

Elektrophoretische Mobilität aktiver *Escherichia coli*-Ribosomen in Polyacrylamidgelen*

Von

K. Bauer** und E. Kückler

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien, Österreich

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 14. Juni 1974)

Electrophoretic Mobility of Active Escherichia Coli Ribosomes on Polyacrylamide Gels

70 *S* *Escherichia coli* ribosomes are separated into three bands by electrophoresis on polyacrylamide gels. Active ribosomes containing [³⁵S]fMet-tRNA^{fMet} at the donor site or [³H]Val-tRNA at the acceptor site comigrate with both main bands.

Untersuchungen der Proteinzusammensetzung von Ribosomen des Bakteriums *Escherichia coli* haben gezeigt, daß die nach den üblichen Methoden erhaltenen Ribosomenpräparationen ein Gemisch verschiedener Species darstellen¹⁻⁴. Einen ersten Hinweis auf eine funktionelle Heterogenität lieferte die Tatsache, daß in vitro nur ein kleiner Teil der Ribosomen eines Bakterienhomogenates aktiv an der Proteinbiosynthese beteiligt ist. Die strukturelle Heterogenität der Ribosomen wird am besten durch die elektrophoretische Auftrennung von Ribosomen an Polyacrylamidgelen veranschaulicht, wie sie von *Dahlberg et al.*⁵ und von *Talens et al.*^{6, 7} beschrieben worden ist. Durch das hohe Auflösungsvermögen dieser Technik konnte gezeigt werden, daß 70 *S*-Ribosomen sowie 50 *S*- und 30 *S*-Untereinheiten durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese in mehrere Banden aufgespalten werden können. Diese Heterogenität könnte sowohl auf strukturelle Unterschiede, bedingt durch verschiedene Proteinzusammensetzungen, als auch auf Unterschiede in den Konformationen zurückzuführen sein. Verschiedene Befunde, wie die Abhängigkeit der elektrophoretischen

* Herrn Prof. Dr. *Otto Hoffmann-Ostenhof* zum 60. Geburtstag gewidmet.

** Gegenwärtige Adresse: I. Medizinische Universitätsklinik, Lazarettgasse 14, A-1090 Wien, Österreich.

Mobilität von der Salzkonzentration, die Effekte thermischer Vorbehandlung und das Verhalten in der Gelgradienten-Elektrophorese, deuten darauf hin, daß Konformationsunterschiede dabei eine wesentliche Rolle spielen⁷.

Messung des Tritiumaustausches während der Translokation und Verschiedenheiten im Dissoziationsverhalten^{8, 9} zwischen Ribosomen, die Aminoacyl-tRNA in der Donorstelle, und solchen, die Aminoacyl-tRNA in der Akzeptorstelle enthalten, weisen auf Konformationsänderungen des Ribosoms während der einzelnen Schritte der Proteinbiosynthese hin. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, in welchen Banden eines Elektropherogramms von Ribosomen sich die aktiven Ribosomen befinden. Weiters soll mit Hilfe der Elektrophorese festgestellt werden, ob ein Unterschied in der Konformation der Ribosomen besteht, je nachdem, ob Aminoacyl-tRNA an die Donor- oder an die Akzeptorstelle gebunden ist. Dieses Problem wurde schon von anderen Autoren^{8, 9} mit Hilfe von Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten untersucht. Demgegenüber hat die elektrophoretische Methode den Vorteil einer besseren Auflösung; außerdem werden Zentrifugationsartefakte, die durch druckinduzierte Dissoziation hervorgerufen werden können¹⁰⁻¹³, vermieden.

Als Modellsysteme wurden ribosomale Initiationskomplexe hergestellt, die ³⁵[S]fMet-tRNA^{fMet} in der Donorstelle gebunden haben, und deren elektrophoretische Mobilität mit jener von ribosomalen Komplexen, die [³H]Val-tRNA in der Akzeptorstelle enthalten, verglichen.

