

AEROBACTER AEROGENES'ten ELDE EDİLEN OSMOTİK ŞOK SIVISINDA «MEZO-İNOZİTOL BİNDİNG PROTEİN» in ARANMASI (I)

Gül GÜNER

Edirne Tıp Fakültesi, Biokimya Kürsüsü,
Fatih - İstanbul

Ö Z E T

Aerobacter Aerogenes'ten, *Neu ve Heppel*'in kurmuş oldukları temellere dayanarak elde edilen osmotik şok sıvısında, hayvan ve mikroorganizma büyüme faktörü olan mezo-inozitol'e özgül bir periplazmik binding proteinin bulunup bulunmadığı araştırıldı. İlk aşamada değişik konsantrasyon yöntemleri ile şok sıvısını yoğunlaştırma yoluna gidildi. Yoğunlaştırma işleminin çeşitli dönemleri, Lowry protein miktar belirtimi yöntemiyle izlendi. Daha sonra konsantrasyon şok sıvısı, homojen olarak (2-³H) mezo-inozitol içeren poliakrilamid jelinden elektrik akımı altında geçirilerek in vitro binding protein-mezo-inozitol kompleksi arandı.

G İ R İ Ő

Bakteri aktif transport mekanizmasında, transport edilen madde için özgül bağlama yüzeyi taşıyan binding proteinler üzerinde son yıllarda yoğun araştırmalar yapılmaktadır.

Gram negatif bakterilerde iç zar ile dış zar arasındaki periplazmik boşlukta bulunan binding proteinler, *Neu ve Heppel*^{14,15} *Nossal ve Heppel*¹⁷, *Neu ve Chou*¹³ ve *Heppel*⁹'in geliştirdikleri osmotik şok yöntemi ile serbestleştirilmekte, şok sıvısından izole edilerek özellikleri incelenmektedir.

E. coli'den l²⁰, galaktoz², L-arabinoz²², fosfat¹², glutamat³, CN-B₁₂ (siyanokobalamin)⁵, tiamin¹⁶, lizin²¹, arjinin²⁵, L-glutamin²⁴, sistin⁴, *Salmonella typhimurium*'dan sülfat^{18,19}, histidin¹, riboz¹⁰, *Agrobacterium tumefaciens*'den glukoz-1-P⁶, *Pseudomonas aeruginosa*'dan gliserol²³ için spesifik periplazmik binding proteinler elde edilmiştir.

Osmotik şok yönteminin, *Aerobacter aerogenes*'ten dış ortama protein serbestleştirdiği, diğer tarafta şoka uğramış fakat viabilitelerini koruyan bakteri hücrelerinin mezo-inozitolü transport kapasitelerinde belirgin bir düşüş olduğu saptanmıştır⁸. Bu bulgular, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda büyüme faktörü olan mezo-inozitolün, *Aerobacter aerogenes* hücrelerine, spesifik bir binding protein aracılığıyla girdiğini ve osmotik şokun, bu «mezo-inozitol binding protein» i hücre dışına serbestleştirerek, bakterinin mezo-inozitol transportundaki düşüşe neden olduğunu düşündürmektedir⁸. Ancak, böyle bir hipotezin geçerliliği, mezo-inozitol binding proteininin bir takım yöntemlerle kesin olarak ortaya çıkartılmasına bağlıdır.

Çalışmamızın amacı, *Aerobacter aerogenes* şok sıvısında, mezo-inozitol'e özgül binding proteinin mevcut olup olmadığının araştırılmasıdır. Bakterilerde binding proteinlerin mikrogram düzeyinde bulunduğu göz önüne alınacak olursa, *Aerobacter aerogenes* şok sıvısının yoğunlaştırılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızın ilk evresinde, çeşitli konsantrasyon yöntemleri ile şok sıvısını yoğunlaştırma yoluna gidilmiş, daha sonra, konsantrasyon şok sıvısında mevcut olabilecek binding protein, işaretli mezo-inozitol kullanılarak in vitro binding protein-mezo-inozitol kompleksi şeklinde poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle aranmıştır.

