

## Phosphorylierung von Methylthio- $\beta$ -D-galaktosid in *E. coli*

E. LODEMANN, S. ISKRIĆ, C. ALTANER und A. WACKER

Institut für Therapeutische Biochemie der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforsch. **23 b**, 1219—1221 [1968]; eingegangen am 28. Mai 1968)

Methylthio- $\beta$ -D-galaktosid wird in *E. coli* K 12, sowie in den Mutanten ML 3 und ML 308 in vivo zu einem geringen Teil in einen Phosphorsäureester, wahrscheinlich das 6-Phosphat (TMG-P) umgewandelt. TMG-P wird von *E. coli* K 12 aufgenommen, wirkt jedoch nicht als Induktor des Lactose-Operons. Zellfreie Extrakte aus *E. coli* K 12 geben die gleiche Reaktion, wobei die in vitro-Reaktion durch anorganisches Phosphat und Phosphoenolpyruvat stimuliert wird.

Nach in vivo-Induktion von *E. coli* K 12 sowie der Mutanten ML 3 und ML 308 mit  $^3\text{H}$ -Methylthio- $\beta$ -D-galaktosid (TMG) erhält man bei Chromatographie der durch Ultraschallhomogenisation bereiteten zellfreien Extrakte an DEAE-Cellulose zwei radioaktive Peaks<sup>1,2</sup>. Der erste Peak, der mit Puffer (0,01 M Tris-HCl, pH 7,4) von der Säule gewaschen wird, besteht, wie durch Papierchromatographie gezeigt werden konnte, aus unverändertem TMG. 6-Acetyl-TMG<sup>3,4</sup> blieb unter der Nachweisgrenze. Der zweite radioaktive Peak, der bei etwa 0,1 M NaCl eluiert wird, enthält Protein und, wie durch Versuche mit Zellen nachgewiesen wurde, die in Gegenwart von  $^{32}\text{P}$ -Phosphat bzw.  $^{14}\text{C}$ -Adenin und  $^{14}\text{C}$ -Uracil gewachsen waren, auch Phosphat und Nucleinsäurebasen. Bei Diskelektrophorese an Polyacrylamidgel (Länge des Gels: 75 mm) ließen sich die  $^3\text{H}$ -Aktivität des Induktors und die  $^{32}\text{P}$ - bzw.  $^{14}\text{C}$ -Aktivität nicht voneinander trennen. Versuche mit einigen  $\beta$ -Galaktosidase-induzierbaren bzw. -konstitutiven *E. coli*-Mutanten, sowie Versuche mit *o*-Nitrophenylfucosid (ONPF), einem kompetitiven Hemmstoff der  $\beta$ -Galaktosidase-Induktion<sup>5</sup>, dessen Wechselwirkung mit dem Repressor des Lactose-Operons von RICKENBERG und Mitarbb.<sup>6</sup> durch Versuche mit Mutanten nachgewiesen wurde, ließen einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des zweiten radioaktiven Peaks im Chromatogramm und dem Induktionsvorgang vermuten<sup>1</sup>. Auch bei in vitro-Inkubation (2 Min., Raumtemperatur) zellfreier Extrakte nicht induzierter *E. coli* K 12-Zellen wurde das Auftreten des zweiten radioaktiven Peaks im Chro-

matogramm beobachtet, jedoch war der Einfluß des Antiinduktors ONPF in diesem Fall nicht festzustellen.

Inzwischen haben wir die Zusammensetzung des zweiten radioaktiven Peaks mit verbesserten elektrophoretischen Methoden — längere Laufstrecke auf Agarose- und Polyacrylamidgelplatten (12 cm) — genauer untersucht. Dabei stellten wir fest, daß die Maxima der  $^3\text{H}$ -Aktivität des Induktors und der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität von Adenin und Uracil etwas gegeneinander verschoben sind und daß die dialysierbare  $^3\text{H}$ -Aktivität dieser Fraktion TMG und ein phosphathaltiges, durch alkalische Phosphatase spaltbares Folgeprodukt von TMG enthält, das bei der Gelelektrophorese (pH 8,4) dicht hinter der Amidoschwarz-Markierung läuft. Um  $R_f$ -Werte für diese Verbindung bestimmen zu können — eine direkte Papierchromatographie war wegen des Salzgehalts der Fraktion nicht möglich —, wurden die zu untersuchenden Fraktionen gegen Tris-HCl-Puffer dialysiert und über DEAE-Sephadex filtriert. Nach Elution des Austauschers mit Ammoniumbicarbonatpuffer wurde das Eluat gefriergetrocknet und über Natriumhydroxid und Schwefelsäure im Vakuumexsiccator entsalzt. Der Rückstand wurde absteigend chromatographiert, wobei für das TMG-Derivat folgende  $R_f$ -Werte erhalten wurden: 0,28 in *n*-Propanol/Wasser 3 : 1 (TMG: 0,59) und 0,08 in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 4 : 1 : 1 (TGM: 0,40).

