

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS
Zakład Biochemii

Andrzej LEONOWICZ

Fenole jako induktory niektórych oksydaz u *Basidiomycetes*.

Część I. mRNA i lakaza u grzyba *Coriolus versicolor* *

Фенолы как индукторы некоторых оксидаз у *Basidiomycetes*.

Часть I. mRNA и лакказа у гриба *Coriolus versicolor*

Phenols as Inductors of some *Basidiomycetes* Oxidases.

Part I. mRNA and Laccase in the Fungus *Coriolus versicolor*

U wielu rozkładających drewno *Basidiomycetes* stwierdzono obecność pozakomórkowej lakazy (oksydoreduktazy p-dwufenol : O₂ EC 1.10.3.2.). Enzym ten jest między innymi wydzielany do środowiska zwłaszcza przez grzyby tzw. „białej zgnilizny” z podgrupy *Hymenomycetes*.

F a h r a e u s zauważył, że wprowadzenie do hodowli grzybów niektórych związków fenolowych oraz amin aromatycznych powoduje wyraźny wzrost aktywności lakazy (3, 4, 6). Autor ten wykazał, że najbardziej aktywnymi induktorami lakazy są związki, które zawierają grupy położone w pozycji orto-, w przeciwieństwie do ich meta- i paraizomerów. I. y r (11, 12, 13, 14), a później H a i d e r i G r a b b e (8) i G r a b b e i współprac. (7) do badań nad indukcją lakazy oprócz fenoli zastosowali związki rozkojarzające procesy fosforylacji oksydacyjnych, takie jak np. 2,4 dwunitrofenol, pięciochlorofenol czy kwas jodoctowy. Okazało się, że zarówno w przypadku dodania fenoli, jak i wymienionych inhibitorów wzrostowi aktywności lakazy w kulturze towarzyszyło znaczne obniżenie procesów fosforylacyjnych (obniżenie P/O) i zahamowanie syntezy ATP. Po pewnym czasie (który można było skrócić dodając do kultury glukoze) energetyczne procesy wracały do normy przy jednoczesnym obniżeniu

* Praca wykonana w ramach problemu węzłowego 09.3.1 koordynowanego przez Polską Akademię Nauk. Autor wyraża wdzięczność Profesorowi Dr Jerzemu Trojanowskiemu za cenne uwagi dotyczące niniejszej pracy.

aktywności lakazy. Na podstawie powyższych wyników autorzy sądzą, że organizm grzybowy, broniąc się przed czynnikiem rozkojarzającym, wydziela lakazę, enzym, który może detoksykować ten czynnik przez utlenienie.

Nie znany jest natomiast sam mechanizm stymulującego oddziaływania związków fenolowych na lakazę. Sekeris i Mergenhagen (10) przyjmują możliwość wpływania fenoli na zmianę powinowactwa pomiędzy istniejącymi już podjednostkami enzymu, co powoduje jego aktywację. Grabe i współprac. (7) nie potwierdzają jednak przechodzenia nieczynnej formy lakazy w aktywną. Autorzy ci zakładają możliwość biosyntezy lakazy *de novo* w warunkach indukcji związkami fenolowymi. Podobnego zdania są i inni autorzy (3, 8, 13), nikt jednak nie przedstawia wystarczających dowodów na to, że jest to indukcja, ani nie próbuje wyjaśnić mechanizmu tego procesu.

W poprzedniej pracy ustalono, że w warunkach inkubacji kultury grzyba *Pleurotus ostreatus* z kwasem ferulowym wzrostowi aktywności lakazy towarzyszyła zwiększona synteza mRNA; nie podano jednak szczegółów dotyczących następstwa czasowego omawianych procesów (10).

Celem niniejszej pracy jest dokładniejsze prześledzenie kolejności i czasu pojawiania się mRNA i lakazy w kulturze *Coriolus versicolor* od momentu podania kwasu ferulowego oraz wykazanie przy pomocy antybiotyków, że lakaza pojawia się na drodze biosyntezy *de novo*, a nie aktywacji istniejącego już proenzymu. Gatunek grzyba i związek fenolowy wybrano eksperymentalnie. Z uwagi na zastosowanie między innymi antybiotykami streptolidyginy, przeprowadzono przy użyciu niektórych prekursorów RNA i DNA dodatkowe badania mające na celu sprawdzenie, czy ten inhibitor inaktywuje, podobnie jak u bakterii, również grzybową polimerazę RNA, nie wpływając na syntezę DNA.

MATERIAŁ I METODY

SZCZEPY GRZYBÓW I ODCZYNNIKI

Posłużono się kulturami 28 czystych szczepów grzybowych pochodzących z różnych źródeł. Kultury przechowywano na skosach śliwkowo-agarowych (9). Nazwy i pochodzenie gatunków podano w tab. 1.

Antybiotyki: aktynomycynę D, puromycynę i chloramfenikol uzyskano z firm: Merck, Nutritional Biochemical Corporation i Parke-Davis, inhibitor polimerazy RNA — streptolidygine otrzymano dzięki uprzejmości prof. P. Kaesberga z Laboratorium Biofizyki Uniwersytetu Wisconsin (USA).

Kwas y: protokatechowy, wanilinowy, kawowy i chlorogenowy uzyskano z firmy Fluka, podobnie wanilinę i aldehyd syringowy. Kwas ferulowy i melilotol otrzymano z Koch-Light, aldehyd i kwas weratrowy z ROTH Laboratorchemicalien, kwas syringowy z LOBA, alkohol koniferylowy z firmy T. Schuchard, α -koniden-drynę z K. K. Laboratories. Dehydrodwuwanilinę i koniferynę uzyskano dzięki

uprzejmości prof. Lyra z Eberswalde (NRD) i prof. Freudenberga z Heidelbergu (NRF).

Odczynniki do elektroforezy: akryloamid i N,N'-metyleno-bis-akryloamid otrzymano z BDH, TEMED z Fluka, błękit Coomasie BB z Serva.

Odczynniki radioaktywne: $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$ o stężeniu promieniotwórczości 7,7 mCi i na 1 mg P w 1 ml roztworu uzyskano z Ośrodka Produkcji i Dystrybucji Izotopów IBJ w Świerku, ^{14}C -urydynę znakowaną na wszystkich węglach o aktywności specyficznej 400 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$ i ^{14}C -tymidynę o aktywności specyficznej 53 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$ otrzymano z firmy Chemapol w Pradze Czeskiej.

HODOWLE GRZYBÓW

Grzyby przeszczepiano ze skosów agarowych na płynne podłoże mineralne wariantu a (20) w 500 ml kolbach Roux (150 ml pożywki) lub 100 ml kolbach stożkowych (25 ml pożywki). Sterylizację pożywki i inkubację kultur przeprowadzano jak opisano poprzednio (10). Do niektórych eksperymentów używano hodowli wgłębnej napowietrzanej. 15 litrów pożywki wg Fahraeusa i Reinhammara (5) wprowadzano do sterylnej 20-litrowej butli z tubusem i sterylizowano w autoklawie (1 godz. 1,2 Atm). Inoculum przygotowywano w kolbach stożkowych 250 ml z perełkami szklanymi. Mycelium inoculum przed zaszczepieniem hodowli wytrząsano. Hodowle inkubowano w temp. 27° napowietrzając (ok. 5 000 ml sterylnego powietrza na min.).