YÖNTEM VE GEREÇLER

Aerobacter aerogenes şok sıvısı *Neu ve Heppel*'in yöntemi temel alınarak elde edildi⁸.

1) Şok sıvısının yoğunlaştırılması:

— Gereçler:

- Sartorius selüloz nitrat membran (SM 114), Ø:47 mm, porların çapı : 0,45µ
- Sartorius membran filter GmbH, Cat. No. SM 121, Format/Size: 160 × 160 mm.
- Küçük çaplı diyaliz tübü (Union Carbide Corporation, G 19 DM 30C 20502 L10)
- Liyofilizatör (Secroid, Lausanne, Suisse).
- 1 litrelik Lyovar liyofilizatör balonları
- Tris - HCl tamponu (5 × 10⁻²M, pH : 7,3)

— Yöntem :

. *Aerobacter aerogenes* şok sıvısı, tüm yoğunlaştırma süreçlerinden önce, Sartorius SM 114 membranından geçirilerek süzüldü. Bu işlemin amacı, sıvıya karışmış olabilecek bozulmuş hücrelerin ve diğer artıkların uzaklaştırılmasıydı. Daha sonra şok sıvısı, basınç altında ultrafiltrasyon, vakum diyalizi ve liyofilizasyon gibi değişik yöntemler kullanılarak yoğunlaştırıldı ve her aşamanın sonunda *Lowry*'nin kurmuş olduğu temellere¹¹ dayanarak protein miktar belirtimi yapıldı. Böylelikle konsantrasyon sürecini izlemek, değişik konsantrasyon yöntemlerini karşılaştırmak ve daha sonra uygulanacak poliakrilamid jel elektroforezi için kullanılacak numune hacmini saptamak olanağı sağlandı.

. Basınç altında ultrafiltrasyon yönteminde Sartorius SM 121 membranı kullanıldı. Membrandan geçemeyen, molekül ağırlığı 20,000'in üzerindeki moleküller konsantre edildi. Bir litre şok sıvısı 4-5 saat içerisinde 50 ml'ye indirildi.

. Vakum diyalizinde küçük çaplı diyaliz tübü kullanıldığından, bu yöntem oldukça ufak hacimli sıvıya uygulandı. Basınç altında ultrafiltrasyon sonunda elde edilen 25-50 ml'lik sıvının konsantrasyonuna vakum diyaliziyle devam edildi. Sıvı, 12 saatte 5 ml'ye kadar indirildi.

. Liyofilizasyonda 1 litre sıvı 17 saatte tümüyle kurutuldu (ΔP : 0,04 - 0,05 atm.). Toz halindeki madde 5 ml Tris - HCl tamponunda çözüldü.

2) Konsantre edilmiş şok sıvısında mezo - inozitol binding proteinin işaretli poliakrilamid jel elektroforezi ile aranması:

— Gereçler:

. (2 - ³H) mezoinozitol NEN, Dreieichenchain (Almanya)'dan temin edildi.

. Jel çözeltisi için:

Çözelti A :	H Cl I N	48,0 ml
	Tris (hidrometilaminometan)	36,6 g
	TEMED (tetrametiletildiamin) . .	0,23 ml
Çözelti B :	Akrilamid.	28 g
	Bizakrilamid	0,735 g
	H ₂ O	100,0 ml

Çözelti C : Amonyum persülfat 0,14 g
H₂O 100,0 ml

. 2 ml A çözeltisi, 4 ml B çözeltisi, 2ml H₂O, 8 ml C çözeltisi karıştırıldıktan sonra, bu jel çözeltisine, (2 - ³H) mezoinozitol'ün 1mg/ml ($5,3 \times 10^6$ cpm/ml) lik çözeltisinden 30µlt eklendi.

