

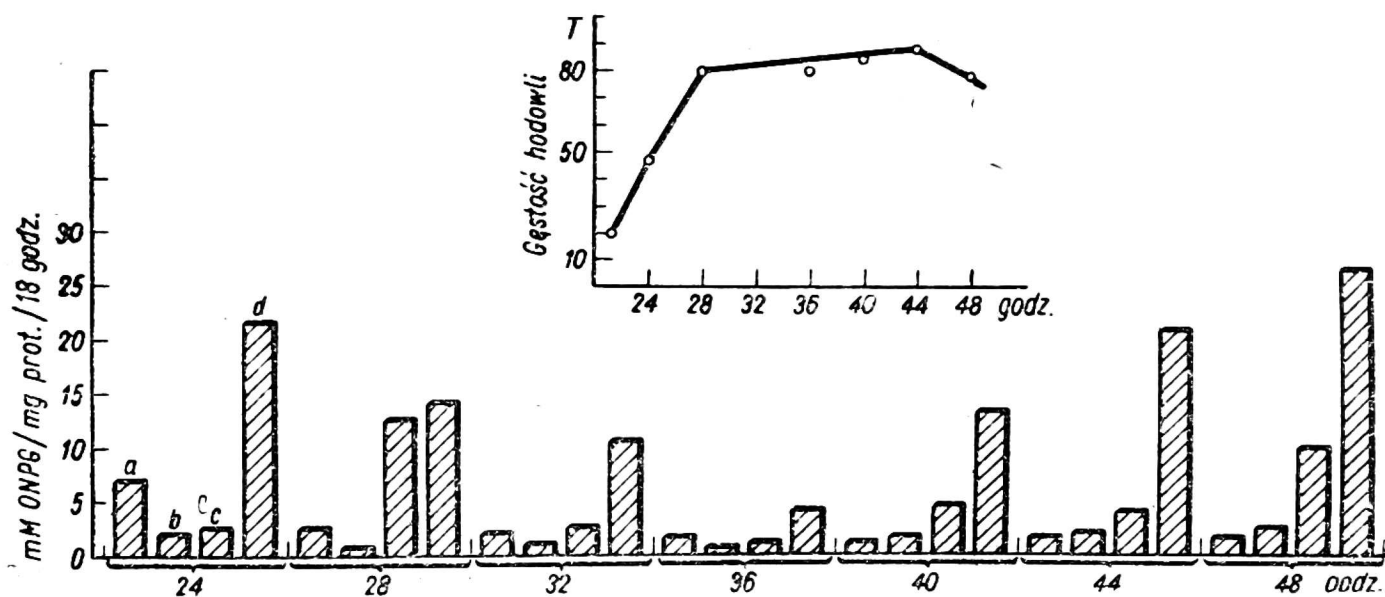
BADANIA NAD REGULACJĄ SYNTEZY β -GALAKTOZYDAZY U MYCOBACTERIUM PHLEI

Zsuzsa Magyar, J. Gyula Weiszfeiller

Mikrobiologiczna Grupa Badawcza Węgierskiej Akademii Nauk w Budapeszcie
Kierownik: prof. dr J. G. Weiszfeiler

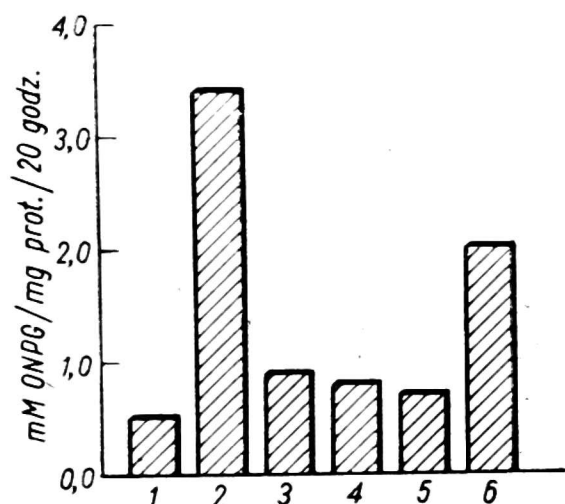
Celem naszych badań było uchwycenie indukcji β -galaktozydazy u prątków i regulacji syntezy tego enzymu. Uzyskane wyniki badań tego problemu przedstawiono na sympozjum atypowych mykobakterii w Tihany 1971 r.

