

Zum Mechanismus der Enzyminduktion

Über die spezifische Bindung von TMG in *E. coli* *

E. LODEMANN, D. DRAHOVSKY, R. FLÖHL und A. WACKER

Institut für Therapeutische Biochemie der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforschg. 22 b, 301—306 [1967]; eingegangen am 18. November 1966)

Following treatment with the β -galactosidase inducer [methyl- ^3H]-thiogalactoside, an inducer-acceptor-complex was isolated from extracts of *E. coli* K 12 using DEAE cellulose chromatography. Enzymatic digestion with trypsin suggested that the inducer was bound to a protein component.

Specific radioactive peaks demonstrated acceptor activity in the inducible strains *E. coli* K 12 and ML 3, but different results were obtained using the non-inducible mutants ML 35, ML 308 and ML 309.

The potent inhibitor of TMG-induction, *o*-nitrophenylfucoside, reduced the radioactive acceptor peak and caused a similar inhibition of β -galactosidase synthesis, *p*-nitrophenylfucoside was ineffective.

Further evidence is presented for the in vitro formation of an inducer-acceptor-complex in cell free extracts of *E. coli* K 12.

Der molekulare Mechanismus der Enzyminduktion wurde in den vergangenen Jahren von JACOB und MONOD am Lactose-Operon von *E. coli* K 12 untersucht. Bereits 1961¹ konnten sie die Ergebnisse ihrer Untersuchungen zu der Hypothese zusammenfassen, daß die Synthese der Enzyme des Lactose-Operons durch den Repressor, das Produkt eines Regulatorgens, gesteuert wird. Durch einen Induktor, z. B. Methylthio- β -D-galaktosid oder verschiedene andere Galaktoside, wird der Repressor inaktiviert und die Enzymsynthese freigegeben.

JACOB, MONOD und Mitarbb.² sowie verschiedene andere Arbeitsgruppen³, konnten inzwischen indirekt nachweisen, daß der Repressor vermutlich ein allosterisches Protein ist. Versuche zur Isolierung und näheren Charakterisierung des Repressors des Lactose-Operons sind bisher jedoch nicht bekannt. Mit Hilfe von Tritium markiertem TMG hoher spezifischer Aktivität (28 mC/mMol) haben wir versucht, die Reaktion des Induktors mit dem Repressor sowohl in vivo als auch in vitro zu verfolgen und durch Isolierung eines Induktor-Repressor-Komplexes eine Aussage über die chemische Natur des Repressormoleküls zu erhalten.

Abkürzungen: TMG, Methylthio- β -D-galaktosid; ^3H -TMG, [Methyl- ^3H]-thio- β -D-galaktosid; ONPF, *o*-Nitrophenyl- β -D-fucosid; ^3H -ONPF, *o*-Nitrophenyl- β -D-fucosid-[^3H]; PNPF, *p*-Nitrophenyl- β -D-fucosid.

* Auszugsweise vorgetragen, Mai 1966, Chemisches Institut der Universität Heidelberg, Tagung der Gesellschaft für Physiologische Chemie, Marburg, Oktober 1966.

¹ F. JACOB u. J. MONOD, J. molecular Biol. 3, 318 [1961].

² C. WILSON, D. PERRIN, M. COHN, F. JACOB u. J. MONOD, J. molecular Biol. 8, 582 [1964].

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen kultivierten wir *E. coli* K12 und ML 3 und die nicht induzierbaren Mutanten ML 35, ML 308 und ML 309 bei Gegenwart von ^3H -TMG. Außerdem stellten wir aus Kulturen der gleichen Stämme, die in Abwesenheit von TMG gewachsen waren, zellfreie Extrakte her und inkubierten diese mit ^3H -TMG. In beiden Fällen verfolgten wir an Hand der Radioaktivität säulenchromatographisch den Weg des Induktors.