. 0,6 cm çapında, ve 12 cm uzunluğunda cam borular, 7 ml piridin, 2 ml hexametildisilazan ve 1 ml trimetilklorsilan içeren bir karışım ile silikonize edilerek sıcak su ile çalkalandı.

. Jellerin kesimi için, «*Gilson*» jel kesici aygıtı kullanıldı.

— Yöntem:

Silikonize cam tüpler içinde polimerize olmuş jellere, 50 - 500µlt konsantre şok sıvısı 10 - 20µlt %0,25 Coomassie Brilliant ve bir damla gliserol ile karıştırılarak uygulandı.

Tüp başına 2,5 mA uygulanarak, numunelerin Tris-Glisin tamponunda (pH : 8,3,0, 1M) 150 - 200 V'luk bir gerilimde 5-6 saat göçü sağlandı. Bu süre sonunda jeller cam tüplerden çıkarılarak *Gilson* aygıtına alındı ve enine olarak 0,5 veya 1,0 mm lik fraksiyonlara kesildi. Jel fraksiyonlarının her biri 10 ml Bray-Cab-0-Sil çözeltisi içine alınarak radyoaktivite içeriği, Beckmann LS 250 sayacında CPM olarak saptandı. Aynı işlemler, numune yerine tamponun uygulandığı kontrol jelinde de tekrarlandı.

BULGULAR

1) Şok sıvısının yoğunlaştırılması:

Binding proteinin aranmasında kullanılacak şok sıvısının eldesinde 6-12lt *Aerobacter aerogenes* kültürü ile çalışıldı⁸ ve 425-1300 ml arasında şok sıvısı elde edildi. Gerek şok sıvısında, gerekse uygulanan değişik konsantrasyon işlemleri sonunda *Lowry*¹¹ yöntemine göre yapılan protein miktar belirtimi sonuçları Tablo I'de özetlenmiştir.

2) İşaretli poliakrilamid jel elektroforezi:

Gerek konsantre şok sıvısının uygulandığı jelin, gerekse kontrol jelinin 1 veya 2 mm'lik fraksiyonlarının, sayacıta CPM olarak saptanmış radyo-

Tablo I : Protein miktar belirleme sonuçları (Kullanılan kısaltmalar : B.A.U. : Basınç altında ultrafiltrasyon, V.D. : Vakum diyalizi, L. : Liyofilizasyon)

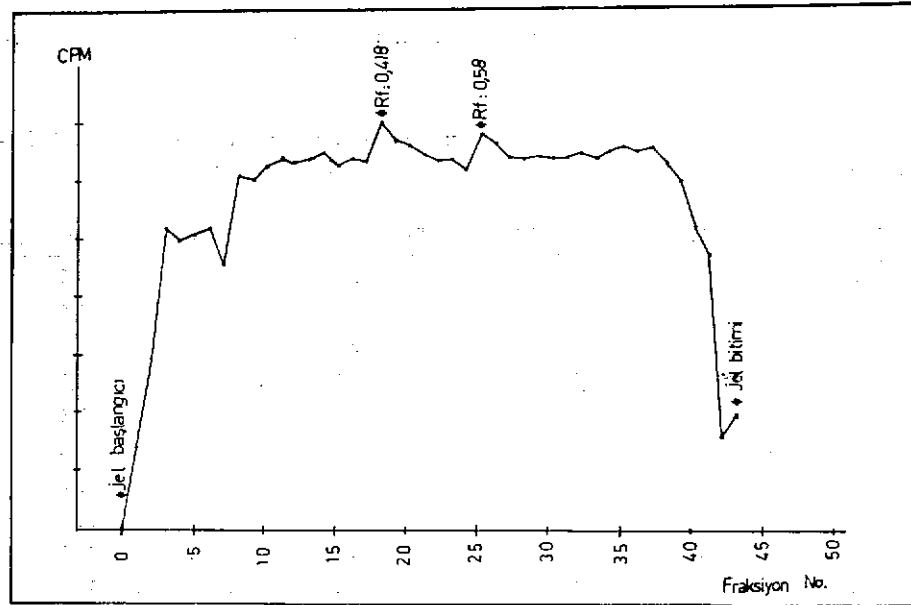
Deney No.	Şok sıvı hacmi (ml)	μ g protein/ ml şok sıvısı	Kullanılan yoğunlaştırma yöntemi	mg protein/ ml konsantr çözelti
1	1000	40,8	B.A.U. + V.D.	0,117; 2,9
2	500	100,0	V.D.	2,4
3	1200	53,5	L.	11,0
4	1300	83,0	650ml:B.A.U., 650ml:L.	0,096 ; 8,2
5	1200	60,7	600ml:B.A.U+V.D.,600ml:L.	0,30 ; 3,5
6	1300	104,3	V.D.	2,5
7	425	144,0	B.A.U.	0,093

