

SESSION 2006

Filière : 2^{ème} concours

BIOLOGIE - BIOCHIMIE

(Epreuve commune aux ENS Ulm et Lyon)

Durée : 3 heures

L'usage de la calculatrice est autorisé.

La Glutamine Synthétase et l'incorporation de NH_4^+ sous forme organique.

L'usage de documents est interdit, les calculatrices autonomes sont autorisées. Ce problème comporte trois grandes parties et une question récapitulative supplémentaire. Les différentes parties sont liées les unes aux autres, néanmoins certaines sous-parties peuvent être traitées sans connaître les réponses aux questions antérieures, donc, s'il est fortement recommandé de commencer par répondre aux premières questions avant d'aborder les suivantes, il n'y a aucune raison de se décourager en cas de difficulté ponctuelle : il suffit de passer à la suite. A la fin du document se trouve une annexe avec divers renseignements utiles pour la résolution du problème, il est vivement conseillé de la consulter avant de commencer.

Dans tous les cas vos réponses doivent être argumentées, même brièvement, une réponse correcte mais non justifiée ne sera pas comptée.

Les temps conseillés pour chaque partie sont :

Partie A : 45 minutes ; partie B : 1 heure et 15 minutes ; partie C : 50 minutes ; partie D : 10 minutes.

A. LA RÉGULATION DE L'ENTRÉE D'AZOTE, PRINCIPES GÉNÉRAUX

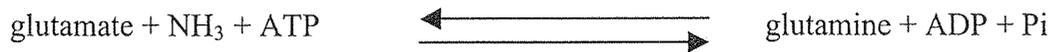
L'activité Glutamine Synthétase

Un groupe de scientifiques, parmi lesquels on retrouve Lavoisier, ont baptisé l'élément N "azote" ce qui signifie littéralement "sans vie". Paradoxalement l'azote est essentiel à la vie et arrive en quatrième position après le carbone, l'hydrogène et l'oxygène pour sa contribution à la masse des systèmes vivants.

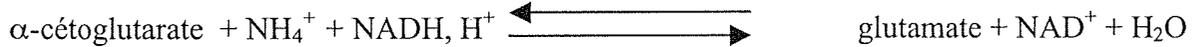
Les êtres vivants ont donc des besoins en azote, parmi ceux-ci on distingue ceux qui peuvent utiliser des formes minérales d'azote (par exemple NO_3^- ou NH_3 , en réalité sous forme de NH_4^+), comme les plantes ou des bactéries comme *Escherichia coli*, et ceux qui utilisent de l'azote organique.

L'incorporation de NH_4^+ sous forme organique réalisée par les plantes et les procaryotes met en œuvre trois types d'activités enzymatiques (les formules des composés sont données en annexe) :

- la glutamine synthétase (GS)



- la glutamate deshydrogénase (GDH)



- la glutamate synthase (GOGAT) : glutamine oxoglutarate amino transférase



Chez *Escherichia coli* la source préférentielle d'azote, celle qui permet les vitesses de croissance les plus élevées, est NH_4^+ . Lorsqu'il y a une disponibilité en NH_4^+ les trois activités vues précédemment sont présentes, mais en fait la voie principale de l'assimilation de NH_4^+ est représentée par l'activité GS.

L'un des objectifs de ce problème est de comprendre comment ces bactéries régulent leur activité GS.

Questions 1

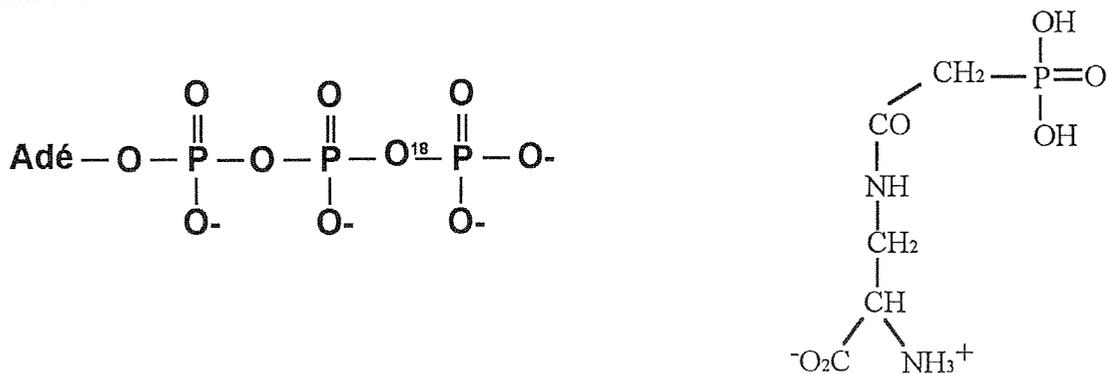
- Rappeler les relations métaboliques qui peuvent exister entre la glutamine, le glutamate, l' α -cétoglutarate (aussi noté 2oxoglutarate un des composants du cycle de Krebs) l'aspartate et l'asparagine, et montrez en quoi les trois activités enzymatiques citées participent effectivement à l'entrée d'azote dans la cellule. Pour plus de clarté vous pouvez écrire les formules semi-développées des composés cités.
- Pourriez vous indiquer comment l'azote de la glutamine peut ensuite être réparti entre les différents acides aminés de la cellule ?

Étude de la réaction catalysée par la glutamine synthétase.

Pour étudier le mécanisme réactionnel de la réaction catalysée par la GS plusieurs approches sont envisagées. Ici deux expériences vous sont proposées avec d'abord, l'observation d'une réaction d'échange entre cette enzyme et l'un de ses substrats.

Des expériences antérieures que l'on ne détaillera pas avaient seulement permis de conclure que si un intermédiaire γ -glutamyl phosphate était formé au niveau du site actif le relargage d'ADP du complexe Enzyme-ADP devait être extrêmement lent.

Figure 1 : Gauche : formule de l'ATP, Adé est l'abréviation de adénine, la position de l'isotope stable est indiquée. Droite : formule du PA2LA ou 3-(phosphonoacétylamido)-L-alanine, c'est une molécule artificielle.



On marque de l'ATP avec du ^{18}O comme indiqué sur la figure 1 et l'on incube en présence de GS, et de glutamate.

On analyse ensuite lorsque le système est à l'équilibre la position de cet isotope de l'oxygène sur l'ATP, on constate alors que dans 67% des cas le ^{18}O se retrouve dans une position ne faisant pas la liaison entre les P β et γ .

Questions 2

- Quelle est la réaction d'échange que l'on étudie ?
- Expliquez quelles sont alors les positions dans lesquelles on retrouvera le ^{18}O une fois que l'équilibre est atteint ?
- Comment expliquez vous ce résultat ? Que signifie-t-il au niveau du mécanisme de la réaction catalysée par la GS d'*Escherichia coli* ?
- Le PA₂LA (figure 1) est un inhibiteur de la GS d'*Escherichia coli*. D'après vous comment le PA₂LA pourrait-il inhiber cette réaction ? Ce résultat est-il en accord avec le précédent ? Imaginez le mécanisme chimique de l'arrivée de l'azote, donnez la formule de l'intermédiaire réactionnel et terminez la réaction.

Si dans un milieu pauvre en azote la voie principale de l'assimilation de NH_4^+ est effectivement l'activité GS, on constate que chez *Escherichia coli* cultivé dans un milieu riche en NH_3 l'activité de la GS est régulée négativement, l'entrée d'azote se fait alors à 85% par la GDH alors que la GS n'y contribue plus qu'à 15%. Huit différents métabolites semblent alors exercer une inhibition sur l'activité de la GS purifiée à partir d'extraits d'*E. coli* : l'histidine, le tryptophane, l'AMP, le CTP, le carbamyl phosphate, la glucosamine-6-P, l'alanine et la glycine.

Question 3

- Comment peut on justifier l'effet inhibiteur présenté par ces composés d'un point de vue physiologique ? Pourquoi ces métabolites ?

Voici quelques chiffres montrant cette inhibition, l'activité GS est donnée en unités arbitraires :

Tableau I

Activité GS	Addition de :
1	rien
0,8	histidine
0,7	tryptophane
0,6	AMP
0,34	histidine+tryptophane+AMP

Questions 4

- Commentez les résultats du tableau I ?
- Proposez une explication qui pourrait permettre de comprendre le fonctionnement de ce contrôle ? Qu'est ce que cela supposerait au niveau de la structure de la GS ?

Après que Woolfolk et Stadtman, dans les années 1964-1966, eurent établis ces résultats avec une première préparation d'enzyme d'*Escherichia coli* ils eurent la désagréable surprise de voir que leur seconde préparation enzymatique n'était plus sensible à l'inhibition par l'histidine, le tryptophane ou l'AMP. Après beaucoup de recherches ils se rendirent compte que les préparations de GS issues de cultures en milieu carencé en azote (ammoniac < 1mM) n'étaient plus sensibles aux inhibiteurs et ont une activité importante, alors que celles issues de milieu riche en azote (ammoniac > 1mM) sont sensibles et ont une faible activité. Par la suite on appellera **GSi** la GS peu active issue de milieu riche en azote, et **GSs** la GS active issue de cultures en milieu carencé en azote. Toutes les propriétés physiques des deux types d'enzymes semblent identiques sauf l'absorbance dans l'ultraviolet, les courbes ci-dessous vous montrent les spectres d'absorption des deux préparations et le spectre différentiel obtenu à partir de quantités identiques des deux préparations. Cette différence d'absorbance ne peut pas être enlevée par traitement par 0,3M NaOH ou HCl à 37°C pendant 3h.

