

---

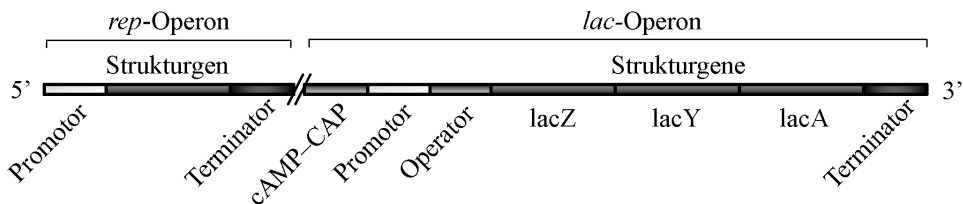
# UNTERSUCHUNG DER $\beta$ -GALAKTOSIDASE

## Analyse der Induktion und Hemmung

### Grundlagen

#### Transkription bei Prokaryonten

Die sog. Haushaltsgene sind unabhängig von äußeren Einwirkungen, sie werden kontinuierlich exprimiert, dadurch eine konstante Menge von mRNA wird hergestellt: man nennt es **konstitutive Expression**. Dagegen die meisten Gene sind **induzierbar**, d.h. die Synthese der mRNA (und des Proteins) kann ein- bzw. ausgeschaltet werden, abhängig davon, ob bei einem gegebenen Zustand die Zelle das bestimmte Protein benötigt oder nicht. Der DNA-Bereich an der 5'-Seite der kodierenden Sequenz und die Proteine, die auf diesem Bereich wirken, spielen eine wichtige Rolle bei dieser Regelung. Die DNA-Sequenz, die als Bindungsstelle der regulierenden Moleküle dient, wird **cis-regulierendes Element** (oder Operator) genannt. Proteine, die sich an diese Sequenz anbinden, sind die **Regulatoren**. Ein Regulator kann sowohl positive, als auch negative Wirkung ausüben, d.h. er kann die Transkription beschleunigen oder hemmen, darüber hinaus gibt es weitere Faktoren (**Induktor** oder **Repressor**) die die Bindung des Regulators beeinflussen. Die regulierende Wirkung des Regulators ist nur so möglich, dass die Bindungsstelle der RNA-Polymerase (**Promotor**) und die des Regulators (cis-regulierendes Element) in der Nähe voneinander liegen, deshalb diese Sequenz wird „cis“ genannt. Nach dem cis-regulierenden Element und dem Promotor befindet sich die DNA-Sequenz, die für die Aminosäurereihenfolge des Proteins codiert, sie wird **Strukturgen** bezeichnet. Bei den Prokaryonten können mehrere Strukturgene nach einem einzigen Promotor aufeinander folgen. Die mRNA wird **polycistronisch** genannt (eine mRNA codiert für verschiedenartige Proteine). Dagegen bei den Eukaryonten praktisch alle Gene sind **monocistronisch** (eine mRNA codiert fast immer nur für einerlei Protein).



**Abb. 1. Schematische Darstellung des lac-Operons.** *rep*-Operon (Promotor, Strukturgen und Terminator – linke Seite): funktionelle Einheit, die für den Repressor codiert. cAMP-CAP: Bindungsstelle von cAMP-CAP Komplex, Promotor: Bindungsstelle der RNA-Polymerase, Operator: Bindungsstelle des Repressors, Strukturgene lacZ:  $\beta$ -Galaktosidase, lacY: Galaktosid-Permease, lacA: Transacetylase

Da der Regulator selbst auch ein Protein ist, er verfügt auch über ein eigenes Gen. Das Gen des Regulators kann überall in dem Genom sein, regelmäßig ist es nicht in der Nähe des regulierten Gens lokalisiert. Man nennt deshalb das Gen des Regulators das **trans-regulierende Element**. Das cis-regulierende Element, der Promotor und die Strukturgene bauen zusammen das **Operon** auf.

Das sog. „*lac*-Operon“ ist das eine der meisten und längsten bekannten Operone. In *lac*-Operon des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) sind die Gene enthalten, die die Informationen für Synthese derer Enzyme tragen, die zum Abbau der Lactose nötig sind. Solange dieses Disaccharid nicht zur Verfügung steht, die Synthese solcher Enzyme ist unnötig. Der Repressor bindet sich mit einer großen Affinität an die Operatorsequenz (*Abb. 1*), und hemmt dadurch die Funktion der RNA-Polymerase. Falls die Konzentration der Lactose in der Zelle zunimmt, Lactose wirkt als **Induktor**, sie bindet sich an den Repressor und verursacht eine Konformationsänderung des Repressors. Der Repressor-Induktor-Komplex wird von der Operatorstelle getrennt. Danach die RNA-Polymerase kann die Transkription durchführen, folglich die Synthese der Enzymproteine und dadurch der Abbau der Lactose findet auch statt. Die Regelung hat eine weitere Komponente auch. Obwohl die Funktion der RNA-Polymerase in der Anwesenheit von Lactose nicht mehr gehemmt ist, trotzdem nur eine geringe Menge von Enzymen wird hergestellt, da der Promotor schwach ist. Die Geschwindigkeit der Transkription wird erst dann gesteigert, wenn sich der cAMP-CAP (catabolite gene activator protein)-Komplex an die DNA bindet (*Abb. 1*). Er verursacht eine Veränderung der Raumstruktur der DNA-Sequenz, demzufolge die Affinität der RNA-Polymerase nimmt zu. Im Falle von Glucosemangel erhöht sich die Konzentration von cAMP, also die hohe Lactose- und niedrige Glucosekonzentration sind zusammen verantwortlich für die maximale Induktion dieser Gene. Dieser Regelmechanismus hat zur Folge, dass die Synthese der Enzyme für den Abbau der Lactose bei Anwesenheit der Lactose nur dann intensiv zustande kommt, wenn gleichzeitig Glucosemangel vorliegt. So ist es auch erklärlich, dass *E. coli* bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glucose und Lactose Glucose für Energiegewinnung bevorzugt.

