

METHYLENE BLUE'NUN E.COLİ KROMOZOMAL DNA'SI İLE İN VİTRO'DA ETKİLEŞİMİ

IN VITRO INTERACTION BETWEEN METHYLENE BLUE AND THE CHROMOSOMAL DNA OF E.COLİ

Afife İZBIRAK*

Özet: Bu çalışmada, E.coli bakterisinden izole edilen kromozomal DNA, methylene blue ile muamele edilmiş ve bu boyanın E.coli kromozomal DNA'sı ile ısıya dayanıklı kompleksler oluşturduğu gözlenmiştir. E.coli DNA'sının methylene blue ile kompleks oluşturması, onun hiperkromik özelliklerinde değişmelere neden olmuştur. In vivo'da boya DNA bağlanmasının DNA çift zincirlerinin birbirinden ayrılmasını engelleyici bir etki göstermesi muhtemel görünmektedir.

Summary: In the present work, the chromosomal DNA isolated from the bacterium E.coli was treated with methylene blue. Formation of a heat-stable complex with methylene blue and E.coli chromosomal DNA, has changed the hyperchromic characteristics of E.coli DNA to some extent. It seemed possible that in vivo binding of the dye with DNA may inhibit the separation of DNA chains thus preventing the DNA replication.

GİRİŞ

Doğal ya da yapay boyalar gerek laboratuarda gerekse gıda, ilaç, kozmetik, kağıt, tekstil ve basım endüstrilerinde çok yaygın olarak kullanılan maddelerdir. Bu bileşikler aynı zamanda potansiyel mutajen ve karsinojen olabilecekleri göz önüne alınarak, çevre sağlığı açısından birçok araştırmaya konu olmuştur (1-8).

Birçok boyanın çeşitli mikroorganizmalar üzerine bakteriostatik ya da bakterisidal etki gösterdiği çok uzun yıllardan beri bilinmektedir (9, 10). Trifenilmetan grubundaki bazik boyaların büyük bir kısmı bakteri üremesini önemli ölçüde inhibe eder (11-13). Bu gruptaki boyaların hücre zarı ile doğrudan etkileşerek, hücre içine girdikleri (14, 15) hücre-içi enzimler (16, 17) ve hücre DNA'sını (18) etkiledikleri gösterilmiştir.

* Yard. Doç. Dr., Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı.

METİLEN BLUE VE E. COLİ ETKİLEŞİMİ

Bu çalışmada tıbbi bakteriyolojide boya, indikatör, kimyasal ayıraç ve antiseptik olarak kullanılan methylene blue'nun E.coli kromozomal DNA'sı ile in vitro'daki etkileşimi incelenmiş ve bu boyanın inhibitör kapasitesinin moleküler düzeyde hangi aşamada gerçekleştiği araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada kullanılan methylene blue Merck firmasından alınmıştır. Bu boyanın kimyasal yapı ve özellikleri Tablo 1'de görülmektedir. E.coli bakterisi Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümü'nden sağlanmıştır. Deneylerimizde sıvı üreme ortamı olarak, distile su içinde hazırlanan ve % 0.8 gr Nutrient broth (Difco Lab. Michigan, U.S.A.) ve % 0.8 gr NaCl (Merck) içeren besiyeri kullanılmıştır. Besiyerinin pH'sı sterilizasyondan önce 1 N NaOH ya da 1 N HCl ile 6.8'e ayarlanmıştır. Kullanılan boyanın stok çözeltileri distile su içinde hazırlanmış ve por çapı 0.45 µm olan steril milipor süzgeçten (Millipore Co., U.S.A.) süzülerek steril edilmiştir.

Tablo 1

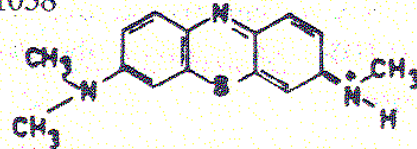
Methylene Blue'nun Özellikleri

Molekül Ağırlığı : 319.86

Renk İndeks No : 52015

Seri No : 1038

Kapalı Formülü :



Toplam 5 lt'lik sıvı besiyerinde, 37°C'lik kuru sistem çalkantılı etüvde bir gece üretilen E.coli hücreleri, IEC (International Equipment Co.) Model PR-6 soğutmalı santrifüjde, +4°C'de 7200 r.p.m.'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve hücre çökeleği toplanmıştır. Bu hücrelerin DNA'sı Zamenhoff'un (19) yöntemine göre izole edilmiş ve deneylerde kullanılmak üzere 0.14 M NaCl, 0.015 M tri-sodyum sitrat tamponu (pH: 7.1) içinde çözülerek, içine bakteriyostatik ajan olarak 1 damla Na-azid damlatılarak, +4°C'lik buzdolabında saklanmıştır.