Material und Methoden

Bindungspuffer: 50 mMol KCl, 10 mMol NH₄Cl, 0,1 Mol Tris-HCl pH 7,4, 6 mMol Mercaptoäthanol, 5 mMol Magnesiumacetat ad 1 l. Präinkubierte Ribosomen aus *E. coli* D 10 (14) wurden mittels Zentrifugation durch 1M-Saccharose-Lösung in Bindungspuffer gereinigt. [³H]Val-tRNA wurde mit [³H]L-Valin (Amersham), spezif. Aktivität 31,6 Ci/mMol, präpariert. Spezifische Aktivität des Endproduktes $4,3 \times 10^7$ Ipm/mg tRNA. [³⁵S]fMet-tRNA wurde mit [³⁵S]Methionin (Amersham), Spezif. Aktivität 130 Ci/mMol, präpariert. Spezif. Aktivität zur Zeit der Verwendung $5,3 \times 10^7$ Ipm/mg tRNA. Elongationsfaktor *T* (Gemisch von *Tu* und *Ts*) wurde nach Gordon et al.¹⁵ isoliert. Poly (A, G, U) von Boehringer Mannheim hatte eine Sedimentationskonstante von 6—8 S.

[³H]Val-tRNA-Ribosomen-Komplexe

Die Bindung von Val-tRNA an Ribosomen erfolgte nach einer Modifikation der Methode von Gupta et al.¹⁶.

Ansatz *A* enthielt in Bindungspuffer: GTP 0,4 mMol/l, Ribosomen 4,7 mg/ml, Poly(A, G, U) 0,15 mg/ml, tRNA (ungeladen) 0,36 mg/ml. Die Lösung wurde 10 Min. bei 37 °C inkubiert und auf 0 °C abgekühlt. Ansatz *B* enthielt in Bindungspuffer: GTP 0,012 mMol/l, Elongations-

faktor T 9 $\mu\text{g/ml}$, [^3H]Val-tRNA 0,28 mg/ml. Es wurde 5 Min. bei 37 °C inkubiert und auf 0 °C abgekühlt.

Ansatz *A* und *B* wurden im Verhältnis 3 : 2 (*v/v*) gemischt und 20 Min. bei 0 °C gehalten. Anschließend inkubierten wir 10 Min. bei 20 °C und kühlten die Probe sofort wieder auf 0 °C ab. Danach wurde die Magnesiumionen-Konzentration auf 10 mMol/l erhöht und die Probe weitere 10 Min. bei 0 °C gehalten. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 0°—4 °C.

[^{35}S]fMet-tRNA-Ribosomen-Komplex

Die Herstellung der [^{35}S]fMet-tRNA-Ribosomen-Komplexe erfolgte analog wie oben beschrieben, wobei zu Ansatz *B* an Stelle der [^3H]Val-tRNA 0,022 mg/ml [^{35}S]fMet-tRNA zugesetzt und die ungeladene tRNA in Ansatz *A* weggelassen wurden.

Puromycin-Reaktion

Zur Überprüfung der Reaktivität mit Puromycin wurden aliquote Teile der oben beschriebenen Aminoacyl-tRNA-Ribosomen-Komplexe verwendet. 50 μl der Lösung des [^3H]Val-tRNA-Ribosomen-Komplexes und 25 μl der Lösung des [^{35}S]fMet-tRNA-Ribosomen-Komplexes wurden mit Puromycin bis zu einer Endkonzentration von 2 mMol/l versetzt.

Nach einer Inkubation von 10 Min. bei 20 °C wurden die Proben mit 2 ml eiskaltem Bindungspuffer, die 50 mMol KCl, 10 mMol NH_4Cl , 0,1 Mol Tris/HCl pH 7,4, 10 mMol Magnesiumacetat und 6 mMol Mercaptoäthanol ad 11 enthielten, verdünnt, langsam durch Milliporefilter filtriert und letztere 3mal mit je 3 ml desselben Puffers gewaschen¹⁷. Nach der Trocknung zählten wir die Filter im Toluol-Szintillator.

Gradienten-Zentrifugation

Die [^3H]Val-tRNA-Ribosomen-Komplexe und die [^{35}S]fMet-tRNA-Ribosomen-Komplexe wurden auf separaten Gradienten gereinigt. Genau 10 Min. nach Zugabe von Ribonuklease A (0,1 $\mu\text{g/ml}$) wurden je 0,5 ml des Inkubationsgemisches auf einen 5 ml Saccharose-Gradienten (5—20% g/g in Bindungspuffer) gelegt, der dritte Gradient mit 70 S-Ribosomen als Vergleichsprobe beschichtet und 3 Stdn. bei 33 000 U/Min. zentrifugiert (Beckman Rotor SW 50). Die Position der 70 S-Ribosomen wurde durch Messung des Extinktionsprofils des Vergleichsgradienten bestimmt. Danach erfolgte Teilung der übrigen Gradienten in Fraktionen zu je 0,3 ml und Bestimmung des Radioaktivitätsprofils. Die Fraktionen aus der 70 S-Region wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Elektrophorese