Tablo II : *Aerobacter aerogenes* konsantr şok sıvısının uygulandığı jelin 2 şer mm'lik fraksiyonlarının Beckmann L, S 250'de saptanan radyoaktivite miktarları (CPM)

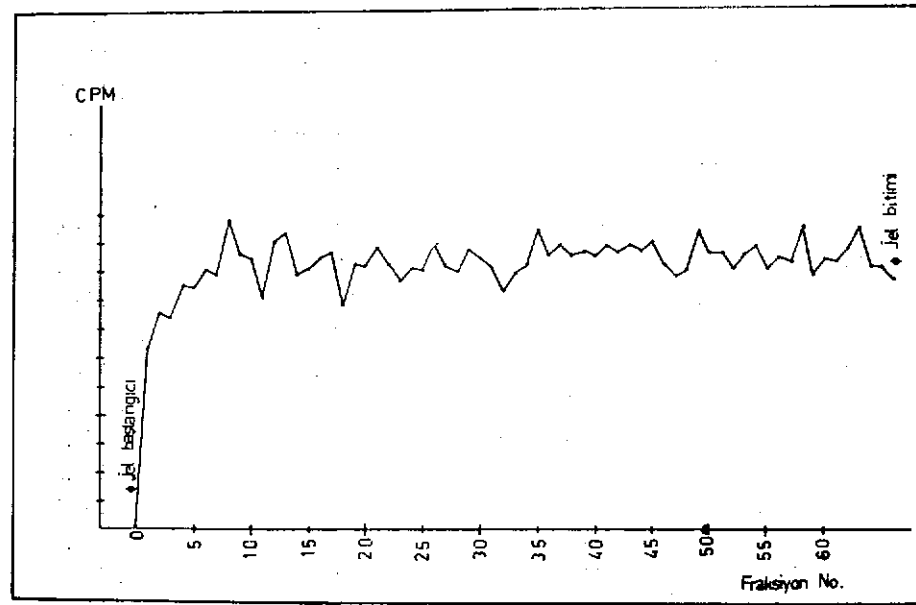
Fraksiyon No.	Radyoaktivite (CPM)	Fraksiyon No.	Radyoaktivite (CPM)
1	70,4	23	322,2
2	147,5	24	312,8
3	260,3	25	343,9
4	250,3	26	336,0
5	255,1	27	323,5
6	260,2	28	322,6
7	227,9	29	324,3
8	305,1	30	322,9
9	302,6	31	323,5
10	314,7	32	326,9
11	318,1	33	323,2
12	316,2	34	328,4
13	321,1	35	334,1
14	326,3	36	329,0
15	316,3	37	332,5
16	321,0	38	319,4
17	319,5	39	304,3
18	354,3	40	264,3
19	337,2	41	238,7
20	333,4	42	77,4
21	325,0	43	101,2
22	321,4		

Tablo III : Yalnızca Tris-Glisin tamponunun uygulandığı jelin 1'er mm'lik fraksiyonlarının Beckmann LS250'de saptanan radyoaktivite miktarları (CPM).