Material und Methoden

Synthese der Glykoside: Methylthio- β -D-galaktosid wurde dargestellt durch Umsetzen von Acetothioalaktose mit Methyljodid und Abspalten der Schutzgruppen mit Natriummethylat⁴. [Methyl- ^3H]-thio- β -D-galaktosid (spezifische Aktivität 28 mC/mMol) wurde nach dem gleichen Verfahren unter Verwendung von Methyljodid-[^3H] gewonnen. *o*- und *p*-Nitrophenyl- β -D-fucosid** erhielten wir durch Kondensation von Acetobromfucose mit dem entsprechenden Nitrophenol im alkalischen Milieu⁵. *o*-Nitrophenyl- β -D-fucosid-[^3H] (spezifische Aktivität 8 mC/mMol) wurde auf dem gleichen Wege synthetisiert. Die dazu benötigte Fucose-[^3H] wurde

³ S. BOURGEOIS, M. COHN u. L. E. ORGEL, J. molecular Biol. 14, 300 [1965]; B. MÜLLER-HILL, J. molecular Biol. 15, 374 [1966]; J. R. SADLER u. A. NOVICK, J. molecular Biol. 12, 305 [1965]; S. D. BARBOUR u. A. B. PARDEE, J. molecular Biol. 20, 505 [1966]; T. HORIUCHI u. Y. OSHIMA, J. molecular Biol. 20, 517 [1966].

** ONPF für die ersten Versuche wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. WALLENFELS zur Verfügung gestellt.

⁴ M. CERNY, J. STANĚK und J. PACÁK, MH. Chem. 94, 293 [1962].

⁵ D. BERK, Dissertation, Freiburg 1962.

durch Dehalogenierung der geschützten 6-Jod-6-desoxygalaktose mit Raney-Nickel in Tritiumgas dargestellt⁶.

Bakterienstämme: *E. coli* K 12 ($i^+z^+y^+$), *E. coli* ML 3 ($i^+z^+y^-$), ATCC 22223, *E. coli* ML 308 ($i^-z^+y^+$), ATCC 22224, *E. coli* ML 35 ($i^-z^+y^-$) und *E. coli* ML 309 ($i^-z^+y^+$). Die beiden letzteren Stämme wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. WALLENFELS überlassen.

Kultivierung der Bakterien: Die Zellen wurden in einem Minimalmedium kultiviert, das je l 2 g Glycerin, 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 13,6 g KH_2PO_4 , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und 0,5 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ enthält und mit KOH auf pH 7 eingestellt wurde. Die Vorkulturen wurden ca. 48 Stdn., die Hauptkulturen (jeweils 100 ml, 1:10 angeimpft) 15 Stdn. bei 37° in einem Inkubator (Gyrotory Shaker, New Brunswick Scientific Company) bebrütet. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert, in dem gleichen Volumen von frischem Medium resuspendiert und 3 Stdn. bei Gegenwart von TMG, ONPG oder PNPf kultiviert.

Gewinnung der zellfreien Extrakte: Die Zellen wurden unter Kühlung abzentrifugiert, dreimal mit je 100 ml 0,01 M Tris-Succinat-Puffer pH 7,6 (1,21 g Tris-hydroxymethylaminomethan, 0,3 g Bernsteinsäure, 0,021 g Magnesiumacetat pro l) gewaschen, in 3 ml Puffer resuspendiert und mit Ultraschall (Branson Sonifier, Stufe 8, 90 Sek.) homogenisiert. Das Homogenat wurde zunächst 20 Min. bei 15 000 g, der Überstand anschließend 30 Min. bei 105 000 g (Spinco L 50, Rotor 40, 40 000 Upm) zentrifugiert. Auf diese Weise wurden aus 100 ml Zellkultur 2,5 ml zellfreier Extrakt erhalten.

Säulenchromatographie: Je 2,5 ml zellfreier Extrakt (aus 100 ml Zellkultur) wurden auf eine DEAE-Cellulose-Säule (Cl^- -Form, 12·1,5 cm) gegeben. Die Säule wurde mit 100 ml Tris-Succinat-Puffer gewaschen, dann wurde das Substanzgemisch mit einem linearen NaCl-Gradienten (200 ml Puffer, 200 ml 1 M NaCl in Puffer) bei Zimmertemperatur eluiert. Mit Hilfe eines Fraktionssammlers wurden Fraktionen zu je 128 Tropfen (ca. 5 ml) aufgefangen. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug etwa 50 ml pro Stunde. Die Extinktion der Fraktionen wurde bei 260 nm mit einem Spektralphotometer (Zeiss PQ II) gemessen.