Während in vivo die Ausbeute an Umwandlungsprodukt bei 3-stdg. Inkubation mit  $^3\text{H}$ -TMG etwa 10% der Gesamtaktivität des Extrakts, aber weniger

<sup>1</sup> E. LODEMANN, D. DRAHOVSKY, R. FLÖHL u. A. WACKER, Z. Naturforsch. **22 b**, 301 [1967].

<sup>2</sup> H. DELLWEG, E. LODEMANN, D. DRAHOVSKY u. A. WACKER, Biochem. biophysic. Res. Commun. **26**, 71 [1967].

<sup>3</sup> I. ZABIN, A. KEPES u. J. MONOD, Biochim. biophysic. Res. Commun. **1**, 289 [1959].

<sup>4</sup> L. A. HERZENBERG, Arch. Biochem. biophysics **93**, 314 [1961].

<sup>5</sup> B. MÜLLER-HILL, H. V. RICKENBERG u. K. WALLENFELS, J. molecular Biol. **10**, 303 [1964].

<sup>6</sup> K. JAYARAMAN, B. MÜLLER-HILL u. H. V. RICKENBERG, J. molecular Biol. **18**, 339 [1966].

als 0,1% der den Zellen angebotenen Radioaktivität beträgt — das Medium enthält zusätzlich etwa die fünffache Menge der radioaktiven, phosphathaltigen Verbindung —, wird bei in vitro-Inkubation (100 µg TMG/ml Extrakt, 10 Min., 37°) ca. 1% des angebotenen TMG umgewandelt<sup>7</sup>. Die bei 10-min. Inkubation erhaltene Ausbeute entspricht etwa 75% der bei dieser Temperatur zu erhaltenden optimalen Ausbeute<sup>7</sup>. Die Reaktion wird durch Zugabe von anorganischem Phosphat, von Phosphoenolpyruvat, nicht aber von ATP verstärkt (Tab. 1). Inkubation des Reaktionsgemischs oder des isolierten Peaks mit alkalischer Phosphatase führt zum Verschwinden des TMG-Folgeprodukts im DEAE-Cellulose-Chromatogramm.

Inkubationsansatz	TMG-P [%]
Extrakt + TMG	100
Extrakt + TMG + ATP (3,3 mMol)	102
Extrakt + TMG + Pi (3,3 mMol)	110
Extrakt + TMG + Pi (9 mMol)	120
Extrakt + TMG + PEP (2 mMol)	135

Tab. 1. Inkubation von zellfreien Extrakten aus *E. coli* K 12 mit <sup>3</sup>H-TMG (100 µg/ml) in Gegenwart verschiedener Zusätze 10 Min. bei 37°. Anschließend Chromatographie an DEAE-Cellulose, Waschen der Säule mit Inkubationspuffer (0,01 M Tris-HCl, 0,001 M MgCl<sub>2</sub>, 0,001 M KCl, pH 7,4) und Elution mit 0,1 M NaCl im gleichen Puffer. Pi = Phosphatpuffer pH 7, PEP = Phosphoenolpyruvat.

Auf Grund der beschriebenen Ergebnisse besteht kein Zweifel, daß es sich bei der TMG-Umwandlung um eine enzymatische Phosphorylierung und bei dem gebildeten Produkt wahrscheinlich um TMG-6-Phosphat (TMG-P) handelt, wie es kürzlich von LAUE und MACDONALD<sup>8</sup> aus *Staphylococcus aureus*

isoliert und von KUNDIG und Mitarbb.<sup>9</sup> als Intermediärprodukt des aktiven Transports bei *E. coli* postuliert wurde. — Das Auftreten unterschiedlicher Mengen von freiem TMG in der TMG-P-Fraktion erklärt sich durch das Vorhandensein von saurer Phosphatase, die im DEAE-Cellulose-Chromatogramm z. T. bereits mit dem TMG-P zusammen eluiert wird. Während der Trennung und anschließend beim Stehen im Kühlraum (4°) erfolgt eine langsame Spaltung von TMG-P<sup>7</sup>.