OZNACZANIE AKTYWNOŚCI LAKAZY

Oznaczanie lakazy w odwirowanym homogenacie mycelium lub w pożywce wykonywano podobnie jak w pracy wcześniejszej (19), przy czym 2 M bufor octanowy do sporządzania 0,1% roztworu p-fenylenodwuaminy zastąpiono buforem octanowym 0,2 M również o pH 5,2. Aktywność lakazy wyliczano ze wzoru:

$$A = \frac{E_{380}}{v_e \times t} \times D$$

co odpowiada ekstynkcji przy długości fali 550 nm dla tzw. zasady Bandrowskiego (19), uzyskanej przez utlenienie optymalnej ilości p-fenylenodwuaminy przez 1 ml preparatu enzymatycznego w ciągu 1 min. przy grubości warstwy optycznej 1 cm. W celu obliczenia ilości lakazy wydzielanej do danej objętości pożywki przez daną ilość mycelium stosowano równanie:

$$A_{eg} = \frac{A \times v_m}{w_{myc}}$$

natomiast aktywność lakazy w mycelium w odniesieniu do ilości białka na 1 ml homogenatu wyrażono wzorem:

$$A_{en} = \frac{A}{w_p}$$

przy czym: $E_{1\text{ cm}}^{550}$ oznacza mierzoną ekstynkcję, A — aktywność lakazy, A_{eg} — aktywność lakazy pozakomórkowej, A_{en} — aktywność lakazy wewnątrzkomórkowej, v — objętość mieszaniny reakcyjnej w ml (= 7), v_e — objętość enzymu w ml, v_m — objętość kultury w ml, t — czas reakcji w min., w_{myc} — suchą masę mycelium w g, w_p — ilość białka w g na 1 ml preparatu enzymatycznego.

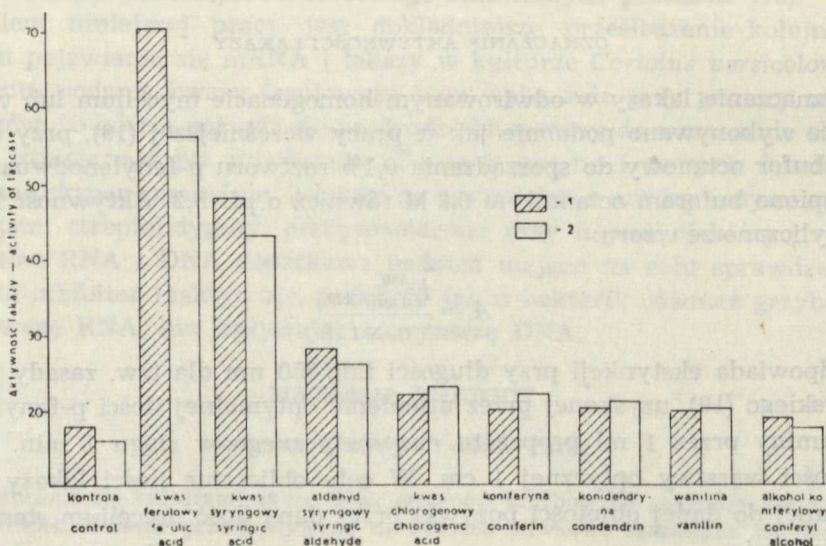
W zależności od wariantu doświadczenia aktywność lakazy wyrażano w jednostkach A , A_{eg} lub A_{en} .

OZNACZANIE BIAŁKA

Białko oznaczano metodą cytowaną w pracy wcześniejszej (19) przy użyciu jako standardu krystalizowanej albuminy wołowej.

ODDZIAŁYWANIE RÓŻNYMI ZWIĄZKAMI FENOLOWYMI NA GRZYBA *CORIOLUS VERSICOLOR*

Związki fenolowe o stężeniu wyjściowym 2×10^{-2} M w roztworach lub zawiesinach w pożywce wprowadzono sterylnie do stacjonarnych kul-



Ryc. 1. Aktywność lakazy: 1 — wewnątrzkomórkowej, 2 — pozakomórkowej w zależności od związku fenolowego wprowadzonego do 50 ml kultury *Coriolus versicolor* w stężeniu 2×10^{-4} M po 4 dniach hodowli; aktywność lakazy mierzono po 12 godz. inkubacji ze związkiem fenolowym

The laccase activity: 1 — intracellular, 2 — extracellular, depending on the phenol compound introduced to 50 ml *Coriolus versicolor* culture at a concentration of 2×10^{-4} M after 4 days of culture; the activity of laccase was measured after 12 hours incubation with phenol compound

tur *Coriolus versicolor* po 4 dniach hodowli w temp. 20° do końcowego stężenia fenolu 2×10^{-4} M. Kultury kontrolne uzupełniano odpowiednią ilością wody. Po 24 godz. inkubacji w temp. 20° w grzybni i pożywce oznaczano aktywność lakazy. Wyniki ilustruje ryc. 1, z której wynika, że związkiem fenolowym najaktywniej indukującym lakazę u *Coriolus versicolor* jest kwas ferulowy. Do dalszych doświadczeń używano więc jako induktora wyłącznie kwas ferulowy.

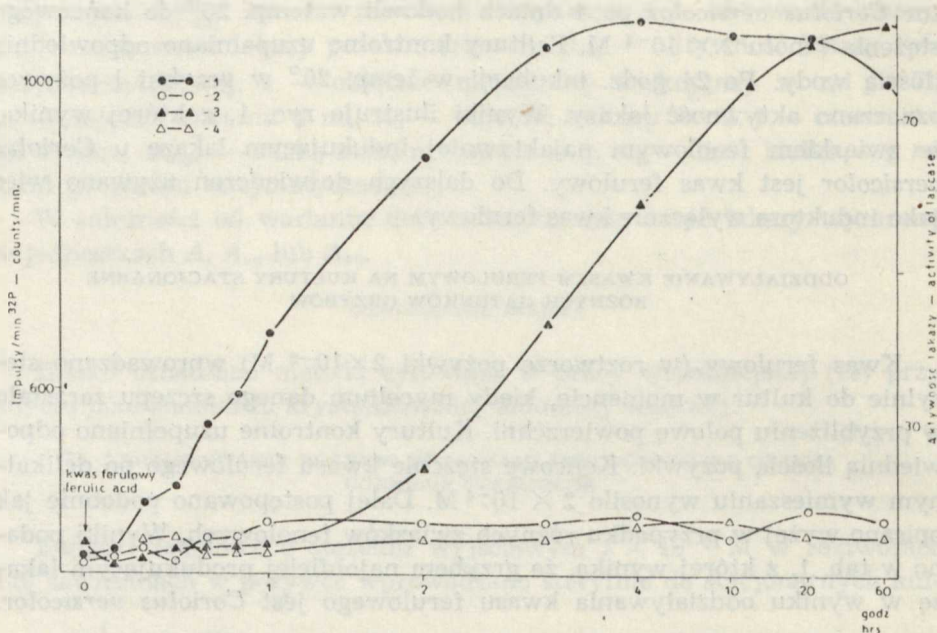
ODDZIAŁYWANIE KWASEM FERULOWYM NA KULTURY STACJONARNE
RÓŻNYCH GATUNKÓW GRZYBÓW

Kwas ferulowy (w roztworze pożywki 2×10^{-2} M) wprowadzono sterylnie do kultur w momencie, kiedy mycelium danego szczepu zarastało w przybliżeniu połowę powierzchni. Kultury kontrolne uzupełniano odpowiednią ilością pożywki. Końcowe stężenie kwasu ferulowego po delikatnym wymieszaniu wynosiło 2×10^{-4} M. Dalej postępowano podobnie jak opisano wyżej w przypadku różnych związków fenolowych. Wyniki podano w tab. 1, z której wynika, że grzybem najobficiej produkującym lakazę w wyniku oddziaływania kwasu ferulowego jest *Coriolus versicolor*.

