

Anwendung der Dinitrophenylierung und der Hydrazinolyse auf lösliche radioaktive Proteine aus Kulturen von HeLa-Zellen

Von

A. Z. Budzyński* und **E. Broda**

Institut für Physikalische Chemie der Universität Wien

und

G. Kellner und **S. J. Frimmel**

Histologisch-embryologisches Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 5. April 1962)

Einschichtkulturen von HeLa-Krebszellen wurden in Anwesenheit von radioaktivem D,L-Leucin mit synthetischem Nährmedium inkubiert und die löslichen Proteine durch Ultrafiltration unter Druck isoliert. Etwa 5% des Leucins waren in diese Proteine eingebaut worden. Die Proteine wurden einerseits der Dinitrophenylierung, andererseits der Hydrazinolyse unterworfen. In der Fraktion der N-Endgruppen wurde nur 0,1%, in der Fraktion der C-Endgruppen nur 0,8% des Radiokohlenstoffes der Proteine gefunden. Es wird geschlossen, daß das Radioleucin in das Protein der Gewebekultur während seiner Synthese de novo eingebaut und nicht etwa nachträglich von vorgebildetem Protein aufgenommen wird.

Kulturen von HeLa-Carcinomzellen¹ bauen bei Inkubation mit Medien, die biogene Bestandteile enthalten können (aber nicht müssen), radioaktive (¹⁴C)-Aminosäuren in lösliche Proteine ein^{2, 3, 4}. Zur Iso-

* Beurlaubt von der Abteilung für Strahlenschutz, Institut für Kernforschung, Warszawa-Zeran, Polen.

¹ W. F. Scherer, J. T. Syverton und G. O. Gey, J. Exper. Medic. **97**, 695 (1953).

² G. Manner, E. Broda und G. Kellner, Mh. Chem. **88**, 896 (1957).

³ Y. M. Abdel-Samie, E. Broda, G. Kellner und W. Zischka, Nature [London] **184**, 361 (1959).

⁴ Y. M. Abdel-Samie, E. Broda und G. Kellner, Biochem. J. **75**, 209 (1960).

lierung dieser Proteine werden die Zellen durch Einfrieren zerstört, die Trümmer durch Zentrifugierung entfernt und die Proteine von Substanzen niederen Molekulargewichts — einschließlich der radioaktiven Aminosäure — durch Ultrafiltration unter Druck und gründliches Waschen auf dem Ultrafilter befreit. Man findet in der Regel einige Prozent des Radiokohlenstoffs in den löslichen Proteinen. Nach Inkubation der radioaktiven Aminosäure mit „natürlichem“ Nährmedium allein (in Abwesenheit von Zellen) weisen die löslichen Proteine praktisch keine Radioaktivität auf. Als „natürlich“ werden solche Medien bezeichnet, die Proteine (meist in Form von Serum) enthalten.

Durch die Ninhydrinprobe wurde gezeigt, daß die radioaktive Aminosäure im Protein im wesentlichen in α -peptidischer Bindung vorliegt. Wenn nämlich carboxylmarkiertes Leucin angewendet und das Protein nach der Isolierung in Anwesenheit nicht-radioaktiven Leucins als Träger mit Ninhydrin behandelt wurde, fand sich im entwickelten Kohlendioxid nur sehr wenig Radiokohlenstoff. Wenn die Behandlung mit Ninhydrin aber nach vorhergehender Hydrolyse des Proteins mit Salzsäure ausgeführt wurde, wurde der Hauptteil des Radiokohlenstoffs im CO_2 gefunden.

Durch die Ninhydrinprobe kann man jedoch zwischen Aminosäureresten innerhalb der Ketten und endständigen Aminosäuren nicht unterscheiden. Nun wäre denkbar, daß Aminosäuren durch vorgebildete Proteine aufgenommen, also unter Wasseraustritt an diese endständig angeschlossen werden. Eine derartige Reaktion ist zwar bisher an Gewebekomplexen oder anderen in bezug auf Proteinsynthese studierten biochemischen Systemen nicht beobachtet worden, doch sind Zellen in Kultur in dieser Hinsicht nicht untersucht worden. In Kultur liegen insofern abweichende Verhältnisse vor, als wegen der geringen Masse des Gewebes (etwa 0,1 mg Trockenmasse je Rollerröhrchen mit 1 ml Medium) die gesamte Aufnahme von markierter Aminosäure durch Protein nur gering ist (einige μg je Versuch). Unter Umständen könnten daher Nebenreaktionen, die sonst keine Rolle spielen, relativ stärker hervortreten. Eine Prüfung wurde daher als notwendig erachtet.