Badania przeprowadzono na szczepie *M. phlei* ATCC 19249. Hodowle wstrząsane prowadzono na półsyntetycznym podłożu z hydrolizatorem



Rys. 1. Badanie indukcji w nietkniętych bakterjach *M. phlei*. Kolumny wykazują wyniki badań w różnych okresach czasu (między 24 a 48 godziną) a — wyjściowa aktywność hodowli, b — wyjściowa aktywność hodowli po głodzeniu, c — działanie laktozy, jako czynnika indukującego ($10^{-2}M$), d — działanie melibiozy, jako czynnika indukującego ($10^{-2}M$)

kazeiny w temp. $30^{\circ}C$. Po odwirowaniu, głodzono je przez 8 godzin w buforze fosforanowym M/15 przy pH 7 a następnie badano działanie czynników indukujących. Już wcześniej stwierdzono, że w tym układzie β -galaktozydaza u *M. phlei* jest podatna na czynniki indukujące.



Rys. 2. Indukcja enzymu z IPTG i hamowanie antybiotykami oraz katabolity u głodzonych bakterii *M. phlei*

1 — kontrola (wyjściowa aktywność po głodzeniu), 2 — IPTG 10⁻³M, 3 — IPTG 10⁻³M + aktynomycyna D, 1500 µg/ml, 4 — IPTG 10⁻³M + chloromycyna 150 µg/ml, 5 — IPTG 10⁻³M + streptomycyna 100 µg/ml, 6 — IPTG 10⁻³M + glukoza 10⁻¹M

Rysunek 1 dowodzi, że melibioza stosowana w różnych odstępach czasu ma duży wpływ na zwiększenie aktywności enzymatycznej.

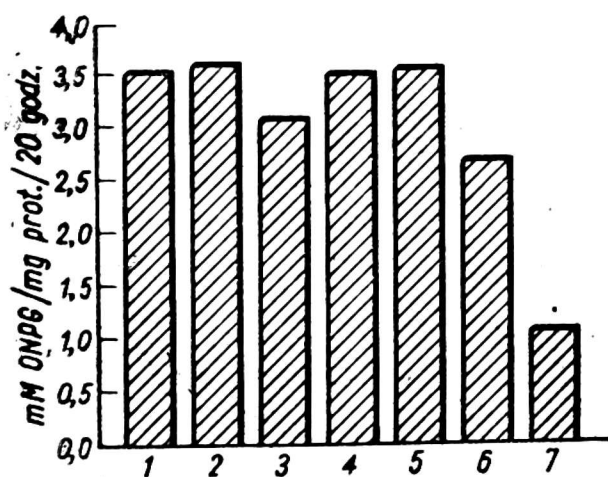
Rysunek 2 przedstawia wyniki badań, w których obok czynników indukujących, stosowano również różne antybiotyki. Wykazano, że działanie IPTG izopropyl-β-galaktopyranosydu prowadzi do zahamowania specyficznego niemetabolicznego czynnika indukującego β-galaktozydazy ze zwiększeniem enzymatycznej aktywności, stosowanego łącznie z antybiotykami: jak aktynomycyna, D-chloromycyna czy streptomycyna, która oddziałuje na poziom translacji czy transkrypcji. Do wywołania hamowania są jednak niezbędne wysokie stężenia antybiotyków (150 µg na 1 ml).