SZYBKO ZNAKUJĄCY SIĘ RNA I AKTYWNOŚĆ LAKAZY U *CORIOLUS VERSICOLOR*
W ZALEŻNOŚCI OD CZASU INKUBACJI KULTURY Z KWASEM FERULOWYM
I ANTYBIOTYKAMI

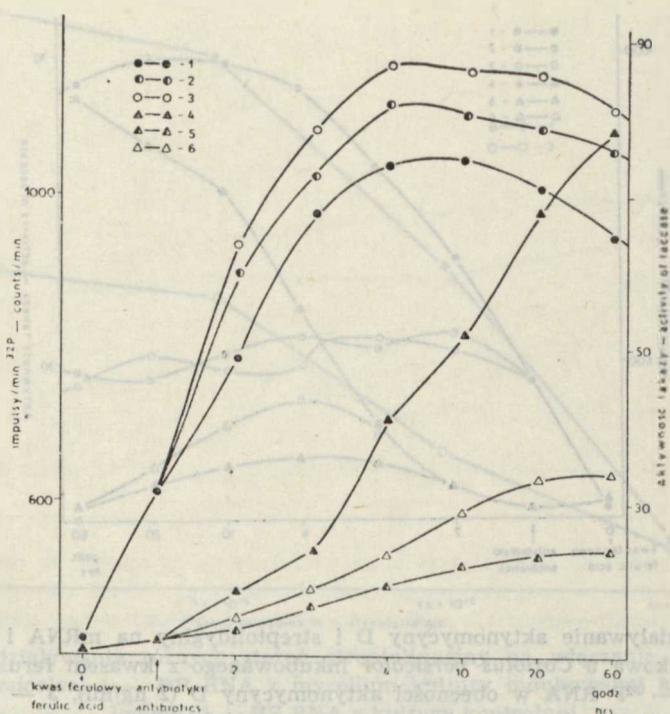
Szybko znakujący się RNA oznaczano na drodze włączania do RNA grzybowego ^{32}P ($\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$) poprzez 3-minutową inkubację mycelium z radioaktywnym prekursorem i pomiaru radioaktywności wyizolowanego z grzybni ^{32}P -RNA. Streptolidyginę i inne antybiotyki wprowadzano do kultury bez uprzedniej aktywacji błony komórkowej mycelium. ^{14}C urydynę, $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$ i ^{14}C tymidynę używano jako prekursorów RNA i DNA, które podawano do kultury razem ze streptolidyginą w celu sprawdzenia oddziaływania tego antybiotyku na metabolizm grzyba.

I n k u b a c j a: Strzępki mycelium w postaci kulek z hodowli w głębszej tuz po uformowaniu się kulek (po ok. 3 dniach inkubacji) w ilości 10 g na próbkę trzykrotnie płukano delikatnie na gazie, w zależności od podawanych później radioaktywnych prekursorów, pożywką a (dla ^{14}C -urydyny i ^{14}C -tymidyny) lub pożywką a¹ (dla ^{32}P), w której bufor fosforanowy zastąpiono 0,01 M buforem octanowym o pH 5,5. Następnie do części próbek po godzinnej inkubacji w 20 ml pożywki a lub a¹ wprowadzano antybiotyki w różnych wariantach stężeń i czasu oraz kwas ferulowy do stężenia 2×10^{-4} M. Próbkę kontrolną uzupełniano odpowiednią ilością pożywki bez kwasu ferulowego. Po określonym czasie inkubacji w obu wariantach próbek oznaczano szybko znakujący się RNA i lakazę. Wyniki ilustrują ryc. 2—7.



Ryc. 2. mRNA i aktywność lakazy wewnątrzkomórkowej u *Coriolus versicolor* w zależności od czasu inkubacji z kwasem ferulowym; czas oddziaływania ^{32}P na mycelium — 3 min.; 1 — ^{32}P RNA (mRNA) w obecności kwasu ferulowego, 2 — ^{32}P RNA kontrola bez kwasu ferulowego, 3 — aktywność lakazy w obecności kwasu ferulowego, 4 — aktywność lakazy bez kwasu ferulowego

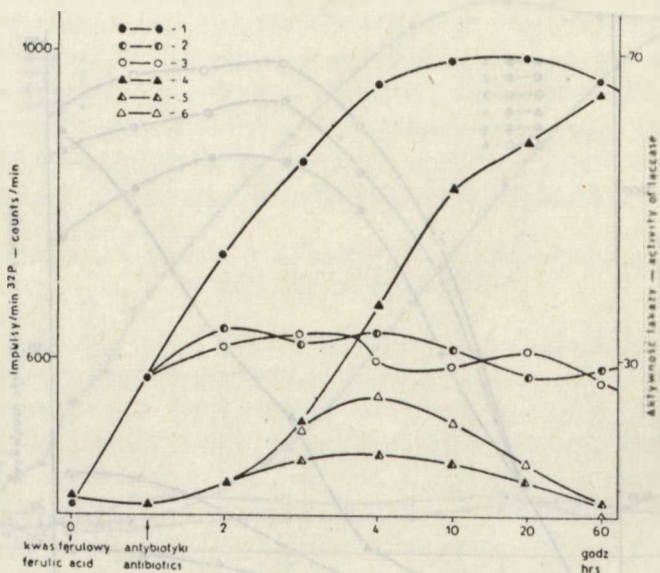
Oznaczanie szybko znakującego się RNA. Strzępki mycelium zawieszono w zależności od wariantu doświadczenia w pożywce a lub a¹ inkubowano przez określony czas z $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$, ^{14}C -urydyną lub ^{14}C -tymidyną o końcowym stężeniu promieniotwórczości odpowiednio 10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ dla ^{32}P i po 0,2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ dla nukleozydów. Po inkubacji z ^{32}P strzępki grzybni natychmiast trzykrotnie przemywano schłodzonym do 0° 0,1 M KH_2PO_4 pH 5,5 i trzykrotnie mieszaniną chłodnego 0,01 M octanu sodu i 0,1 M chlorku sodu o pH 5,5. W przypadku nukleozydów grzybnię trzykrotnie przemywano 0,1 M roztworem zimnej urydyny lub tymidyny w octanie — chlorku sodu jak wyżej oraz 3 razy w octanie — chlorku sodu. Po odsączeniu ostatniego buforu strzępki homogenizowano przez 15 min. w temp. 4° w aparacie Pottera z domieszką 100 mg/ml aluminy (typ 305 firmy Sigma) w obecności 1% SDS (siarczanu dodecylo-sodowego) i 0,5% PVS (siarczanu poliwinylu). Do homogenatu wariantów z ^{32}P i ^{14}C -ury-



Ryc. 3. Oddziaływanie chloramfenikolu i puromycyny na mRNA i lakazę wewnątrzkomórkową u *Coriolus versicolor* inkubowanego z kwasem ferulowym; 1 — ^{32}P RNA, 2 — ^{32}P RNA w obecności puromycyny (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 3 — ^{32}P RNA w obecności chloramfenikolu (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 4 — aktywność lakazy, 5 — aktywność lakazy w obecności puromycyny (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 6 — aktywność lakazy w obecności chloramfenikolu (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

The effect of chloramphenicol and puromycin on mRNA and intracellular laccase in the *Coriolus versicolor* incubated with ferulic acid; 1 — ^{32}P RNA, 2 — ^{32}P RNA in the presence of puromycin (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 3 — ^{32}P RNA in the presence of chloramphenicol (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 4 — laccase activity, 5 — laccase activity in the presence of puromycin (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 6 — laccase activity in the presence of chloramphenicol (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

dyną dodawano taką samą ilość fenolu nasyconego SSC (0,15 M chlorek sodu i 0,015 M cytrynian sodu), energicznie wytrząsano przez 15 min. w temp. 4° i wirowano. Fazę fenolową ekstrahowano jeszcze za pomocą wytrząsania i wirowania z 0,5 obj. SSC. Połączone fazy wodne ekstrahowano, podobnie jak poprzednio, taką samą ilością fenolu nasyconego SSC. RNA z fazy wodnej wytrącano podwójną ilością 0,1 M octanu potasu w 96% etanolu, trzymano przez 1 godz. w -20°, następnie suszono w strumieniu powietrza i rozpuszczano w 1 ml 10 mM Tris — 1 mM MgSO_4 , pH 7,4. Roztwór inkubowano przez 30 min. w temp. 20° z 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DN-azy



