

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

Gül GÜNER

Edirne Tip 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 büyümeye faktörü olan mezo-inozitol'e özgü bir periplazmik binding proteinin bulunup bulunmadığı araştırıldı. İlk aşamada değişik konsantrasyon yöntemleri ile şok sıvısını yoğunlaştırmaya yoluna gidildi. Yoğunlaştırma işleminin çeşitli dönemleri, Lowry protein miktar belirtimi yöntemiyle izlendi. Daha sonra konstantere şok sıvısı, homojen olarak ($2\text{-}^3\text{H}$) mezo-inozitol içeren poliakrilamid jelinden elektrik akımı altında geçirilerek in vitro binding protein-mezo-inozitol kompleksi arandı.

G İ R İ Ş

Bakteri aktif transport mekanizmasında, transport edilen madde için özgü 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 Heppel¹⁷, Neu ve Chou¹³ ve Heppel⁹'in geliştirdikleri osmotik şok yöntemi ile serbestleştirilmekte, şok sıvısından izole edilerek özellikleri incelenmektedir.

E. coli'den lösin²⁰, galaktoz², L-arabinoz²², fosfat¹², glutamat³, CN-B₁₂ (siyanokobalamin)⁵, tiamin¹⁶, lizin²¹, arjinin²⁶, L-glutamin²⁴, sistin⁴, *Salmonella typhimurium*'dan sülfat^{18,19}, histidin¹, riboz¹⁰, Agrobakterium tumefaciens'den glukoz-1-P⁶, Pseudomonas aeuroginosa'dan gliserol²³ için spesifik periplazmik binding proteinler elde edilmiştir.

Osmotik şok yönteminin, Aerobacter aerogenes'ten dış ortama protein serbestleştirtiği, diğer tarafta şoka uğramış fakat viabilitelerini koruyan bakteri hücrelerinin mezo-inozitolü transport kapasitelerinde belirgin bir düşüş olduğu saptanmıştır⁸. Bu bulgular, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda büyümeye faktörü olan mezo-inozitolun, 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 düşüše 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 özgül binding proteinin mevcut olup olmadığını araştırılmıştır. 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, konstantere sıvıda mevcut olabilecek binding protein, işaretli mezo-inozitol kullanılarak in vitro binding protein-mezoinozitol 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 membranı (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 (Seefroid, Lausanne, Suisse)
- 1 litrelilik Lyovar liyofilizatör balonları
- Tris - HCl tamponu ($5 \times 10^{-2}\text{M}$, pH : 7,3)

— Yöntem :

. Aerobacter aerogenes şok sıvısı, tüm yoğunlaştırma süreçlerinden önce, Sartorius SM 114 membranından geçirilerek süzüldü. Bu işlemin amacı, sıviya 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 Lowry¹¹ kurmuş olduğu temellere¹¹ dayanarak protein miktar belirtimi yapıldı. Böylelikle konsantrasyon prosesini izlemek, değişik konsantrasyon yöntemlerini karşılaştırmak ve daha sonra uygulanacak poliakrilamid jel elektroforezi için kullanılacak nüümune hacmini saptamak olağanı sağlandı.

. Basınç altında ultrafiltrasyon yönteminde Sartorius SM 121 membranı kullanıldı. Membrandan geçemeyen, molekül ağırlığı 20,000'in üzerindeki moleküller konsantr 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 sıviya 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) Konsantr edilmiş şok sıvisında mezo - inozitol binding proteinin işaretli poliakrilamid jel elektroforezi ile aranması:

— Gereçler:

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

Jel çözeltisi için:

<i>Çözelti A :</i>	H Cl 1 N	48,0 ml
	Tris (hidrometilaminometan) . . .	36,6 g
	TEMED (tetrametiletilendiamin) . .	0,23 ml
<i>Çözelti B :</i>	Akrilik	28 g
	Bizakrilamid	0,735 g
	H ₂ O	100,0 ml

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

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

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

. Jellerin kesimi için, «Gilson» jel kesici aygıt kullanıldı.