Dialyse und Rechromatographie: Die für die Rechromatographie vorgesehenen Proben wurden eine Stde. lang bei 0° in „Visking“-Dialysierschlauch gegen Tris-Succinat-Puffer dialysiert. Das Innendialysat wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule (Cl^- -Form, 12·1,5 cm) gegeben. Die Säule wurde mit 50 ml Puffer gewaschen und anschließend mit 0,1 M NaCl eluiert.

Papierchromatographie: Die Papierchromatographie wurde absteigend auf Papier der Fa. Schleicher & Schüll 2043 b in den Systemen n-Butanol/Wasser 86:14 und Pyridin/Essigester/Wasser 2:8:1 durchgeführt.

Die R_f -Werte für TMG betragen 0,18 bzw. 0,35. Die Auswertung des gesamten Chromatogramms erfolgte durch Elution von 1,5·1,5 cm großen Chromatogrammabschnitten in 2 ml Wasser und Bestimmung der Radioaktivität im Liquidszintillationszähler nach Zugabe von 10 ml Szintillator.

Messung der Radioaktivität: Die Radioaktivität der Proben wurde in einem Liquidszintillations-Spektrometer (Packard 3003) gemessen. Als Szintillator diente eine Lösung von 4 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO), 75 mg 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol (Dimethyl-POPOP) und 120 g Naphthalin in 1 l Dioxan. Bis zu einer NaCl-Konzentration von 0,15 M wurden Mischungen von 0,5 ml Probe und 5 ml Szintillator, für höhere NaCl-Konzentrationen (bis etwa 0,5 M) Mischungen von 0,2 ml Probe, 1,3 ml Wasser und 10 ml Szintillator verwendet.

Analytische Methoden: Der Proteingehalt der Fraktionen wurde nach dem Verfahren von Folin-Ciocalteu⁷, der Ribosegehalt mit Hilfe des Orcintests nach MEJBAUM⁸ bestimmt. Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde durch Spaltung von *o*-Nitrophenylgalaktosid (ONPG) ermittelt. Dazu wurden 2 ml Reagenzlösung (50 mg ONPG pro 100 ml Phosphatpuffer pH 7) mit 0,5 ml Probenlösung 5 Min. bei 37° inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zusatz von 2 ml Sodalösung (0,3 M) gestoppt und die Extinktion bei 405 nm gemessen. Eine Extinktion = 1 entspricht unter diesen Bedingungen der Abspaltung von 1 μMol *o*-Nitrophenol.

Experimenteller Teil

I. In vivo-Versuche

A) Versuche mit $^3\text{H-TMG}$: Kultiviert man *E. coli* K 12 3 Stdn. in Gegenwart von $^3\text{H-TMG}$ (50 $\mu\text{g/ml}$ Medium), so zeigt sich ein starker Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivität. Die Bakterien wurden, wie oben beschrieben, homogenisiert und zentrifugiert. Bei dieser Aufarbeitung verteilte sich die Radioaktivität wie folgt: Von dem angebotenen radioaktiven TMG nahmen die Zellen etwa 0,1% auf. Nach dreimaligem Waschen war die Radioaktivität des Waschwassers zu vernachlässigen. Das Zellhomogenat von 100 ml Bakterienkultur enthielt eine Radioaktivität von $1,25 \cdot 10^6$ Ipm, der Überstand nach der Ultrazentrifugation $1,06 \cdot 10^6$ Ipm. Der 105 000 g-Überstand wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule gegeben. Wäscht man die Säule zunächst mit Tris-Succinat-Puffer und eluiert anschließend mit einem linearen NaCl-Gradienten, so ergibt sich das in

⁶ K. FREUDENBERG u. R. M. HIXON, Ber. dtsch. Chem. Ges. 56, 2119 [1923].

⁷ O. FOLIN u. V. CIOCALTEAU, J. biol. Chemistry 73, 627 [1927].