Rysunek 3 przedstawia powtórzenie uprzednich badań z tym, że bakterie hodowane są nie na półsyntetycznym podłożu z hydrolizatem kazeiny, lecz na podłożu Sautona. W tych warunkach nie stwierdza się działania indukującego na zwiększenie aktywności enzymatycznej. W przypadku prowadzenia hodowli na podłożu bulionowym również nie stwierdzono żadnej indukcji enzymatycznej. β-galaktozydazę można stwierdzić tylko przy prowadzeniu hodowli na podłożu z hydrolizatem kazeiny i w tym przypadku głodzone bakterie *M. phlei* wykazują wpływ na czynniki indukujące.

Zubay, Chamber i Chong wykazali, że β-galaktozydaza powstaje również u *E. coli*. Wykazali oni również zdolność jej indukowania w wolno-

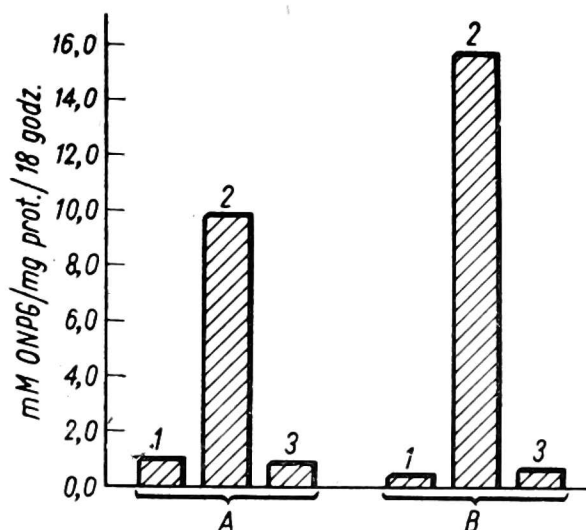
Rys. 3. Badanie indukcji i jej hamowania u bakterii *M. phlei* hodowanych na podłożu Soutona

1 — kontrola (aktywność wyjściowa), 2 — melibioza 10⁻²M, 3 — TMG 10⁻³M, 4 — IPTG 10⁻³M, 5 — IPTG 10⁻³M + aktynomycyna D, 150 µg/, 6 — IPTG 10⁻³M + chloromycyna 150 µg/ml, 7 — IPTG 10⁻³ + glukoza 10⁻¹M



Rys. 4. Indukcja w układzie wolnym od komórek

A — 2-godzinny okres indukcji, B — 18-godzinny okres indukcji, 1 — kontrola (aktywność wyjściowa), 2 — IPTG 10^{-3} M, 3 — IPTG 10^{-3} M + streptomycyna 100 μ g/ml



komórkowym układzie przy nieobecności makroergicznych połączeń (ATP, CTP itp. oraz aminokwasów).