### Untersuchung der Induktion und Synthese der $\beta$ -Galaktosidase

Bei Prokaryonten die Induktion bzw. die Synthese der Proteine findet in 3 Schritten statt. (1) Der Induktor (die Lactose) entfernt den Repressor, demzufolge die RNA-Polymerase kann bereits funktionieren (2). Die RNA-Polymerase tritt in die Elongationsphase ein, die Synthese der mRNA kommt zustande (3). Kurz nachher, noch bevor der Vollendung der Transkription, am 5'-Ende der mRNA startet die Synthese der Enzymproteine (Translation). Diese drei Vorgänge werden bei diesem Versuch untersucht.

Wir können Kenntnisse über die Induktion und Aktivität der Transkription und Translation (Proteinbiosynthese) durch Bestimmung der Aktivität des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase erhalten, da die Enzymaktivität und Menge des Proteins proportional zueinander sind. Außer Lactose gibt es weitere  $\beta$ -D-Galaktoside, die sowohl als Induktor der Transkription wie auch als Substrat für das Enzym dienen. Bei unserem Versuch als **Induktor** wird **Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)** angewandt. IPTG ist kein Substrat der  $\beta$ -Galaktosidase, deshalb die Konzentration verändert sich während dem Versuch nicht. Als Substrat dient **o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (ONPG)**.  $\beta$ -Galaktosidase spaltet das Substrat, das neben  $\beta$ -D-Galaktopyranose entstandene Reaktionsprodukt o-Nitrophenol ist ein gelber Farbstoff. Die Konzentration von o-Nitrophenol kann

demnach mit Hilfe eines Photometers ( $\lambda=420$  nm) gemessen, und dadurch die Enzymaktivität bestimmt werden.

Protein- und mRNA-Synthese können voneinander unabhängig spezifisch gehemmt werden. So ist es zu beobachten, dass die Protein-Synthese 5–10 Minuten nach der Hemmung der Transkription noch immer vor sich geht, da die früher synthetisierten mRNA Moleküle für die Translation noch zur Verfügung stehen.

## Ausführung

Die folgenden Reaktionsgemische werden in Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Die Inkubationszeiten der einzelnen Proben sind in der Tabelle angegeben.

	Bakterien-Suspension	2,12 mg/mL IPTG	100 $\mu$ L Hemmstoff	H <sub>2</sub> O	Inkubationszeit	Beschreibung
1.	1 mL	–	–	200 $\mu$ L	30 Min	Blindlösung für Proben 2–6.
2.	1 mL	100 $\mu$ L	–	100 $\mu$ L	0 Min	Unterschiedlich lange Induktionen
3.	1 mL	100 $\mu$ L	–	100 $\mu$ L	15 Min	
4.	1 mL	100 $\mu$ L	–	100 $\mu$ L	30 Min	
5.	1 mL	100 $\mu$ L	Clo bei 0 Min	–	30 Min	Hemmung der Proteinsynthese
6.	1 mL	100 $\mu$ L	Clo bei 15 Min	–	30 Min	
7.	1 mL	–	Rif bei 0 Min	100 $\mu$ L	30 Min	Blindprobe für Proben 8–9.
8.	1 mL	100 $\mu$ L	Rif bei 0 Min	–	30 Min	Hemmung der mRNA-Synthese
9.	1 mL	100 $\mu$ L	Rif bei 15 Min	–	30 Min	

Clo: **100  $\mu$ L** 0,5 mg/ml Chloramphenicol-Lösung; Rif: **100  $\mu$ L** 2 mg/ml Rifampicin-Lösung

(Da Rifampicin eine intensive orange Farbe hat, es soll eine Blindprobe (7.) für Probe 8. und 9. bereitgestellt werden.)

Nachdem die Inkubation beendet wird, jeder Probe werden **50  $\mu$ L** von **Toluol** zugegeben, und man stellt die Reagenzgläser in Eisschmelze. Da Toluol die Permeabilität der Zellmembran erhöht, die cytoplasmatischen Enzyme werden aus der Zelle freigelassen. Wenn alle Proben fertig sind, die Reagenzgläser werden wieder in Wasserbad mit **37 °C für 15 Minuten** gestellt um die Membrane der Bakterienzellen völlig aufzuspalten.

Bestimmung der Enzymaktivität: aus **jedem Reaktionsgemisch** werden **800  $\mu$ L** mit **1200  $\mu$ L Phosphatpuffer (pH = 7,4)** und **400  $\mu$ L ONPG** (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid – Substrat) vermischt. Die Proben werden **bei 37 °C** inkubiert. Nach **15 Minuten** jeder probe werden **2000  $\mu$ L** Lösung von **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** mit **c = 2 mol/L** zugesetzt um die Reaktion abzustellen. Die Lichtabsorptionen ( $\lambda = 420$  nm) der Proben 2–5 werden gegen die von Probe 1, die der Proben 8–9 gegen die von Probe 7 abgelesen.

**Auswertung der Messergebnisse**

Proben 2–4: *Vergleichen wir die Enzymaktivitäten nach unterschiedlich langen Inkubationen der Bakterien mit dem Induktor!*

Proben 4–6: *Beobachten wir die Hemmung der Proteinsynthese!*

Proben 8–9: *Beobachten wir die Hemmung der Transkription!*

Proben 6 und 9: *Vergleichen wir die Hemmung der mRNA- und Proteinsynthese!*