Möglich wäre (1) eine Reaktion der radioaktiven Aminosäure mit freien Aminogruppen unter Bildung radioaktiver N-Endgruppen, oder (2) eine Reaktion mit freien Carboxylgruppen unter Bildung radioaktiver C-Endgruppen. Wir haben nun die löslichen HeLa-Proteine durch Dinitrophenylierung oder Hydrazinolyse auf radioaktive Endgruppen geprüft. Nach unserer Kenntnis wurden radioaktive Proteine auch anderer Herkunft als aus Zellen in Kultur niemals nach diesen beiden Methoden untersucht. In der vorliegenden Untersuchung wurden Erkenntnisse über das Verhalten radioaktiver Proteine bei Behandlung nach diesen beiden Verfahren gewonnen.

Eine dritte Möglichkeit der Anlagerung würde in einer Esterbildung mit Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten vorgebildeten Proteins bestehen. Eine solche Reaktion erschien aber von vornherein als weniger wahrscheinlich; daher wurde auf eine diesbezügliche Untersuchung verzichtet.

Experimenteller Teil

Züchtung der Gewebe und Isolierung der Proteine

Die HeLa-Zellen wurden nach einem früher beschriebenen Verfahren in Rollerröhren als Einschicht-Kulturen gezüchtet⁵. Dazu wurden Stücke von HeLa-Gewebe durch Trypsinisierung in Suspensionen verwandelt, jede Röhre mit $2 \cdot 10^5$ Zellen beladen und die Röhren bei 37°C mit 1 ml proteinfreien „synthetischen“ Mediums⁶ sowie 0,5 Mikrocurie $1\text{-}^{14}\text{C-D,L-Leucin}$ (Harwell; spezifische Aktivität 41,6 Mikrocurie/mg) inkubiert.

Nach 4 Tagen betrug die Zahl der Zellen je Röhre im Mittel $4,5 \cdot 10^5$; sie wurde an parallelen Röhren durch Trypsinisierung mit nachfolgender Auszählung im Hämocytometer ermittelt. Sodann wurde jeder Röhre als Träger 1 ml menschlichen Nabelschnurserums zugefügt, der Inhalt von 5 Röhren vereinigt, die Zellen wurden durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen zerstört, die Mischung homogenisiert und die Zellreste durch Zentrifugierung beseitigt. Ein Zehntel des Überstandes wurde unter Druck durch ein Ultrafilter LSG 60 (Membranfiltergesellschaft, Göttingen) gepreßt. Der hauptsächlich aus Protein bestehende Rückstand auf dem Filter wurde mehrmals mit physiologischer Salzlösung gewaschen und schließlich in 0,5 ml Salzlösung aufgenommen.

Bestimmung der Radioaktivität

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden die Proben naß verbrannt⁷, das CO_2 in NaOH absorbiert und als BaCO_3 gefällt. Zur Messung wurde das CO_2 in einer Vakuumapparatur mit HClO_4 freigesetzt und dann ohne Reinigung oder Zusatz von Fremdgasen in ein Gaszählrohr eingeführt; aus den gemessenen Stoßzahlen wurden die Aktivitäten (*dpm*) berechnet^{8, 9, 10, 11}. Der Leerwert betrug etwa 40 min^{-1} . Die in den Tabellen angegebenen mittleren Fehler sind aus den Stoßzahlen berechnet.