İzole edilen E.coli DNA'sı Sepharose 4B agaroz jeli (Pharmacia Fine Chemicals Inc.) içeren 0.9 × 20 cm'lik kolondan geçirilerek, belirli büyüklükteki DNA moleküllerinin eldesi sağlanmıştır. Fraksiyonasyon işlemi, kolon 10⁻⁴ M EDTA içeren 10⁻² M Tris-Hcl (pH: 7.4) tamponu ile yıkanmış ve işlem sırasında ISCO Model UA5 absorban monitörlü ISCO

Model 273 Fraction Collector ve Buchler marka polistaltik pompa kullanılmıştır. Çözücünün akış hızı 0.2 ml/dakika, monitörün absorbands aralığı 2.0 olacak şekilde ayarlanmış ve fraksiyonlar 0.8 ml'lik hacimler halinde toplanmıştır.

Sepharose 4B kolonundan çıkan ve 260 nm dalgaboyunda en yüksek absorbands değerlerini veren fraksiyonlar teorik olarak $3 \times 10^5 - 3 \times 10^6$ molekül ağırlığına sahip DNA parçalarını içermektedir. Bu fraksiyonlar birleştirilmiş ve bundan alınan örnek Sephadex G25 (course) (Pharmacia Fine Chemicals Inc.) ile doldurulmuş 0.9×30 cm. boyutlarındaki kolona uygulanmıştır. Yıkama işleminde ilk fraksiyonasyonda kullanılan tampon kullanılmış olup, akış hızı 0.5 ml/dakika, absorbands aralığı 0.2'dir. Fraksiyonlar 2 ml'lik hacimler halinde toplanmıştır. Daha sonra, DNA örneği Sepharose 4B kolonundan geçirilmeksizin Sephadex G25 kolonuna uygulanmış ve iki uygulamanın sonucunda elde edilen grafikler benzer bulunmuştur. Bu nedenle boya + DNA içeren örnekler doğrudan doğruya Sephadex G25 kolonuna uygulanmıştır.

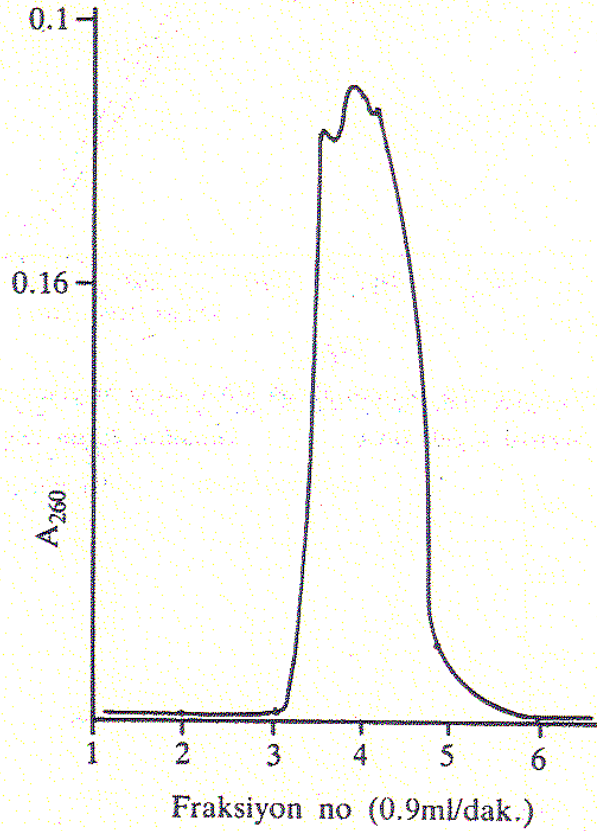
Boya ile muamele edilen DNA örnekleri 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra 0.9×20 cm'lik Sephadex G25 kolonuna uygulanmış olup, akış hızı 0.9 ml/dakika, absorbands aralığı 0.2'dir. Çözücü olarak 10^{-4} M EDTA içeren 10^{-2} M'lik tris-HCl tamponu (pH: 7.4) kullanılmış, fraksiyonlar 3.6 ml'lik kısımlar halinde toplanmıştır.