⁸ W. MEJBAUM, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 285, 117 [1939].

Abb. 1 gezeigte Bild. Etwa 90–95% der aufgegebenen Radioaktivität ist in den Fraktionen 3 bis 6 enthalten, die restliche Radioaktivität erscheint in einem zweiten Peak bei einem NaCl-Gehalt von etwa 10^{-1} M. Bei einigen Versuchen wurde ein weiterer

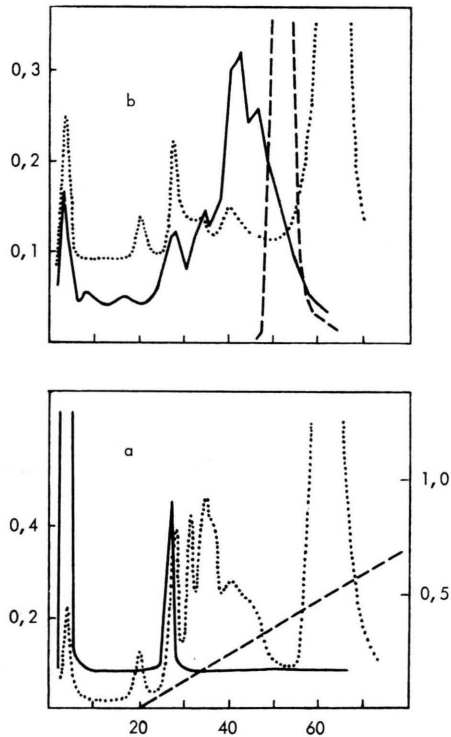


Abb. 1. DEAE-Cellulose-Chromatographie eines zellfreien Extraktes von *E. coli* K 12 nach Kultivierung in Gegenwart von ^3H -TMG. 100 ml einer Zellkultur von *E. coli* K 12 wurden, wie unter Material und Methoden beschrieben, in Gegenwart von ^3H -TMG (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Medium) 3 Stdn. bebrütet, aufgearbeitet und chromatographiert. Abszisse: Fraktionen zu 5 ml. Ordinate: a) links: Absorption bei 260 nm bzw. Radioaktivität [$\text{Ipm} \cdot 10^{-3}$], rechts: Konzentration des Gradienten [$\text{Mol NaCl}/\text{l}$], b) Absorption bei 670 bzw. 750 nm. a) \cdots Absorption bei 260 nm, — Radioaktivität, --- Gradient. b) \cdots Ribosegehalt (Absorption bei 670 nm), — Proteingehalt (Absorption bei 750 nm), --- β -Galaktosidase.

kleinerer radioaktiver Peak vor Beginn des Gradienten etwa bei Fraktion 16 beobachtet. Die Proteine des zellfreien Extraktes sind in den Fraktionen 3 bis 6 und 27 bis 55 enthalten. Die β -Galaktosidase konnten wir in den Fraktionen 48 bis 56, RNS in den Fraktionen 55 bis 70 nachweisen. Ribosehaltige, bei 260 nm absorbierende Verbindungen treten außerdem im Bereich der Fraktionen 3 bis 6, 16 bis 19 und 26 bis 28 auf.

Bei der Identifizierung der beiden radioaktiven Peaks kamen wir zu folgendem Ergebnis: Der

radioaktive Teil von Peak 1 war nach seinem papierchromatographischen Verhalten im wesentlichen freies TMG. Chromatographiert man Peak 2 nach Dialyse unter gleichen Bedingungen an einer DEAE-Cellulose-Säule, so erhält man wieder einen einheitlichen radioaktiven Peak bei einer NaCl-Konzentration von 10^{-1} M. Außer diesem Peak finden wir auch Peak 1 als geringe, aber deutlich nachweisbare Radioaktivität. Die quantitative Analyse des Rechromatographievorganges zeigt folgendes Bild:

	[Ipm]
Radioaktivität von Peak 2	14000
Radioaktivität nach Dialyse gegen Puffer bei 0° 1 Stde.	9000
Radioaktivität in Peak 1 nach Rechromatographie	300
Radioaktivität in Peak 2 nach Rechromatographie	5000

Der Radioaktive Komplex in Peak 2 ist also bei Dialyse und Rechromatographie unter milden Bedingungen *relativ* stabil.