Isolierung der N-endständigen Aminosäuren

Die Dinitrophenylierung wurde nach der Methode von Sanger¹² vollzogen. Alle chemischen Operationen wurden im Dunkeln ausgeführt. 0,5 ml Proteinlösung wurden auf 4 ml verdünnt, 400 mg NaHCO_3 und 50 μl 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (Merck, Darmstadt) zugesetzt, die Mischung bei Zimmertemperatur 24 Stdn. geschüttelt und durch 3malige Extraktion mit je 2 ml

⁵ G. Kellner und L. Stockinger, Arch. internat. pharmacodyn. **110**, 259 (1957).

⁶ K. Waymouth, J. Nation. Cancer Inst. **22**, 1003 (1959).

⁷ D. D. Van Slyke und J. Folch, J. Biol. Chem. **136**, 509 (1940).

⁸ E. Broda und G. Rohringer, Z. Elektrochem. **58**, 634 (1954).

⁹ E. Broda, W. Rücker, O. Suschny, G. A. Abdel-Tawab und G. Kellner, Exptl. Cell Res. **23**, 555 (1961).

¹⁰ E. Broda und B. Kalab, Mikrochim. Acta [Wien] 128 (1962).

¹¹ B. Kalab und E. Broda, Internat. J. Appl. Radiation Isotopes, im Druck.

¹² F. Sanger, Biochem. J. **45**, 563 (1949).

peroxydfreien Äthers von überschüssigem Reagens befreit. Die 3 Extrakte wurden vereinigt und ihre Aktivität gemessen (Tab. 1, Zeile 1).

Die wässrige Phase wurde mit HCl (1:1) gegen Methylorange angesäuert und wieder 3mal mit Äther extrahiert. Der Extrakt enthielt dinitrophenylierte freie Aminosäuren und dinitrophenylierte kurze Peptide, die schon vor der Reaktion vorlagen oder vom Protein abgespalten worden waren, sowie freies Dinitrophenol, durch Hydrolyse von Fluordinitrobenzol oder von dinitrophenylierten Derivaten entstanden. Die Aktivität wird in Zeile 2 angegeben.

Sodann wurde die gelbe Suspension des dinitrophenylierten Proteins in Wasser bei 3000 Umdrehungen 5 Min. zentrifugiert. Die Aktivität des Überstandes findet sich in Zeile 3. Der gelbe Rückstand wurde von verbliebenem Dinitrophenol befreit, indem er im Vakuum einer Rotationspumpe über festem KOH 8 Stdn. bei 77°C (siedendes CCl₄) gehalten wurde. Dann wurde er mit 0,5 ml HCl (1:1) aufgenommen und zur Vervollständigung der Hydrolyse in einem geschlossenen Rohr 11 Stdn. auf 105°C erhitzt. Das Rohr wurde 3mal mit 0,5 ml Wasser ausgespült und die saure Lösung 3mal mit 2 ml Äther extrahiert. Der Äther des Extrakts wurde weggedampft und die Entfernung freien Dinitrophenols wie beschrieben wiederholt. Die Aktivität des Rückstandes, also der dinitrophenylierten N-endständigen Aminosäuren, wird in Zeile 4 angegeben. Wenn die Identität der markierten Aminosäure zweifelhaft wäre, könnte sie durch Papierchromatographie dieses Rückstandes ermittelt werden.

Zeile 5 der Tab. gibt die Aktivität der wässrigen Lösung nach der Äther-Extraktion. Diese Lösung enthält die nicht-N-endständigen Aminosäuren.

Die gesamte Aktivität des Proteins war in einem gesonderten Aliquot der Proteinlösung ohne Behandlung mit Fluordinitrobenzol bestimmt worden. Man erkennt, daß die Ausbeute bei der Wiedergewinnung des Radiokohlenstoffs nach der Dinitrophenylierung mehr als 91% betrug.