Um Aufschluß über die Aufnahme von TMG-P in die Zellen und seine evtl. Induktorwirkung zu erhalten, wurden Parallelkulturen von *E. coli* K 12 mit <sup>3</sup>H-TMG bzw. <sup>3</sup>H-TMG-P inkubiert und aufgearbeitet (Tab. 2). An Hand der Radioaktivität wurde festgestellt, daß die Aufnahme an TMG-P unter den angegebenen Bedingungen nur etwa 40% der TMG-Aufnahme betrug.  $\beta$ -Galaktosidase-Induktion war in den mit TMG-P inkubierten Zellen nicht nachzuweisen.

Diese Unwirksamkeit des TMG-P überrascht nicht, wenn man berücksichtigt, daß Modifizierung am C<sub>6</sub> bei Galaktosiden zum Verlust der Induktorwirkung führt. Besonders gute Beispiele dafür sind Methylthiofucosid, Methylfucosid<sup>5</sup> und Methylgalakturonsäure<sup>10</sup>.

Die Frage, ob die Bildung von TMG-P in *E. coli* K 12 (*i*<sup>+</sup> *z*<sup>+</sup> *y*<sup>+</sup>), *E. coli* ML 3 (*i*<sup>+</sup> *z*<sup>+</sup> *y*<sup>-</sup>) und *E. coli* ML 308 (*i*<sup>-</sup> *z*<sup>+</sup> *y*<sup>+</sup>)<sup>1</sup> auf eine Transportphosphorylierung zurückzuführen ist, läßt sich noch nicht beantworten. Die Ergebnisse sprechen jedoch gegen eine Phosphorylierung durch das  $\gamma$ -Gen-Produkt, da sonst eine TMG-P-Bildung bei *E. coli* ML 3 und in Extrakten von nicht induzierten *E. coli* K 12-Zellen nicht stattfinden dürfte und auch kein nennenswerter

Versuchs-Nr.	TMG angeboten [Ipm]	TMG aufgenommen [Ipm]	TMG aufgenommen [%]	$\beta$ -Galaktosidase [ <i>E</i> <sub>405nm</sub> ]	TMG-P angeboten [Ipm]	TMG-P aufgenommen [Ipm]	TMG-P aufgenommen [%]	$\beta$ -Galaktosidase [ <i>E</i> <sub>405nm</sub> ]
1	198 000	5450	2,75	1,300	237 000	2800	1,18	0,018
2	153 000	2330	1,52	1,350	149 000	1120	0,75	0,004
3	279 000	5000	1,80	1,060	255 000	1540	0,60	0,004

Tab. 2. Aufnahme von TMG und TMG-P in *E. coli* K 12. *E. coli* K 12-Kulturen wurden über Nacht in Glycerinmedium gezüchtet, abzentrifugiert und in dem gleichen Volumen frischen Glycerinmediums resuspendiert. Von diesen Zellsuspensionen wurden 2·5 ml in 25-ml-Erlenmeyer-Kolben überführt, mit 1 ml TMG- bzw. TMG-P-Lösung (spezif. Aktivität 0,28 mC/mMol; ca. 200–300 µg/ml Lösung) versetzt und 3 Stdn. bei 37° im Wasserbad geschüttelt. Dann wurde abzentrifugiert, dreimal bei 0° gewaschen und mit Ultraschall homogenisiert. Im Homogenat wurde die Radioaktivität und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (in 0,1 ml Extrakt) bestimmt.

<sup>7</sup> E. LODEMANN, unveröffentlicht.

<sup>8</sup> P. LAUE u. R. E. MACDONALD, *J. biol. Chemistry* **243**, 680 [1968].

<sup>9</sup> W. KUNDIG, F. D. KUNDIG, B. ANDERSON u. S. ROSEMAN, *J. biol. Chemistry* **241**, 3243 [1966].

<sup>10</sup> J. MONOD u. M. COHN, *Advances in Enzymol.* **13**, 67 [1952].

Unterschied in der Phosphorylierungs-Aktivität der Extrakte induzierter und nicht induzierter Zellen festgestellt wurde<sup>7</sup>. In Übereinstimmung hiermit sind Ergebnisse von KENNEDY und SCARBOROUGH<sup>11</sup>, die keine Transportphosphorylierung von Lactose bei *E. coli* ML 308 – 225 ( $i^- z^- y^+ a^+$ ) feststellen konnten.

Inwieweit eines der anderen Galaktosid- oder Galaktose-Transportsysteme<sup>12</sup> oder ein Glucose-Transportsystem<sup>13, 14</sup> für die Bildung von TMG-P verantwortlich ist, muß vorläufig offen bleiben.