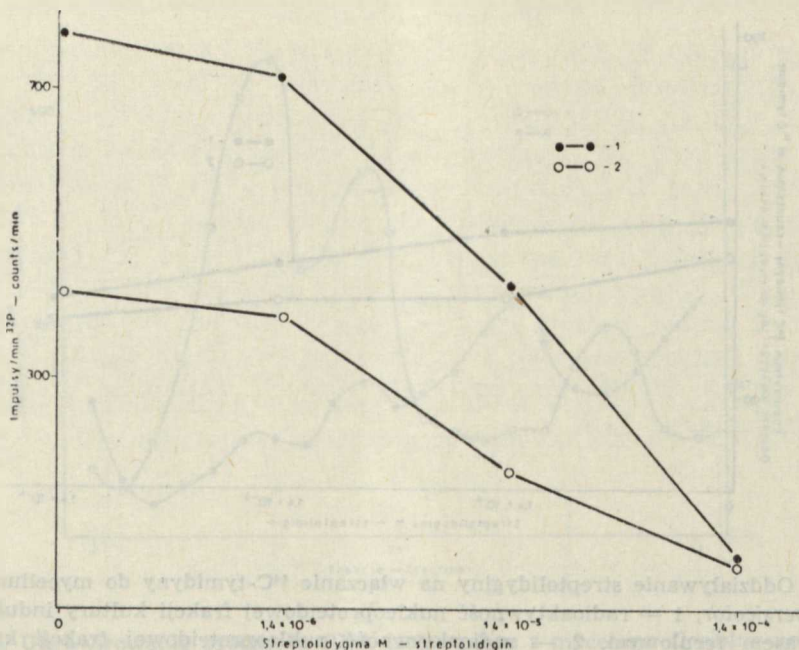
Ryc. 4. Oddziaływanie aktynomycyny D i streptolidyginy na mRNA i lakazę wewnątrzkomórkową u *Coriolus versicolor* inkubowanego z kwasem ferulowym; 1 — ^{32}P RNA, 2 — ^{32}P RNA w obecności aktynomycyny D (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 3 — ^{32}P RNA w obecności streptolidyginy (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 4 — aktywność lakazy, 5 — aktywność lakazy w obecności aktynomycyny D (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 6 — aktywność lakazy w obecności streptolidyginy (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

The effect of actinomycin D and streptolydigin on mRNA and intracellular laccase in the *Coriolus versicolor* incubated with ferulic acid; 1 — ^{32}P RNA, 2 — ^{32}P RNA in the presence of actinomycin D (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 3 — ^{32}P RNA in the presence of streptolydigin (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 4 — laccase activity, 5 — laccase activity in the presence of actinomycin D (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 6 — laccase activity in the presence of streptolydigin (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

4 razy krystalizowanej (firmy Worthington). Po inkubacji nierozpuszczalne zanieczyszczenia wirowano i z supernatantu wytrącano RNA 0,1 M CH_3COOK w etanolu (jak poprzednio). Osad sączono przez krążki bibuły Whatman 3 MM ϕ 15 mm, przemywając osad alkoholem — CH_3COOK ,

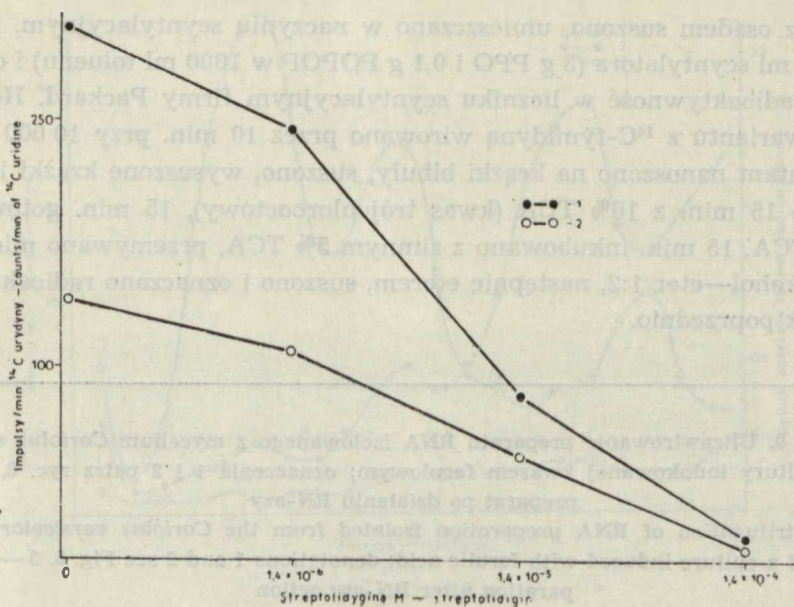
Ryc. 6. Oddziaływanie streptolidyginy na włączanie ^{14}C -urydyny do RNA *Coriolus versicolor*; 1 — ^{14}C RNA z mycelium kultury indukowanej kwasem ferulowym, 2 — ^{14}C RNA z mycelium kultury kontrolnej

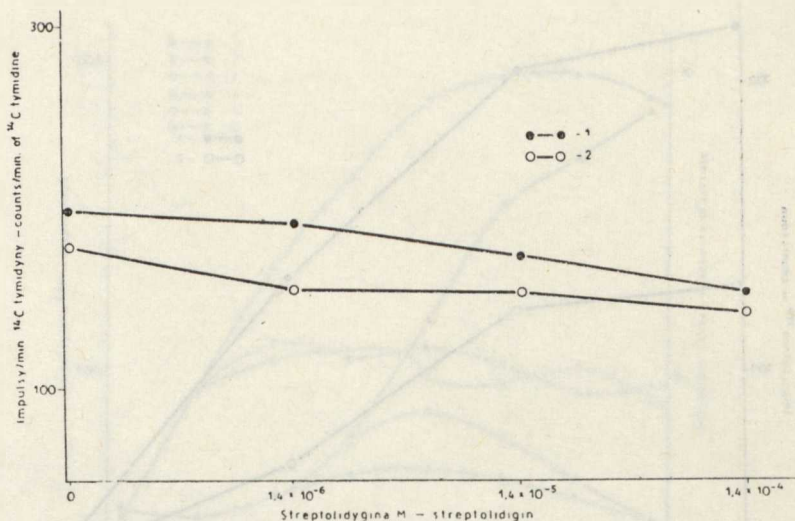
The effect of streptolydigin on the incorporation of ^{14}C -uridine into *Coriolus versicolor* RNA; 1 — ^{14}C RNA from the mycelium of culture induced with ferulic acid, 2 — ^{14}C RNA from control culture



Ryc. 5. Oddziaływanie różnych stężeń streptolydżiny na włączenie ^{32}P do RNA *Coriolus versicolor*; 1 — ^{32}P RNA z mycelium kultury indukowanej kwasem ferulowym, 2 — ^{32}P RNA z kultury kontrolnej

The effect of various concentrations of streptolydigin on the incorporation of ^{32}P to the *Coriolus versicolor* RNA; 1 — ^{32}P RNA from the mycelium of culture incubated with ferulic acid, 2 — ^{32}P RNA from control culture





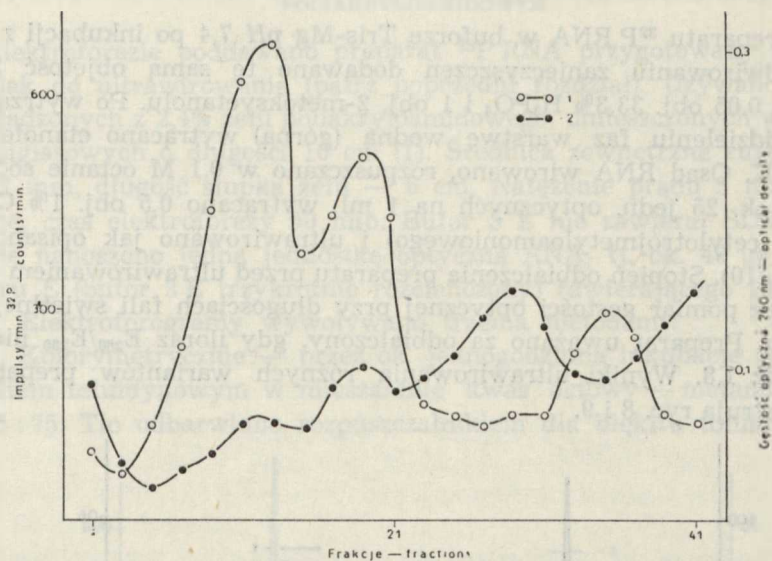
Ryc. 7. Oddziaływanie streptolidyginy na włączenie ^{14}C -tymidyny do mycelium *Coriolus versicolor*, 1 — radioaktywność nukleoproteidowej frakcji kultury indukowanej kwasem ferulowym, 2 — radioaktywność nukleoproteidowej frakcji kultury kontrolnej

The effect of streptolydigin on the incorporation of ^{14}C -thymidine to the *Coriolus versicolor* mycelium; 1 — the radioactivity of nucleoprotein fraction of the culture induced with ferulic acid, 2 — the radioactivity of nucleoprotein fraction of the control culture

krążki z osadem suszono, umieszczano w naczyniu scyntylicyjnym, zalewano 5 ml scyntylicatora (3 g PPO i 0,1 g POPOP w 1000 ml toluenu) i oznaczano radioaktywność w liczniku scyntylicyjnym firmy Packard. Homogenat wariantu z ^{14}C -tymidyną wirowano przez 10 min. przy $10\,000 \times g$, supernatant nanoszono na krążki bibuły, suszono, wysuszone krążki inkubowano 15 min. z 10% TCA (kwas trójchlorooctowy), 15 min. gotowano w 5% TCA, 15 min. inkubowano z zimnym 5% TCA, przemywano mieszaniną alkohol—eter 1:2, następnie eterem, suszono i oznaczano radioaktywność jak poprzednio.