Fraksiyon No.	Radyoaktivite (CPM)	Fraksiyon No.	Radyoaktivite (CPM)
1	126,0	34	183,5
2	151,5	35	208,4
3	146,9	36	190,4
4	170,1	37	197,8
5	168,3	38	191,5
6	181,2	39	193,8
7	177,3	40	190,2
8	215,0	41	197,8
9	191,7	42	193,0
10	187,2	43	197,8
11	161,5	44	193,6
12	200,2	45	201,0
13	206,4	46	184,5
14	176,4	47	176,0
15	180,9	48	180,5
16	188,9	49	209,3
17	193,1	50	192,0
18	156,1	51	192,3
19	185,0	52	180,5
20	183,2	53	191,4
21	196,2	54	196,6
22	183,6	55	181,2
23	173,1	56	189,5
24	182,7	57	186,3
25	180,0	58	212,5
26	199,0	59	175,3
27	182,3	60	189,3
28	179,8	61	186,2
29	194,3	62	194,8
30	189,3	63	210,0
31	182,7	64	182,5
32	165,8	65	182,3
33	179,1	66	173,5



Şekil 1. Yöntemlerde belirtildiği üzere *Aerobacter aerogenes*'ten elde edilen şok sıvısından 500 µlt'nin uygulandığı (2-³H) mezo-inozitol ile işaretli poliakrilamid jelinin 2 şer mm'lik fraksiyonlarının içerdiği radyoaktivite miktarı (CPM) ordinatta, fraksiyon numarası ise absiste işaretlenmiştir.



Şekil 2. Yalnızca Tris-Glisin tamponundan 500 µlt'nin uygulandığı (2-³H) mezo-inozitol ile işaretli poliakrilamid jelinin 1'er mm'lik fraksiyonlarının içerdiği radyoaktivite (CPM) ordinatta, fraksiyon numarası ise absiste işaretlenmiştir.

aktivite bulguları Tablo II ve Tablo III'de gösterilmiştir. Ordinatta fraksiyon başına CPM, absiste ise jel fraksiyon numarası işaretlenerek elde edilen eğriler Şekil 1 ve 2'de sunulmuştur.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Şok sıvısını yoğunlaştırmak için kullanılan yöntemlerden özellikle vakum diyalizi ve liyofilizasyon ile protein konsantrasyonu açısından yeterli sonuçlar alınmıştır. Şöyle ki, poliakrilamid jellere uygulanan 50-500 µlt konsantre şok sıvısında total protein düzeyini 0,5 - 1 mg arasında ayarlayabilmek olanağı sağlanmıştır.

Şok sıvısında bir «mezo-inozitol binding protein»in varlığı, bu proteinin jelde homojen olarak dağılmış (2 - ³H) -mezo - inozitol ile yapacağı in vitro kompleks yoluyla ortaya çıkartılabilecekti. Zira, böyle bir kompleks kendisine bağlanan mezo-inozitolü sürükleyerek, jeldeki homojen radyoaktivite dağılımını etkileyecek, fraksiyonlara ayrılan işaretli jelin profilinde değişiklik yaratacağı. Şöyle ki, bazı fraksiyonların CPM'i normale göre bir düşüş gösterirken, bu düşüşü izleyen fraksiyonlarda bir «pik» in ortaya çıkması bekleniyordu.

Aerobacter aerogenes'ten elde ettiğimiz konsantre şok sıvısı numunesini uyguladığımız jelin profilinde, Rf: 0,418 ve Rf: 0,58'e uyan iki küçük pik göze çarpmaktadır. Ancak, bu piklerin ne derece anlamlı olduğu tartışma konusudur. Zira, kontrol jel profilinin incelenmesinde, amplitüd açısından daha küçük olmakla birlikte bazı iniş-çıkışlar görülmektedir. Bu osilasyonlar, jelin 1 - 2 şer mm'lik fraksiyonlara ayrılmasındaki ufak çaptaki eşitsizliklere bağlanmaktadır. Nümune ve kontrol jellerimizin karşılaştırılmasında, nümune jeline saptanan piklerin bir mezo-inozitol binding proteinin varlığını kanıtlamaya yeterli olamayacağı sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu durumda, aşağıdaki üç olasılık söz konusudur:

1) *Aerobacter aerogenes*'te mezo-inozitol için özgül bir binding protein mevcut değildir. Ancak, *Aerobacter aerogenes*'in periplazmik boşluğundan osmotik şok yöntemiyle dış ortama proteinler serbestleştğinde, *Aerobacter aerogenes* hücresinin mezo-inozitol transportunda anlamlı bir düşüş kaydedilmiştir⁸. Bu bulgular bir binding proteinin varlığını düşündürmektedir.

2) *Aerobacter aerogenes*'te mezo-inozitol için bir binding protein mevcuttur fakat substratı mezo-inozitol ile oluşturduğu kompleksin dissosiyas-

yon sabiti yüksek olup kompleksin saptanması güçleşmektedir. Bu durumda, bu kompleksin dissosiyasyonunu önleyen veya geciktiren koşullar aranmalıdır.

3) *Aerobacter aerogenes*'te mezo-inozitol binding protein mevcuttur fakat kullandığımız poliakrilamid jel elektroforez yöntemi ile ortaya çıkartılması için daha başka şartlar gerekmektedir. Şöyle ki, elektroforez yönteminin, bir protein karışımının fraksiyonlara ayrılmasının ilk aşamasında kullanılması sakıncalı olabilmektedir⁷. Brüt şok sıvısının saflaştırılması, veya kompleksi ortaya çıkartmak için daha başka yöntemlerin kullanılması düşünülebilir.

Amaçlanan temel çalışmanın tamamlanabilmesi için daha başka yöntemlerle binding protein-mezo-inozitol kompleksini arama yoluna gidilecektir.

SUMMARY

RESEARCH OF A BINDING PROTEIN IN THE OSMOTIC SHOCK FLUID OBTAINED FROM AEROBACTER AEROGENES (I)

In this study, shock fluid obtained from *Aerobacter aerogenes* using the method of *Neu* and *Heppel* was investigated to determine if a periplasmic binding protein specific for myo-inositol was present.

In the first part of the study, the shock fluid was concentrated using various methods such as ultrafiltration under pressure, vacuum dialysis, and liophilisation. Specially vacuum dialysis and liophilisation gave satisfactory results, as detected by Lowry's protein determination technique. A concentrated shock fluid containing between 2,4 - 11,0 mg/ml protein was obtained.

In the second part of the study, 50 - 500µlt's of this concentrated shock fluid was applied to polyacrylamide gels prepared by mixing 30µlt of a 1 mg/ml (2-³H) myo-inositol solution with 16 ml of the gel solution before polymerisation of the gel. The test gels, as well as the control gels where only the same volume of the buffer solution was applied, were run under an electric current 2,5mA/gel, in a Tris-Glycine buffer (0,1 M, pH : 7,3) for 5 - 6 hours. Following completion of the electrophoresis, the gels were divided evenly into fractions 1 - 2 mm in width by a Gilson gel cutter, and the radioactivity (CPM) present in each fraction was determined in a *Beckmann* LS250.

By plotting the CPM on the ordinate and the number of the gel fraction on the abscissa, curves were obtained for the control gel as well as for the test gels. Two small peaks obtained for the gel were compared with the radioactivity profile of the control gel.

An eventual binding protein - myo - inositol complex was expected to form a significant peak in the radioactivity profile by entraining some of the radioactive myo-inositol bound to itself, thereby causing an accumulation of radioactivity, a peak in the profile.

