

Mikroorganizmalarda Ağır Metal Stresine Yanıtın Proteom Analizi ile Araştırılması¹

Nur Koçberber Kılıç², Gönül Dönmez³

Ağır metaller ve Etkileri

Birçok ağır metal, d orbitallerinin tamamen dolu olması nedeniyle geçiş elementleridir. Bu d orbitalleri ağır metal katyonlarına redoks tepkimelerine girebilen veya giremeyen herhangi bir bileşik ile karmaşık yapı oluşturmasını sağlamaktadır. Bu nedenle, ağır metaller birer iz element olarak birçok karmaşık biyokimyasal reaksiyonda önemli rol oynamaktadır (1). Örneğin Ca(II), Co(II), Cr(VI), Cu(II), Fe(II), K(I), Mg(II), Mn(II), Na(I), Ni(II) ve Zn(II) gibi metaller esansiyeldir ve besiyerlerine eklenmeleri gerekmektedir. Bu metaller, mikrobesein olarak redoks tepkimelerinde, moleküllerin elektrostatik etkileşimlerini kararlı tutmak ve ozmotik basıncı kontrol etmek için enzimlerin bileşenleri şeklinde kullanılırlar. Fakat Ag(I), Al(I), Au(II), Cd(I), Pb(II) ve Hg(II) gibi ağır metallerin biyolojik bir önemi yoktur ve bu metaller esansiyel değildirler. Aynı zamanda besinsel değerleri de yoktur. Bununla birlikte, mikroorganizmalara oldukça toksik etkileri bulunmaktadır. Bu toksik metaller önemli hücrenel bileşenlerle kovalan ve iyonik bağlarla etkileşime girmektedirler. Yüksek konsantrasyonlarda esansiyel olan ve olmayan bütün metaller hücre zarı hasarına yol açıp, enzim spesifikliğini değiştirebilir, hücrenel fonksiyonları bozabilir ve DNA'nın yapısına zarar verebilmektedir. Bu nedenle metallerin bütün canlı hücrelerin metabolizmalarının dengede tutulmasında çok önemli bir yer oluşturduğu açıkça görülmektedir (1, 2).

Tekstil, deri, boya, metal ve kâğıt endüstrilerinden kaynaklanan atıksular fazla miktarda ağır metal içermektedir. Bu tip atıksuların arıtılmadan kontrolsüz bir şekilde çevreye boşaltılmaları o çevredeki canlılara toksik ve mutajenik etki yapmaktadır. Çeşitli metaller bazı organizmalarda canlılığın devam ettirilmesi için çok az miktarlarda kullanılsalar da yüksek konsantrasyonları hücrede zararlı etkilere yol açmaktadır. Gümüş(I), Al(I), Au(II), Cd(I), Pb(II) ve Hg(II) gibi toksik metallerin ise biyolojik önemi bulunmamakla birlikte hücrede düşük konsantrasyonda bile bulunmaları tehlikeli olmaktadır (2-6).

¹ Bu çalışma Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ danışmanlığında hazırlanıp, 1 Mayıs 2008 tarihinde tamamlanan "Proteomik Yaklaşımla Atıksu Kaynaklı Mikroorganizmalarda Cr(VI) Direnç Yollarının Araştırılması" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır.

² Dr., Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: nkili@science.ankara.edu.tr

³ Prof. Dr., Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara.

Bu nedenlerden endüstriyel atıksulardan öncelikle ağır metallerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Yapılan birçok çalışmada, ağır metallerin çeşitli mikroorganizmalarla endüstriyel atıksulardan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. Mikroorganizmaların toksik, karsinojen ve mutajen olabilen ağır metal iyonlarına tolerans gösterip bu kirleticileri ortamdaki uzaklaştırabilmesi ağır metallerle direnç geliştirmeleri ile gerçekleşmektedir. Mikroorganizmalarca ağır metallerin hücre içine alınmaması, hücre içinde veya dışında tutulması, kirleticinin daha az toksik forma çevrilmesi, metallerin hücre dışına aktif taşınması ve mikroorganizmanın metallerle karşı daha duyarsız hale gelmesi gibi direnç mekanizmaları bugüne kadar tanımlanabilmiş sistemlerdir (2, 4, 7-14).