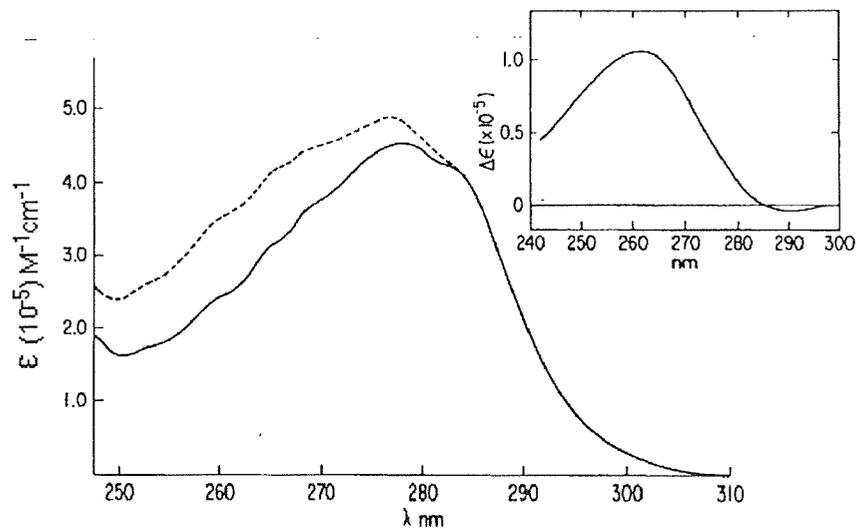


Figure 2 Spectres d'absorption ultraviolet de glutamine synthétase purifiée à partir de cellules cultivées dans un milieu riche en ammoniac comme seule source d'azote (GSi), en pointillés, et, de glutamine synthétase purifiée à partir de cellules cultivées dans un milieu pauvre en ammoniac (GSs), en trait continu. Le coefficient d'extinction molaire ϵ est exprimé par mole d'enzyme. En cartouche le spectre de différence.

Questions 5

- Décrivez et interprétez les résultats de cette expérience ? De quel(s) type(s) de modification(s) pourrait-il s'agir ?
- Connaissez-vous d'autres types de modification des enzymes pouvant affecter leur fonctionnement ? Si oui décrivez ces modifications et citez si possible des exemples.

Question 6

- Par quels autres moyens une cellule bactérienne peut-elle moduler une de ses activités enzymatique ? Indiquez les principaux moyens utilisés en moins d'une quinzaine de lignes.

La GSs peut être incubée en présence de [^{14}C]ATP et d'extraits de *Escherichia coli* issus de cultures riches en ammoniac. Après incubation la GS est purifiée et son contenu en [^{14}C] est déterminé. On observe alors qu'une grande partie de l'enzyme contient du [^{14}C]. Ce changement est accompagné d'une modification des propriétés de la GS, qui se comporte alors comme une GSi.

Question 7

- Que suggère cette expérience ? Expliquez.

Lorsque de la GSi est traitée par de la phosphodiesterase de venin de serpent, de l'AMP est relargué et l'enzyme est convertie en une forme apparemment identique à celle des préparations issues de cultures en milieu carencé en azote : identité du spectre d'absorption et des propriétés enzymatiques avec celle de la forme GSs.

Des extraits d'*Escherichia coli*, issus de cultures riches en ammoniac ou de cultures pauvres en ammoniac peuvent être fractionnés biochimiquement pour isoler la (ou les) activités permettant l'interconversion de la GS. L'activité permettant la transformation d'une GSs, issue de cultures en milieu carencé en azote, en une GSi sera appelée **ATase**, celle qui permet la conversion inverse (transformation d'une GS inactive en une GS active) sera appelée **ATdase**.

Après fractionnement d'extraits bactériens on étudie l'activité ATdase dans un tampon comprenant entre autres de l'ATP, de l'UTP et de l' α -cétoglutarate ou de la glutamine en quantités variables. Les courbes correspondant à ces essais vous sont données ci-dessous (figures 3 et 4).

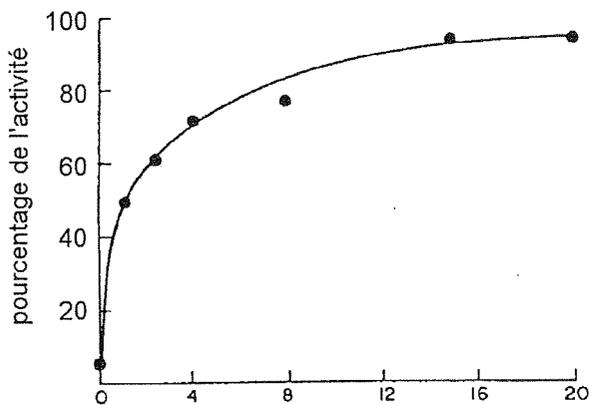


Figure 3 α -cétoglutarate (mM)

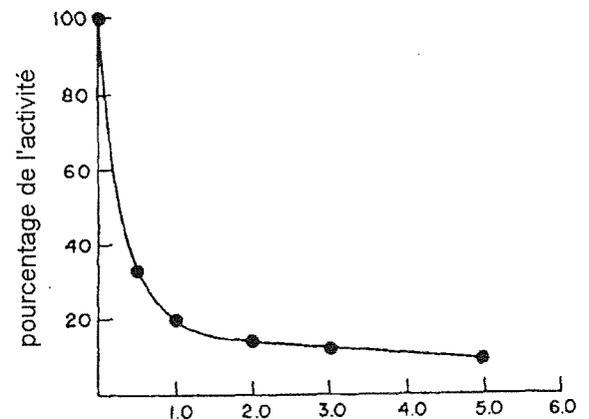


Figure 4 glutamine (mM)

Questions 8

- Quelles sont, selon vous, les activités catalysées par l'ATase et l'ATdase ?
- Commentez les données qui sont présentées avant les figures 3 et 4.
- Commentez les figures 3 et 4.
- Expliquez en quoi un contrôle de l'activité ATdase par ces métabolites est important ?

B. L'OPÉRON *glnALG* ET SA RÉGULATION

L'opéron *glnALG*

Des équipes de chercheurs ont pu d'isoler le gène codant pour la GS, que l'on appelle le gène *glnA*. Ce gène appartient à un opéron qui code aussi pour d'autres protéines et que l'on appelle l'opéron *glnALG*. La séquence de la région promotrice située juste en amont du gène *glnA* vous est donnée ci-dessous.

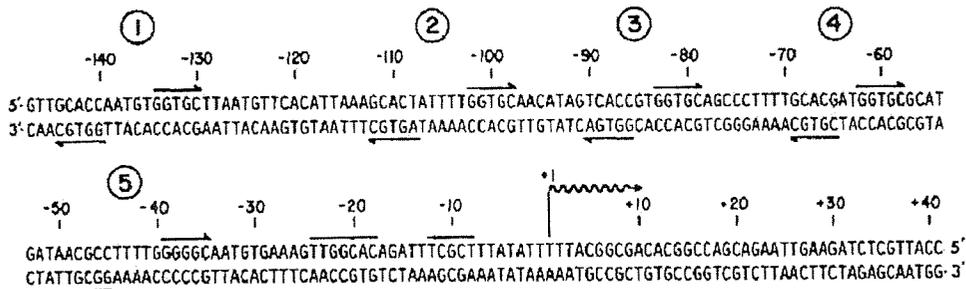


Figure 5. La séquence promotrice de l'opéron *glnALG*. vous est donnée ci dessus, les nucléotides sont numérotés à partir du +1 qui correspond à l'initiation de la transcription, en positif s'ils sont situés en aval et en négatif s'ils sont situés en amont dans la région promotrice. Les zones notées de 1 à 5 renvoient à la même notation dans la figure 8. La séquence codante de *glnA* commence au nucléotide +80 non figuré sur cette figure.

Questions 9

- Commentez les zones fléchées de la figure 5.
- Quels sont les éléments que l'on trouve classiquement en -10 et en -35 des promoteurs procaryotes ?
- Que remarquez vous de particulier au niveau de la région promotrice de cet opéron ? Quelles conséquences cela va-t-il avoir ?
- Si la séquence codante de *glnA* commence au nucléotide +80 non figuré sur cette figure, à quoi correspond la séquence située entre les nucléotides +1 et +79 ?

La transcription du gène *glnA* semble être sous le contrôle de plusieurs protéines régulatrices. Parmi celles-ci on trouve les gènes *ntrA* et *ntrC*. Le produit de *ntrA* est noté gpnrA (pour **g**ene **p**roduct), le produit de *ntrC* est noté gpnrC ou **NRI** (Nitrogen Regulator I). La figure 6 ci-dessous est une expérience de protection du promoteur de *glnA* vis à vis de la digestion par la DNase I, en présence ou absence de NRI. La DNase I est une endonucléase peu spécifique qui est utilisée ici dans le cadre d'expériences de protection de type "empreintes".

Le principe des empreintes (ou footprint) consiste à marquer radioactivement un fragment d'ADN bicaténaire à l'une de ses extrémités, puis à l'incuber en présence d'une endonucléase (ici la DNase I) ou d'un réactif chimique capable de cliver cet ADN. Les réactions seront donc courtes en durée et les réactifs utilisés à de faibles concentrations, de façon à ce que chaque fragment d'ADN ne soit statistiquement hydrolysé qu'une seule fois. Les fragments d'ADN sont ensuite séparés par électrophorèse dénaturante et les bandes radioactives sont révélées par autoradiographie. L'analyse par

électrophorèse montre donc une série de bandes caractéristiques correspondant à des fragments de toutes tailles. Si une ou des protéines sont fixées sur l'ADN alors elles peuvent le protéger de l'action de la DNase I, les bandes correspondant aux régions protégées disparaissent alors. Dans ce type d'expérience on dépose souvent en parallèle une séquence de la région d'ADN correspondante pour se repérer.