Boya-DNA bağlanmasının incelenebilmesi amacıyla, E.coli DNA'sının 260 nm'de 0.100-0.300 arasında absorbands okuması verecek uygun sulandırımı yapılmıştır.

Methylene blue, DNA'nın çözünürlüğünü azaltarak çökmesine neden olduğundan, 0.01 ml methylene blue (5 mg/ml) çözeltisi, uygun sulandırım-daki 0.1 ml DNA çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra, oluşan çökelek su ile yıkanmış ve IEC (International Equipment Co.) Model HN masa santrifüjünde 3300 r.p.m.'de 20 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Çökeltideki boya + DNA kompleksi, 2 ml tampon (0.14 M NaCl, 0.015 M tri-sodyum sitrat, pH: 7.1) içinde çözülmüş ve 200-300nm dalga boyları arasındaki absorbands değerleri Beckman Model DU-2 spektrofotometrede okunmuştur. Boya içeren örnek ve boyasız kontrol DNA'nın hiperkromik özellikleri, 10 dakika kaynar su banyosunda tutulduktan sonra buz içinde aniden soğutulularak, 200-300 nm dalgaboyları arasındaki absorbands değerleri okunarak incelenmiştir. Methylene blue, 200-300 nm dalgaboylarındaki UV ışınlarını absorblamadığından, grafiklerin çiziminde doğrudan doğruya methylene blue-DNA karışımının verdiği absorbands değerleri kullanılmıştır.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

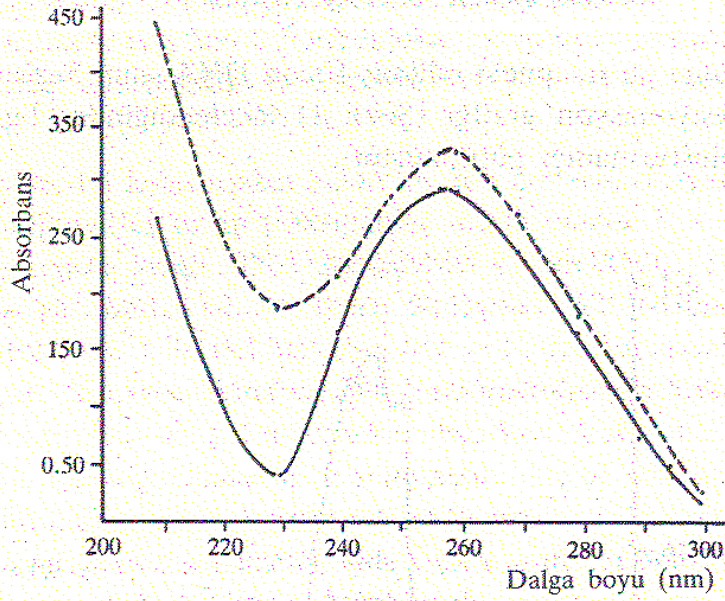
Methylene blue ile muamele edilmiş E.coli DNA'sının Sephadex G25 kolonundan fraksiyonasyon grafiği (Şekil 1) incelendiğinde, bu boyanın DNA'da kırık oluşturmadığı görülmüştür.



Şekil 1

Methylene blue ile işlem görmüş E.coli DNA'sının Sephadex G25 (course) kolonundan fraksiyonasyonu.

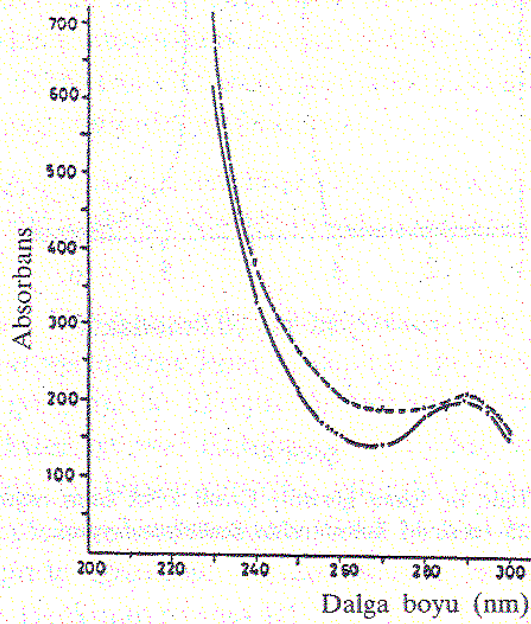
Boya ile işlem görmemiş E.coli DNA'sının denatürasyona bağlı absorpsiyon artışı 260 nm'de % 11.9 olarak bulunmuştur (Şekil 2). Buna karşılık, methylene blue ile muamele edilmiş E.coli DNA'sında 260 nm'deki hiperkromisite % 2'dir (Şekil 3). Bu sonuçtan yola çıkılarak, methylene blue'nun DNA çift zincirlerinin birbirinden ayrılmasını engellediği söylenebilir. Boya ile işlem görmüş DNA'nın maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyu



Şekil 2

Boya ile işlem görmemiş normal E.coli DNA'sında hiperkromik etki.