— Yöntem:

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

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

BULGULAR**1) Şok sıvisının 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 sıvisında, gerekse uygulanan değişik konsantrasyon işlemleri sonunda Lowry¹¹ yöntemine göre yapılan protein miktar belirtimi sonuçları Tablo I'de özetlenmiştir.

2) İ işaretli poliakrilamid jel elektroforezi:

Gerek konsantr şok sıvisının uygulandığı jelin, gerekse kontrol jelinin 1 veya 2 mm'lik fraksiyonlarının, sayıça CPM olarak saptanmış radyo-

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

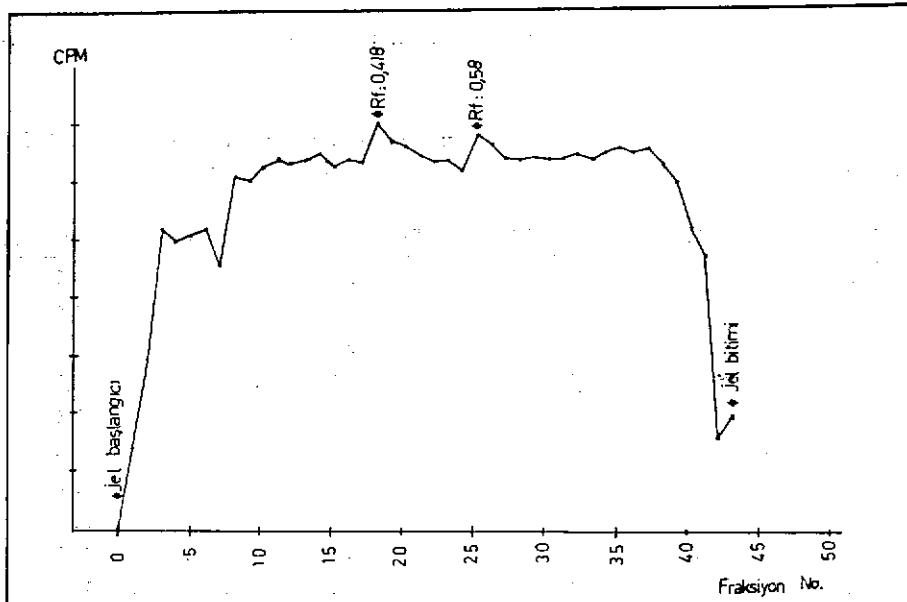
Deney No.	Şok sıvı hacmi (ml)	$\mu\text{g protein}/\text{ml şok sıvısı}$	Kullanılan yoğunlaşturma yöntemi	mg protein/
				ml konsantre çözelti
1	1000	40,8	B.A.U. + V.D.	0,117; 2,9
2	500	100,0	V.D.	2,4
3	1200	53,5	L.	11,0
4	1300	83,0	650ml:B.A.U., 650ml:L.	0,096; 8,2
5	1200	60,7	600ml:B.A.U.+V.D., 600ml:L.	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 konsantrasyon uygulandığı jelin 2'er mm'lik fraksiyonlarının Beckmann L, S 250'de saptanan radyoaktivite miktarları (CPM)