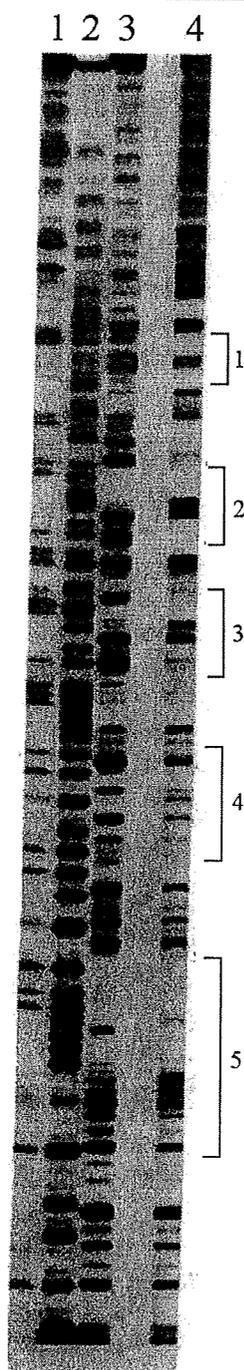


Figure 6. Une expérience de digestion à la DNase I d'un fragment du promoteur *glnA* a été effectuée en présence (piste ou ligne 4) ou en absence (piste 3) de NRI (1 μ g purifié). Les numéros et les crochets renvoient aux régions définies dans la figure précédente (séquence du promoteur). Les pistes 1 et 2 correspondent à une séquence de la même région par une méthodologie de type chimique (Maxam et Gilbert), ne coupant que au niveau des G (piste 1) ou au niveau des G et des A (piste 2). Gel d'acrylamide dénaturant à 8% (pistes 1 à 4).

Questions 10

- Décrire et interpréter l'expérience de la figure 6 ?
- Connaissez vous des méthodes qui auraient permis de mettre en évidence l'implication de ces deux gènes *ntrA* et *ntrC* dans la régulation de *glnA* ?

Des extraits bactériens de type S30 (c'est un type particulier d'extrait) possèdent tout l'équipement enzymatique pour permettre de transcrire et traduire un gène bactérien quelconque. Ces extraits peuvent être faits à partir de n'importe quelle souche de bactéries.

Pour étudier la régulation de la transcription au niveau du promoteur du gène *glnA* on construit deux plasmides : le premier (plasmide 1) porte un gène de fusion promoteur de *glnA-lacZ*, le second (plasmide 2) porte un gène de fusion promoteur classique *lacUV5-lacZ*. Des extraits cellulaires S30 sont faits à partir de souches d'*Escherichia coli* $\Delta glnA$, $\Delta ntrC$ et $ntrA^-$ (dans lesquelles le gène *ntrA* est inactivé) ou $\Delta glnA$, $\Delta ntrC$ et $ntrA^+$ (dans lesquelles le gène *ntrA* est fonctionnel). Dans ces extraits cellulaires on peut rajouter des quantités variables de différentes protéines préalablement purifiées.

Tableau II : Expression des deux gènes rapporteurs, cette expression peut être transcriptionnelle et traductionnelle, elle est alors représentée par une activité enzymatique de la β galactosidase en unité arbitraire, ou uniquement transcriptionnelle, elle est alors représentée par une unité arbitraire qui rend compte de l'activité transcriptionnelle du promoteur. Les extraits cellulaires S30 sont testés seuls ou avec NRI (17 μ g/ml quand présent), ou *gpnrA* (30 μ g/ml quand présent). E représente la core enzyme de l'ARN polymérase bactérienne, c'est à dire l'ensemble $\alpha 2\beta\beta'$, $\sigma 70$ est le facteur complémentaire.

	S30 de <i>ntrA</i> ⁺		S30 de <i>ntrA</i> ⁻	
	plasmide 1	plasmide 2	plasmide 1	plasmide 2
traduction-transcription				
Extraits S30 seuls	390	23777	285	16380
S30 + NRI	31780	24105	128	17415
transcription				
E + $\sigma 70$ + NRI			40	550
E + <i>gpnrA</i> + NRI			1280	20

Un autre moyen de visualiser l'activité transcriptionnelle de la région promotrice de *glnA* est de fabriquer un plasmide qui porte le promoteur de *glnA* et qui génère un transcrit de 509 nucléotides que l'on peut repérer facilement sur gel par autoradiographie lorsque la transcription s'est faite en présence d'un précurseur nucléotidique radioactif (voir figure 7). (Attention plusieurs kilobases d'ADN génomique de la région promotrice ont été utilisés et cette région contient d'autres gènes fonctionnels).

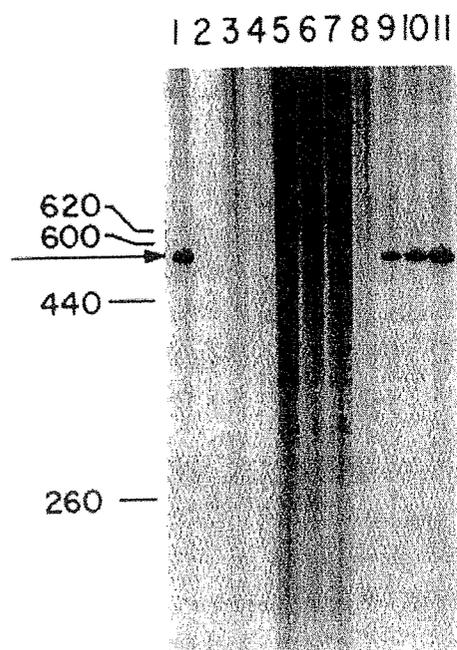


Figure 7. Essais de transcription in vitro avec des extraits cellulaires issus de la souche $\Delta glnA$, $\Delta ntrC$ et $ntrA^-$. Ces extraits sont incubés en présence de nucléotides triphosphates, dont du [$\alpha^{32}P$]CTP à 37°C pendant 4min (pistes ou lignes 1 à 8) pour permettre une transcription, le plasmide rapporteur décrit précédemment est rajouté à tous les extraits. A ces composés communs on ajoute (lignes 1, 9, 10 et 11) *gpnrA* + NRI + E (core enzyme de l'ARN polymérase bactérienne), *gpnrA* + NRI (ligne 2), *gpnrA* + E (lignes 3 et 8), NRI + E (ligne 4), E + $\sigma 70$ (ligne 5), E + $\sigma 70$ + *gpnrA* (ligne 6), E + $\sigma 70$ + NRI (ligne 7). Pour les lignes 9, 10 et 11 les temps d'incubation à 37°C sont respectivement de 1min, 2min et 6min.

Questions 11

- Commentez le tableau II en représentant le système utilisé, puis la figure 7, indiquez pourquoi dans les lignes 5, 6 et 7 on trouve des transcrits de tailles différentes qui forment une trainée.
- Quelles sont les rôles des protéines NRI et gpnrA d'après ces expériences ?

Pour mettre au point l'expérience précédente de transcription *in vitro* on a cherché auparavant à savoir si le temps de transcription choisi dans l'expérience précédente (4 minutes) était suffisant. Pour cela on a pris un autre plasmide rapporteur dont le transcrit à normalement une taille un peu supérieure à 4kb, et l'on a refait des essais de transcription *in vitro* en présence d'un précurseur nucléotidique radioactif pendant des temps variables. Le résultat vous est présenté dans la figure 8.

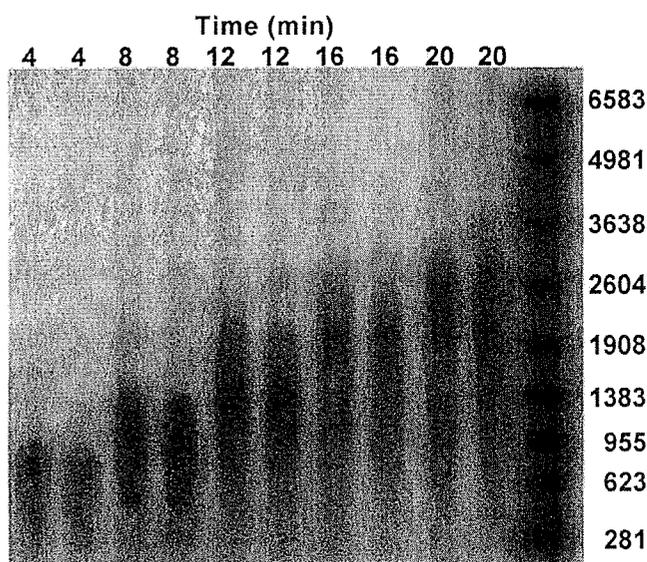


Figure 8. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des transcrits, les expérience de transcription *in vitro* sont arrêtées à des temps variables après le début de la transcription. Cette expérience est effectuée à 23°C avec E (core enzyme de l'ARN polymérase bactérienne) + $\sigma 70$ et 1mM de chacun des nucléotides triphosphate. Sur la piste de droite sont déposés des marqueurs ARN de taille variable, la taille est indiquée sur le côté en nombre de nucléotides.

Questions 12

- Pourquoi la limite des bandes est-elle assez nette vers le haut et floue vers le bas ?
- Calculez la vitesse de transcription dans les conditions de la figure 8.
- D'après vous le temps de transcription choisi pour l'expérience de la figure 7 était-il suffisant ?

Les protéines NRI et NRII

Le but de cette partie est d'essayer de comprendre les interrelations entre les deux protéines bactériennes NRI (produit du gène *ntnC*, parfois aussi appelé gène *glnG*) et NRII (produit du gène *glnL*) d'une part, et le promoteur de la glutamine synthétase (*glnA*) d'autre part. L'utilisation de ce promoteur, dans un système de transcription *in vitro*, est suivie par l'apparition d'un transcrit de 309 nucléotides que l'on peut repérer par électrophorèse suivie d'une autoradiographie lorsque la transcription s'est faite en présence de précurseurs nucléotidiques radioactifs (flèche). Les auteurs de l'article, dont certaines figures vous sont présentées, cherchent à comprendre comment NRII intervient au niveau de ce promoteur, en présence de NRI, *gpntA* et du cœur de l'ARN polymérase bactérienne E (core). Le mélange de transcription *in vitro* contient tous les réactifs nécessaires, sauf l'UTP (nucléotide initiateur qui est ajouté au moment où l'on veut démarrer la réaction). Toutes les transcriptions se font pendant la même période de temps.