Läßt man RNase oder DNase auf den radioaktiven Komplex einwirken, so zeigt sich keine Änderung der Radioaktivitäts-Verteilung im Chromatogramm. Daraus ergibt sich, daß für die Bindung von TMG RNS oder DNS nicht verantwortlich ist. Verdaut man den radioaktiven Komplex jedoch mit Trypsin, so verschwindet der Acceptorpeak, woraus hervorgeht, daß TMG an ein Protein gebunden war.

B) *Versuche mit ONPF*: MÜLLER-HILL et al.⁹ zeigten erstmals, daß die induzierende Wirkung des TMG auf die Synthese der β -Galaktosidase in kompetitiver Weise durch ONPF, nicht dagegen durch PNPf gehemmt wird. Wie wir unter Verwendung von radioaktivem TMG bei *E. coli* K 12 zeigen konnten, wird dabei das TMG durch ONPF aus den Zellen verdrängt. — Es war daher von Interesse, den Einfluß von ONPF und PNPf auf die Bindung von ^3H -TMG in den Zellen näher zu untersuchen. Wir führten dazu, z. T. in von einander unabhängigen Ansätzen, folgende Versuche durch: Eine Kontrollkultur erhielt 50 μg ^3H -TMG/ml, weitere Kulturen erhielten jeweils 50 μg ^3H -TMG/ml und außerdem 10, 100 und 200 μg ONPF/ml bzw. 200 μg PNPf/ml.

Bestimmt man in den Ansätzen nach 3 Stdn. die β -Galaktosidase-Aktivität, so erhält man die in Tab. 1

⁹ B. MÜLLER-HILL, H. V. RICKENBERG u. K. WALLENFELS, J. molecular Biol. 10, 303 [1964].

μg ONPF/ml Zellkultur	μg PNPf/ml Zellkultur	β -Galak- tosidase [%]	Accep- torpeak [%]
—	—	100	100
10	—	92	84
100	—	52	38
200	—	28	33
—	200	99	93

Tab. 1. Einfluß von *o*- und *p*-Nitrophenyl- β -*D*-fucosid auf die β -Galaktosidase-Aktivität und die Radioaktivität des ^3H -TMG-Acceptorpeaks bei *E. coli* K 12. 100-ml-Kulturen von *E. coli* K 12 wurden in Gegenwart von ^3H -TMG (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Medium) und der angegebenen Menge ONPF oder PNPf 3 Std. bei 37° bebrütet. Je 5 ml Zellsuspension wurden 20 Min. bei 37° mit 0,1 ml Toluol geschüttelt. Im so erhaltenen Zell-Lysat wurde die β -Galaktosidase bestimmt. Die restlichen 95 ml Zellkultur wurden, wie unter Material und Methoden beschrieben, aufgearbeitet und chromatographiert. Die Radioaktivität der Acceptorpeaks wurde summiert.

dargestellten Werte. Es zeigt sich, daß die verwendeten steigenden Mengen von ONPF die β -Galaktosidase-Aktivität von 100 auf 28% vermindern, dagegen 200 μg PNPf/ml keinen Einfluß haben. Gewinnt man aus diesen Zellen, wie oben beschrieben, einen zellfreien Extrakt und chromatographiert ihn ebenfalls an DEAE-Cellulose, so zeigt sich, daß die Menge an radioaktivem TMG in Peak 2 entsprechend der ONPF-Konzentration absinkt. Wie schon die Bestimmung der β -Galaktosidase ergab, hat da-

gegen PNPf keinen Einfluß auf den TMG-Acceptor-Komplex. — Aus diesen und den unter A) geschilderten Versuchen ergibt sich, daß die Hemmwirkung von ONPF vermutlich durch die Verdrängung von TMG von einem für die Induktion der β -Galaktosidase notwendigen Acceptor erfolgt.