Tabelle 1. Verteilung der Radioaktivität über die Fraktionen nach Dinitrophenylierung

Fraktion	Aktivität (dpm je Röhrchen)	Prozent der ursprünglichen Aktivität	
1 Ätherextrakt der alkalischen Lösung	0	0	
2 Ätherextrakt der sauren Lösung	1370 ±	20	2,5
3 Wässriger Überstand	214 ±	8	0,4
4 Ätherexakt nach Hydrolyse	63 ±	5	0,1
5 Wässrige Lösung nach Hydrolyse	49200 ±	990	88,2
- Gesamtaktivität	55800 ±	1000	100,0

Isolierung der C-endständigen Aminosäuren

Eine auf dem Prinzip der Hydrazinolyse^{13, 14, 15} beruhende Methode wurde entwickelt. 0,5 ml der Proteinlösung wurden in einem starkwandigen

¹³ S. Akabori, K. Ohno, T. Ikenaka, Y. Okada, H. Hamafusa, I. Haruna, A. Tsugita, K. Sugae und T. Matsushima, Bull. Chem. Soc. Japan **29**, 507 (1956).

¹⁴ J. H. Bradbury, Nature **178**, 912 (1956).

¹⁵ J. H. Bradbury, Biochem. J. **68**, 475, 482 (1958).

Glasröhrchen gefriergetrocknet, 100 mg Hydrazin-Monosulfat und 0,5 ml wasserfreies Hydrazin (Fluka, Buchs) wurden zugefügt und das abgeschmolzene Röhrchen 16 Stdn. auf 60° erhitzt. Sodann wurde der Inhalt von überschüssigem Hydrazin befreit, indem er 24 Stdn. im Vak. über H₂SO₄ gehalten wurde. Der Rückstand wurde in 2 ml Wasser aufgelöst, 1 ml frisch destill. Benzaldehyds zugesetzt, die Suspension 24 Stdn. heftig geschüttelt, und die wässrige Lösung vom gelben Niederschlag und von überschüssigem Benzaldehyd durch Zentrifugierung getrennt. Die Aktivität des Niederschlags (Benzal-Derivate), der zusammen mit dem freien Benzaldehyd verbrannt wurde, findet sich in Tab. 2, Zeile 1.

Die wässrige Lösung wurde mit NaHCO₃ versetzt, bis kein CO₂ mehr entwich. Der dabei gebildete Niederschlag bestand vermutlich aus säurelöslichen Benzal-Derivaten (Zeile 2).

Der Überstand, der außer den C-endständigen Aminosäuren noch Benzal-Derivate enthielt, wurde, wie beschrieben, mit 200 mg NaHCO₃ und 50 µl Fluordinitrobenzol behandelt, und die Aktivität des Ätherextrakts der alkal. Lösung gemessen (Zeile 3).

Der während der Dinitrophenylierung gebildete gelbe Niederschlag, der wahrscheinlich aus dinitrophenylierten Benzal-Derivaten bestand, wurde zentrifugiert und ebenfalls gemessen (Zeile 4). Der Überstand wurde angesäuert und mit Äther extrahiert. Die Aktivitäten des Extraktes, der die dinitrophenylierten C-endständigen Aminosäuren enthielt, und der verbleibenden wässrigen Lösung finden sich in den Zeilen 5 bzw. 6.

Abermals wurde die Gesamtaktivität des Proteins in einem gesonderten Aliquot bestimmt. Fast 95% des Radiokohlenstoffs wurden in den Fraktionen wiedergewonnen.

Tabelle 2. Verteilung der Radioaktivität über die Fraktionen nach Hydrazinolyse

Fraktion	Aktivität (dpm je Röhrchen)	Prozent der ursprünglichen Aktivität
1 Niederschlag mit Benzaldehyd	16000 ± 880	30,8
2 Niederschlag nach Neutralisation	25500 ± 220	49,2
3 Ätherextrakt der alkalischen Lösung nach Dinitrophenylierung	0	0
4 Niederschlag während Dinitrophenylierung	4250 ± 90	8,2
5 Ätherextrakt der sauren Lösung nach Dinitrophenylierung	422 ± 24	0,8
6 Verbleibende saure Lösung	3080 ± 70	5,9
- Gesamtaktivität	52000 ± 1000	100,0

Diskussion

Die Experimente bestätigen, daß HeLa-Zellen markiertes Leucin in lösliche Proteine einbauen — im vorliegenden Fall etwa 5% des angebotenen Radioleucins. Die Experimente bestätigen auch, daß die freien Aminosäuren beim Waschen des Proteins auf dem Ultrafilter fast voll-

ständig entfernt werden; andernfalls würde die Fraktion 2 (Tab. 1) erhebliche Radioaktivität zeigen. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß die kleine Aktivität der genannten Fraktion auf eine proteolytische Wirkung des als Träger zugesetzten Serums zurückzuführen ist¹⁶.