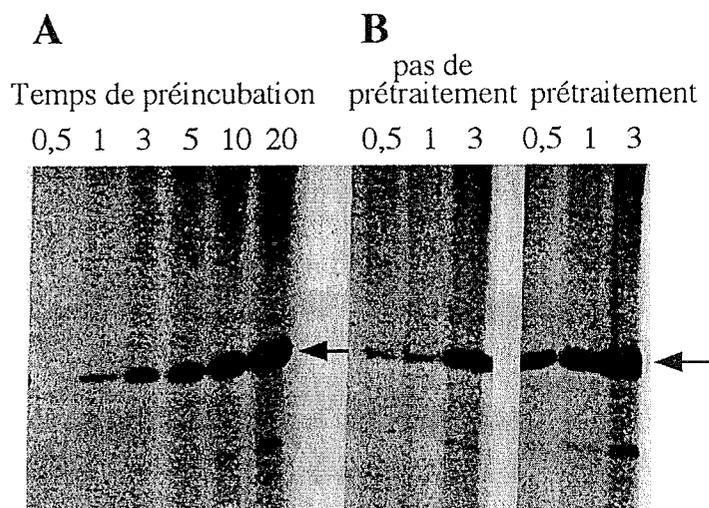


Figure 9. Réaction de transcription *in vitro*, le produit attendu est indiqué par une flèche, ne pas tenir compte de la déformation due à la migration dans le gel.

La réaction s'effectue en présence de NRI, *gpntA* et du cœur de l'ARN polymérase bactérienne E (core). Les flèches indiquent le transcrit de 309 nucléotides.

A. Le nombre au dessus de chaque piste correspond au temps (en minutes) d'incubation du mélange précédant avec NRII (2nM) avant l'addition d'UTP.

B. Effets du prétraitement de NRI avec NRII et de l'ATP, CTP et GTP, pendant 0 minutes à 4°C (pas de prétraitement) ou 20min à 37°C (prétraitement). Puis les réactifs du mélange de transcription *in vitro* sont préincubés pendant les temps indiqués comme en A. Dans tous les cas (A et B) NRII est présent pour la transcription.

Question 13

- Quels renseignements vous apportent les parties A et B de la figure 9 ? Interprétez cette expérience.

On cherche ensuite à comprendre les relations qui pourraient exister entre NRI, NRII, *gpntA* et la protéine PII qui intervient dans la régulation de l'activité de la GS. Dans ce but on a isolé divers mutants dans les gènes codant pour ces protéines. L'analyse de l'activité GS de ces mutants est faite dans des conditions de disponibilité en azote différentes. Elle vous est présentée dans le tableau ci-dessous. Les milieux de culture utilisés sont Ggln, GN, GNgln, LBgln et GLBgln.

Ggln est du milieu minimum limitant en azote contenant 0,4% de glucose et 0,2% glutamine ; GN du milieu minimum riche en azote avec 0,2% sulfate d'ammonium et 0,4% de glucose ; GNgln idem et complétement par 0,2% glutamine ; LBgln est du LB complétement en glutamine 0,2% ; GLBgln est du

LB complétement en glutamine 0,2% et glucose 0,4%. Les deux derniers milieux sont respectivement considérés comme très riche et extrêmement riche en azote.

Tableau III. Les activités GS des différents mutants sont données en nanomoles de produit formé par mg de protéines d'un extrait brut préparé avec la même quantité de cellules dans tous les cas. Les activités mentionnées dans le tableau correspondent à un essai particulier et non à des moyennes sur plusieurs essais. Parfois un numéro est indiqué après l'indication du gène muté, il correspond simplement au nom du mutant, ces mutants sont générés par l'insertion de transposons, on peut considérer que les gènes correspondants sont inactifs. La correspondance gènes, protéines formées est donnée dans tableau en annexe. Dans ces expériences le niveau d'activité GS est un reflet du niveau de transcription à partir du promoteur *glnA*.

Souches	Milieu de culture	activité GS
Gln+ (ou wt)	Ggln	1365
	GN	200
	GNgln	154
	LBgln	40
$\Delta glnB$	Ggln	1100
	GNgln	540
	GLBgln	371
$\Delta glnG10$	Ggln	70
	GNgln	80
$\Delta glnF208$	GNgln	<10
$\Delta glnL2001$	Ggln	1382
	GN	570
	GNgln	190
	LBgln	35
$\Delta glnD99$	Ggln	337
	GNg	41
	LBgln	36
$\Delta glnL2001 \Delta glnB$	Ggln	1135
	GLBgln	46
$\Delta glnB \Delta glnG10$	Ggln	75
	GNgln	52
$\Delta glnB \Delta glnF208$	GNgln	<10
$\Delta glnL2001 \Delta glnD99$	Ggln	1583
	GLBgln	50
$\Delta glnB \Delta glnD99$	Ggln	590
	GNgln	524
	LBgln	410

Question 14

- Que pouvez vous dire des besoins en glutamine du mutant $\Delta glnF208$, comment appelle-t-on ce type de mutant ?

Questions 15

- En analysant les effets des simples mutants puis des doubles mutants du tableau III pouvez vous reconstituer les relations qui existeraient entre les protéines PII, *gpglnD*, *gpntA*, NRI et NRII ?
- Comment s'appellent ces relations en génétique ?

De nouvelles expériences de mutagenèse ont permis d'isoler un autre mutant du gène *glnG*, le mutant 2302 à l'origine de la protéine mutante de NRII : NRII2302, qui entraîne une activation de la transcription, indépendante de la disponibilité en NH_4^+ dans le milieu, au niveau du promoteur *glnA* de la glutamine synthétase. C'est un mutant constitutif activateur de *glnA*. Des expériences de transcription *in vitro* en présence de NRI prétraité avec NRII2302 et différents nucléotides vous sont présentées.

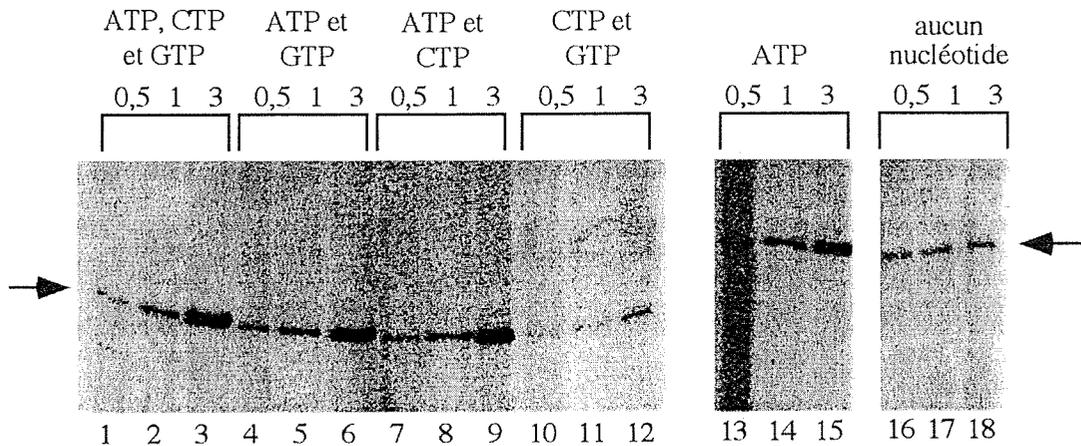


Figure 10. Réaction de transcription *in vitro* identiques à celles de la figure 9, le produit attendu est indiqué par une flèche. Par rapport à la figure 9 une différence consiste à remplacer NRII par NRII2302. Les nucléotides indiqués au dessus des pistes sont ceux qui sont présents pendant la préincubation. Ensuite les 4 nucléotides nécessaires à la transcription sont présents dans le mélange.

Questions 16

- Pourquoi utiliser NRII2302 plutôt que NRII dans ces expériences?
- Quels renseignements vous apporte la figure ci-dessus?

Pour comprendre les mécanismes par lesquels l'activation du promoteur de *glnA* intervient les auteurs incubent de grandes quantités de NRI en présence de NRII2302 et de $[\gamma$ ou $\alpha^{32}\text{P}]$ ATP.

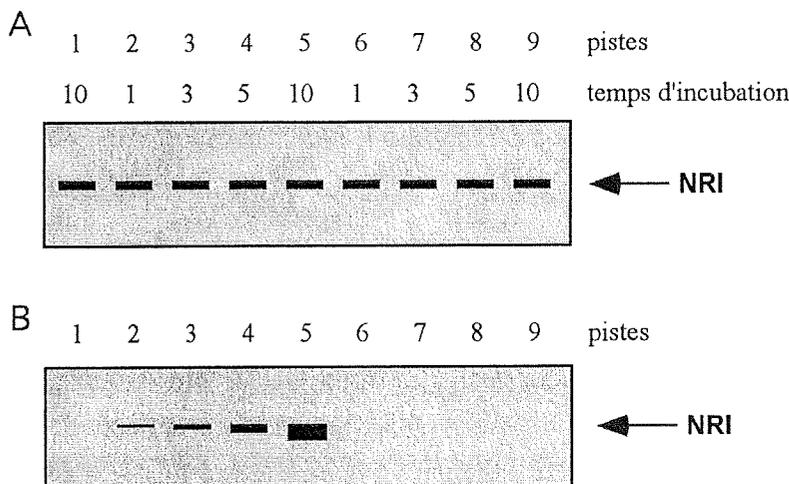


Figure 11. NRI est incubé en présence de NRII2302 (10nM), et de $[\gamma$ ou $\alpha^{32}\text{P}]$ ATP pendant des temps variables indiqués au dessus de chaque piste. **A.** Après incubation les protéines sont analysées par électrophorèse sur un gel, coloré ensuite par le bleu de coomassie un colorant non spécifique des protéines, la bande avec NRI vous est montrée (flèche). **B.** Autoradiographie du même gel montrant les endroits avec de la radioactivité incorporée. piste 1 incubation de NRI en présence de NRII2302 et de $[\alpha^{32}\text{P}]$ ATP, pistes 2 à 9 incubation en présence de $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP, pistes 2 à 5 NRII2302 présent, pistes 6 à 9 NRII2302 absent. La position de NRI vous est montrée (flèche).

Question 17

- Que pouvez vous conclure de la figure 11 ? Pourquoi avoir utilisé NR12302 dans cette expérience ?