Acrylamid (Merck) wurde durch Umkristallisieren aus CHCl_3 gereinigt. Polyacrylamidgele wurden nach *Loenig*¹⁸ hergestellt, Durchmesser 5 mm, Länge 100 mm, die Gelkonzentration betrug 3,5%. Elektrophoresepuffer: 50 mMol Tris-Acetate pH 7,0, 74 mMol Ammoniumacetat, 10 mMol Magnesiumacetat ad 1 l. Eine Umwälzanlage zwischen Kathoden- und Anodengefäß garantierte konstanten pH-Wert während der Elektrophorese. Zunächst wurde eine Präelektrophorese 60 Min. bei 8 mA/Gel, 100 V und 4 °C durchgeführt. Kurz vor dem Auftragen der Proben auf die Gele erfolgte die Mischung der bis zu diesem Punkt getrennt präparierten ribosomalen [^3H]Val-tRNA- und [^{35}S]fMet-tRNA-Komplexe. Dabei wurde

das Mischungsverhältnis mit 50:3 (*v/v*) so gewählt, daß Messung und Auswertung der Doppelmarkierung in einem optimalen Bereich erfolgen konnte. Die Dauer der Elektrophorese war 24 Std. bei 8 mA/Gel, 100 V und 4  C. Die Messung des Profils der Extinktion bei 260 nm im Gilford-Spektrophotometer ergab die Basis für die Zuordnung der Radioaktivität zu bestimmten ribosomalen Partikeln. Danach wurden die Gele gefroren, geschnitten, und jedes Scheibchen (1 mm Dicke) einzeln im Szintillatort aschchen mit 0,3 ml 4M-NH₃ 3 Std. bei 50  C inkubiert. Der Ammoniak wurde über Nacht abgedampft und die Radioaktivität in Triton-Toluol-Szintillator bestimmt.

Tabelle 1.

Wirkung von Puromycin auf Aminoacyl-tRNA-Ribosomen-Komplexe.
Puromyinkonzentration im Ansatz 2 mM-, Inkubation 10 Min. bei 20  C

	[³⁵ S]fMet-tRNA [Ipm]	[³ H]Val-tRNA [Ipm]
+ Poly(A, G, U), — Puromycin	12 993	15 538
+ Poly(A, G, U), + Puromycin	1 674	13 407
— Poly(A, G, U), — Puromycin	739	618

Ergebnisse

Aminoacyl-tRNA kann selektiv an die Donor- oder Akzeptorstelle des Ribosoms gebunden werden. Als Test für die Position der Aminoacyl-tRNA wurde die Reaktion mit Puromycin verwendet. Wird [³⁵S]fMet-tRNA^{fMet} in 5 mM-Mg²⁺ in Gegenwart von Initiationsfaktoren und Poly(A, G, U) an Ribosomen gebunden, so können — wie die Tabelle zeigt — 87% des [³⁵S]fMet mit Puromycin reagieren und als fMet-Puromycin abgespalten werden. Dies beweist, daß sich fMet-tRNA^{fMet} unter diesen Bedingungen ausschließlich an die Donorstelle bindet. Hingegen erfolgt die enzymatische Bindung von [³H]Val-tRNA bei 5 mM-Mg²⁺ Ionenkonzentration in Gegenwart von Poly(A, G, U), Elongationsfaktor *T* und GTP an die Akzeptorstelle des Ribosoms; wie die Tabelle zeigt, waren nach der Puromycinbehandlung 86% des [³H]Val noch an Ribosomen gebunden.

Um die ribosomalen Komplexe von freier Aminoacyl-tRNA abzutrennen, wurden die Reaktionsgemische nach der Inkubation auf Saccharose-Gradienten zentrifugiert und die Fraktionen der 70 S-Ribosomen gesammelt. Die getrennt isolierten [³⁵S]fMet-tRNA-Ribosomen-Komplexe und [³H]Val-tRNA-Ribosomen-Komplexe wurden anschließend gemischt und der Elektrophorese auf Polyacrylamidgelen unterworfen. Abb. 1 zeigt das typische Ergebnis eines derartigen Experiments. Wie das Profil des bei 260 nm absorbierenden Materials zeigt, wurden 70 S-Ribosomen bei Elektrophorese auf 3,5% Poly-

acrylamidgelen in zwei Banden (*B*, *C*) aufgespalten. Daneben trat auch eine langsamer wandernde Bande (*A*) auf, die jedoch weniger als 10% der gesamten Ribosomen repräsentiert. Aktive Ribosomen waren in beiden Hauptbanden *B* und *C* zu finden; es ergab sich jedoch kein Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit zwischen Initiationskomplexen, die [³⁵S]fMet-tRNA in der Donorstelle, und ribosomalen Komplexen, die [³H]Val-tRNA in der Akzeptorstelle gebunden haben.

