

GRAM (-) BAKTERİLERDE TRANSPORT OLAYININ OSMOTİK ŞOK YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

Gül GÜNER

*Edirne Tıp Fakültesi, Biokimya Kürsüsü,
Fatih - İstanbul.*

ÖZET

Aerobakter aerogenes'te, Neu ve Heppel'in kurmuş oldukları temellere dayanarak, osmotik şok gerçekleştirildi. Bu şokun, bakteri yapısındaki birtakım proteinleri serbestleştirtiği, diğer tarafta şoka uğramış hücrelerde, mezo - inozitol transportunun belirgin olarak düştüğü saptandı.

GİRİŞ

Osmotik şok yöntemi, Gram (-) bakterilerde hücre yüzeyine yakın bulunan birtakım hidrolitik enzimlerin ve aktif transport için gerekli faktörler olan binding proteinlerin selektif olarak serbestleştirilmesine olanak vermektedir^{4,8,9,10,11}. Gram (-) bakterilerin dış zarı EDTA ile işlem gördüğünde, kısmın olara bozulmakta ve anı bir osmotik değişiklik yaratıldığında, bakteri proteinlerinin %3,5 u ve 260 nm'de absorpsiyon yapan diğer maddeler serbestleşmektektir. Bu maddeler, sitoplazmadan değil, Gram (-) bakterideki iç zar ile dış zar arasındaki periplazmik boşluktan açığa çıkmaktadırlar⁶.

Şoka uğrayan hücrelerin viabilitelerini korumaları, osmotik şok yönteminin en önemli özelliğidir¹. Böylelikle osmotik şoktan sonra hücreler üzerinde çalışmalar yapılmaktı ve özellikle bakterilerde transport olayı üzerinde aydınlatıcı bilgiler elde edilebilmektedir.

Hayvanlarda ve mikroorganizmalarda büyümeye faktörü olan mezo - inozitol, Aerobacter aerogenes hücrelerine indüktibl bir aktif transport mekanizması ile girmektedir^{2,3}. Çalışmamızın amacı, osmotik şokun, Aerobacter

aerogenes üzerine yaptığı etkiyi, ortama serbestleşen protein düzeyi ve şoka uğramış hücrenin mezo - inozitolu transport kapasitesindeki değişiklik yönünden incelemektir.

YÖNTEM VE GEREÇLER

$2 \text{-} {}^3\text{H}$ mezo - inozitol, filtrasyon deneylerinde kullanılmak üzere NEN, Dreieichenchain (Almanya)'dan temin edildi. Bakteri kültürü için Aerobacter aerogenes'in Magasanik 1033 suyu kullanıldı.

— Besi ortamı: 1 lt su, 1 g NH_4Cl , 12,4 g KH_2PO_4 , 200 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7,6 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 mg CaCl_2 , 13,6 g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ve 1 ml oligoelement çözeltisi içeren mineral ortam ile karbon kaynağı olarak %1 lik mezo - inozitolden oluşmaktadır.

Oligoelement çözeltisi: (1 lt su için: $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,2 mg), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,64 mg), CuSO_4 (0,12 mg), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (0,2 mg) ve $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,22 mg).

— Sterilizasyon, Webeco tipi otoklavda, $\Delta P : 1, 4$ de yapıldı. Mineral ortam ve mezo - inozitol için ayrı sürelerde (1 saat ve yarım saat) sterilizasyon uygulandı.

— Bakteri kültürü, 1 lt lik erlende bulunan ortama suş inokülasyonundan sonra, $30^\circ\text{C}'de$, aerobik şartlarda dakikada 250 - 270 devirde 16 - 20 saat çalkalamak suretiyle elde edildi. Bu şartlarda hazırlanan kültürün, 54 No.lu filtre ile verdiği turbidite, 200 - 300 Klett ünitesi idi.

2 lt yi geçen bakteri kültürlerinin hazırlanmasında, fermantör kullanıldı.

Osmatik şokun uygulanması ve serbestleşen protein düzeyinin incelenmesi:

Bakterilerde, Neu ve Heppel'in yöntemi temel alınarak osmotik şok aşağıdaki şekilde uygulandı:

— Bakteri kültürüne, 0,03 Molariteyi sağlamak üzere, 1 M NaCl ve 1 M Tris - HCl tamponu ($\text{pH} : 7,3$), gereği hacimde eklendi.

— Darası alınmış kaplarda, 5 000 devir/dak. da 10 dakika santrifüj edilerek üst sıvı atıldı.

— Tartım yapılarak, çöken hücrelerin ağırlığı kaba olarak saptandı.

— Hücreler, ağırlıklarının 10 misli hacimde Tris - HCl tamponunda ($\text{pH} : 7,3$, 0,033M) tekrar süspansiyon haline getirildi.

Tablo : I

İŞLEMLERİN YAPILIŞ ŞEMASI

Enkübasyon (500 ml besi ortamında, $30^\circ\text{C}'da$, 16-20 saat çalkalayarak)

↓
Santrifügasyon (5000 devir/dakika, 10 dakika)

↓
Myoinozitol yönünden aç bırakma (500 ml mineral ortamda)

KONTROL

Santrifügasyon (5000 devir/dak., 10 dak.)