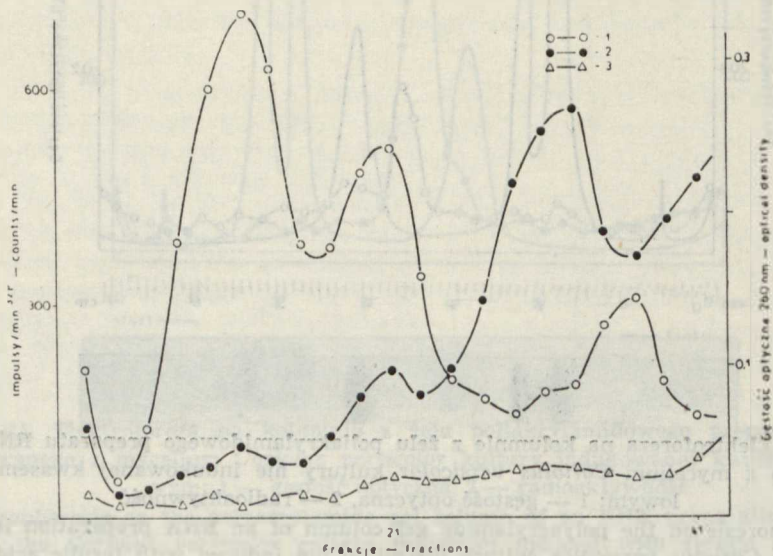
Ryc. 9. Ultrawierowanie preparatu RNA izolowanego z mycelium *Coriolus versicolor* kultury indukowanej kwasem ferulowym; oznaczenia 1 i 2 patrz ryc. 8, 3 — preparat po działaniu RN-azy

Ultracentrifugation of RNA preparation isolated from the *Coriolus versicolor* mycelium of a culture induced with ferulic acid; denotations 1 and 2 see Fig. 8, 3 — preparation after RN-ase action



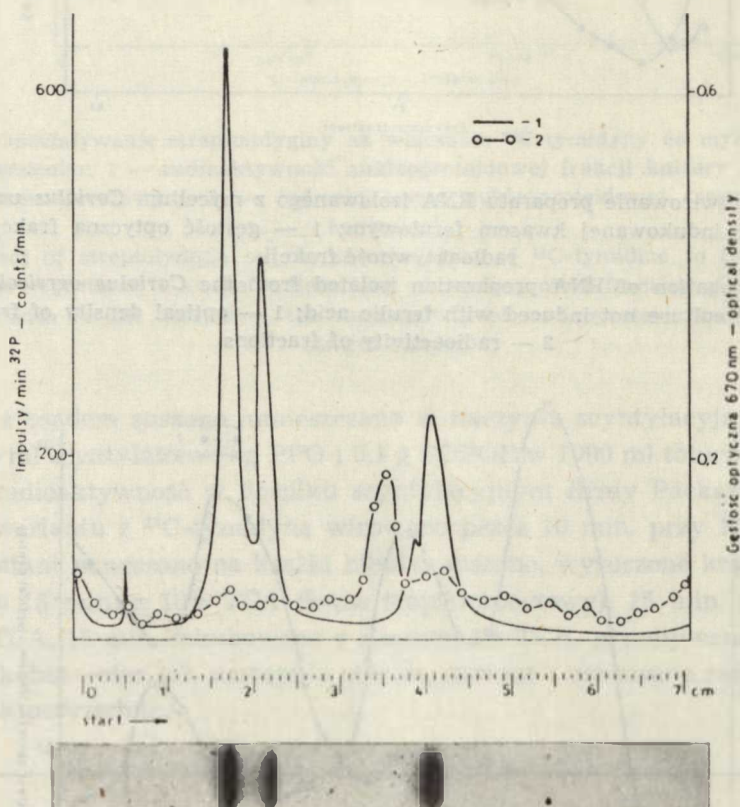
Ryc. 8. Ultrawierowanie preparatu RNA izolowanego z mycelium *Coriolus versicolor* kultury nie indukowanej kwasem ferulowym; 1 — gęstość optyczna frakcji, 2 — radioaktywność frakcji

Ultracentrifugation of RNA preparation isolated from the *Coriolus versicolor* mycelium of a culture not induced with ferulic acid; 1 — optical density of fractions, 2 — radioactivity of fractions



ROZDZIAŁ SZYBKO ZNAKUJĄCEGO SIĘ RNA METODĄ ULTRAWIROWANIA

Do preparatu ^{32}P RNA w buforze Tris-Mg pH 7,4 po inkubacji z DN-azą i odwirowaniu zanieczyszczeń dodawano tę samą objętość 2,5 M K_2HPO_4 , 0,05 obj. 33,3% H_3PO_4 i 1 obj. 2-metoksyetanolu. Po wytrząśnięciu i oddzieleniu faz warstwę wodną (górną) wytrącano etanolem — CH_3COOK . Osad RNA wirowano, rozpuszczano w 0,1 M octanie sodu do stężenia ok. 25 jedn. optycznych na 1 ml, wytrącano 0,5 obj. 1% CTAB (bromku cetylotrójmetyloamoniowego) i ultrawirovano jak opisano poprzednio (10). Stopień odbiałczenia preparatu przed ultrawirowaniem ustalano przez pomiar gęstości optycznej przy długościach fali świetlnej 260 i 280 nm. Preparat uważano za odbiałczony, gdy iloraz E_{260}/E_{280} nie był niższy niż 1,8. Wyniki ultrawirowania różnych wariantów preparatów RNA ilustrują ryc. 8 i 9.



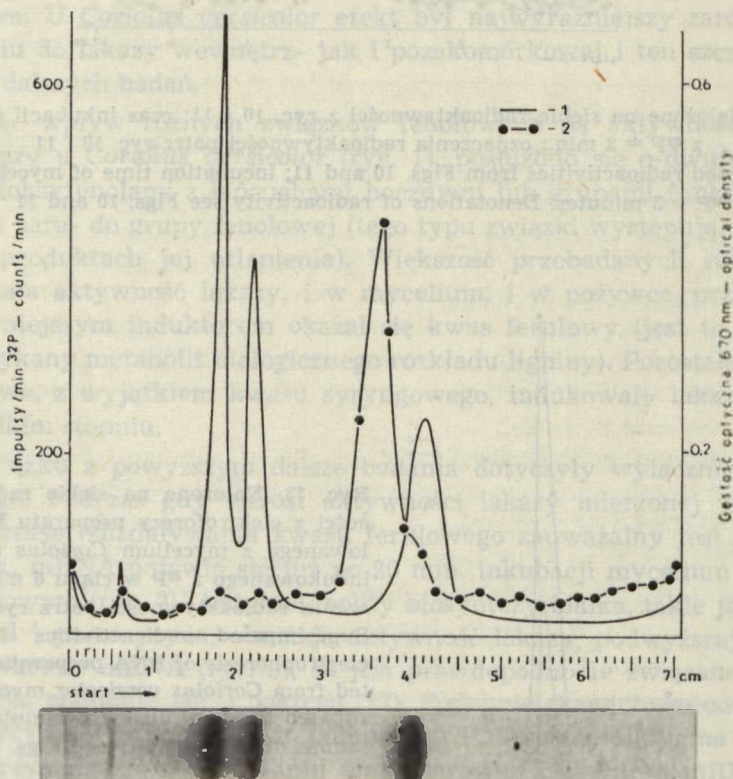
Ryc. 10. Elektroforeza na kolumnie z żelu poliakrylamidowego preparatu RNA izolowanego z mycelium *Coriolus versicolor* kultury nie indukowanej kwasem ferulowym; 1 — gęstość optyczna, 2 — radioaktywność

