ Alımı

Fungal Sideroforlar

Sideroforlar erime ile düşük biyoelverişlilik sorununu yenmek için Fe⁺³ iyonu ile sıkı bileşikler oluştururlar. Sideroforların bakterilerde, funguslarda ve bitkilerde oluşturulma mekanizmaları farklıdır. Sideroforlar demirin oksijene bağlanma kimyasal yapısına bağlı olarak 3 ana gruba ayrılabilirler:

1. Aryl Kaps bileşikler (katekolatlar ve fenolatlar)
2. Karboksilat bileşikler
3. Hidroksimat bileşikler

Bazı Zygomyceteslerin oluşturduğu karboksilat sideroforun dışında bugüne kadar saptanan tüm fungal sideroforlar hidroksimatlar olarak tanımlanmışlardır. Fungal hidroksimatlar protein oluşturmayan bir aminoasit olan ornithine ve farklı acyl gruplarından türetilirler ve 4 yapısal familya içinde gruplandırılabilirler:

1. Rhodotorulic asit,
2. Fusarininler,
3. Coprogenler,
4. Ferrichrome'lar

En basit hidroksimat siderofor olan rodotorulik asit basidiomycetous maya cinsi *Rhodotorulla* tarafından oluşturulur.

Fusarininler ve coprogenler *Peizizomycota* türleri tarafından demir kazanımı için salgılanan sideroforlardır.

Ferrikromlar tipik olarak *Peizizomycota* türleri tarafından demirin hücre içi işlemlerinde kullanılırlar.

Taphrinomycota ve *Basidiomycota*' da ferrikrom salgırlar.

Triasetilfusarinin C (TAFC) fusarinin C nin N2 ile asetilleşmesi ile oluşur. Oluşan bu sideroforlar kimyasal stabiliteyi artırır.

Ferrikrom, ferrikrom A ve ferrikrosin (FC) gibi ferrikromlar, 3 N⁵-acyl-N⁵-hydroxyornithine'ler ve 3 amino asit (glycine, serine ve alanine)' ten ibaret cyclic hexa peptidlerdir. Bu familyada bulunan Acyl grupları acetyl, cis-,trans-anhydromevalonyl ve trans-β-methylglutaconyl'dir.

Tipik olarak funguslar birden fazla hidroksamat siderofor sentezlerler. Örneğin *A. nidulans* ve *A. fumigatus* demir alımı için TAFC salgırlarken, hücre içi demir kullanımı için ferrikrom salgırlar.

Fungal Siderofor Biyosentezi

Fungal hidroksimat sideroforların biyosentezinin ilk adımında ornithine N⁵ hydroxylation, ornithine N⁵-monooxygenase katalizasyonuna uğrar ve bu olayı oluşturan enzimler değişik isimler alarak siderofor biyosentezini gerçekleştirirler.

Fungal Demir Depolama

Hücreler demir elde etme işini garantiye almak için demir depolamaya ihtiyaç duyarlar. Demir hayvanlarda, bitkilerde ve bakterilerde ferritin, fitoferritin veya bakterio-ferritin olarak depolanır. Zygomycetes'ler hariç fungusların bazıları ise mikoferritin üretir. Ferritin gibi moleküller funguslar içinde bulunmamakla beraber son zamanlarda yapılan bir çalışmada *Aspergillus parasiticus*'un ferritin benzeri bir proteininin saflaştırıldığı rapor edilmiştir (Matzanke, 1994).

Fakat *Aspergillus parasiticus*' un ve diğer iplikimsi fungusların genomik sekansı ferritin benzeri molekül olarak kodlanabilmeleri için çok belirli değildir (Shashidhar ve ark., 2005).

Funguslarda demir depolanması için iki farklı mekanizma açıklanmıştır. Bunlar:

1. Vakuolar olarak demir depolanması
2. Demir bağlı sideroforlarla demir depolanmasıdır.

Vakuollerde Demir Depolanması

Değişik çalışmalar ağır metallerin detoksifikasyonu ve saklanması için doğal bir yeteneğe sahip olan maya vakuollerinin önemini ortaya koymuştur. Demirin burada polifosfat olarak ferrik formunda depolanmakta olduğu düşünülmektedir

Sideroforlarla Demir Depolanması

Fungusların ürettiği sideroforlarla ilgili bütün çalışmalar, fungusların demir depolama molekülleri olarak hücreler arasında sideroforlara sahip olduğunu göstermiştir.