## Material und Methoden

<sup>3</sup>H-TMG (spezif. Aktivität 28 mC/mMol) wurde von FLÖHL synthetisiert, <sup>3</sup>H-TMG-P wurde von SINGH durch ein verändertes Inkubationsverfahren biochemisch dargestellt<sup>15</sup>. Die Kultivierungen der Bakterien, Aufarbeitungen, chromatographischen und elektrophoretischen Trennungen, Enzymbestimmungen und Radioaktivitätsmessungen wurden wie früher beschrieben durchgeführt<sup>1, 2</sup>. Für die Papierchromatographie wurde Papier der Fa. Schleicher & Schüll 2043 b verwendet.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit und Frau I. NIEDENTHAL für ausgezeichnete technische Assistenz.

<sup>11</sup> E. P. KENNEDY u. G. A. SCARBOROUGH, Proc. nat. Acad. Sci. USA **58**, 225 [1967].

<sup>12</sup> A. K. GANESAN u. B. ROTMAN, J. molecular Biol. **16**, 42 [1966].

<sup>13</sup> S. SCHAEFLER, J. Bacteriol. **93**, 254 [1967].

<sup>14</sup> C. F. FOX u. G. WILSON, Proc. nat. Acad. Sci. USA **59**, 988 [1968].

<sup>15</sup> E. LODEMANN, R. FLÖHL, A. SINGH u. A. WACKER, in Vorbereitung.

## Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades

### X. Der „AS-Effekt“, ein Kurzzeitreparatur-Effekt\*

W. LASKOWSKI und U. SCHÄDEL \*\*

Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin

(Z. Naturforschg. **23 b**, 1221–1226 [1968]; eingegangen am 19. März 1968)

A certain mutation in the *is<sub>2</sub>* gene of *Saccharomyces* resulting in isoleucine and valine dependence also gives rise to an increase in resistance to ionising radiation in diploid cells under certain conditions. This increase in radiation resistance is due to an increase in short-time recovery as well as a decrease in long-term recovery (e. g. liquid-holding recovery). Possible mechanisms for this effect are discussed.

Bei strahlenbiologischen Untersuchungen an weitgehend isogenen homozygoten di-, tri- und tetraploiden *Saccharomyces*-Stämmen war festgestellt worden, daß bestimmte Aminosäure-bedürftige Mutanten sich durch einen Resistenzgewinn gegenüber Röntgenstrahlen auszeichnen. Prototrophe Revertanten verlieren diesen Resistenzgewinn wieder. Der mit bestimmten Aminosäure-Bedürftigkeiten korrelierte Resistenz-Effekt war „AS-Effekt“ genannt worden<sup>1, 2</sup>. Ob dieser Resistenzgewinn durch Ansammlung von Strahlenschutzsubstanzen als Folge bestimmter Stoffwechselblockierungen oder durch zelluläre Reparaturprozesse verursacht wird, war zunächst unbekannt. Die im folgenden beschriebenen

Untersuchungsergebnisse an einem Isoleucin-Valin-bedürftigen Stamm zeigen, daß der „AS-Effekt“ durch das Wirksamwerden bestimmter Reparaturprozesse verursacht wird.

## I. Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden mit einem diploiden Isoleucin-Valin-bedürftigen Stamm (*iv*<sup>-</sup>-Stamm) und einem bis auf die Isoleucin-Valin-Bedürftigkeit diploiden isogenen Wildtyp-Stamm durchgeführt: 211-1aM/2 ( $\alpha\alpha is_2 is_2$ ) und 211-1a/2 ( $\alpha\alpha + +$ ). Die Symbole in den Klammern kennzeichnen den Genotyp der Stämme. Die Paarungstypallele sind durch die Symbole  $\alpha$  und  $\alpha$  bezeichnet. Die in einem haploiden Ausgangsstamm spontan aufgetretene Isoleucin-Valin-Bedürftigkeit beruht

\* Für diese Veröffentlichung wurden Teile aus der Doktor-Dissertation des zweiten Autors bei der math.-nat. Fakultät der Freien Universität Berlin verwendet.

\*\* Jetzt: Gesellschaft für Kernforschung, Karlsruhe.

<sup>1</sup> W. LASKOWSKI, Z. Naturforschg. **17 b**, 93 [1962].

<sup>2</sup> W. LASKOWSKI, Abh. Deutsch. Akad. Wiss. zu Berlin, Klasse für Medizin **1962**, 171.