Nur 0,1% des eingebauten Radiokohlenstoffs finden sich in N-endständigen Aminosäuren (Tab. 1, Zeile 4), nur 0,8% in C-endständigen Aminosäuren (Tab. 2, Zeile 5). Man muß obendrein berücksichtigen, daß von der Hydrazinolyse eher zu hohe als zu niedrige Werte zu erwarten sind. Es ist nämlich möglich, daß vom C-Ende der Kette freie Peptide statt freier Aminosäuren abgelöst werden, oder daß Hydrazide hydrolysiert werden. Im ganzen ist demnach auszuschließen, daß die Radioaktivität des Proteins zu einem nennenswerten Teil durch eine Anlagerung von radioaktiver Aminosäure an vorgebildetes Protein während der Inkubation verursacht ist. Die Aufnahme von Radiokohlenstoff durch das Protein der gezüchteten Zellen ist vielmehr auf den Einbau von radioaktiver Aminosäure zurückzuführen, wie er bei der Synthese von Proteinen de novo erfolgt.

Die Tatsache, daß die verhältnismäßig große Menge an Protein in natürlichem Medium in Abwesenheit von Zellen keine Aufnahme von Radiokohlenstoff bewirkt⁴, beweist das Fehlen eines wirkungsvollen nicht-enzymatischen Mechanismus für die Anlagerung von Aminosäuren an Proteine. Die Geringfügigkeit der Aktivität der Endgruppen der Proteine nach Inkubation in Gegenwart von Zellen, wie sie jetzt festgestellt wurde, zeigt weiterhin, daß die HeLa-Zellen keine Enzyme nennenswerter Aktivität besitzen, die eine derartige Anlagerung bewirken könnten. Die kleine Aktivität der Endgruppen beruht mindestens zum Teil darauf, daß ein Teil der neu gebildeten Proteinmoleküle endständiges Leucin enthalten dürfte, wie die folgende Überlegung nahelegt.

Die löslichen Proteine von HeLa- (oder anderen) Zellen sind natürlich heterogen. Daher mögen einige statistische Abschätzungen zulässig sein. Es seien n verschiedene Aminosäuren über eine Mischung von Proteinen gleichmäßig verteilt, und jede der p Proteinketten enthalte im Mittel q Aminosäurereste. Dann haben p/n Ketten als N-Endgruppen Leucin und jede Kette enthält q/n Leucinreste. Daher ist das Verhältnis N-endständiges Leucin / gesamtes Leucin gleich $(p/n)/(pq/n) = 1/q$. Im gegebenen Fall (Tab. 1) ist $1/q \sim 0,001$ und $q \sim 1000$. Dies entspricht einem mittleren Molekulargewicht W des Proteins von etwa $1,2 \cdot 10^5$.

Eine analoge Berechnung in bezug auf die C-endständigen Gruppen (Tab. 2) mit $1/q \sim 0,008$ ergibt $q \sim 125$ und $W \sim 1,5 \cdot 10^4$. Dieser Wert von W ist offenbar zu klein, was im Hinblick auf die genannten Fehler der Hydrazinolyse nicht überrascht. Nichtsdestoweniger ist klar,

¹⁶ H. Eagle, Proc. Nat. Acad. Sci. [Wash.] **46**, 427 (1960).

daß auch die C-endständige Aufnahme von Leucin durch vorgebildetes HeLa-Protein geringfügig oder null ist.

Wir danken dem Jane Coffin Childs Memorial Fund for Medical Research für großzügige finanzielle Unterstützung, der Internationalen Atomenergie-Organisation (I. A. E. A.) für ein Stipendium („Fellowship“) für *A. Z. B.*, und Herrn Dr. *G. Kreil* (Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät) für wertvolle Ratschläge.