Toujours dans le but de comprendre les relations (biochimiques) entre NRI et NR12, d'autres auteurs ont incubé ces deux protéines, soit séparément, soit ensemble, en présence de $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ radioactif. Les protéines sont ensuite analysées par électrophorèse puis autoradiographie. Le résultat de ces expériences vous sont présentées sur la figure 12 ci-dessous :

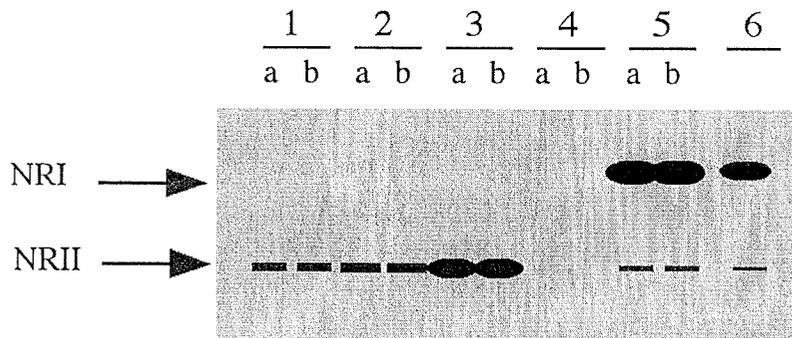


Figure 12. NRI ou NR12 sont incubés en présence de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (0,15mM) dans un tampon permettant aux protéines d'être actives. Piste 1 à 3 du $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et NR12 seul à 29nM (1), 58nm (2) et 116nM (3). Piste 4 NRI (2,5 μM) est incubé seul en présence de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Piste 5 NRI (2,5 μM) est incubé en présence de NR12 (116nM) et de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$. L'incubation se fait pendant 2 min (lignes a pistes 1-5) ou 10min (lignes b pistes 1-5). Puis les échantillons sont analysés sur un gel d'acrylamide (SDS PAGE) par électrophorèse et celui ci est séché puis autoradiographié pour visualiser les régions où se retrouve la radioactivité. Les zones de migration de NRI ou NR12 vous sont indiquées par des flèches. Piste 6 les protéines NRI et NR12 sont incubées en présence de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ séparément (comme pour les pistes 2 et 4) puis l'ensemble est ensuite mélangé pendant 60 secondes avant d'être analysés sur gel, on obtient alors les proportions de 58nM NR12 et 1,2 μM NRI.

Questions 18

- Interprétez d'abord les expériences 1 à 3 de la figure 12. Pourquoi avoir utilisé du $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ radioactif ?
- Interprétez les résultats présentés dans les pistes 4 et 5.
- Interprétez la piste 6, pour cela pensez à bien la comparer à la piste 2. Récapitulez.

D'autres expériences sont effectuées pour tenter de comprendre les interrelations entre NRI et NR12. On commence par incubé NR12 avec du $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ à 37°C pendant 10 minutes dans un tampon permettant à la protéine d'être fonctionnelle. Ensuite les fractions protéiques et non protéiques sont séparées de façon à ne récupérer que la protéine NR12. La fraction protéique est alors incubée avec NRI pendant des temps variables et ceci en présence d'EDTA ou de MgCl_2 (Note : l'EDTA est un chélateur du Mg^{2+}). Après ces temps d'incubation les protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE et l'ensemble est analysé par autoradiographie pour détecter la radioactivité. Les résultats vous sont montrés ci-dessous : figure 13.

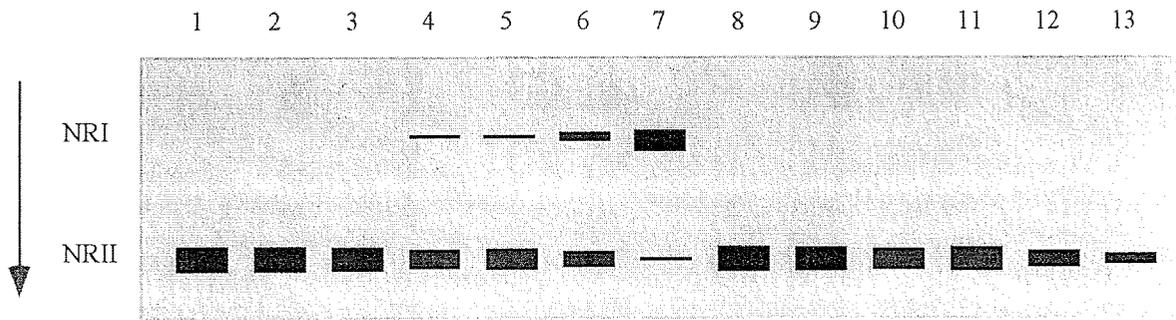


Figure 13. Piste 1- fraction protéique correspondant à l'incubation de NRII avec du $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ à 37°C pendant 10 minutes (360nM NRII environ). Piste 2- Même fraction protéique mise en présence de $5\ \mu\text{M}$ NRI et 5mM EDTA pendant 1 minute, Piste 3- 5 minutes, Piste 4- 60minutes. Piste 5- Même fraction protéique mise en présence de $5\ \mu\text{M}$ NRI et 5mM MgCl_2 pendant 1 minute, Piste 6- 5 minutes et Piste 7- 60minutes. Les pistes 8 à 10 correspondent aux mêmes temps que les pistes 2 à 4, mais on analyse la fraction protéique correspondant à l'incubation de NRII avec du $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ à 37°C pendant 10 minutes mise en présence d'ADP (2mM) et d'EDTA (5mM). Pistes 11 à 13, même chose que de 8 à 10 mais on remplace l'EDTA par 5mM MgCl_2 .

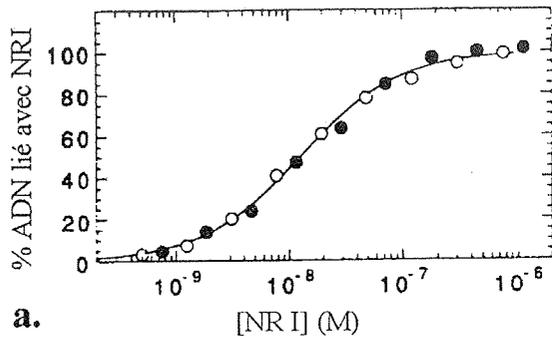
La fraction protéique correspondant à l'incubation de NRII avec du $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ à 37°C pendant 10 minutes (piste 1 figure 14) est ensuite totalement hydrolysée et les acides aminés sont analysés par chromatographie. Cette analyse révèle la présence d'histidine phosphorylée radioactive (τ phosphohistidine). De plus on constate que la radioactivité de cette fraction est assez stable pour des pH supérieurs à 3, par contre dans un tampon de pH inférieur ou égal à 3 cette radioactivité est très rapidement perdue. De même l'hydrolyse de la fraction radioactive de NRI montre la présence d'aspartate phosphorylé radioactif.

Questions 19

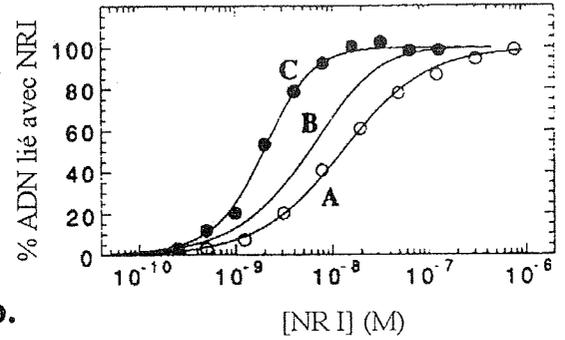
- Dans la figure 13 comment pouvez vous interpréter les données des pistes 8 à 13 ?
- Interprétez ensuite l'ensemble des données de la figure 13. Pourquoi la radioactivité de cette fraction protéique correspondant à l'incubation de NRII avec du $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ est elle instable à pH bas ?
- Est ce que la présence de τ phosphohistidine vous étonne ? Commentez.
- Interprétez l'ensemble des données présentées avant.
- Comment appelle-t-on le couple de protéines NRI et NRII ? Citez d'autres systèmes comparables si vous en connaissez.

Le rôle de NRI

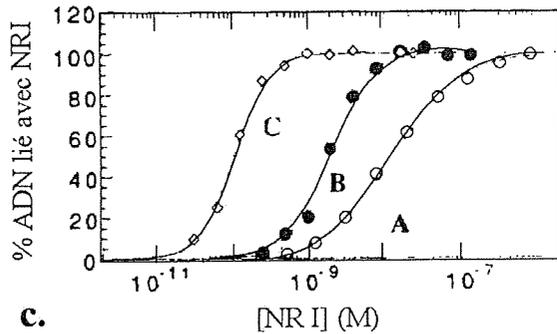
Les sites 1 et 2 qui sont mentionnés par la suite font référence aux régions du promoteur *glnA* indiquées dans les figures 5 et 6. On s'intéresse maintenant aux effets des modifications de NRI. Quels effets moléculaires et physiologiques ont elles ? Pour répondre à cette question des expériences de mesure de la capacité de liaison de NRI (modifié ou non) sur ces sites pris individuellement et pris ensemble sont faites. Les résultats vous sont présentés ci dessous :



Liaison de NRI au site 1. NRI non modifié: ●; NRI modifié: ○.



Liaison de NRI à deux sites 1 et 2 adjacents. A, liaison à un seul site 1 ; B, courbe théorique correspondant à une liaison indépendante à deux sites 1 and 2; C, courbe observée de la liaison aux deux sites 1 and 2.



Liaison de NRI modifié à deux sites 1 et 2 adjacents. A, NRI non-modifié liaison à un seul site 1 ; B, NRI non-modifié liaison aux sites 1 and 2; C, NRI modifié liaison aux sites 1 and 2.

Figure 14.

Question 20

- Quels renseignements nouveaux vous apporte cette figure, quel est l'effet de la modification de NRI vis à vis de sa capacité de liaison aux séquences en amont du promoteur *glnA* ?

C. LES FRACTIONS PI ET PII

PI et PII, introduction

L'étape suivante dans la démarche expérimentale a consisté à purifier les activités ATase et ATdase d'*E. coli*. Ceci a été tenté à partir d'extraits bactériens par plusieurs méthodes : gel filtration, chromatographie, électrophorèse etc... dans tous les cas il fut impossible de séparer les activités ATase et ATdase qui se retrouvèrent systématiquement dans une seule fraction appelée PI. Une seconde fraction protéique est néanmoins nécessaire à la régulation, elle a été appelée PII. Les propriétés de cette fraction PII sont explorées dans les expériences qui suivent.