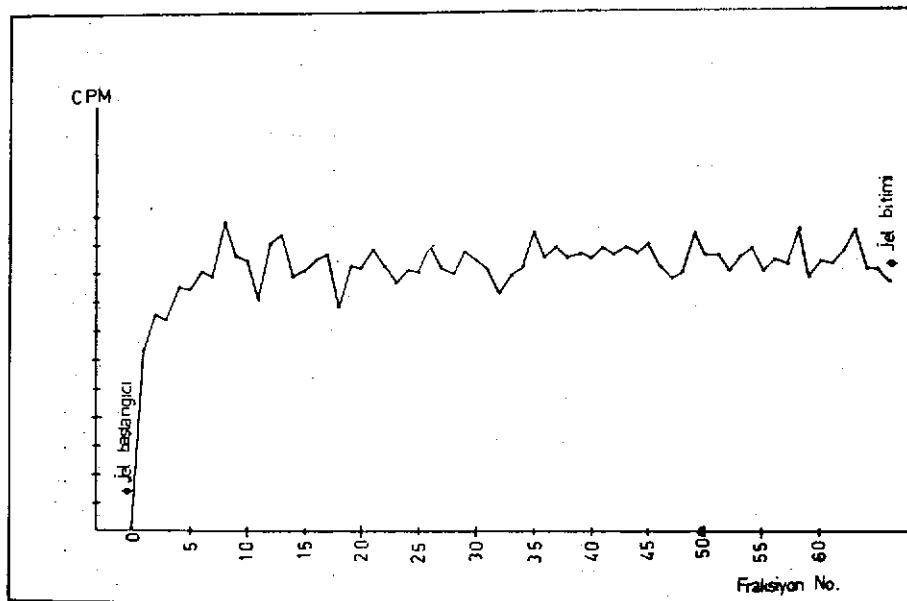
Fraksiyon No.	Radyoaktivite (CPM)	Fraksiyon No.	Radyoaktivite (CPM)
1	70,4	23	322,2
2	147,5	24	312,8
3	260,3	25	343,9
4	250,3	26	336,0
5	255,1	27	323,5
6	260,2	28	322,6
7	227,9	29	324,3
8	305,1	30	322,9
9	302,6	31	323,5
10	314,7	32	326,9
11	318,1	33	323,2
12	316,2	34	328,4
13	321,1	35	334,1
14	326,3	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 μ lt'nın uygulandığı ($2\text{-}^3\text{H}$) mezo-inozitol ile işaretli poliakrilamid jelinin 2'er mm'lik fraksiyonlarının içeriği radyoaktivite miktarı (CPM) ordinatta, fraksiyon numarası ise absiste işaretlenmiştir.



Şekil 2. Yalnızca Tris-Glisin tamponundan 500 μ lt'nın uygulandığı, ($2\text{-}^3\text{H}$) mezo-inozitol ile işaretli poliakrilamid jelinin 1'er mm'lik fraksiyonlarının içeriği 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 açısından yeterli sonuçlar alınmıştır. Şöyle ki, poliakrilamid jellere uygulanan 50-500 μ lt konsantrasyonda 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 ($2\text{-}^3\text{H}$) -mezo - inozitol ile yapacağı in vitro kompleks yoluyla ortaya çıkartılabilicekti. Zira, böyle bir kompleks kendisine bağlanan mezo-inozitolü sürükleyerek, jeldeki homojen radyoaktivite dağılımını etkileyecekti, fraksiyonlara ayrılan işaretli jelin profilinde değişiklik yaratacaktı. 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 konsantrasyon şok sıvısı nüümunesini 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, amplitüt açısından daha küçük olmakla birlikte bazı iniş-çıkışlar görülmektedir. Bu osilasyonlar, jelin 1 - 2'er mm'lik fraksiyonlara ayrılmışındaki ufak çaptaki eşitsizliklere bağlınakmaktadır. Nüümune ve kontrol jellerimizin karşılaştırılmasında, nüümune 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 boşluğunundan osmotik şok yöntemiyle dış ortama proteinler serbestleştiğinde, *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 sübstratı mezo-inozitol ile oluşturduğu kompleksin dissosiyasyonu

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 düşünelilebilir.

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-inozitol 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 - 500 μ lt's of this concentrated shock fluid was applied to polyacrylamide gels prepared by mixing 30 μ lt of a 1 mg/ml (2^3 H) myo-inozitol 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 - inozitol complex was expected to form a significant peak in the radioactivity profile by entraining some of the radioactive myo-inozitol 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 - inozitol complex. In this situation, the following three alternatives can be discussed:

1 — A specific binding protein for myo - inozitol 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 - inozitol transport of the shocked cell⁸. These findings suggest the presence of a binding protein.

2 — A myo - inozitol 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 - inozitol 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 Tip 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).

148 GÜNER · A. AEROGENES'DE «MEZO-İNOZİTOL BINDİNG PROTEİN»

- 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).