

REGULACJA AKTYWNOŚCI FORMAMIDAZOWEJ U MYKOBAKTERII

Ingrit Sehrt, Heintz Ivansky

Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Berlinie
Dyrektor: prof. dr P. Steinbrück

Już Nagayama, Konno i Oka wykazali, że z wielu badanych szczepów prątków tylko saprofity wykazują aktywność formamidazową, zwrócili oni uwagę na znaczenie tego faktu dla różnicowania mykobakterii. Również w następnych latach interesowano się aktywnością formamidazową i patogennością. Hauduroy i Muftic wykazali, w oparciu o ujemne lub słabo dodatnie odczyny u patogennych szczepów w przeciwieństwie do silnie dodatnich odczynów u apatogennych mykobakterii, możliwość szybkiej oceny patogenności. Również Urabe, Takei i Saito omawiali aktywność formamidazową w tym samym aspekcie.

Aktywność konstytutywnej formamidazy zwiększa się w zależności od rodzaju szybko rosnących mykobakterii i dobranych przez nas warunków inkubacji od 0-70 $\mu\text{g NH}_4^+$ /ml przy jednogodzinnej inkubacji, przy czym stwierdza się niskie aktywności do 10 $\mu\text{g NH}_4^+$ /ml u *M. borstelense*, *M. abscesus* i *M. phlei* — wysokie do 20 $\mu\text{g NH}_4^+$ /ml u *M. fortuitum* i *M. smegmatis* i najwyższe do 70 $\mu\text{g NH}_4^+$ /ml dla *M. vaccae*. U *M. smegmatis* i *M. phlei* wykazano formamidazę podatną na indukcję.

W badaniach oznaczano specyficzność substratu przy hydrolizie dużej liczby amidów. Wykazano słabą aktywność enzymu dla prostych i rozgałęzionych homologów alifatycznych amidów. Przyjmując rozszczepianie formamidazy za 100, szereg hydrolityczny leży w każdym przypadku poniżej 1. Asparagina, glutamina, amid kwasu szczawowego jak również cykliczne amidy benzamid, nikotinamid, izonikotinamid i pyrazinamid nie ulegają hydrolizie. Enzym odznacza się wysoką specyficznością substratu.

Zakres syntezy enzymu zależy od koncentracji czynnika indukującego. Przy $5 \cdot 10^{-4}$ M/l występuje wyraźna indukcja. Wzrasta ona ze wzrostem ilości czynnika indukującego i osiąga optymalną wartość przy stężeniu $4 \cdot 10^{-2}$ M/l czynnika indukującego.

Badanie aktywności formamidazy w odniesieniu do czasu indukcji pozwoliło stwierdzić, że od 1—10 godzin synteza enzymu przebiega z taką

samą prędkością, przy czym aktywność narasta wolno i osiąga po 16 godzinach maksymalną wartość. Indukcja formamidazy jest zahamowana przez chloramfenikol. Przy 1 $\mu\text{g/ml}$ chloramfenikolu hamowanie to jest słabo zaznaczone, przy 10 $\mu\text{g/ml}$ aktywność wynosi szóstą część wartości wyjściowej, przy 25 $\mu\text{g/ml}$ indukcja jest już niemożliwa do wykazania.

Przy badaniu specyfiki indukcji stosowano amidy różnych struktur oraz aminokwasy. Chociaż były one substratem dla enzymu, tylko formamid wykazał zupełnie wyraźne działanie indukujące. Najlepszymi czynnikami indukującymi okazały się homologi szeregu alifatycznego amidów kwasów węglowych, szczególnie o połączeniach węgla C-4. Przy zastosowaniu, jako czynnika indukującego, wiązań o wydłużonym łańcuchu stwierdzano utratę działania indukującego.

Rozszczepienie wiązań łańcuchowych zmieniało efekt indukujący. Stwierdzano to przy użyciu amidu kwasu izomasłowego, którego aktywność, w porównaniu z aktywnością amidu o prostym łańcuchu wynosiła $1/3$. Amid kwasu izowalerianowego jak również amid kwasu *n*-walerianowego nie daje efektu indukującego.

Opierając się na silnie zaznaczonych właściwościach czynników indukujących amidu kwasu octowego, włączano do badań *N*-podstawniki. Amidy kwasu *N*-metylooctowego, *N*-fenylooctowego, *N*-acetylooctowego i *N,N*-dwumetylooctowego nie wykazały jednak działania indukcyjnego. Działania indukujące jest więc związane z wolną grupą amidową.