Questions 21

- Comment feriez vous simplement pour suivre ces activités ATase et ATdase, imaginez un protocole (sans mettre de détails techniques) ?
- Commentez ces résultats.

Des expériences supplémentaires sont effectuées pour comprendre les interrelations entre PI, PII et la glutamine synthétase. Pour cela on incube la GS avec ces fractions en présence d'ATP, d'UTP et d' α -cétoglutarate et l'on teste l'activité ATdase. Les résultats vous sont présentés dans le tableau et les figures ci dessous.

Tableau IV

Mélange de préincubation	activité ATdase en pmol/min	
	Avant préincubation	Après préincubation
PI + PII	3,4	18,7
PI + PII + GS	3,5	18,7
PI	3,4	3,8
PII	3,5	3,9
PI + GS	3,5	3,1
PII + GS	3,1	3,3

Différents essais de préincubation (0 min. ou 60 min.) comprenant la GS (40 μ g) et PI (30 μ g) ou PII (50 μ g) en combinaisons variables sont faits en présence d'ATP, d'UTP et d' α -cétoglutarate. Ces mélanges sont ensuite ajoutés à un mélange de PI (17,3 μ g) et PII (9 μ g) qui est alors testé vis à vis de son activité ATdase.

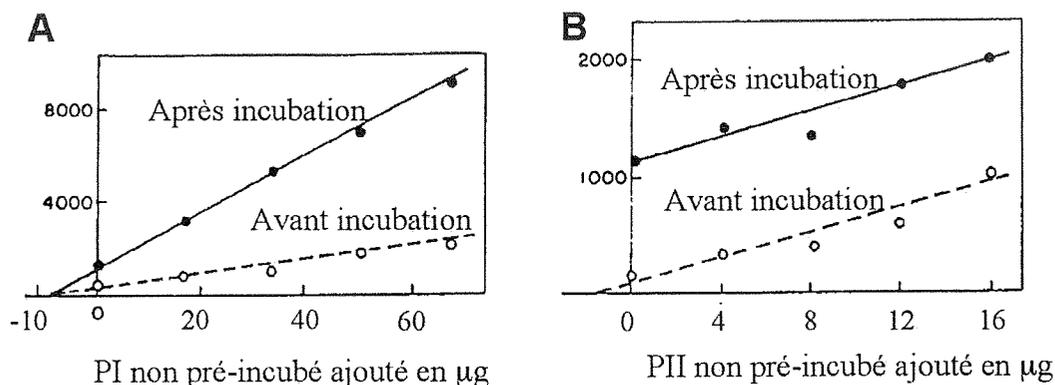


Figure 15. PI (150 μg) et PII (35 μg) préincubés en présence d'ATP, d'UTP et d' α -cétoglutarate pendant 0 (cercles creux) ou 60 minutes (cercles pleins) à 37°C. Puis une partie du mélange comprenant 7,5 μg de PI et 1,75 μg de PII est prélevée et testée vis à vis de son activité ATdase en présence des quantités de PI ou PII non incubées indiquées en abscisse. En ordonnée l'activité ATdase en unité arbitraire.

Question 22

- Interprétez le tableau IV

Questions 23

- Indiquez pourquoi dans la figure 15 les droites correspondant aux essais "avant incubation" ne coupent pas l'axe des ordonnées au point 0 ? Pourquoi dans la partie A de la figure 15 les droites correspondant aux essais avant et après incubation se coupent elles au même point de l'axe des abscisses alors que dans la partie B elles sont parallèles ?
- Interprétez simplement ces deux figures. (Note : il n'est pas demandé d'équations).
- D'après les données qui vous sont présentées ci-dessus (tableau IV et figure 15) indiquez les interrelations que vous voyez entre PI, PII et la GS ? Quel serait le rôle de la fraction PII ?

Une autre expérience d'incubation de PI avec PII vous est présentée.

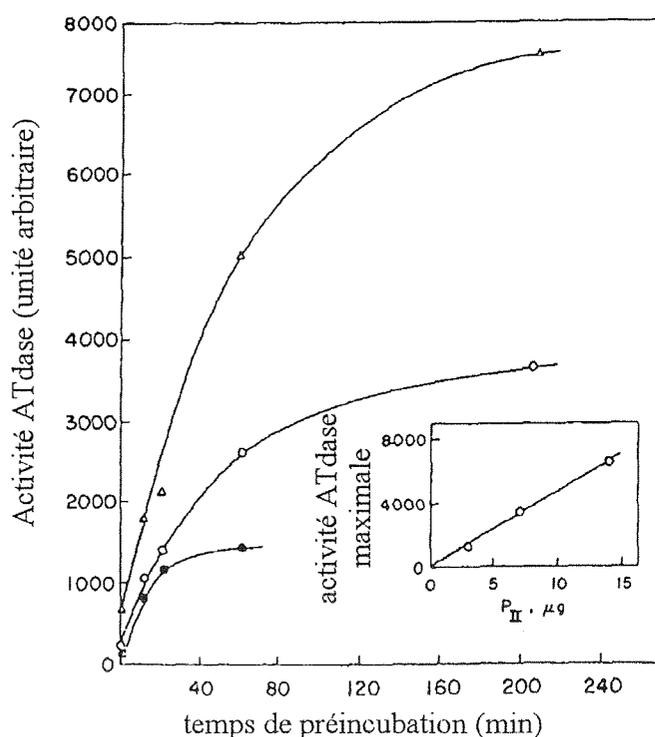


Figure 16. 96 μg de PI sont préincubés pendant des temps variables (indiqués en abscisse) avec différentes quantités de PII : 3,5 μg (ronds noirs), 7 μg (ronds blancs), ou 14 μg (triangles) dans un tampon contenant de l'ATP, de l'UTP et de l' α -cétoglutarate. Puis une partie du mélange est prélevée et testée vis à vis de son activité ATdase. L'insert correspond à une courbe dérivée.

On a ensuite pu montrer que la fraction protéique nommée PII pouvait, dans certaines conditions de milieu, stimuler l'activité ATase présente dans la fraction PI. En pratique un mélange de PI et PII, fait extemporanément, voit son activité ATase stimulée d'un facteur d'environ 3 par rapport à l'activité ATase de PI seul. Par contre lorsque que l'on préincube PI et PII pendant un certain temps (60min ou plus dans un tampon avec de l'ATP, de l'UTP et de l' α -cétoglutarate) alors cette stimulation de l'activité ATase de PI baisse de plus de 50%. Il semble donc que PII puisse exister sous deux formes : une forme qui serait susceptible de stimuler l'activité ATdase notée PII-DA, et une forme qui serait susceptible de stimuler l'activité ATase notée PII-AT.

Dans une nouvelle expérience on a incubé PI en présence de PII-AT dans un tampon contenant de l'ATP, du [γ ³²P, ¹⁴C]UTP et de 1mM d' α -cétoglutarate, dans ces conditions la forme PII-AT peut être convertie en une forme PII-DA qui, si elle est isolée, contient du ¹⁴C mais pas de ³²P. Cette conversion est fortement inhibée en présence de glutamine (0,4mM). Le traitement de PII-DA par une phosphodiesterase de venin de serpent transforme cette forme en une forme du type PII-AT.

Questions 24

- Exploitez les informations apportées par la figure 6, notamment l'insert, reliez ceci à vos connaissances d'enzymologie. (vous pouvez donner une équation)
- Exploitez ensuite les informations qui sont fournies par le texte ci-dessus.
- Que pouvez vous dire de PII-DA et PII-AT ?
- Que pouvez vous dire des interrelations entre PI, PII et la GS, en quoi ces nouvelles données complètent elles vos réponses de la question précédente, comment expliquer le rôle de la glutamine ?

Dans les expériences rapportées précédemment il semblerait que les fractions protéiques PI et PII ne soient pas totalement pures. De nouvelles données montrent que la conversion de PII en PII-DA et PII-AT est sous le contrôle d'une quatrième protéine qui réagit directement au rapport glutamine/ α -cétoglutarate. Appelons cette protéine gpInD (gene product glnD).

Questions 25

- Essayez de récapituler les principales voies de contrôle de l'activité Glutamine Synthétase dans la cellule d'*Escherichia coli*.
- Quel peut être l'avantage d'un tel système qui semble *a priori* assez complexe ?

Le rôle de la protéine PII

On cherche maintenant à comprendre le rôle spécifique de la protéine PII. Les auteurs des articles dont certains résultats vous sont présentés se sont intéressés à une éventuelle corrélation entre une (des) modification(s) de NRI correspondant à ce qui vous a été présenté dans les figures 12 et 13 et l'activation de *glnA*. Ils ont décidé de tester l'effet de PII dans la régulation de l'activité GS chez *Escherichia coli* (cf. figures ci-dessous).