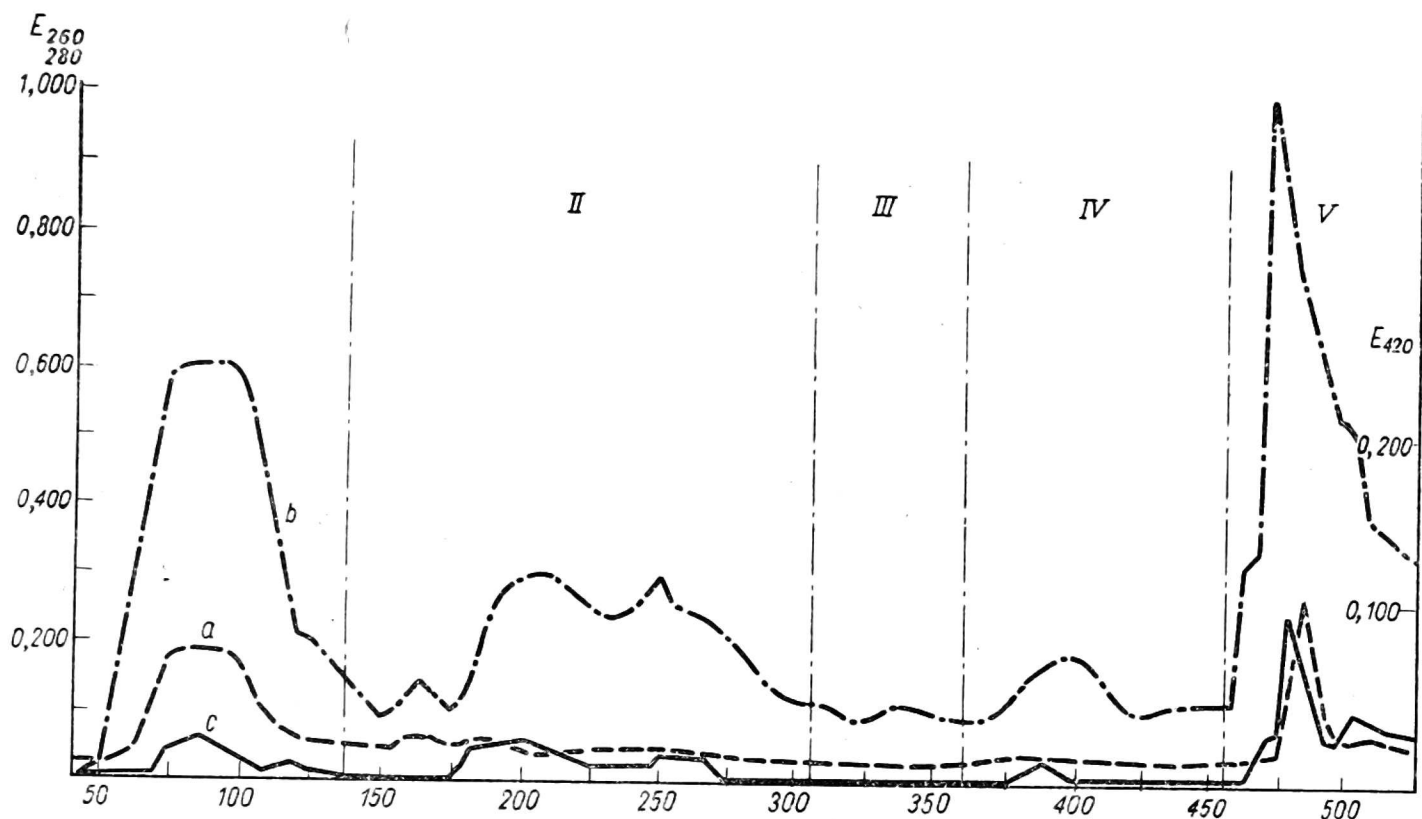
Rysunek 4 przedstawia wyniki doświadczeń, w których badano indukowaną syntezę enzymatyczną w układzie wolnokomórkowym u *M. phlei*. Przemyte wygłodzone bakterie rozbijano przy pomocy wirowania przy 23 tys. g w desintegratorze typu Mickla. Supernatant, który zawierał całą zawartość komórki, bez ściany komórkowej, dodawano do podłoża z hydrolizatem kazeiny i IPTG, jako czynnika indukującego. Nie stosowano żadnych makroergicznych połączeń, jak ATP, CTP jako dodatków do układu.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzano wyraźną indukcję enzymatyczną zarówno po krótkim czasie, nie dłuższym od 2 godzin, jak i po długim okresie czasu indukcji trwającym 18 godzin. Stwierdzone zwiększenie aktywności enzymatycznej było hamowane przez streptomycynę.