↓
Yıkama (Tris - HCl tamponunda)

↓
Santrifügasyon (5000 devir/dak., 10 dak.)

↓
Nemli ağırlığın saptanması

↓
10 hacim mineral ortam eklenmesi

↓
Çalkalama (15 dakika)

↓
Santrifügasyon (10 000 devir/dak., 15 dak.)

↓
20 hacim mineral ortam eklenmesi

↓
Çalkalama (15 dakika)

↓
Santrifügasyon (10 000 devir/dak., 15 dak.)

↓
250 ml mineral ortam eklenmesi

ŞOK

Santrifügasyon (5000 devir/dak., 10 dak.)

↓
Yıkama (Tris - HCl tamponunda)

↓
Santrifügasyon (5000 devir/dak., 10 dak.)

↓
Nemli ağırlığın saptanması

↓
10 hacim sakkaroz - EDTA karışımının eklenmesi

↓
Çalkalama (15 dakika)

↓
Santrifügasyon (10 000 devir/dak., 15 dak.)

↓
20 hacim destile su ($4^\circ\text{C}'da$) ve MgCl_2 eklenmesi

↓
Çalkalama (15 dakika)

↓
Santrifügasyon (10 000 devir/dak., 15 dak.)

↓
250 ml mineral ortam eklenmesi

— Karıştırmak suretiyle, aynı hacimde, ancak %40 sakkaroz ve 5 mM NaEDTA içeren tampon çözeltisi (0,033M Tris - HCl, $\text{pH} : 7,3$) eklenerek 15 dakika çalkalandı.

— 15 dakika 10 000 devir/dak. da santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı.

— Çöken hücreler, ağırlıklarının 20 misli hacimde, $4^\circ\text{C}'a$ getirilmiş destile su ile tekrar süspansiyon haline getirilerek, aynı dakikada, 1 M MgCl_2 çözeltisinden, 1 mM'e seyrelecek şekilde eklendi.

— 15 dakika, 10 000 devir/dak. da, santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı - şok sıvısı - ve altta çöken şoka uğramış hücreler elde edilmiş oldu.

Şok sıvısından alınan nümunelerde, Lowry'nin kurmuş olduğu yöntem kullanılarak protein tayini yapıldı⁷. Ayrıca, şok sıvısının total hacmi ölçüldü. Hücrelerin kuru ağırlığı saptandı (Bk. filtrasyon deneyleri).

— *Osmotik şokun uygulanması ve şoka uğramış hücrelerde filtrasyon deneyleri ile mezo - inozitol transportunun incelenmesi:* (Tablo : I).

Bakteri kültürü, önce, 10 dakika 5000 devir/dak. da santrifüj edilerek çöken hücreler, steril mezo - inozitsüz besi ortamına (mineral ortama) alındı. 30 dakika 30°C'da çalkalanarak, bakterilerin mezo - inozitol yönünden aç bırakılmaları sağlandı. Daha sonra, kültür, iki kısma bölünerek, kontrol ve şok deneyleri, Tablo I' e göre hazırlandı.

Filtrasyon Deneyleri :

— Kontrol ve şok nümuneleri için, 0,1 ml 0,5 mg/ml lik $2 - ^3\text{H}$ mezo - inozitol ile 0,9 ml mineral ortam içeren enkübasyon tüpleri ve yalnızca 1 ml mineral ortam içeren yıkama tüpleri hazırlandı. Bakteri hücresini tutan ve mezo - inozitol molekülünü geçiren selüloz nitrat filtreleri (Porlarının çapı : 0,45 μ), vakuma bağlanabilen süzme ünitelerine yerleştirildi.

— O zamanda, 1 ml hücre süspansiyonu Eppendorf pipeti yardımıyla enkübasyon tüplerine konuldu.

— 30 saniye sonra, bu karışımından 1 ml, önceden ıslatılmış selüloz nitrat zarı üzerine aktarıldı. Zar, yıkama tüplerinde bulunan çözelti ile yıkandı.

— Zarlar, ağızı kapaklı plastik şişelere alınarak 10 ml Bray - Cab - 0 - Sil çözeltisi eklendi ve sayaçta, her zarın tutmuş olduğu, yani, bakteri hücresine girmiş olan radyoaktivite, CMP olarak saptandı.

— Kuru ağırlık : Daha sonra yapılacak hesaplarda kullanılmak üzere, belirli hacimde bakteri süspansiyonunda bulunan hücrelerin kuru ağırlığı saptandı. Bunun için, iyice karıştırılmış süspansiyondan 5 ml, önce darası alınmış santrifüj tüplerine aktarilarak, maximum hızda çevrildi. Üst sıvı atılarak, tüp desikatörde 10 - 20 saat bekletildi. Tekrar tartım yapılarak aradaki fark bulundu.