Ağır metallerle dirençli mikroorganizmalar, bahsedilen bu direnç sistemlerinden birini veya birkaçını bir arada kullanarak ağır metallerin toksik etkilerinden korumaya ve canlılığını sürdürmeye çalışmaktadır. Bu direnç yollarında da stres koşullarına yanıt niteliğinde sentezi artan bazı proteinler anahtar rolü oynamaktadır. Ağır metal stresindeki bir mikroorganizma bu strese adapte olabilmek ve dayanıklılık sağlamak için bazı proteinlerin sentezini artırma yoluna gidebilmektedir (15-18). Bu proteinler hem hücre içinde sentezlenen sitozol proteinlerini hem de zar proteinleriyle birlikte hücre dışı bileşenlerini de içerebilmektedir. Bu tip proteinlerin bulunarak tanımlanması ile stres koşullarına mikrobiyel yanıtın belirlenmesi ancak "proteom çalışmaları" ile mümkün olmaktadır (15, 19).

Proteom Nedir?

Proteom terimi ilk kez 1995 yılında bir genomun proteomunun tam olarak tamamlanması anlamıyla kullanılmıştır. Genetik kaynaklı ve aktif proteomun sonlanan düzenleyici olaylar çağlayanında proteom, genomun son ürünü olarak görülmektedir. Genom proteoma kıyasla değişmezken, proteom oldukça yüksek bir dinamizme sahiptir (20).

Bu dinamizm, hücrenin çevresel koşullardan, çeşitli stres durumlarından etkilenmesine bağlı olabileceği gibi, hücrenin sağlıklı olup olmaması ile fizyolojik durumundan da kaynaklanabilmektedir. Bununla birlikte, farklı ortam koşulları altında genom aynı olsa bile farklı organizmaların farklı proteomları olacaktır (20).

Proteom çalışmaları ile belli koşullar altında bütün bir organizmanın, özel bir dokunun veya herhangi bir hücrenin proteomundaki değişiklikler belirlenebilmektedir. Bu tip çalışmaların iki önemli amacı bulunmaktadır: Birincisi, hücrelerden izole edilen proteinlerin tanımlanması, ikincisi de tanımlanmış proteinlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesidir. Bu iki hedefe ulaşmada kütle spektrofotometri (MS) vazgeçilmez bir araç olmuştur. Bu tip çalışmalarda öncelikle proteinler izoelektrik noktalarına (birinci boyut) ve daha sonra molekül ağırlıklarına (ikinci boyut) göre ayrılmaktadır. Bu şekildeki ayırma yöntemine iki boyutlu jel elektroforezi (2D jel elektroforezi) adı verilmiştir. MS analizinden önce proteinler denatüre edilerek, enzimatik yolla sindirilmektedir. Proteinlerin sindirilmesinde sıklıkla tripsin enzimi kullanılmaktadır. Son olarak peptid örnekleri kütle spektrofotometri ile ölçülmektedir (21). Bütün bu çalışmalar sonucunda, bir mikroorganizmanın bütününün, özel bir dokunun veya herhangi bir hücrenin proteomundaki değişiklikler izlenebilmektedir.

Çevresel Stres Koşulları ve Proteom Çalışmaları

Bir hücrenin, dokunun veya organizmanın genomundan yazılan tüm proteinlerin araştırılması olarak tanımlanan proteom çalışmaları, toksisite ile ilgili proteinleri veya protein gruplarının tespit edilmesinde de yardımcı olmaktadır. Ayrıca bu proteinler, toksik kirleticilerin bulunmasında biyolojik birer işaretleyici olarak da kullanılabilir. Bir mikroorganizmaya ait farklı stres koşullarında üretilen proteinlerin karşılaştırılması, o mikroorganizmaya ait proteom farklılıklarını ortaya koymaktadır. Stres koşullarında sentezi artan veya azalan proteinlerin tanımlanması ise organizmaların stres ortamına verdiği yanıtın moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına yardımcı olabilmektedir (22).

Farklı çevresel koşulların organizmalara etkisinin araştırıldığı proteom çalışmaları, global proteinleri veya tek bir hedef proteini kapsayabilmektedir. Global protein analizlerinde araştırmacılar maksimum sayıda protein elde edip tanımlamayı isterken, tek bir hedef protein ile analiz yapılacaksa, bu protein hücrenin bileşenlerinden bir tanesi (bir organel, hücre çekirdeği veya bir sinyal yolunun elemanı gibi) olabilmektedir (22).

Ekosistemde özellikle organik kirleticiler ve ağır metaller gibi stres koşullarından birincil olarak etkilenen canlı grubu bakteri ve fungus gibi mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar biyotransformasyon ve biyobirikimde anahtar rolü oynamaktadır. Bugüne kadar 200'den fazla bakteri ve yaklaşık 50 fungus genomu tanımlanmıştır. Bu genomlar küçük boyutları ve basit olmaları ile protein seviyesindeki değişikliklerin belirlenmesinde çok çekici modellerdir. Son yıllarda yapılan proteom çalışmaları, özellikle ağır metal kirliliğinin mikroorganizmaların hücrenin yanıtının protein bazında bulunmasında kullanılmaktadır (23).