U. sphaerogena ve *U. maydis*'in ferrikrom ve ferrikrom A sideroforlarını salgıladığı fakat yalnızca ferrikromun demir depolama bileşiği olarak görev

yaptığı ve hücrelerin demir ihtiyacının %50' sini karşılayabildiği tespit edilmiştir.

Pezizomycota'nın bazı türlerinde hifler ve konidilerde hücre içi siderofor olarak ferrikrom içeriği araştırılmıştır.

A.fumigatus'da konidilerde ferrikrom'un depolamada kullanılabildiği bulunmuştur.

Ferrikrom veya onun türevinin, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus* ve *N. crassa*'da en fazla % 47-74 oranında konidial demir içeriği oluşturduğu tespit edilmiştir.

Fungal Sideroforlar Ve Konukçuları İle Etkileşimleri

Hücre içindeki serbest demir iyonu hücrelere yüksek derecede toksik olan reaktif oksijen türlerinin potansiyel kaynağıdır. Bu zararı önlemek için demir, bitki konukçu hücrelerinde, ferritin gibi demir bağlayan proteinler tarafından sıkı bir şekilde bağlanır. Bu nedenle konukçu hücrelerinden demir alımı yoluyla konukçunun demir bağlaması engellenir, bu da başarılı bir fitopatogenite için zorunludur.

Bitki konukçularına virülenste mikrobiyal sideroforların rolü ilk defa katekolat krisobaktin ve karboksilat akromobaktin (Persmark ve ark., 1989) üreten bakteriyel patojen *Erwinia chrysanthemi* için gösterilmiştir (Enard ve ark., 1988, Masclaux and Expert 1995, Neema ve ark., 1993). Yabani tipler, chrysobactine dayalı demir alımı bakımından eksik olan mutantlar açısından mukayese edildiğinde, bu sideroforların sistemik enfeksiyon için gerekli olduğu ortaya çıkmıştır (Enard ve ark., 1988, Neema et al. 1993). Ayrıca hem krisobaktin hem de akromobaktin biyosentezinden eksik olan mutantların virülens bakımından da zayıfladıkları gözlenmiştir (Franza ve ark., 2005).

Fitopatogenik funguslarda siderofor biyosentezinin genetik karakterizasyonu sadece iki basidiomycete fungus türü için kaydedilmiştir (Birch and Ruddat 2005, Mei ve ark., 1993).

Bunlardan mısır rastığı fungusu *U. maydis* iki hidroksimat siderofor olan, ferrikrom ve ferrikrom A üretmiştir (Mei ve ark., 1993). Bu fungusun L-ornithine-N⁵-monooxygenase proteinini kodlayan *sid1* geninin çıkarılmasının siderofor biyosentezini tamamen önlediği ancak konukçuya olan virülensinde önemli bir azalma gözlenmediği tespit edilmiştir.

Benzer şekilde beyaz şapkalı fitopatogen olan *Microbotryum violaceum*, rodotorulik asit sentezi olmayan konukçuda yabani tipin virülensini göstermiştir (Birch and Ruddat 2005).

Yeni sideroforların bitkilere olan fungal virülenste önemli olduğuna dair yeni kayıtlar bulunmaktadır. Fakat bu durumun daha çok konukçu-patojen kombinasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir. Son zamanlarda yapılan bir çalışma RIA sisteminin *U. maydis*'in konukçu enfeksiyonu için gerekli olduğunu rapor etmiş ve demirin bu fungusun virülensi için anahtar

faktör olduğunu göstermiştir (Eichhorn ve ark., 2006). Fungal ekstraselüler sideroforların virülens belirleyici olduğu ilk defa 2006'da Oide ve ark. tarafından tespit edilmiştir.

Cochliobolus heterostrophus'da NPS6 siderofor geninin kesilmesi mısır bitkisine virülenste azalmaya neden olan bir streyn oluşturmuştur ve *C. miyabeanus*, *G. zea*, *F. graminearum* ve *A. brassicicola*'da NPS6 geninin kesilmesi sırasıyla çeltik, buğday ve arabidopsiste patojenitede azalmaya yol açmıştır. Nps6 ürünü *C. heterostrophus*'da coprogen, *A. brassicicola*'da dimethylcoprogen ve *F. graminearum*'da triasetilfusarinin C (TAFC) üretir.