BULGULAR

— Deneylerimizde, hacmi 3 - 12 lt arasında değişen bakteri kültürü kullanıldı. Alınan hacim ve kültürün turbiditesine göre, 4,8 - 29,8 g arasında

değişen total hücre ağırlığı elde edildi. Şok sıvılara serbestleşmiş olan protein konsantrasyonu, Lowry yöntemiyle saptandıktan sonra, her deney için gram bakteri hücresi başına açığa çıkmış olan miligram protein hesaplandı (Tablo : II).

Tablo : II Şok sıvısında protein tayin sonuçları.

Deneys No.	Bakteri kültür hacmi (lt)	Hücrelerin toplam ağırlığı (g)	şok sıvı hacmi ml	$\mu\text{g protein}/\text{ml şok sıvısı}$	$\text{mg protein/g hücre}$
1	3	4,8	120	95	2,4
2	6	10,2	1000	40,8	4,0
3	6	8,5	500	100,0	5,8
4	12	19,2	1200	53,5	3,3
5	12	29,8	1300	83,0	3,6
6	12	20,4	1200	60,7	3,5
7	12	21,1	1300	104,3	6,4
8	6	9,6	425	144,0	6,3

— Mezo - inozitol transportunun incelendiği filtrasyon deneylerinin sonuçları, Tablo III de özetlenmiştir.

Tablo : III Filtrasyon deneyleri sonuçları.

Deneys No.	C P M	Hücre Ağırlığı (5ml de mg)	Ağırlık için Düzeltme	Transport düşüş oranı (%)
1	Kontrol hücreleri	3000	6,45	465
	Şok hücreleri	1852	6,46	287
2	Kontrol hücreleri	8698	8,50	1023
	Şok hücreleri	4423	8,00	552
3	Kontrol hücreleri	17864	8,08	2210
	Şok hücreleri	7656	7,30	1048
4	Kontrol hücreleri	12485	7,80	1600
	Şok hücreleri	7892	7,70	1024
5	Kontrol hücreleri	6116	6,70	912
	Şok hücreleri	3550	6,60	538
6	Kontrol hücreleri	8755	8,90	984
	Şok hücreleri	5389	8,95	602

TARTIŞMA

Membranlar, hücreye giren ve hücreden çıkan maddeler için bir bariyer oluştururlar⁵. Bir maddenin içeriye girmesi, büyük bir çoğunlukla, membranın permeabilitesi sonucu değil, «aktif transport» mekanizmasının sonucudur. Bu transport mekanizmasında, transport edilen madde için özgül bağlama yüzeyi taşıyan periplazmik binding proteinlerin önemi, son yıllarda üzerinde durulan bir konudur.

Çalışmamızda, osmotik şokun, *Aerobacter aerogenes*'den, dışarıya proteinler serbestleştirdiğini, diğer tarafta, şoka uğramış hücrelerde, mezo - inozitol transportunda belirgin bir düşüş olduğunu gözlemledik. Bu bulgular, *Aerobacter aerogenes* hücresinde, mezo - inozitol transportunda görev alan önemli bazı faktörlerin (binding proteinin) hücre dışına serbestleştirildiğini ve buna bağlı olarak hücre mezo - inozitol transport kapasitesinin düşmüş olacağını düşündürmektedir.

Yapılan literatür taramasında, *Aerobacter aerogenes* te, mezo - inozitolun spesifik bir binding proteinin aracılığıyla transportuna dair bir bulguya rastlanmadığından, bu bulguları başka araştırmaların bulguları ile karşılaştırma olanağımız olmamıştır.

SUMMARY**STUDIES ON THE TRANSPORT PHENOMENA IN GRAM (-) BACTERIES USING THE OSMOTIC SHOCK TECHNIQUE**

Using the method of Neu and Heppel, osmotic shock has been applied to *Aerobacter aerogenes*. Protein determinations were made in the shock fluid and myo - inositol transport was observed to decrease in the shocked cells.

KAYNAKLAR

- 1 — ANRAKU Y. ve HEPPEL, L.A.: *J. Biol. Chem.* **242**, 2561 (1967).
- 2 — DESHUSSES J. ve REBER G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **274**, 568 - 605 (1972).
- 3 — DESHUSSES J. ve REBER G.: *Experientia (Basel)* **30**, 996 - 997 (1974).
- 4 — HEPPEL L.A.: *Science*, **156**, 1451 - 1455 (1967).
- 5 — HEPPEL L.A.: in *Structure and Function of Biological Membranes*, ed. Lawrence I. Rothfield, Academic Press, New York, London, 224 - 247 ve 314 - 315 (1971).
- 6 — KEPES A.: *Biochemie*, **55**, 693 - 702 (1973).

- 7 — LOWRY D.H., ROSEBROUGH N.J., FARR E.L. ve RANDALL R.F., *J. Biol. Chem.* **193**, 265 - 275 (1951).
- 8 — NEU H.C. ve CHOU J.J.: *J. Bacteriol.*, **94**, 1934 - 1945 (1967).
- 9 — NEU H.C. ve HEPPEL L.A.: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **17**, 215 - 219 (1964).
- 10 — NEU H.C. ve HEPPEL L.A.: *J. Biol. Chem.*, **240**, 3685 - 92 (1965).
- 11 — NOSSAL N.G. ve HEPPEL L.A.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 3055 - 3062 (1966).