W dalszych doświadczeniach badano, czy β -galaktozydaza w bakteriach jest wbudowana w organelle komórkowe, czy wytwarzana jest w stanie wolnym. Bakterie rozbijano w desintegratorze Mickla i frakcjonowano różniczkowym wirowaniem. Po rozbiciu w desintegratorze, odrzucano nierozbite komórki przez wirowanie przy 10 tys. g a ściany komórkowe przy 17 tys. g. Przez wirowanie przy 30 tys. g otrzymywano frakcję „mitochondrialną”. Z supernatantu, uzyskanego po wirowaniu 30 tys. g otrzymywano rybosomy, izolowano również frakcję cytoplazmatyczną po 3-godzinnym wirowaniu przy 105 tys. g. We wszystkich frakcjach badano aktywność β -galaktozydazy. Tylko frakcja supernatant 105 tys. g wykazywała wyraźną aktywność enzymatyczną. Enzym ten nie jest związany z organelami komórkowymi.

Z supernatantu 105 tys. g uzyskano dalsze frakcje, częściowo za pomocą chromatografii jonowymiennej a częściowo techniką filtracji w żelu.

Rysunek 5 przedstawia wyniki badania supernatantu 105 tys. g, uzyskane chromatografią jonowymienną. Do kolumny DEAE Sephadex



Rys. 5. Frakcjonowanie chromatografią jonowymienną elstraktów wolnych od komórek (105 tys. g supernatant) na kolumnie DEAE Sephadex A₅₀Cl
 I — woda destylowana, II — M/15, pH 7 P roztwór buforu, III, IV, V — w roztworze buforowym 0,1 M, 0,3 M, 1,0 M NaCl, a — krzywa elucji przy długości fali 260 m μ , b — krzywa elucji przy długości fali 280 m μ , c — krzywa elucji przy długości fali 420 m μ (aktywność enzymatycznej frakcji)

A₅₀Cl, częstość 2×20 cm, nakładano 10 ml supernatantu z 600 μ g/ml białka. W tych warunkach uzyskiwano ok. 90% β -galaktozydazy w eluacie badanej frakcji, przy użyciu 1,0 M NaCl. Frakcja ta pod względem ładunku zachowywała się jednorodnie.

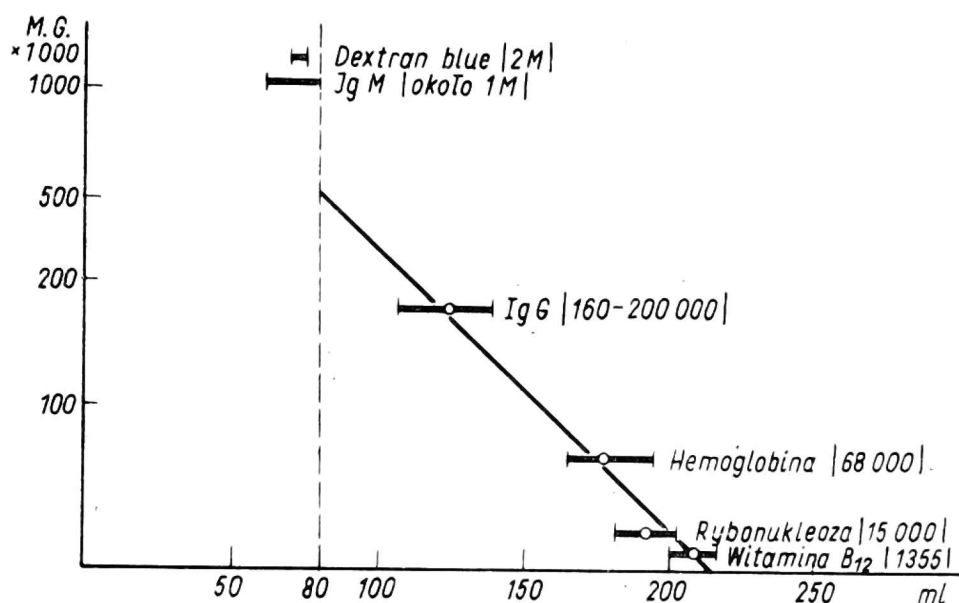
Supernatant 105 tys. g, po określeniu ciężaru cząsteczkowego, frakcjonowano w kolumnie Sephadex G 200. Najpierw sporządzano krzywą standardową w celu określenia ciężaru cząsteczkowego przy użyciu kolumny Sephadex G 200 K_{25×45} przy eluowaniu destylowaną wodą. Woda destylowana nie jest idealnym środowiskiem dla eluowania, w celu określenia ciężaru cząsteczkowego, jest ona jednak niezbędna do uzyskania aktywnego enzymu.