Ağır Metal Stresine Mikrobiyel Yanıtın Belirlenmesinde Proteom Analizinin Kullanılması

Proteom analizi ile mikrobiyel ağır metal stres yanıtının belirlenmesiyle ilgili çalışmalar henüz çok yeni olmakla birlikte mikroorganizmaların ağır metal stresine maruz kalınca verdiği yanıtın ve savunma mekanizmalarında kullanılan proteinlerin araştırıldığı bazı proteom çalışmaları bulunmaktadır.

Vido ve arkadaşları (2001) *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile yaptıkları çalışmada, Cd(II) stresine maruz bıraktıkları maya hücrelerinin bu stres koşuluna hücrenin yanıtını proteom analizi ile belirlemişlerdir. Araştırmada, *S. cerevisiae* hücreleri ağır metal stresine cevap olarak 54 proteinin sentezini arttırırken, 43 proteinin sentezini azaltmıştır. Çalışmada, özellikle sülfür içeren aminoasitlerin biyosentezi ile ilgili enzimlerin yapımının arttığı görülmüştür.

Aynı zamanda araştırmacılar, glutatyon sentezi ile antioksidant özelliğe sahip bazı proteinlerin Cd(II) iyonları ile muamele edilen maya hücreleri tarafından daha fazla sentezlediğini göstermişlerdir.

Çalışmada, tiyoredoksin ve tiyoredoksin redüktaz gibi proteinlerin yapımı da ağır metal içeren ortamda artmıştır. Araştırmacılar sentezi artan bu proteinlerin *S. cerevisiae* mayasının Cd(II) iyonlarına karşı hücresel savunma mekanizmasında esansiyel olduğunu bildirmişlerdir (24).

Felicio ve arkadaşlarının (2003) gerçekleştirdiği ve Cu(II) iyonlarının *Acidithiobacillus ferrooxidans*'ın protein sentezi üzerine etkisinin araştırıldığı denemelerde demir içeren ortamda geliştirilen *A. ferrooxidans*'ın zar ve periplazma protein sentezine 200 mM Cu(II)'nin etkisi incelenmiştir. Mikroorganizma Cu(II) içermeyen ve bu kirleticiyi içeren iki farklı ortamda geliştirilmiştir. İki farklı besiyerinde geliştirilen bakterinin proteinleri izole edilerek protein profillerindeki farklılıklar 2D jel elektroforezi ile tespit edilmiştir. Bakır(II) içeren ortamda bakterinin bazı proteinlerinin sentezinin azaldığı veya bazılarının arttığı görülmüştür. Düşük molekül ağırlıklı proteinlerin Cu(II) iyonları içeren ortamda yapımının belirgin bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Çalışmada bu proteinlerin muhtemelen asidik proteinler olduğu ve dış zara ait elemanlar olabileceği ileri sürülmüştür. Araştırmacılar rustiksiyanin isimli bir proteinin ise ağır metal içeren ortamda daha fazla sentezlendiği tespit etmiştir.

Periplazmik bir protein olan rustiksiyaninin demir oksidasyon yolunun elektron taşıma zincirinde görev aldığı bilinmektedir. Bu nedenle araştırmacılar bakterinin iki yolla Cu(II) iyonlarına karşı cevap verdiğini belirlemişlerdir. Birinci yolda Cu(II) iyonlarına karşı geçirgenlik azaltılmakta, ikinci yolda ise Cu(II) periplazmada sentezi artan proteince tutulmaktadır (25).

Schmidt ve arkadaşları (2005) Ni(II) iyonlarının *Streptomyces acidiscabies* bakterisinin hücre içi protein sentezine etkisini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada, mikroorganizma Ni(II) içermeyen ve içeren iki farklı ortamda geliştirilmiştir. Protein sentezindeki farklılıklar 2D jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Denemelerde, Ni(II) içeren ortamlarda glikoliz ile ilgili bazı enzimlerin sentezinin arttığı, demir içeren süperoksit dismutazın sentezinin ise engellendiği bulunmuştur.