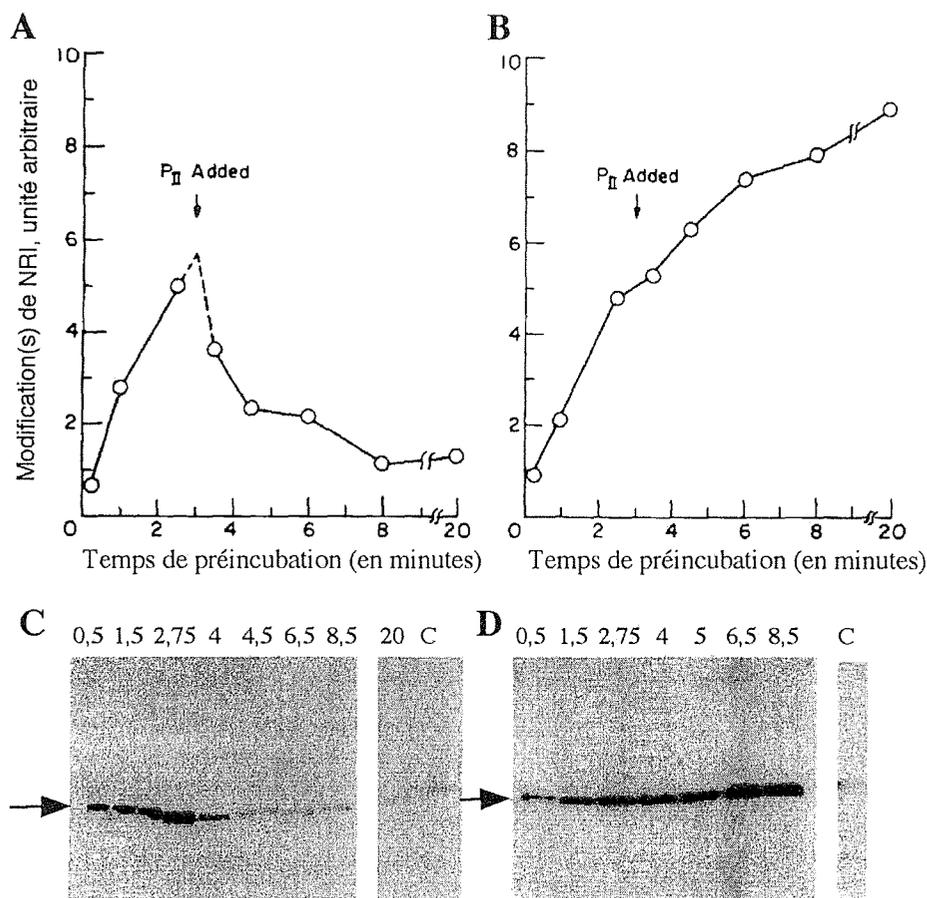


Figure 17. (A) Suivi de la (les) modification(s) de NRI au cours du temps en présence de 40 nM de NRII, les conditions de l'incubation sont comparables à celles de la figure 11. Au temps 3min, on ajoute PII à une concentration finale de 0,33 μ M. Chaque échantillon analysé contenait 19,2 pmol de NRI. (B) Même chose qu'en A mais avec NRII2302 à 10nM à la place de NRII. (C) Essais de transcription in vitro en utilisant des échantillons prélevés dans l'expérience présentée en A aux temps (en minutes) indiqués au dessus de chacune des lignes de dépôt. La position des transcrits spécifiques du promoteur *glnA* est indiquée par une flèche. Les conditions de cet essai de transcription in vitro sont en tout point comparables à celles que vous avez dans les figure 9 et 10. La ligne c correspond à une transcription contrôle en absence de NRI et NRII. (D) Même chose qu'en C mais les échantillons sont prélevés dans l'expérience présentée en B, et aux temps indiqués au dessus de chaque ligne de dépôt. En c contrôle sans NRI, ni NRII2302.

Question 26

- Interprétez les parties A et B, puis C et D de la figure ci dessus.
- Quel(s) pourrait(ent) être le(s) rôle(s) de la protéine PII ?

L'analyse d'un extrait protéique total a été faite par chromatographie (gel) d'exclusion : c'est une méthode non dénaturante qui permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire (PM). La recherche de PII a été faite dans chaque fraction. Le résultat de cette expérience vous est présenté sur la figure 18. Plus tard le gène *glnB* a pu être isolé, la séquence de ce gène vous est donnée dans la figure 19 :

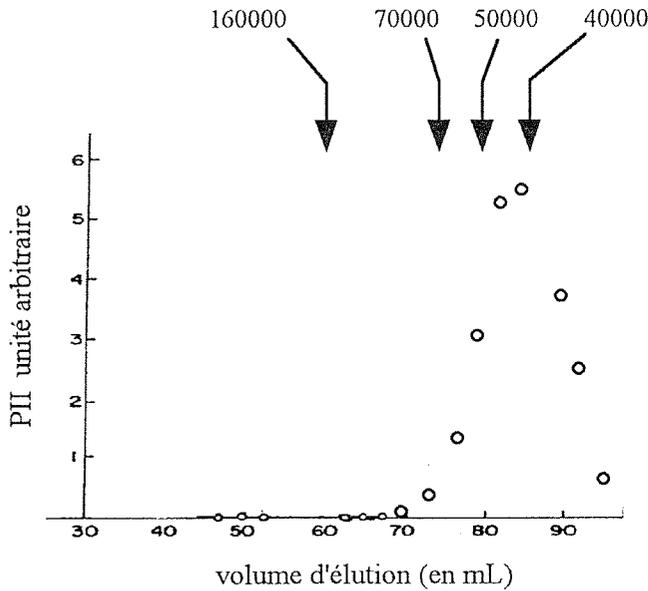


Figure 18. Isolement de PII par gel d'exclusion. Les ronds clairs correspondent à la quantité de PII dans les fractions testées (attention toutes les fractions ne sont pas testées). Des protéines de PM de référence sont passées en même temps, les fraction où elles éluent sont indiquées par les flèches.

```

-140          -130          -120
A G A A T G G C G G G G G C A A C C G G A C A G A A I T T
-110          -100          -90
I A T A A A C T G C T I T C C C G A C A C G A G C T G C A T
-80          -70          -60
G C A A A C G A T T T C A A C G A A T G A A T T G G C G T T
-50          -40          -30
A T G T G T T A C G T T T A G C A G A T C A A A A G A C A G
-20          -10          +1
G C G A C C T T T T C A A G G A A T A G C A T G A A A A A G
                                     Met(1) Lys Lys(3)

A T T G A T G C C A T T A T A A A A C C C T T C A A G C T G
Ile Asp Ala Ile Ile Lys Pro Phe Lys Leu(13)

G A C G A T G T C C G C G A A C G A C T G G C C G A A G T C
Asp Asp Val Arg Glu Arg Leu Ala Glu Val(23)

G G T A T T A C C G G C A T C A C G G T G A C C G A A G T G
Gly Ile Thr Gly Met Thr Val Thr Glu Val(33)

A A A C G C T T T G G T C G C C A G A A A G G C C A T A C C
Lys Gly Phe Gly Arg Gln Lys Gly His Thr(43)

G A G C T G T A C C G C G G C G C G C A G T A T A T G S T G
Glu Leu Tyr Arg Gly Ala Glu Tyr Met Val(53)

C A T I T T C T C C G G A A A G T G A A A A T T G A G A T T
Asp Phe Leu Pro Lys Val Lys Ile Glu Ile(63)

G T C E T A C C G G A C G A C A T T G T C G A T A C C T G T
Val Val Pro Asp Asp Ile Val Asp Thr Cys(73)

G T C G A T A C C A T T A T T C G C A C G G A A A C C G G C
Val Asp Thr Ile Ile Arg Thr Glu Thr Gly(83)

A A A A T C G G T G A C G G T A A A A T C T T G T C T T T
Lys Ile Gly Asp Gly Lys Ile Phe Val Phe(93)

G A C G T C G C A C G G C T C A T T C G C A T C G T A C C G
Asp Val Ala Arg Val Ile Arg Ile Val Pro(103)

T G A A G A G G A C G A C G C G G C A A T T T A
End
    
```

Figure 19. Séquence nucléotidique de *glnB* et séquence en acide aminés déduite de la protéine PII (les nombres indiquent la position des acides aminés à partir de l'extrémité N terminale de la protéine). Ne pas tenir compte des flèches.

Questions 27

- Que pouvez conclure à partir des renseignements qui vous sont donnés dans les figures 18 et 19 ?
- Des études par spectrométrie de masse, une méthode très précise de détermination du poids moléculaire des protéines, permet de mesurer un PM de 12435 Da pour PII. Qu'en pensez vous ? Est ce compatible avec les autres renseignements et que cela signifie-t-il ?

Cette protéine PII peut subir des modifications (cf. les formes PII-DA et PII-AT). Celles-ci ont été étudiées, on vous présente ci dessous une électrophorèse non dénaturante, ici les conditions d'électrophorèse permettent de respecter la forme native de la protéine PII et d'analyser des différences de PM très faibles, ce qui n'est généralement pas le cas.

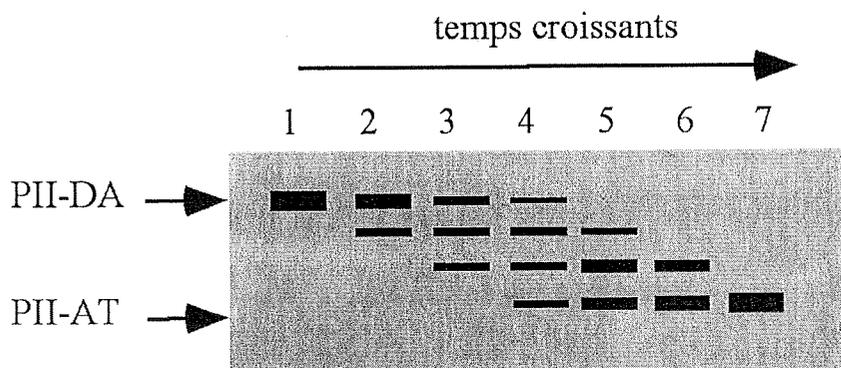


Figure 20. On se place dans des conditions dans lesquelles la forme PII-DA est convertie en une forme PII-AT (cf. avant) et l'on prélève des fractions à des temps croissants pour analyser PII au cours de cette réaction de conversion, et ceci dans des conditions d'électrophorèse non dénaturante. Les seules formes moléculaires visibles sur ce gel sont les différentes formes de PII.

Question 28

- Que pouvez en conclure vis à vis de la structure de la protéine PII ?
- Est ce en conformité avec ce que vous avez conclu à la question d'avant ? Justifiez.

On s'intéresse maintenant un peu plus au devenir de la forme modifiée de NRI telle qu'elle a pu être mise en évidence dans les figures 11, 12 et 13, et au rôles de NRII et de PII dans ce devenir. Pour cela on a purifié NRII puis les formes PII-DA et PII-AT, on a aussi purifié la protéine gpglnD qui interviendrait dans le contrôle de l'interconversion entre ces deux formes.