C) Versuche mit ^3H -TMG bei einigen *E. coli*-Mutanten: Geht man von der Annahme aus, daß die spezifische Bindung des Induktors TMG an einen Repressor erfolgt, wie es JACOB und MONOD vorgeschlagen haben, so sollten die verschiedenen *E. coli*-Mutanten, je nachdem, ob sie Repressor-positiv oder -negativ sind, chromatographisch bez. des Peaks 2 ein unterschiedliches Bild zeigen. Wir ließen die beiden induzierbaren Mutanten K 12 und ML 3 und die beiden nicht induzierbaren Mutanten ML 35 und ML 308 in Gegenwart von ^3H -TMG wachsen und arbeiteten die zellfreien Extrakte, wie oben beschrieben, auf. Dabei ergab sich das in Abb. 2 gezeigte chromatographische Bild. Wie zu erwarten, erhält man bei *E. coli* ML3 ebenso wie bei *E. coli* K 12 den Peak 2, bei den nicht induzierbaren Mutanten dagegen ist das Ergebnis unterschiedlich. Die Mutante ML35 enthält den Peak 2 nur in sehr geringer Menge. Überraschenderweise findet man in dem Chromatogramm der nicht induzierbaren Mutante ML 308 (ähnlich auch bei ML 309) den Peak 2 in

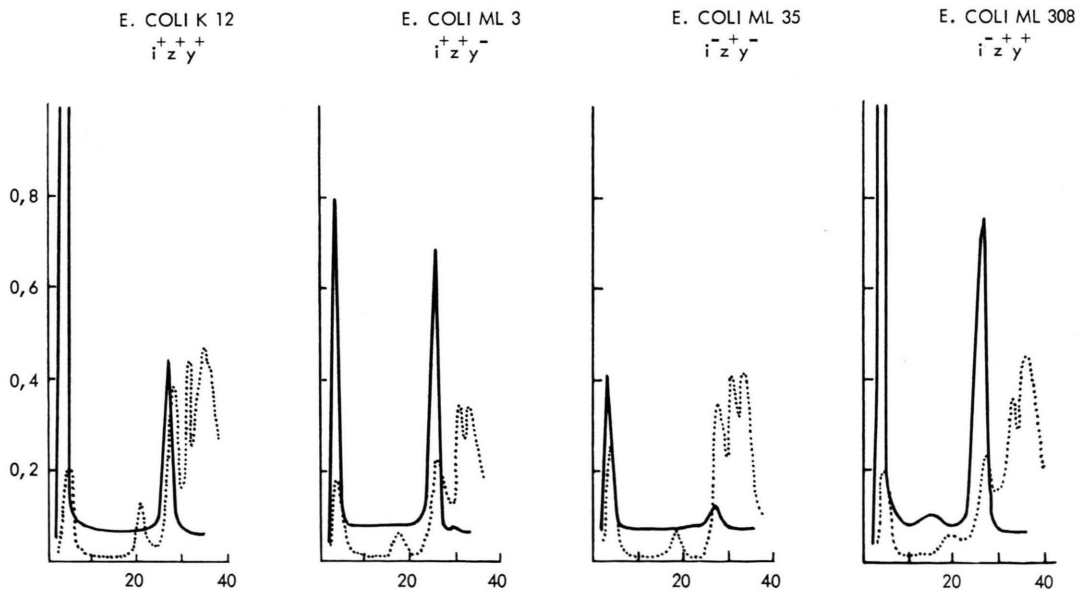


Abb. 2. DEAE-Cellulose-Chromatographie der zellfreien Extrakte einiger *E. coli*-Mutanten nach Kultivierung in Gegenwart von ^3H -TMG. 100-ml-Zellkulturen wurden, wie unter Material und Methoden beschrieben, in Gegenwart von ^3H -TMG (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Medium) bebrütet, aufgearbeitet und chromatographiert (Gradient ab Fraktion 20). Abszisse: Fraktionen zu 5 ml. Ordinate: Absorption bei 260 nm bzw. Radioaktivität [$\text{Ipm} \cdot 10^{-3}$]. ··· Absorption bei 260 nm, — Radioaktivität.

relativ großem Ausmaß. Charakteristisch ist, daß bei den beiden Permease-negativen Stämmen ML 3 und ML 35 der Peak 1 relativ klein ist. Peak 1 enthält, wie wir bereits oben gezeigt haben, das frei TMG.