Sharma ve arkadaşları (2006) *Pseudomonas fluorescens*'in ağır metal stresine karşı gösterdiği direnç mekanizmasında proteinlerin rolünü proteomik bir yaklaşımla açıklamışlardır. Çalışmada bakteri çeşitli ağır metallere maruz bırakıldığında farklı olarak sentezlenen proteinleri 2D jel elektroforezi ile belirlenmiş ve MS ile tanımlanmıştır. Bakteri Pb(II) ve Cu(II)'ye maruz bırakılınca spo VG ile enolaz proteinlerinin sentezinin arttığı görülmüştür. Mikroorganizma Co(II) ağır metale maruz kaldığında ise varsayılan proteinin sentezinin azaldığı, ksilotransferaz, ORF 18 faj fi KZ, OMP H1 ve translasyonel uzama faktör (EF-Tu) gibi proteinlerin ise yalnızca bu metale maruz kalındığında sentezlendiği görülmüştür. Araştırmacılar bütün bu sonuçlar ışığı altında, bakterinin ortamda ağır metaller varken çalışmada tanımlanan proteinler aracılığı ile bakterinin ağır metal stresine karşı bir savunma mekanizması geliştirdiğini göstermişlerdir.

Bar ve arkadaşları (2007) ağır metallerle kirletilmiş ortamlardan izole ettikleri mikroorganizmayı *Klebsiella pneumoniae* olarak tanımlamışlardır. Bakteri Co(II) ve Pb(II) içeren ortamlarda geliştirilmiştir.

Ağır metale maruz kalan bakterinin farklı olarak sentezlediği proteinler 2D jel elektroforezi ve MS ile belirlenerek tanımlanmıştır. Buna göre L-izoaspartat protein

karboksimetiltransferaz tip II ile DNA girazın farklı olarak sentezlendiği görülmüştür (16).

Özcan ve arkadaşları (2007) *Phanerochaete chrysosporium* fungusunun Cd(II) ve Cu(II) iyonlarına maruz kaldığında verdiği yanıtı proteom analizi ile belirlemiştir. Ağır metal stresine yanıt olarak fungusun, 3 adet ribozomal protein ile flavonol/sinamoyl-CoA redüktaz, ATP-az, ribozomal protein S7, ribozomal protein S21e ve uzama faktör EF-1 alfa alt ünitesi gibi proteinleri daha fazla sentezlediğini göstermişlerdir (26).

Leonhäuser ve arkadaşlarının (2007) gerçekleştirdikleri çalışmada, Hg(II) ağır metale dirençli olduğu bilinen *Pseudomonas putida* suşları ile çalışılmıştır. Araştırmacılar yüksek konsantrasyonda Hg(II) ağır metale maruz kalan bakterilerin toplam hücre proteomunda çok az bir değişim belirlerken, özellikle zara ait taşıyıcı proteinlerde değişiklik gözlemlemiştir. Bu çalışmaya göre, yüksek konsantrasyonda ağır metal içeren ortamda katyon akışını sağlayan taşıyıcı proteinlerin yapımı 45 kez daha fazla olurken, bir dış zar proteini olan porinin yapımı 106 kat azalmıştır. Araştırmacılar stres koşullarında enerji metabolizması ile ilgili herhangi bir proteinin daha fazla sentezlendiğini tespit etmemişlerdir.

Shilev ve arkadaşları (2007) çalışmalarında sodyum arsenata dirençli *Pseudomonas fluorescens* bakterisinin arsenat varlığında ve yokluğunda toplam protein içeriğinin proteom analizi ile belirlemiştir. Bu çalışmada, araştırmacılar, 1000 ppm arsenat varlığında, dirençli bakterinin 9 adet proteini farklı olarak, 4 adet proteini yeni olarak sentezlediği, 4 adet proteinin sentezini arttırdığını ve 1 adet proteinin sentezini azalttığını tespit etmişlerdir.

Özetlendiği gibi ağır metal stresine maruz kalan mikroorganizmalar bu toksik kirlenmelere bazı proteinlerinin sentezini artırarak veya bazı proteinlerinin yapımını azaltarak cevap vermektedir. Bu tip proteinlerin tespit edilip, tanımlanması da son yıllarda oldukça önem kazanan proteom çalışmaları ile yapılabilmektedir.

Kaynaklar

1. Nies, D.H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. Appl. Microbiol Biotechnol. 51: 730-750.
2. Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme., F.W., 2000. Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicology and Environmental Safety 45: 198-207.
3. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2003. Brock Biology of Microorganisms, Tenth edition. Pearson Education, USA.
4. Malik, A. 2004. Metal bioremediation through growing cells. Environmental International 30: 261-278.
5. Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier V, Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., Lelie, D. and Wattiea, R. 2003. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. FEMS Microbiology Reviews 27: 385-410.