On a pu montrer qu'un système *in vitro* contenant un tampon avec (entre autres) 0,1mM ATP 0,2mM UTP, 30 μ M α -cétooglutarate 6,4 μ M PII-AT et 1,7 μ M gpglnD évoluait spontanément vers la transformation de la forme PII-AT en une forme PII-DA. La figure 21A vous montre ce type d'expérience et l'effet de l'ajout de certains métabolites. L'effet des différentes formes de PII sur la forme modifiée de NRI est aussi testé (figure 21B), il faut noter (cf avant) qu'en absence de NRII il n'y a pas de modification de NRI.

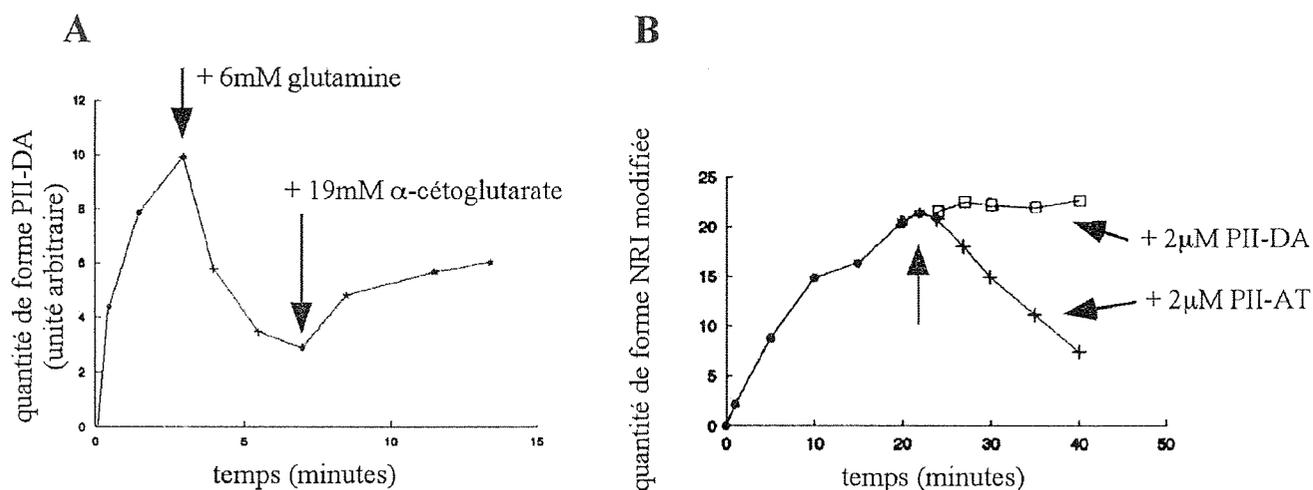


Figure 21. A. Incubation de ($1,7\mu\text{M}$) gpIInD et ($6,4\mu\text{M}$) PII-AT en présence de $0,1\text{mM}$ ATP $0,2\text{mM}$ UTP, $30\mu\text{M}$ α -cétoglutarate on suit la quantité de PII-DA. Aux temps indiqués on ajoute de la glutamine (6mM final), ou de l' α -cétoglutarate (19mM final).

B. Suivi de la modification de NRI dans un tampon contenant (entre autres) : $20\mu\text{M}$ NRI, 180nM NRII, $1,5\text{mM}$ ATP, $0,2\text{mM}$ UTP, au temps 22 minutes on ajoute de PII-DA ou PII-AT.

Question 29

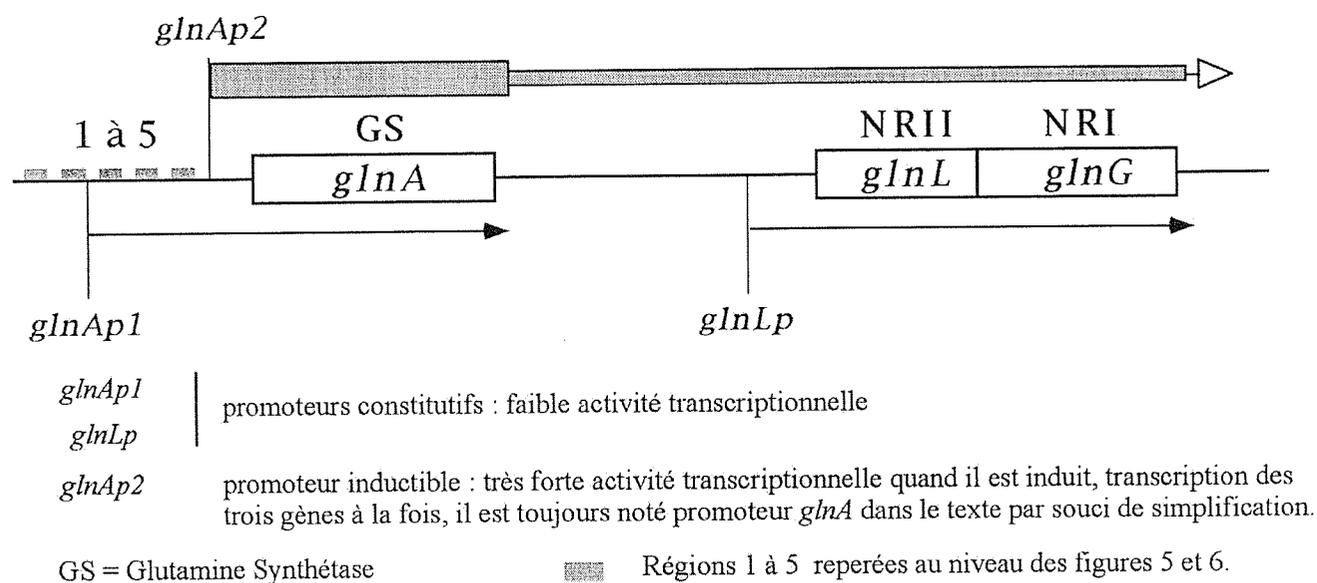
- Quels renseignements nouveaux vous apportent les parties A et B de cette figure ? Comparez notamment par rapport à la figure 17.
- Est ce en accord avec ce que vous connaissez de la voie métabolique étudiée ?

D. RÉCAPITULATION

Question 30

- Faites une récapitulation sous forme de schéma du fonctionnement global du système régulant l'entrée d'azote dans la cellule. Faites notamment apparaître les protéines que vous avez pu découvrir aux questions précédentes. Montrez bien à quoi servent les signaux glutamine et α -cétoglutarate. Pour vous aider voici ci-dessous (figure 22) un schéma simplifié de l'opéron *glnALG*, vous êtes libre de l'utiliser ou non.

Figure 22.



ANNEXES

Le code génétique universel

TTT phe F	TCT ser S	TAT tyr Y	TGT cys C
TTC phe F	TCC ser S	TAC tyr Y	TGC cys C
TTA leu L	TCA ser S	TAA OCH Z	TGA OPA Z
TTG leu L	TCG ser S	TAG AMB Z	TGG trp W
CTT leu L	CCT pro P	CAT his H	CGT arg R
CTC leu L	CCC pro P	CAC his H	CGC arg R
CTA leu L	CCA pro P	CAA gln Q	CGA arg R
CTG leu L	CCG pro P	CAG gln Q	CGG arg R
ATT ile I	ACT thr T	AAT asn N	AGT ser S
ATC ile I	ACC thr T	AAC asn N	AGC ser S
ATA ile I	ACA thr T	AAA lys K	AGA arg R
ATG met M	ACG thr T	AAG lys K	AGG arg R
GTT val V	GCT ala A	GAT asp D	GGT gly G
GTC val V	GCC ala A	GAC asp D	GGC gly G
GTA val V	GCA ala A	GAA glu E	GGA gly G
GTG val V	GCG ala A	GAG glu E	GGG gly G

Le poids moléculaire moyen d'un acide aminé est de 110 Da.

Formules de quelques acides aminés (l'ionisation peut être différente dans les molécules biologiques) :

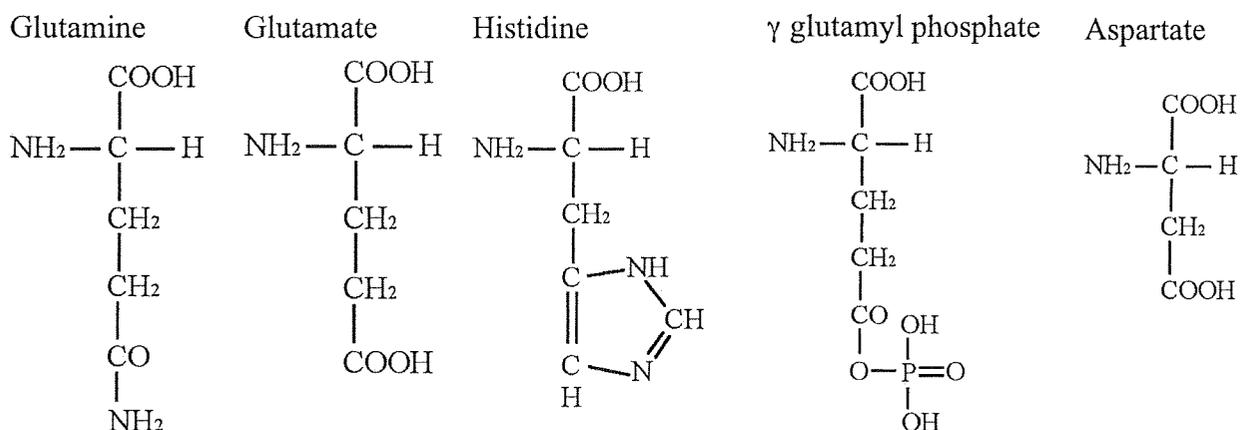


Tableau des principaux gènes cités dans le texte (liste non exhaustive)

Gène	Produit du gène
<i>glnA</i>	Glutamine Synthétase ou GS
<i>glnB</i>	PII
<i>glnE</i>	
<i>glnD</i>	gp _{glnD}
<i>glnL</i>	NR _{II}
<i>glnG</i> ou <i>ntrC</i>	NR _I ou gp _{ntrC}
<i>glnF</i> ou <i>ntrA</i>	gp _{ntrA}
<i>lac z</i>	β galactosidase