II. In vitro-Versuche

Enzymatische Beeinflussung der Acceptor-Aktivität: Die spezifische Bindung von TMG läßt sich auch in vitro in zellfreien Extrakten von *E. coli* K 12 nachweisen. Chromatographiert man einen zellfreien Extrakt, der 5 Min. bei 25° mit ³H-TMG (100 µg/ml) inkubiert wurde, an DEAE-Cellulose, so erhält man ein Chromatogramm mit Peak 1 und Peak 2, ähnlich wie in Abb. 1 dargestellt. Inkubiert man den zellfreien Extrakt vor Zugabe von TMG mit DNase, RNase oder Trypsin, so erhält man nach Chromatographie für den TMG-Acceptor-Peak (Peak 2) die in Tab. 2 angegebenen Impulswerte, aus denen man

Behandlung des Extraktes vor Inkubation mit ³ H-TMG			Radioaktivität des Acceptor-peaks [Ipm]
[Min.]	[°C]		
15	37		3590
15	37	+ RNase	3420
15	37	+ DNase	3450
15	37	+ Trypsin	340

Tab. 2. Einfluß einer Trypsin-, RNase- oder DNase-Behandlung zellfreier Extrakte von *E. coli* K 12 auf die TMG-Acceptor-Aktivität. Aus je 100 ml Zellkultur von *E. coli* K 12 wurden, wie unter Material und Methoden beschrieben, zellfreie Extrakte gewonnen. Diese wurden mit 100 µg RNase, 100 µg DNase, 1 mg Trypsin pro ml oder ohne Zusatz 15 Min. bei 37° im Wasserbad inkubiert. Dann wurden die Proben mit ³H-TMG (100 µg/ml) versetzt und nach 2 Min., wie unter Rechromatographie beschrieben, chromatographiert. Die Radioaktivität der Acceptorpeaks wurde summiert.

ersehen kann, daß eine Trypsin-Behandlung die spezifische Bindung von TMG verhindert, die Behandlung mit RNase und DNase dagegen keinen Einfluß hat. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den in vivo-Versuchen, wonach der in vivo gebildete TMG-Acceptor-Komplex Trypsin-sensitiv ist.

Inkubiert man einen zellfreien Extrakt mit ³H-ONPF und chromatographiert anschließend, so findet man ebenfalls einen radioaktiven Acceptorpeak.

Diskussion

Wie aus vorstehenden Versuchen deutlich hervorgeht, verbindet sich der Induktor des Lactose-Operons in den Bakterienzellen mit einer makromolekularen Substanz, die wir nach vorläufigen Versuchen (enzymatische Verdauung) als ein Protein identifiziert haben. Nach unseren bisherigen Versuchen können wir noch keine Angaben darüber machen, ob der TMG-Acceptor zusätzlich eine RNS-Komponente enthält, etwa im Sinne der Hypothese von MILLER und SOBELL¹⁰. Versuche zur Klärung dieser Frage sind im Gange*. Für die Bindung des Induktors dürfte jedoch ein evtl. RNS-Bestandteil, wie vorstehende Versuche gezeigt haben, ohne Bedeutung sein. Überraschend ist die Bindungsfestigkeit des Induktors TMG an das Protein. Sie ist jedoch nicht irreversibel, denn dieser Komplex zerfällt, wie die Versuche zeigten, bei der Dialyse und wiederholtem Chromatographieren. Die relativ hohe Stabilität des Induktor-Acceptor-Komplexes wird verständlicher, wenn man neue Ergebnisse von WALLENFELS et al.¹¹ berücksichtigt, denen es gelang, einen relativ stabilen Komplex zwischen β -Galaktosidase und einem Substratanalogen zu kristallisieren. Die Bindungsfestigkeit derartiger Enzym-Substrat- oder ähnlicher Komplexe kann demnach doch höher sein als man gemeinhin geneigt ist, anzunehmen. — Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß auch der Antagonist des TMG, das ONPF, an den Acceptor gebunden wird und sich dieser Komplex ebenfalls chromatographieren läßt. PNPF, ein Analogon des ONPF, verdrängt das TMG nicht.