Electrophoresis on the polyacrylamide gel column of an RNA preparation isolated from the *Coriolus versicolor* culture mycelium not induced with ferulic acid; 1 — optical density, 2 — radioactivity

ROZDZIAŁ SZYBKO ZNAKUJĄCEGO SIĘ RNA METODĄ ELEKTROFOREZY NA ŻELU POLIAKRYLOAMIDOWYM

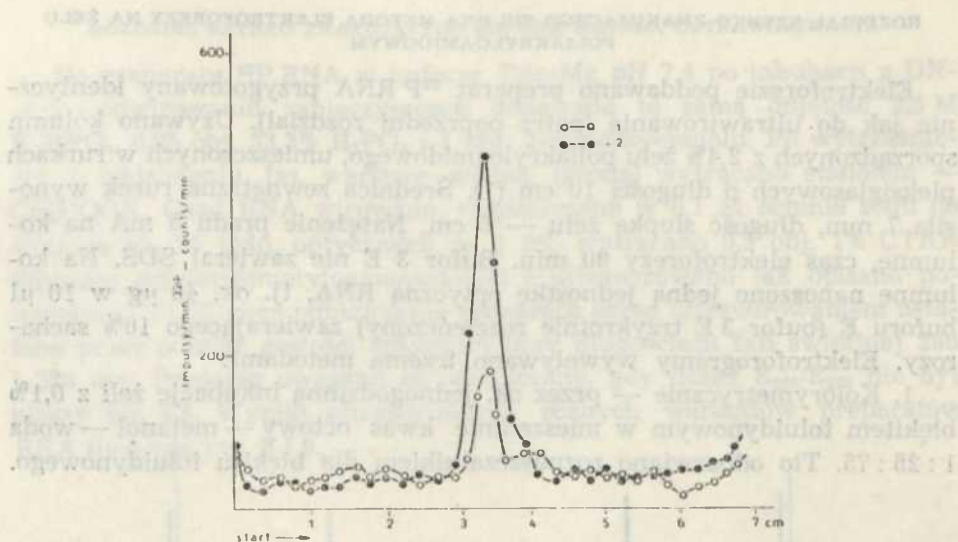
Elektroforezie poddawano preparat ^{32}P RNA przygotowany identycznie jak do ultrawiorowania (patrz poprzedni rozdział). Używano kolumn sporządzonych z 2,4% żelu poliakryloamidowego, umieszczonych w rurkach pleksiglasowych o długości 10 cm (1). Średnica zewnętrzna rurek wynosiła 7 mm, długość słupka żelu — 6 cm. Natężenie prądu 5 mA na kolumnę, czas elektroforezy 90 min. Bufor 3 E nie zawierał SDS. Na kolumnę nanoszono jedną jednostkę optyczną RNA, tj. ok. 40 μg w 10 μl buforu E (bufor 3 E trzykrotnie rozcieńczony) zawierającego 10% sacharozy. Elektroforogramy wywoływano trzema metodami:

1. Kolorymetrycznie — przez ok. jednogodzinną inkubację żeli z 0,1% błękitem toluidynowym w mieszaninie kwas octowy — metanol — woda 1 : 25 : 75. Tło odbarwiano rozpuszczalnikiem dla błękitu toluidynowego.

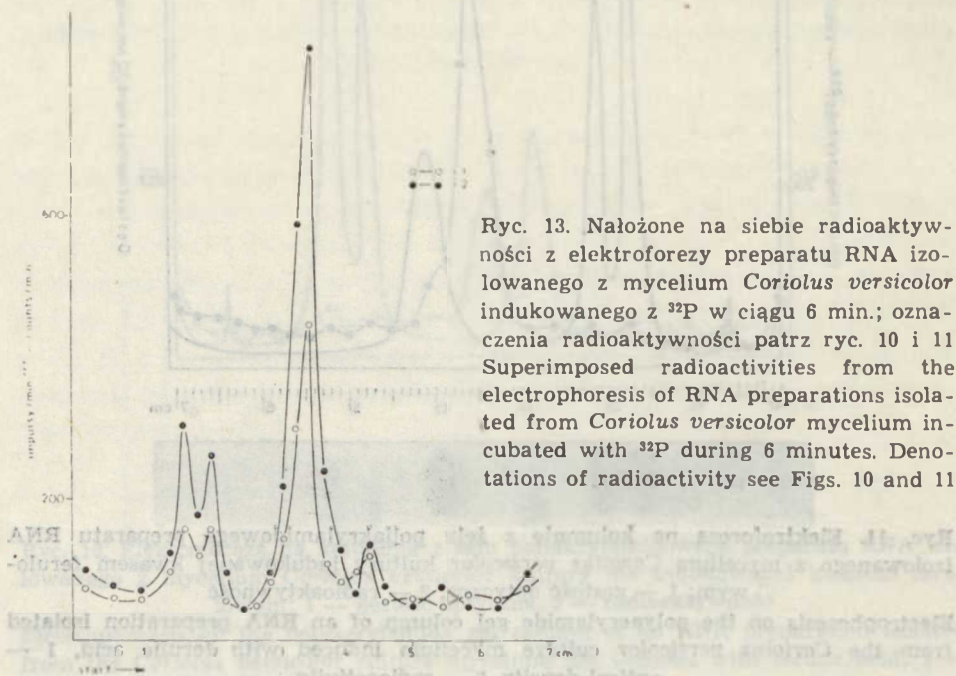


Ryc. 11. Elektroforeza na kolumnie z żelu poliakrylamidowego preparatu RNA izolowanego z mycelium *Coriolus versicolor* kultury indukowanej kwasem ferulowym; 1 — gęstość optyczna, 2 — radioaktywność

Electrophoresis on the polyacrylamide gel column of an RNA preparation isolated from the *Coriolus versicolor* culture mycelium induced with ferulic acid, 1 — optical density, 2 — radioactivity



Ryc. 12. Nałożone na siebie radioaktywności z ryc. 10 i 11; czas inkubacji mycelium z ^{32}P = 3 min.; oznaczenia radioaktywności patrz ryc. 10 i 11
 Superimposed radioactivities from Figs. 10 and 11; incubation time of mycelium with ^{32}P = 3 minutes. Denotations of radioactivity see Figs. 10 and 11



Ryc. 13. Nałożone na siebie radioaktywności z elektroforezy preparatu RNA izolowanego z mycelium *Coriolus versicolor* indukowanego z ^{32}P w ciągu 6 min.; oznaczenia radioaktywności patrz ryc. 10 i 11
 Superimposed radioactivities from the electrophoresis of RNA preparations isolated from *Coriolus versicolor* mycelium incubated with ^{32}P during 6 minutes. Denotations of radioactivity see Figs. 10 and 11

2. Densytometrycznie — sporządzając profile gęstości optycznej przy długości fali 670 nm za pomocą densytometru.

3. Przez pomiar radioaktywności: elektroforogramy zamrażano z suchym lodem i cięto gilotynką (zestaw żyłek umocowanych w stałych odległościach od siebie) na 1,5 mm odcinki. Po przeniesieniu do naczyń scyntylacyjnych i wysuszeniu dodawano scyntylator i mierzono impulsy ^{32}P w liczniku scyntylacyjnym. Wyniki przedstawiono na ryc. 10—13.