W porównaniu do amidu kwasu C-4 jednowęglowego, amid kwasu C-4 dwuwęglowego daje wyraźny efekt silnej indukcji. Te same właściwości ma również monoamid jednoaminodwuwęglowego kwasu z 4 atomami węgla. Amidy z pierścieniem aromatycznym i heterocyklicznym (benzamid, nikotinamid, izonikotinamid, pyrazinamid) nie indukują formamidazy.

Aminokwasy jak alanina, histydyna, tryptofan i in. nie wykazują działania indukującego.

Jak ustalono dotychczas, czysty formamid nie jest czynnikiem indukującym dla enzymu. Również dodatek glicerolu, laktatu, pyruwawatu, glukozy jako energetyczne mechanizmy transportowe pozostawały bez wpływu. Równocześnie uzyskano wyraźny efekt indukujący w kombinacji z octanem lub propionatem. Jest to raczej związane z samym formamidem niż z działaniem określonych produktów rozpadu, szczególnie u szczepu wykazującego wybitną aktywność formaidazową. W badaniach, przy zastosowaniu niespecyficznych amidów, uzyskano również jony amonowe w obecności octanu lub indukowanego propionatu. Badanie działania indukującego potwierdziło przydatność tych układów. Uzyskane aktywności są duże, można więc nie zwiększać ilości jonów amonowych dla wykazania wyraźnego działania enzymu, inne źródła azotu jak np. aminokwasy nie mogą zastąpić jonów amonowych.

Podczas dotychczasowych badań stwierdzono, przy podobnych sposo-

bach przedstawiania dla obu rodzajów, niskie absolutne wartości aktywności formamidazowej u *M. phlei* zaś u *M. smegmatis* stwierdzono indukujące działanie produktów hydrolizy amidów.

Przy rozdziale na kolumnie chromatograficznej ekstraktów wolnokórkowych *M. smegmatis*, na Sephadex G 200, aktywność koncentruje się na szczycie. Bliższa charakterystyka tego enzymu, który szczególnie nadaje się do badań modelowych, pozwoli równocześnie wyjaśnić ich znaczenie dla, wcześniej badanych, niespecyficznych amidaz. Może uda się nam również poznać biologiczne znaczenie formamidazy. Zagadnienie to pozostaje nadal otwarte.

I. Sehart, H. Ivansky

REGULATION OF FORMAMIDASE ACTIVITY IN MYCOBACTERIA

Summary

Formamidase activity has investigated in the group of rapid growers (*M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. fortuitum*, *M. vaccae*, *M. abscessus*, *M. borstelense*).

The liberation of ammonia, measured after an incubation for 60 min. by the phenol-hypochlorite-method, was used to estimate the activity of the enzyme. The observed activities of the washed bacterial suspensions grown on Hohn IV and Loewenstain-Jensen respectively were within a range 0 (*M. phlei*, *M. borstelense*) to $70 \mu\text{g NH}_4^+$ /ml (*M. vaccae*).

In *M. smegmatis* and *M. phlei* an enzyme is inducible with a special activity for the hydrolysis of formamide. Testing many substrates for their ability to act as inducers for this enzyme, only the homologous aliphatic amides with 2-4 C-atoms have a strong inducing effect. Formamide as inducer influences the hydrolytic activity of the bacteria only in a small degree, while the homologous amides with more than 4 C-atoms, the monoamides asparagine and glutamine, succinamide, urea and other nitrogen sources are practically without any inducing action.

In *M. smegmatis* incubation of the germs in the presence of ammonia and acetate or ammonia and propionate has the same strong inducing effect as the respective amides. We have not found it possible to replace the ammonia by other nitrogen sources. Glucose, propionate, acetate, succinate, pyruvate, lactate or keto glutarate in the inducing medium do not change significantly the hydrolytic activity; a repressive action is only observed in the presence of glycerol. In *M. phlei* the enzyme induction is not influenced by glycerol. Inducers are only the homologous amides with 2-4 C-atoms. Acetate or propionate in combination with ammonia have no inducing effect.

The induced activity for the hydrolysis of formamide is very high. In *M. smegmatis* the obtained value is about 200 times in *M. phlei* about 60-times as high as the values for the induced hydrolysis of butyramide. By means of column chromatography on Sephadex G 200 the enzyme was enriched and further characterised.