Es erhebt sich nunmehr die Frage, ob der von uns isolierte Induktor-Acceptor-Komplex mit dem von JACOB und MONOD postulierten Induktor-Repressor-Komplex identisch ist. Hinweise, daß dies tatsächlich der Fall sein könnte, sind einmal die Ergebnisse mit dem Antiinduktor ONPF: Verkleinerung der Radioaktivität durch spezifische Verdrängung bewirkt auch Verminderung der Syntheserate der β -Galaktosidase. Zum anderen konnten wir den Komplex in der Repressor-negativen Mutante ML 35 nicht finden. Das überraschende Vorhandensein dieses Komplexes in den ebenfalls Repressor-negativen Mutan-

¹⁰ J. H. MILLER u. H. M. SOBELL, Proc. nat. Acad. Sci. USA 55, 1201 [1966].

¹¹ P. SCHAEDEL u. K. WALLENFELS, persönliche Mitteilung.

¹² A. R. KOLBER u. W. D. STEIN, Nature [London] 209, 691 [1966].

* Anmerk. b. d. Korr.: Vgl. hierzu H. DELLWEG, E. LODEMANN, D. DRAHOVSKY u. A. WACKER, Biochem. Biophysic Res. Commun. 26, 71 [1967].

ten ML 308 und 309 können wir vorläufig nur so deuten, daß die *i*-Mutation die Bindung des Induktors nicht beeinflußt hat, sondern lediglich die biologische Aktivität gegen die DNS im Sinne von JACOB und MONOD.

Daß bei beiden Permease-negativen Mutanten der erste Peak, der, wie wir zeigen konnten, nicht gebundenem TMG entspricht, im Vergleich zu den Permease-positiven Mutanten wesentlich verkleinert ist, war auf Grund der wichtigen Funktion, die der Permease beim Transport des TMG zukommt, zu erwarten.

Wie Versuche mit ³H- und ¹⁴C-Phenylalanin in Analogie zu den Versuchen von KOLBER und STEIN¹² gezeigt haben, befindet sich die Permease-Aktivität bei unserer Aufarbeitung vermutlich im Bereich der Fraktionen 3 bis 8.

Wichtig und interessant ist, daß bei *E. coli* K 12 auch in vitro der Induktor spezifisch an eine makromolekulare Fraktion gebunden wird, die durch Verdauungsversuche als ein Protein identifiziert wurde. Diese in vitro-Versuche zeigen einen Weg, wie es auf rationellem Wege möglich ist, größere Mengen des Induktor-Acceptor-Komplexes herzustellen, um an

der Strukturaufklärung des Acceptors arbeiten zu können.

In einer früheren Arbeit¹³ haben wir davon berichtet, daß wir aus nicht induzierten Zellen von *E. coli* K 12 eine makromolekulare Fraktion isoliert haben, mit der wir die DNS-abhängige RNS-Polymerase hemmen konnten und diese Hemmung spezifisch mit TMG, dagegen nicht mit Lactose (vgl. hierzu BURSTEIN et al.¹⁴) aufheben konnten. Weitere Versuche in dieser Richtung haben ergeben, daß bei der Isolierung dieser Fraktionen aus Repressor-negativen Stämmen hinzugefügtes TMG keinen Einfluß zeigte*. Damit haben wir erstmals in vitro die biologische Wirkung eines Induktors nachweisen können. In weiteren Versuchen sind wir bemüht, den chromatographisch isolierten TMG-Acceptor elektrophoretisch zu reinigen und die chromatographischen und elektrophoretischen Fraktionen im DNS-abhängigen RNS-Polymerase-System auf ihre biologische Spezifität zu untersuchen.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für eine Sachbeihilfe.

¹³ A. WACKER, L. TRÄGER u. P. CHANDRA, *Naturwissenschaften* **52**, 134 [1965].

* unveröffentlichte Ergebnisse.

¹⁴ C. BURSTEIN, M. COHN, A. KEPES u. J. MONOD, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **95**, 634 [1965].