WYNIKI I Dyskusja

Z 27 przebadanych szczepów u 6 zaobserwowano wyraźną stymulację aktywności lakazy po dodaniu kwasu ferulowego (tab. 1). Były to: *Coriolus versicolor*, *Polystictus versicolor* (oba badane szczepy), *Pholiota mutabilis*, *Armillariella mellea* (jeden szczep z dwu przebadanych) i *Poria albidofusca*. U *Coriolus versicolor* efekt był najwyraźniejszy zarówno w odniesieniu do lakazy wewnątrz- jak i pozakomórkowej i ten szczep wybrano do dalszych badań.

Badając wpływ różnych związków fenolowych na aktywność endo- i egzolakazy u *Coriolus versicolor* (ryc. 1), posłużono się o-dwufenolami lub o-metoksyfenolami z łańcuchami bocznymi lub grupami funkcyjnymi w pozycji para- do grupy fenolowej (tego typu związki występują w ligninie i w produktach jej utlenienia). Większość przebadanych substancji podwyższała aktywność lakazy, i w mycelium, i w pożywce, przy czym najaktywniejszym induktorem okazał się kwas ferulowy (jest to najczęściej spotykany metabolit biologicznego rozkładu ligniny). Pozostałe związki fenolowe, z wyjątkiem kwasu syringowego, indukowały lakazę tylko w niewielkim stopniu.

W związku z powyższym dalsze badania dotyczyły wyłącznie kwasu ferulowego. Podczas gdy wzrost aktywności lakazy mierzonej w zależności od czasu oddziaływania kwasu ferulowego zauważalny jest dopiero po 2 godz., mRNA pojawia się już po 20 min. inkubacji mycelium z kwasem ferulowym (ryc. 2). Antymetabolity biosyntezy białka, takie jak chloramfenikol i puromycyna, obniżają aktywność lakazy, podwyższają natomiast zawartość mRNA (ryc. 3), co jest prawdopodobnie związane z jego akumulacją, podobnie jak u bakterii (17). Podobnie prawidłowo oddziałuje aktynomycyna D oraz inhibitor polimerazy RNA streptolidygina (2, 18). W obu przypadkach zahamowaniu ulega zarówno biosynteza mRNA, jak i lakazy (ryc. 4). Oddziaływanie chloramfenikolu, puromycyny i aktynomycyny D na biosyntezę lakazy i peroksydazy badane było już uprzednio na przykładzie dwóch gatunków grzybowych: *Pleurotus ostreatus* (10) i *Inonotus radiatus* (15), przy czym w odniesieniu do lakazy wyniki uzyskane w niniejszej pracy nie odbiegają w zasadzie od cytowanych. Nie

Tab. 1. Aktywność lakazy wewnątrzkomórkowej i pozakomórkowej w wybranych kulturalnych kontrolnych i stymulowanych $2 \times 10^{-4} \text{M}$ kwasem ferulowym *The intracellular and extracellular laccase activity in selected control and stimulated by $2 \times 10^{-4} \text{M}$ ferulic acid cultures

Szczep i jego pochodzenie Strain and its origin	Nr muzeum Zakładu Biochemii No. of collection in Dept. of Bio- chemistry	Aktywność lakazy wewnątrz- komórkowej A_{en}		Aktywność lakazy poza- komórkowej A_{eg}	
		Activity of intracellular laccase A_{en}		Activity of extracellular laccase A_{eg}	
		Kontrola Control	Kwas ferulowy Ferulic acid	Kontrola Control	Kwas ferulowy Ferulic acid
<i>Armillariella mellea</i> (Vahl. ex Fr.) P. Karst: HMJPC nr 5040	14	72,0	49,2	60,85	43,88
<i>Armillariella mellea</i> (Vahl. ex Fr.) P. Karst: HMJPC nr 3557	27	31,0	65,4	27,30	58,04
<i>Clitocybe connata</i> (Schum.) Fr: IBL nr 0320	28	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Clitocybe nebularis</i> (Batsch. ex Fr.) Kumm: IBL nr 0976	29	9,0	11,2	7,36	9,30
<i>Collybia velutipes</i> Orvelet: Greis- wald, NRD	6	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Coriolus versicolor</i> (L. ex Fr.) Quel.: Muzeum grzybów. Paryż nr 188	2	8,3	99,9	6,1	69,85
<i>Inonotus obliquus</i> (Pers. ex Fr.) Pil: HMJPC nr 5042	19	1,42	1,53	1,36	1,17
<i>Inonotus radiatus</i> (Sow. ex Fr.) P. Karst: HMJPC nr 4335	15	1,92	3,2	1,8	2,5
<i>Lentinus lepidus</i> Fr. (Cartwright): KMR nr 12	39	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Merulius lacrimans</i> Wulf Schum: Greiswald, NRD	5	1,2	1,4	0,98	0,99
<i>Ophiostoma acoma</i> Nannf: KMR nr 37	40	12,3	13,2	11,7	8,35
<i>Phellinus igniarius</i> (L. ex Fr.) Quel: Eberswalde, NRD	34	3,2	3,9	2,34	2,21
<i>Pholiota mutabilis</i> (Scheff. ex Fr.) Quel: IBL	1	10,2	45,6	7,49	39,79
<i>Piptoporus betulinus</i> (Bull. ex Fr.) P. Karst: HMJPC nr 5213	24	7,2	6,9	5,52	4,95

<i>Polyporus adustus</i> Fr: J. F. O. Osaka, Japonia nr 5307	11	5,21	5,34	4,39	4,39
<i>Polyporus sulfureus</i> : Greiswald, NRD	8	13,2	15,7	12,72	14,63
<i>Polystictus abietinus</i> Cooke: I.F.O. Osaka, Japonia nr 4950	10	6,2	7,1	4,88	4,94
<i>Polystictus versicolor</i> Fr: I.F.O. Osa- ka, Japonia nr 4937	9	12,6	72,9	11,38	54,04
<i>Polystictus versicolor</i> (L.) Fr. (C.B.S.): KMR nr 10	38	11,2	96,4	9,58	57,44
<i>Poria albidofusca</i> Doman: HMJPC nr 4509	23	11,4	32,7	10,4	27,92
<i>Poria crustulina</i> Bres: HMJPC nr 4473	22	3,1	3,7	2,46	2,84
<i>Schizophyllum commune</i> : Eberswalde, NRD nr 72	12	3,2	5,4	1,93	2,6
<i>Stereum sanguinoletum</i> Alb. et Schw. (Bavendamm): KMR nr 12	37	2,4	3,8	1,52	1,62
<i>Tricholoma flavovirens</i> (P e r s. ex Fr.) Lund: IBL nr 0349	32	5,3	6,9	4,59	3,75
<i>Tricholoma potentosum</i> (Fr.) Quel: IBL nr 0866	33	59,2	63,4	54,32	54,60
<i>Xanthochrous pini</i> (Thore ex Fr.) P a t.: Muzeum grzybów, Paryż	3	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Xanthochrous pini</i> (BL) 1: Zakład Biochemii, Lublin	4	0,0	0,0	0,0	0,0

* Objętość kultur 50 ml, czas inkubacji z kwasem ferulowym 12 godz.

* The volume of cultures 50 ml, time of incubation with ferulic acid 12 hours.

badano natomiast dotychczas wpływu chloramfenikolu, puromycyny i aktynomycyny D na biosyntezę mRNA. Po raz pierwszy również działano na materiał grzybowy streptolidyginą. W związku z powyższym przeprowadzono uzupełniające badania nad anabolizmem ^{32}P , ^{14}C -urydyny i ^{14}C -tymidyny u *Coriolus versicolor* w obecności streptolidyginy. Okazało się, że antybiotyk ten, podobnie jak u bakterii, blokuje włączanie do grzybowego RNA ^{32}P i ^{14}C -urydyny, nie oddziałując na biosyntezę DNA (niezakłócona inkorporacja ^{14}C -tymidyny). Podobne wyniki uzyskano w wariancie kontrolnym kultury i po podaniu kwasu ferulowego (ryc. 5, 6 i 7). Można więc przyjąć, że streptolidygina w stężeniach 10^{-4} do 10^{-5} M blokuje biosyntezę mRNA, inaktywując prawdopodobnie grzybową polimerazę RNA. Wyniki są porównywalne z danymi dla bakterii (18).