C. heterostrophus'da non-ribosomal peptid sentezi 6 (NPS6) geninin çıkarılması sadece virülenste azalmaya yol açmamış aynı zamanda analiz edilen tüm türlerde oksidatif strese duyarlılığa ve aseksüel sporlanmada azalmaya yol açmış ve dışardan demir uygulanması bu bozulmaları düzeltmiştir. Ayrıca ekstraselüler siderofor biyosentezi kaybından dolayı demir eksikliği, *nps6* streynlerinde anormal fenotiplere neden olmuştur.



Şekil 3. Hem ekstra hem intra siderofor biyosentezi eksik mutantlar yabani tiplerle karşılaştırıldıklarında konukçularına olan virülensliklerinde büyük azalma gözlenmiştir. Tüm 3 panelde yabani tiplerle inokule edilenler solda *nps2nps6* mutantları ile inokule edilenler sağdadır. (a) mısırdaki *C. heterostrophus* (b) buğdayda *F. graminearum* (c) arabidopsiste *A. brassicicola* (Hubertus ve ark., 2008)

Cochliobolus heterostrophus'un non-ribosomal peptid sentezi 2 (Nps2) intraselüler sideroforu, ferrikrom biyosentezi yapar. Nps2'nin çıkarılması virülenste herhangi bir etki oluşturmamış; ancak *nps2nps6* ikili gen çıkarılması tek başına *nps6* çıkarılan mutantların aksine, belirgin derecede virülenste azalma göstermiştir. İkili gen çıkarılan streynler intra ve ekstraselüler siderofor biyosentezi yapamamıştır.

Bu ikili, *nps2nps6*, gen çıkarılmış fenotipler *F. graminearum* ve *A. brassicicola*' da görülmüştür (Şekil 3).

Cochliobolus ve *Alternaria*'nın 2 tane siderofor A (*SIDA*) geni içerdiği, *Pyrenophora tritici repentis*' in ise 3 adet *SIDA* geni içerdiği saptanmıştır. Halbuki *Fusarium*, *Neurospora* ve *Magnaporthe* gibi *Sordariomycetes*'lerin sadece bir tane siderofor A geni (*SIDA*) geni taşıdığı ortaya çıkmıştır.

Non-ribosomal peptit sentezi 2 (*NPS2*) ve non-ribosomal peptit sentezi 6 (*NPS6*) geninin *C. heterostrophus*' da çıkarılması intra ve ekstraselüler sideroforların tamamen yok olmasına yol açmıştır. Aynı zamanda siderofor A1 (*SIDA1*) geninin çıkarılması hidroksimat siderofor içermeyen bir streyn oluşumuna yol açmış, bu streyn; oksidatif stres, demir tüketim stresine aşırı duyarlılık, mısıra virülensinde azalma ve anormal seksüel gelişme göstermiştir. Yapılan bir diğer çalışmada *F. graminearum*' un siderofor biyosentezi ile ilgili Non-ribosomal peptit sentezi (NRPS) kodlu 3 tane gene sahip olduğu görülmüştür. Bu genler;

Non-ribosomal peptit sentezi 6 (*NPS6*) ekstraselüler triasetilfusarinin C (TAFC) biyosentezi için, Non-ribosomal peptit sentezi 2 (*NPS2*) intraselüler ferrikrosin (FC) biyosentezi için, ürünü tanımlanamayan Non-ribosomal peptit sentezi 1 (*NPS1*)' dir. Bulgular bu 3 genin enfeksiyon alanlarında demir metabolizması için gerekli olduğunu göstermiştir. Bu bulgular Greenshield ve arkadaşlarının *F. graminearum*' un siderofor A1 (*SID1/SIDA*) çıkarılmış streynlerinin virülensinde azalmayı gösterdiği son raporla da uyumludur. *Magnaporthe grisea*'nın intraselüler ferrikrom biyosentezi için gerekli olan *SSMI* geninin çeltikte patojenisitede rol aldığı bildirilmiştir (Hof ve ark., 2007).

Bu siderofor mekanizmasının konidi oluşumu, çimlenme, apresoryum gelişimi ve apresoryumdaki reaktif oksijen türlerinin dengelenmesi ile ilgili birçok role sahip olduğu tespit edilmiştir (Aguirre ve ark., 2005).

Patojenik mikroorganizmalarla ilgili olarak demir rekabetinde bitkilerin savunma tepkileri genelde ferritin ile düzenlenmiş savunmalar hariç bilinmemektedir. 24 alt ünitelerden oluşan tipik ferritinler 4000'e kadar demir atomunu barındırabilirler ve ferritine bağlı olan bu demir kesinlikle reaktif oksijen reaksiyonlarına katılmaz. Böylelikle ferritin demirle katalize edilen serbest radikal oluşumunu engelleyerek antioksidant özellikler gösterir.