— Normal E.coli DNA ---- Denatüre E.coli DNA



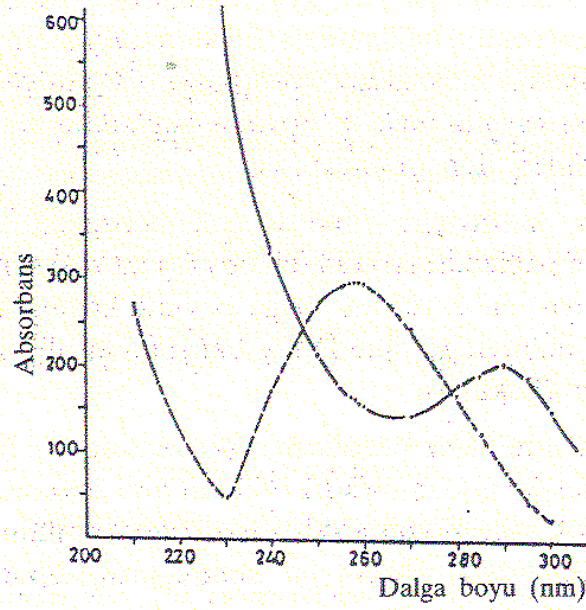
Şekil 3

Methylene blue ile işlem görmüş E.coli DNA'sında hiperkromik etki.

— Normal E.coli DNA + methylene blue
---- Denatüre E.coli DNA + methylene blue

260 nm'den 290 nm'ye kaymaktadır (Şekil 4). Bu durumun denatürasyon işleminden sonra da değişmeden kalması (Şekil 5), boya-DNA bağlanmasının 90°C sıcaklığa dayanıklı olduğunu göstermektedir.

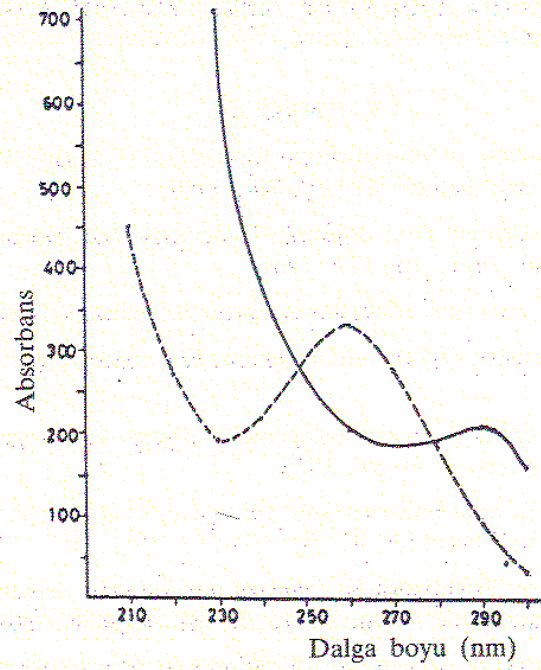
METİLEN BLUE VE E. COLİ ETKİLEŞİMİ



Şekil 4

Methylene blue ile işlem görmüş E.coli DNA'sının absorpsiyon spektrumu.

---- E.coli DNA
— E.coli DNA + methylene blue



Şekil 5

Methylene blue ile işlem görmüş E.coli DNA'sının denatürasyondan sonraki absorpsiyon spektrumu.

---- Denatüre E.coli DNA
— E.coli DNA + methylene blue

Bergman ve O'Konski (20)'ye göre, monomer formdaki methylene blue'nun bir başka moleküle bağlanması, bu formdaki methylene blue'ya ait 660 nm dalga boyundaki maksimum absorbanısı 670 nm'ye kaydırmakta ve tepe noktasındaki bu kayma, boya ile boyanın bağlandığı molekül arasındaki elektriksel etkileşimden ileri gelmektedir.