6. Nies, D.H., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 313-339.
7. Sultan, S., Hasnain, S. 2006. Characterization of an *Ochrobactrum intermedium* strain STCr-5 manifesting high level Cr(VI) resistance and reduction potential. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 883–888.
8. Aksu, Z., Kılıç, N.K., Ertuğrul, S., Dönmez, G. 2007. Inhibitory effects of chromium(VI) and Remazol Black B on chromium(VI) and dyestuff removals by *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 1167-1174.
9. Koçberber, N., G. Dönmez. 2007. Chromium(VI) bioaccumulation capacities of adapted mixed cultures isolated from industrial saline wastewaters, *Bioresource Technology* 98: 2178-2183.
10. Diffels, J.F., Seret, M.-L., Goffeau, A., Baret, P.V., 2006. Heavy metal transporters in hemiascomycete yeasts. *Biochimie* 88: 1639-1649.
11. Kourtev, P.S., Nakatsu, C.H., Konopka, A., 2006. Response of the anaerobic bacterial community to addition of organic C in chromium(VI)-and iron(III)-amended microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 628-637.
12. Moller J.V., Nissen, P., Sorenson, T. L-M, Marie, M. 2005. Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum Ca⁺²-ATPase pump. *Current Opinion in Structural Biology* 15: 387-393.
13. Ksheminska, H., Fedorovych, D., Babyak, L., Yanovych, D., Kaszycki, P., koloczek, H. 2005. Chromium(III) and (VI) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera. *Process Biochemistry* 40: 1565-1572.
14. Egler, M., Grosse, C., Grass, G., Nies, D.H. 2005. Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 187: 2297-2307.
15. Sharma, S., Luthra, P.M., Singh, Y., Sirdeshmukh, R., and Gade, W.N. 2006. Role of proteins in resistance mechanism of *Pseudomonas fluorescens* against heavy metal induced stress with proteomics approach. *Journal of Biotechnology* 126: 374-382.
16. Bar, C., Patil, R., Doshi, J., Kulkarni, M.J., Gade, W.N. 2007. Characterization of the proteins of bacterial strain isolated from contaminated site involved in heavy metal resistance-A proteomic approach. *Journal of Biotechnology* 128: 444-451.
17. Hongo, K., Hirai, H., Uemura, C., Ono, S., Tsunemi, J., Higurashi, T., Mizobata, T., Kawatw, Y., 2006. A novel ATP/ADP hydrolysis activity of hyperthermostable group II chaperonin in the presence of cobalt or manganese ion. *FEBS Letters* 580: 34-40.
18. Tosukhowong, A., Nakayama, J., Mizunoe, Y., Sugimoto, S., Fukuda, D., Sonomoto, K. 2005. Reconstruction and function of *Tetragenococcus halophila* chaperonin 60 tetradecamer. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99: 30-37.
19. Schmidt, A. Haferburg G. Sineriz M, Merten, D. Büchel, G. and Kothe, E. 2005. Heavy metal mechanisms in actinobacteria for survival in AMD contaminated soils. *Chemic Der Erda* 65: 131-144.

20. Rabilloud T. 2000. Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods. Springer, Germany. 248 sayfa.
21. Kolker, E., Higdón, R., Hogan, J.M. 2006. Protein identification and expression analysis using mass spectrometry. *TRENDS in Microbiology* 14: 229-235.
22. Nesatyy, V.J. and Suter, M.J.-F. 2007. Proteomics for the analysis of environmental stress responses in organisms. *Environmental Science & Technology* 41: 6891-6900.
23. Dowling, V.A. and Sheehan, D. 2006. Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology. *Proteomics* 6: 5597-5604.
24. Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., toledano, M.B. 2001. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 8469-8474.
25. Felicio, A.P., Garcia Jr.O., Bertolini, M.C., Ottoboni, L. M. M. and Novo M. T. M. 2003. The effects of copper ions on the synthesis of periplasmic and membrane proteins in *Acidithiobacillus ferrooxidans* as analyzed by SDS-PAGE and 2D-PAGE. *Hydrometallurg* 71:165-171.
26. Özcan, Ö., Yıldırım, V., Kaya, L., Albrecht, D., Becher, D., Hecker, M., and Özcengiz, G. 2007. *Phanerochaete chrysosporium* soluble proteome as a prelude for the analysis of heavy metal stress response. *Proteomics* 7: 1249-1260.
27. Leonhäuser, J., Wang, W., Deckwer, W., Wagner-Döbler, I. 2007. Functioning of the mercury resistance operon at extremely high Hg(II) loads in a chemostat: A proteome analysis. *Journal of Biotechnology* 132: 469-480.
28. Shilev, S., Lopez, A.F., Prieto, M.S., Puebla, E.D.S. 2007. Induced protein profile changes in arsenate tolerant and sensitive *Pseudomonas fluorescens* strains. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management* XV: 221-226.