Hayvan Patojeni Funguslar Ve Sideroforlar

Son zamanlardaki çalışmalar hayvanlarda *A. fumigatus*' un demir kazanma ve serumda canlı kalabilme yeteneğinin konukçu transferin' (konukçunun demir bağlayan proteini) den demir uzaklaştırılmasına bağlı olduğunu göstermiştir. Siderofordan yoksun *A. fumigatus* mutanti, kan agarı üzerinde gelişmemiştir. *A. fumigatus* siderofor biyosentezinin siderofor A

(*SidA*) geninin inaktivasyonu ile iptali, hayvanlarda görülen akciğer *Aspergillus* hastalığını oluşturmamıştır. Benzer etkileşimler *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans* ve *Cryptococcus neoformans* gibi diğer hayvan patojenlerinde de saptanmıştır (Hubertus ve ark., 2008).

Simbiyotik İlişkiler

Sideroforlar aynı zamanda *Epichloe festucae* ve çimen birliklerindeki karşılıklı simbiyotik ilişkilerin devamı için de önemlidir (Johnson ve ark., 2007, Johnson 2008). *E. festucae* iki siderofor oluşturur; hücre içi ferrikrom ve hücre dışı Fusarinin. NRPS2 geninin hücre dışı siderofor biyosentezi ve simbiyosis için gerekli olduğu saptanmıştır. Diğer yandan ferrikrom sideroforun Non-ribosomal peptit sentezi (NRPS) geninin inaktivasyonunun simbiyosiste herhangi bir etki göstermediği gözlenmiştir.

Mikorizal simbiyozis çok sayıda karasal bitkinin mineral beslenmesini pozitif olarak etkilemektedir (Perotto and Bonfante 1997). Mikorizal interaksiyonda rol alan funguslar için 4 tip hidroksamat siderofor tanımlanmıştır:

1. Ericoid mikoriza (düğüm oluşturur) Fusarinin C ve ferrikrosin (FC) (Haselwandter ve ark., 1992),
2. Ektomikorizal *Cenococcum geophilum* ile ferrikrosin (FC) (Haselwandter and Winkelmann 2002),
3. Ektendomikorizalar *Wilcoxina* spp. ve *Phialocephala fortinii* ile ferrikrosin (FC) (Bartholdy ve ark., 2001, Prabhu ve ark., 1996),
4. Orkide mikorizaları *Ceratobasidium* spp. ve *Rhizoctonia* spp. mikorizaları ile yeni bir trihidroksimat siderofor olan basidiokrom' dur (Haselwandter ve ark., 2006).

Bu simbiyotların siderofor oluşumu henüz kanıtlanmamış olmasına rağmen bitkiye demir sağlanmasını sağladıklarına inanılmaktadır (Haselwandter 1995, Haselwandter ve ark., 2006, Haselwandter and Winkelmann 2002). Ancak ektomikoriza olan *Laccaria biocolor*' un hidroksamat siderofor biyosentezi içermediği gözlenmiştir. Bitkiler fungal sideroforlardan aynı zamanda farklı bir yol ile de yararlanabilirler. Çünkü fungal sideroforların (Fusarininler ve dimerium asit) hidroliz ürünleri ile eriyen demir, bitkiler için yararlı bir demir kaynağıdır (Hordt ve ark., 2000).

Yeni tür *Debaryomyces mycophilus* sp. nov. mayası (odun biti türlerinin barsaklarından izole edilen) bilinen tüm fungus türlerinden siderofor (ferrikrom) içermeyen veya normal olarak doğada bulunmayan fazla miktarda demir içermeyen ortamlarda gelişmesi ile ayrılmaktadır. Bu buluş ekolojik bağımlılığa yeni bir örnek oluşturmaktadır (Thanh ve ark., 2002).

Siderofor Belirleme Yöntemleri

Değişik organizmalarda bulunan sideroforların belirlenme yöntemleri ortaya konmuştur. Örneğin bakterilerin ve fungusların oluşturduğu sideroforların belir-

lenme protokolleri açıklanmıştır. Bu protokollerde genellikle CAS (Chrome azürol S) yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem universal siderofor belirleme yöntemi (CAS) olup, boya olarak chrome azürol S'nin kullanıldığı bakteri ve fungusların ürettiği sideroforların tespitinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde öncelikle fungal kültürler;

%2 lik malt ekstrakt sıvı ortamda geliştirilir, santrifüj edilir üstte kalan sıvı -200C de depolanır.