Comparing the radioactivity of the test gels with that of the control gel, it is concluded that the two small peaks are not sufficient to prove the existence of a binding protein - myo - inositol complex. In this situation, the following three alternatives can be discussed:

1 — A specific binding protein for myo - inositol does not exist in *Aerobacter aerogenes*. However, it has been shown that the liberation of proteins from the periplasmic space of *Aerobacter aerogenes* by osmotic shock causes a significant decrease in the myo - inositol transport of the shocked cell⁸. These findings suggest the presence of a binding protein.

2 — A myo - inositol binding protein exists for *Aerobacter aerogenes* but the complex that it forms with its substrate has a dissociation constant which is too high to allow for a detection. In this case, conditions which inhibit the dissociation of the complex should be determined.

3 — A myo - inositol binding protein exists for *Aerobacter aerogenes* but the polyacrylamide gel electrophoresis used for the detection of the complex necessitates other preparative manipulations such as purification of the shock fluid before concentration.

KAYNAKLAR

- 1 — AMES, G.F. ve LEVER, J.E.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **66**, 1096-1103 (1970).
- 2 — ANRAKU, Y.: J. Biol. Chem., **243**, 3116-3122 (1968).
- 3 — BARASH, H. ve HALPERN, Y.S.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **45**, 681 - 688 (1971).
- 4 — BERGER, E.A. ve HEPPEL, L.A.: J. Biol. Chem., **247**, 7684-7694 (1972).
- 5 — DIGIROLAMO, P.M., KADNER, R.J. ve BRADBEER, C.J.: J. Bacteriol., **106**, 751 - 757 (1971).
- 6 — FUKUI, S. ve MIYAIRI, S.J.: J. Bacteriol., **101**, 685-691 (1970).
- 7 — GORDON, A.H.: *Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels*, Wiley Interscience (1969).
- 8 — GÜNER, G.: Edirne Tıp Fakültesi Dergisi, **1/1**, 17-23 (1979).
- 9 — HEPPEL, L.A.: Science, **156**, 1451-1455 (1967).
- 10 — KABACK, H.R.: Ann. Rev. Biochem., **39**, 561-598 (1970).
- 11 — LOWRY, D.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, E.L. ve RANDALL, R.F.: J. Biol. Chem., **193**, 265-275 (1951).
- 12 — MEDVECZKY, N. ve ROSENBERG, H.: Biochem. Acta, **211**, 158-168 (1970).
- 13 — NEU, H.C. ve CHOU, J.: J. Bacteriol. **94**, 1934-1945 (1967).
- 14 — NEU, H.C. ve HEPPEL, L.A.: Biochem. Biophys. Res. Com., **17**, 215-219 (1964).
- 15 — NEU, H.C. ve HEPPEL, L.A.: J. Biol. Chem., **240**, 3685-92 (1965).
- 16 — NISHIMUNE, T. ve HAYASHI, R.: Biochem. Biophys. Acta, **244**, 573-583 (1971).

- 17 — NOSSAL, N.G. ve HEPPEL, L.A.: J. Biol. Chem., **241**, 3055-3062 (1966).
- 18 — PARDEE, A.B.: J. Biol. Chem., **241**, 5886-92 (1966).
- 19 — PARDEE, A.B.: Science, **156**, 1627-28 (1967).
- 20 — PENROSE, W.R., NICHALDS, G.E., PIPERNO, J.R., OXENDER, D.L.: J. Biol. Chem., **243**, 5921-28 (1968).
- 21 — ROSEN, B.P.: J. Biol. Chem., **246**, 3653-3662 (1971 a).
- 22 — SCHLEIF, R.: J. Mol. Biol., **46**, 185-196 (1969).
- 23 — TSAY, S.S., BROWN, K.K. ve GAUDY, E.T.: J. Bacteriol., **108**, 82-88 (1971).
- 24 — WEINER, J.H., FURLONG, C.E. ve HEPPEL, L.A.: Arch. Biochem. Biophys., **124**, 715-717 (1971).
- 25 — WILSON, O.H. ve HOLDEN, J.T.: J. Biol. Chem., **244**, 2743-2749 (1969).