Krzywa standardowa (rys. 6) była sporządzona w mieszaninie związków o znanym ciężarze cząsteczkowym Dextran Blue, IgM, makroglobulina, IgM globulina, hemoglobina, rybonukleaza, witamina B₁₂.

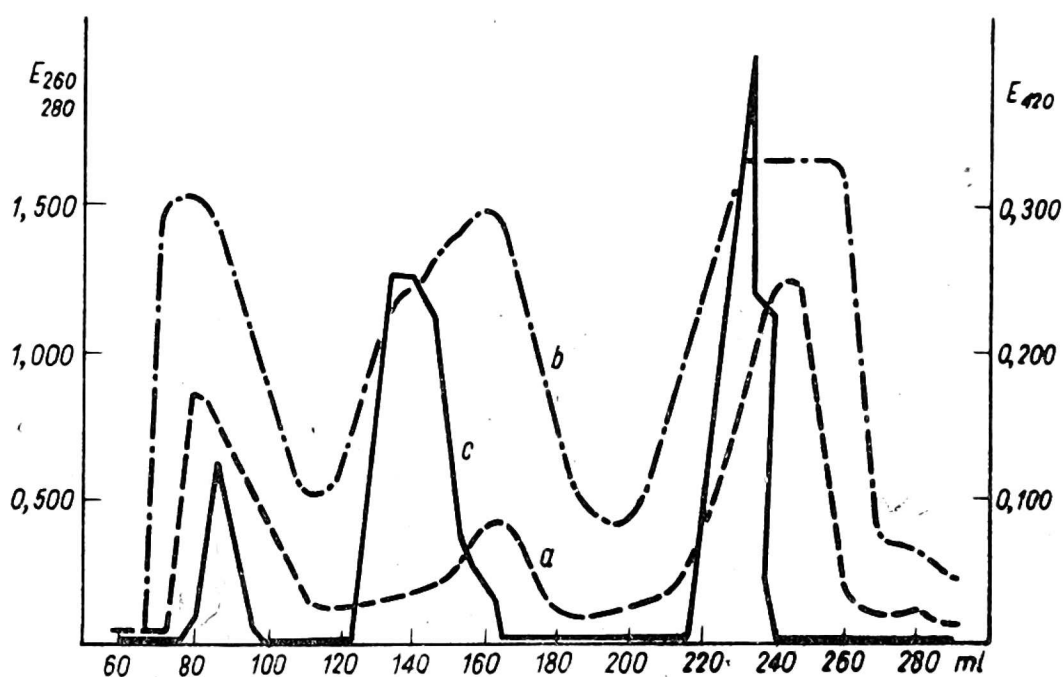
Supernatant 105 tys. g uzyskano z hodowli *M. phlei*.

Z rysunku 7 wynika, że β -galaktozydaza w nieindukowanych komórkach bakteryjnych znajduje się w 3 frakcjach o różnych ciężarach cząsteczkowych:

- 1) ciężar cząsteczkowy ok. 400 tys.
- 2) ciężar cząsteczkowy ok. 20 tys.
- 3) ciężar cząsteczkowy ok. 40 tys.