Bu sıvı %1 lik demir klorürle karıştırılır. Siderofor varsa mavi-mor bir renk oluşur ve kromatografi aşamasına geçilir.

Kromatografiden sonra kalan kısım küçük bir plastik tüp içinde süspansiyon edilir ve whatman kağıt üzerinde elektroforez yapılır.

Elektroforezden sonra bu kağıt kaldırılıp, kurutulur.

Ultraviyole ışık altında kağıt kontrol edilir ve floresan ışık verenler işaretlenip CAS solüsyonu ile spreylenerek kontrol edilir.

Siderofor elde etmede kullanılan diğer yöntemler:

- Özel olmayan siderofor tespit yöntemi,
- Demir klorür sprey reaksiyon yöntemi,
- Ninhidrin sprey yöntemi (Coleman 1995),

SONUÇLAR

Son yıllarda siderofor sistemlerinin, hepsinde değilse bile pek çok fungusta demir dengelenmesinde ana element olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sistemler gelişmeyi, oksidatif strese dayanıklılığı, seksüel ve aseptüel çoğalmayı etkilemektedir. Bundan öte sideroforların en azından bazı hayvan ve bitki patojeni fungal türlerin virülenslerini belirleyen yaygın bileşikler olduğu da ortaya çıkmıştır (Hubertus ve ark., 2008). Sideroforların aynı zamanda simbiyozda da önemli rol aldıkları saptanmıştır.

Virulenslikte demir dengeleme mekanizmalarının rolünün daha çok konukçu-patojen sistemine bağlı olduğu saptanmıştır. Fungusların demir gereksinimi, potansiyel olarak yeni antifungal ilaçlamaların geliştirilmesine ufuklar açabilir. Örneğin demir çelatlama tedavisi veya yüksek afiniteli demir alımının engellenmesi veya sideroforlar için kimyasalların yerini tutan gelişmeler, üzerine gidilebilecek konular arasında sayılabilir. Siderofor sentezleyen funguslar için siderofor taşıyıcıları veya siderofor biyosentetik enzimlerin engellenmesi özellikle ümitvar gözükmektedir. Çünkü burada rol alan proteinler memelilerde ve bitkilerde bulunmamaktadır.

Son zamanlarda patojenik bakterilerin, siderofor biyosentezini engelleyen ilk anti bakteriyel ajanı rapor edilmiştir (Quadri 2007). Fungal siderofor sistemler hakkındaki bilgilerin kullanılması yanında gelecekteki hedef, keşfedilmemiş bazı mekanizmaların açıklanması olacaktır; biyosentetik siderofor yolların detayları, siderofor salgılama mekanizmaları, intrasellüler sideroforlardan demir salgılama mekanizmaları ve

demir metabolizması, reaktif oksijen türleri, tek başına fungal gelişme veya konukçu ile interaksyonları, gibi konuların açıklığa kavuşturulması yararlı olacaktır (Hubertus ve ark., 2008).

KAYNAKLAR

- Aguirre J, Rios-Momberg M, Hewitt D, Hansberg W. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 13:111–18.
- Bartholdy BA, Berreck M, Haselwandter K. 2001. Hydroxamate siderophore synthesis by *Phialocephala fortinii*, a typical dark septate fungal root endophyte. *Biometals* 14:33–42.
- Birch LE, Ruddat M. 2005. Siderophore accumulation and phytopathogenicity in *Microbotryum violaceum*. *Fungal. Genet. Biol.* 42:579–89.
- Coleman, H. W. 1995. Siderophores. *Bioscene Vol 21* (3): November.
- Eichhorn H, Lessing F, Winterberg B, Schirawski J, Kamper J, et al. 2006. A ferrooxidation/ permeation iron uptake system is required for virulence in *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 18:3332–45.
- Enard C, Dirolez A, Expert D. 1988. Systemic virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 requires a functional iron assimilation system. *J. Bacteriol.* 170:2419–26.
- Franza T, Mahe B, Expert D. 2005. *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Mol. Microbiol.* 55:261–75.
- Johnson R, Voisey C, Johnson L, Pratt J, Fleetwood D, et al. 2007. Distribution of NRPS gene families within the *Neotyphodium/Epichloe* complex. *Fungal. Genet. Biol.* 44:1180–90.
- Johnson L. 2008. Iron and siderophores in fungal-host interactions. *Mycol. Res.* In pres.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219:1–14.
- Haselwandter K, Dobernigg B, BeckW, Jung G, Cansier A, Winkelmann G. 1992. Isolation and identification of hydroxamate siderophores of ericoid mycorrhizal fungi. *Biometals* 5:51–56.
- Haselwandter K. 1995. Mycorrhizal fungi: siderophore production. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15:287–91.
- Haselwandter K, Winkelmann G. 2002. Ferricrocin—an ectomycorrhizal siderophore of *Cenococcum geophilum*. *Biometals* 15:73–77.
- Haselwandter K, Passler V, Reiter S, Schmid DG, Nicholson G, et al. 2006. Basidiochrome—a novel siderophore of the orchidaceous mycorrhizal fungi *Ceratobasidium* and *Rhizoctonia* spp. *Biometals* 19:335–43.