Yapısal olarak methylene blue'ya çok benzeyen acridine orange molekülleri DNA'ya bağlandıklarında, bu boyaya ait maksimum absorbanısının gözlendiği dalga boyu, daha yüksek dalga boyuna kaymaktadır (20). Buna benzer bir durum, methylene blue-DNA karışımının absorpsiyon spektrumunda gözlenmiştir (Şekil 4).

Methylene blue gibi bazik boyaların, nükleik asitlerle kompleks oluşturarak onların çökmesine neden olduğu eskiden beri bilinmekle birlikte (21) methylene blue-DNA karışımının absorpsiyon spektrumunun denatürasyondan sonra da değişmemesi, oluşan bu kompleksin oldukça dayanıklı ve kararlı olduğunu göstermektedir.

Eğer methylene blue molekülleri hücre içine alındıktan sonra, DNA'ya bağlanıyor ve çift zincirlerin birbirinden ayrılmasını engelliyorsa, DNA replikasyonu da engellenecektir. Böyle bir yorum, methylene blue'nun antimikrobik aktivitesinin moleküler mekanizmasını açıklamada yardımcı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Hueper WC: Potential role of non-nutritive food additives and contaminants as environmental carcinogens. Arch Pathol, 62: 218-249, 1956.
2. Dacre JC: Synthetic organic food colours: Toxicology and biochemical aspects. Food Technol. New Zealand, June, 169-177, 1969.
3. Drake J: Food colours, harmless aesthetics or epicurean luxuries? Tonicology, 5: 3-42, 1975.
4. Anliker R: Color chemistry and the environment. Ecotoxicol Environ Safety, 1: 211-237, 1977.
5. Yahagi T, Degawa M, Seino Y, et al: Mutagenicity of some carcinogenic azo dyes and their derivatives. Cancer Letters, 1: 91-96, 1975.
6. King-Thom C, Fulk GE, and Andrews AW: Mutagenicity testing of some commonly used dyes. App and Environ Microbiol, 42 (4): 641-648, 1981.
7. Ishidate M Jr, Sofuni T, Yoshikawa K: Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. Food Chem Toxic, 22 (8): 623-636, 1984.
8. Przybojewska B, Baranski B, Spiechowicz E, Sitarek K: Mutagenic activity of some textile dyes in different test systems. Toxicol Lett, 40: 183-192, 1988.
9. Petrof SA, Gump WS: Bacteriostatic and bactericidal studies of various dyes and allied compounds. J Lab Clin Med, 20: 689-698, 1935.
10. Fung DYC, Miller RD: Effect of dyes on bacterial growth. Appl Microbiol, 25: 793-799, 1973.

METİLEN BLUE VE E. COLİ ETKİLEŞİMİ

11. Kline EK: Toxicology of brilliant green for certain bacteria. Amer J Pub Health, 24: 314-318, 1935.
12. Miller VR, Banwart GJ: Effect of various concentrations of brilliant green and bile salts on Salmonella and other microorganisms. App Microbiol, 13: 77-80, 1965.
13. Paetzoldt OH: The mechanism of action of brilliant green on Staphylococci. II. Dependence of the antimicrobial action of the dye on its chemical constitution. Arch Clin Exp Dermatol, 224: 104-116, 1966.
14. Armstrong WMcD: The effects of some dyestuffs on the metabolism of baker's yeast. Arch Biochem Biophys, 73: 153, 1958.
15. Passow H, Rothstein A, Lowenstein B: An all or none response in the release of potassium by yeast cells treated with methylene blue and other basic redox dyes. J Gen Physiol, 43: 97-107, 1959.
16. Gale EF, Mitchell PD: The assimilation of amino acids by bacteria. 4. The action of triphenylmethane dyes on glutamic acid assimilation. J Gen Microbiol, 1: 299, 1974.
17. Fry BA: Basic triphenylmethane dyes and the inhibition of glutamine synthesis by Staphylococcus aureus. J Gen Microbiol, 16: 341, 1957.
18. Elferink JGR, Booij HL: The action of some triphenylmethane dyes on yeast and erythrocyte membranes. Drug Res, 25 (8): 1248-1252, 1975.
19. Zamenhoff S: Methods of Enzymology SP, Colowick NO, Kaplan Eds. Academic Press Inc, New York, Vol. 3: 696, 1957.
20. Bergman K, O'Konski CT: A spectroscopic study of methylene blue monomer, dimer and complexes with montmorillonite. J Phys Chem, 67: 2169-2177, 1963.
21. Vercauteren R: Enzymatic degradation of deoxyribose nucleic acid by deoxyribonuclease. Nature, 163: 603-611, 1950.