Rys. 6. Krzywa standardowa oznaczania ciężaru cząsteczkowego kolumna: Sephadex G 200 K 25 \times 45, eluat: woda destylowana

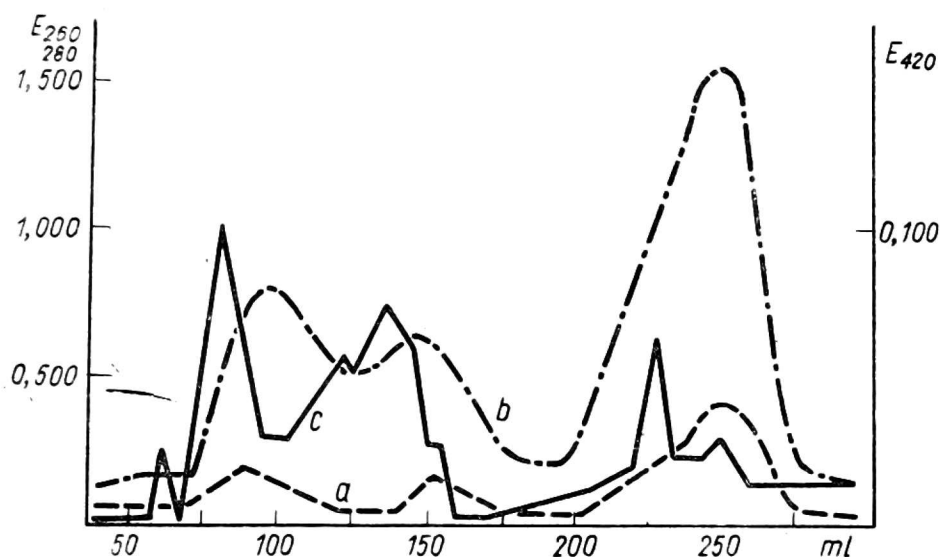


Rys. 7. Frakcjonowanie supernatantu 105 tys. g nieindukowanych komórek bakteryjnych na kolumnie Sephadex G 200 eluat: destylowana woda, a — krzywa elucji przy 620 m μ , b — krzywa elucji przy 280 m μ , c — krzywa elucji przy 420 m μ (aktywności enzymatyczne frakcji)

Nie rozstrzygnięto, czy te 3 formy, właściwe izoenzymowi, są jednorodne, czy przedstawiają różne pod względem cząsteczkowym formy polimeryzacyjne. Kwestia ta wymaga dalszych badań. Należy stwierdzić, że większość indukowanych enzymów należy do frakcji o niskim ciężarze cząsteczkowym. Aktywność frakcji o ciężarze cząsteczkowym 400 tys. jest bardzo niska.

W dalszej części doświadczenia badaniom poddano supernatant 105 tys. g uzyskany z wygłodzonych indukowanych komórek przy użyciu

tej samej metody. Rysunek 8 dowodzi, że większość przypadków β -galaktozydazy w tych warunkach stwierdzono we frakcjach o wysokim ciężarze cząsteczkowym.



Rys. 8. Frakcjonowanie supernatantu 105 tys. g indukowanych komórek bakteryjnych na kolumnie Sephadex G 200. Objaśnienia jak na rys. 7

Z. Magyar, J.G. Weiszfeiller

STUDIES OF THE REGULATION OF β -GALACTOSIDASE SYNTHESIS IN *MYCOBACTERIUM PHLEI*

Summary

The experiments were performed with *M. phlei* ATCC strains No 19249. The bacteria were cultivated in a semisynthetic media containing casein hydrolysate. The β -galactosidase — production was induced by IPTG after 8 hour starvation. It was shown that induced protein — synthesis could be inhibited by Actinomycin D., Chloramphenicol, Streptomycin and glucose as a catabolite. The enzyme induction process took place also in a cell-free system and this was inhibited by antibiotics at the level of translation and transcription. The bacteria grown in casein — hydrolysate — containing media were disrupted by X-press or Mickle-desintegrator. Three isoenzymes of β -galactosidase were established in the cell-free extract by differential centrifugation, Sephadex gelfiltration and ionexchange chromatography.