- Hof C, Eisfeld K, Welzel K, Antelo L, Foster AJ, Anke H. 2007. Ferricrocin synthesis in *Magnaporthe grisea* and its role in pathogenicity in rice. *Mol. Plant Pathol.* 8:163–72.
- Hordt W, Romheld V, Winkelmann G. 2000. Fusarinines and dimerum acid, mono- and dihydroxamate siderophores from *Penicillium chrysogenum*, improve iron utilization by strategy I and strategy II plants. *Biometals* 13:37–46.
- Hubertus Haas, Martin Eisendle and B. Gillian Turgeon. 2008. Siderophores in Fungal Physiology and Virulence. *Annu.Rev. Phytopathol.* 46:149-187.
- Kraemer, Stephan M., Butler, Allison, Borer, Paul, and Cervini-Silva, Javiera. 2005. "Siderophores and the dissolution of iron bearing minerals in marine systems". *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 59: 53–76.
- Kraemer, Stephan M. 2005. "Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores". *Aquatic Science* 66: 3–18.
- Kraemer, Stephan M., Crowley, David, and Kretschmar, Ruben. 2006. "Siderophores in Plant Iron Acquisition: Geochemical Aspects". *Advances in Agronomy* 91: 1–46.
- Masclaux C, Expert D. 1995. Signaling potential of iron in plant microbe interactions: the pathogenic switch of iron transport in *Erwinia chrysanthemi*. *Plant J.* 7:121–28.
- Matzanke BF.1994. Iron storage in fungi. See Ref. 214a, pp. 179-213.
- Mei B, Budde AD, Leong SA. 1993. *sid1*, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:903–7.
- Miller, Marvin J. 2008. Siderophores (microbial iron chelators) and siderophore-drug conjugates (new methods for microbially selective drug delivery). University of Notre Dame, 4/21/2008 <http://www.nd.edu/~mmiller1/page2.html>
- Neema C, Laulhere JP, Expert D. 1993. Iron deficiency induced by chrysobactin in *Saintpaulia* leaves inoculated with *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Physiol.* 102:967–73.
- Neilands, J. B., 1995. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport
- Oide S, Moeder W, Haas H, Krasnoff S, Gibson D, et al. 2006. NPS6, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. *Plant Cell* 18:283–53.
- Persmark M, Expert D, Neilands JB. 1989. Isolation, characterization, and synthesis of chrysobactin, a compound with siderophore activity from *Erwinia chrysanthemi*. *J. Biol. Chem.* 264:3187–93
- Perotto S, Bonfante P. 1997. Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. *Trends Microbiol.* 5:496–501.
- Prabhu V, Biolchini PF, Boyer GL. 1996. Detection and identification of ferricrocin produced by ectendomycorrhizal fungi in the genus *Wilcoxina*. *Biometals* 9:229–34.
- Quadri LE. 2007. Strategic paradigm shifts in the antimicrobial drug discovery process of the 21st century. *Infect. Disord. Drug Targets* 7:230–37.
- Schrettl M, Bignell E, Kragl C, Sabiha Y, Loss O, et al. 2007. Distinct roles for intraand extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS Pathog.* 3:e128.
- Shashidhar J, Sashidhar RB, Deshpande V. 2005. Purification and characterization of mycoferritin from *Aspergillus parasiticus* (255). *FEMS Microbiol. Lett.* 245:287-93.
- Turgeon BG, Oide S, Bushley KE. 2007. Creating and screening *Cochliobolus heterostrophus* nonribosomal peptide synthetase mutants. *Mycol. Res.* 112 (Part 2):200–6.