W celu identyfikacji mRNA (szybko znakującego się RNA) rozfrakcjonowano cytoplazmatyczny kwas rybonukleinowy dwoma metodami: na drodze ultrawierowania (ryc. 8 i 9) oraz elektroforezy na żelu poliakrylo-

amidowym (ryc. 10—13). Materiałem wyjściowym do preparacji RNA była grzybnia kontrolna i po inkubacji z kwasem ferulowym. Profile ultrawierowania zbliżone są do publikowanych już wcześniej wyników z ultrawierowania cytoplazmatycznych kwasów nukleinowych izolowanych z grzybą *Pleurotus ostreatus* (10, 21). Na densytogramie można rozróżnić RNA obu podjednostek rybosomowych oraz tRNA. Wariant „fenolowy” (ryc. 9) w porównaniu z kontrolą (ryc. 8) charakteryzuje widoczna wyższa zawartość szybko znakującego się RNA (mRNA). Podobne wyniki uzyskano na drodze elektroforezy. Na fotografii elektroforogramów (ryc. 10 i 11) nałożono profile gęstości optycznych oraz odpowiadające im radioaktywności w impulsach na minutę ^{32}P . Podobnie jak poprzednio, podczas 3-minutowej inkubacji z ^{32}P w warunkach „fenolowych” więcej syntetyzuje się szybko znakującego się RNA niż w kontroli bez kwasu ferulowego. Widać to wyraźnie na ryc. 12 ilustrującej nałożone na siebie radioaktywności. Podwyższenie czasu inkubacji mycelium z ^{32}P prowadzi już do częścicowego znakowania się rybosomowego RNA (ryc. 13), co mogłoby spowodować zawyżenie danych ilościowych. Wydaje się więc, że 3-minutowa inkubacja mycelium z ^{32}P jest czasem optymalnym dla syntezy mRNA do celów analitycznych.

Wykazana w niniejszej pracy kolejność następowania po sobie biosyntezy mRNA i lakazy w wyniku oddziaływania kwasu ferulowego na mycelium grzyba mogłaby wskazywać na specyficzną aktywację genu lakazy przez ten związek fenolowy. Z nie opublikowanych jeszcze danych wynika, że w warunkach inkubacji z fenolem syntetyzowany jest wyłącznie tylko jeden z izozymów lakazy, różniący się od głównej komponenty szybkością migracji w polu elektrycznym. Analiza frakcji białkowych przed i po krótkiej inkubacji z kwasem ferulowym wskazuje na wysoką specyficzność biosyntezy tej indukowanej frakcji lakazy, co potwierdzałoby hipotezę oddziaływania kwasu ferulowego na biosyntezę lakazy poprzez aktywację genu.

PIŚMIENNICTWO

1. Bishop D. H. L., Claybrook J. R., Spiegelman S.: Electrophoretic Separation of Viral Nucleic Acid on Polyacrylamide Gels. *J. Mol. Biol.* **26**, 373 (1967).
2. Cassani G., Burgess R. R., Goodman H. M., Gold L.: Inhibition of RNA Polymerase by Streptolydigin. *Nature New Biology* **230**, 197 (1971).
3. Fahraeus G.: Aromatic Compounds as Growth Substances for Laccase Producing Rot Fungi. *Physiologia Plantarum* **15**, 572 (1962).
4. Fahraeus G.: Further Studies in the Formation of Laccase by *Polyporus versicolor*. *Physiologia Plantarum* **7**, 704 (1954).

5. Fahraeus G., Reinhammar B.: Large Scale Production and Purification of Laccase from Cultures of the Fungus *Polyporus versicolor* and some Properties of Laccase A. Acta Chem. Scand. **21**, 2367 (1967).
6. Fahraeus G., Tullander V., Ljunggren H.: Production of High Laccase Yields in Cultures of Fungi. Physiologia Plantarum **11**, 631 (1958).
7. Grabbe K., Koenig R., Haider K.: Die Bildung der Phenoloxydase und die Stoffwechselbeeinflussung durch Phenole bei *Polystictus versicolor*. Archiv für Mikrobiologie **63**, 133 (1968).
8. Haider K., Grabbe K.: Die Rolle der Phenoloxydase beim Ligninabbau durch Weissfäulepilze. Zentr. Bacteriol. Parasit. Infekt. Hyg. **205**, 91 (1967).
9. Leonowicz A., Trojanowski J.: Exoenzymes in Fungi Degrading Lignin I. *Pholiota mutabilis*. Acta Microbiol. Polon. **14**, 55 (1965).
10. Leonowicz A., Trojanowski J., Nowak G.: Ferulic Acid as the Inductor of Messenger RNA Synthesis Related to Laccase Formation in the Wood Rotting Fungus *Pleurotus ostreatus*. Microbios **6**, 23 (1972).
11. Lyr H.: Die Induction der Laccase-Bildung bei *Collybia velutipes* Curt. Arch. Microbiol. **28**, 310 (1958).
12. Lyr H.: Enzymatische Detoxification der Kernholztoxine. Flora (Jena) **152**, 570 (1962).
13. Lyr H., Ziegler H.: Die Wirkung von Pentachlorphenol auf den Stoffwechsel höherer Pilze. Phytopath. Z. **36**, 146 (1959).
14. Lyr H., Ziegler H.: Enzymausscheidung und Holzbau durch *Phelinus igniarius* Quel und *Collybia velutipes* Curt. Phytopath. Z. **35**, 173 (1959).
15. Łobarzewski J., Sikora A.: The Effect of Phenols on the Peroxidase Activity in the Cultures of *Inonotus radiatus* Fungus. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C **27**, 87 (1972).
16. Sekeris C. E., Mergenhafen D.: Das Phenoloxydasesystem in der Schmeissfliege *Calliophora erythrocephala*. Science **145**, 68 (1964).
17. Sells B. H., Sayler J.: Messenger RNA Accumulation in *Escherichia coli* during Chloramphenicol Treatment. Biochem. Biophys. Acta **232**, 421 (1971).
18. Siddhikol C., Erbstoesz J. W., Weisblum B.: Mode of Action of Streptolydigin. J. Bacteriol. **99**, 151 (1969).
19. Trojanowski J., Leonowicz A., Andrzejewska W., Steinbrich A.: Model Experiments on Humification of Rye Roots. II. Enzymes. Polish J. Soil Sci. **4**, 29 (1971).
20. Trojanowski J., Leonowicz A.: The Biodeterioration of Lignin by Fungi. Microbios **3**, 247 (1969).
21. Trojanowski J., Leonowicz A.: The Fungal Metabolism of Lignin and Products of Lignin Degradation. Studies About Humus. Intern. Symp. „Humus et Planta V” Prague 1971, 215.

РЕЗЮМЕ

Из исследованных грибов *Basidiomycetes* и феноловых соединений наиболее отчетливую индукцию лаказы вызывала у гриба *Coriolus versicolor* ферулевая кислота. mRNA из культур, индуцированных ферулевой кислотой и контролируемых, идентифицировано путем ультрацентрифугирования и электрофореза на полиакрилоамидовом геле. Оптимальное время инкубации *mycelium* из ^{32}P к синтезу быстрообознача-

ющего RNA с аналитическими целями было равно 3 минутам. Воздействие на синтез mRNA и лаказы феруловой кислоты, а также таких антибиотиков как актиномицин D, стрептолидигин, хлорамфеникол и пурамицин свидетельствовало об активации биосинтеза лаказы на уровне гена.

SUMMARY

From among the series of examined *Basidiomycetes* species and phenol compounds, the most distinct laccase induction in the fungus *Coriolus versicolor* was caused by ferulic acid. mRNA from the culture induced by ferulic acid and control ones, was identified by ultracentrifugation and electrophoresis on polyacrylamide gel. The optimal time of the incubation of mycelium with ^{32}P to the synthesis of rapid labelled RNA for analytical aims was determined as 3 mins. The effect of ferulic acid and antibiotics such as: actinomycin D, streptolydigin, chloramphenicol and puromycin on the synthesis of mRNA and laccase proved the activation of laccase biosynthesis on the gene level.