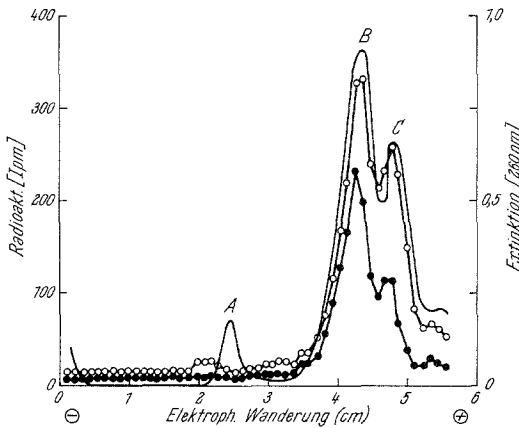


Abb. 1. Elektrophorese von 70 *S*-Ribosomen an Polyacrylamidgelen. [³⁵S]fMet-tRNA- und [³H]Val-tRNA-Ribosomen-Komplexe wurden in separaten 5—20%-Saccharose-Gradienten gereinigt, die 70 *S*-Fraktionen entnommen und gemischt. Pro Gel wurden 0,03 mg Ribosomen aufgetragen. ●● Radioaktivität von [³⁵S]Met; ○○ Radioaktivität von [³H]Val; — Extinktion bei 260 nm

Diskussion

Eine wesentliche Voraussetzung für diese elektrophoretischen Experimente war die Verwendung stabiler Aminoacyl-tRNA-Ribosomen-Komplexe.

Das „random Polymer“ Poly(A, G, U) besitzt Codons sowohl für Formylmethionin als auch für Valin. Präinkubierte Ribosomen, die mittels einer Zentrifugation durch eine Saccharoselösung gereinigt worden sind, enthalten die Initiationsfaktoren an 30 *S*-Untereinheiten gebunden. Sie stellen eine sehr effiziente Präparation für die Translation von *R* 17-Phagen-RNA dar¹⁴. Die in unseren Experimenten verwendeten präinkubierten Ribosomen brauchen daher keine exogenen Initiationsfaktoren für die Bindung von fMet-tRNA^{fMet}. Aus der Puromycin-

Reaktion kann geschlossen werden, daß sich fMet-tRNA^{fMet} erwartungsgemäß auch in Gegenwart des synthetischen Polymeren Poly(A, G, U), ebenso wie mit *R* 17-Phagen-RNA als messenger-RNA ausschließlich an die Donorstelle bindet¹⁹.

Die Zugabe von Elongationsfaktor *T* und GTP ist jedoch für die Bindung von Val-tRNA in 5 mM-Mg²⁺ absolut erforderlich²⁰. Der enzymatischen Bindung von Aminoacyl-tRNA an die Akzeptorstelle geht die Besetzung der Donorstelle durch ein Molekül ungeladene tRNA voraus²¹. Daher wurde als zusätzlicher Schritt eine Präinkubation der Ribosomen mit einem Gemisch aus ungeladener tRNA durchgeführt. Erfolgt die Bindung unter den oben angegebenen Bedingungen, so besitzen diese Komplexe genügende Stabilität für die Zentrifugation auf Saccharose-Gradienten und für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Die nicht-enzymatische Bindung von Val-tRNA in 20 mM-Mg²⁺ ergibt hingegen instabile Komplexe, die bereits bei der Zentrifugation in Saccharose-Gradienten dissoziieren (nicht publizierte Experimente).

Um Polysomen zu zerstören, wurden die Inkubationsgemische 10 Min. bei 0 °C mit 0,1 µg/ml Ribonuklease behandelt. Die messenger-RNA zwischen den einzelnen Ribosomen wird dabei soweit abgebaut, daß eine Umwandlung der Polysomen in monomere Ribosomen erfolgt. Frühere Experimente von Küchler et al.²² haben gezeigt, daß die Aktivität von *E. coli*-Ribosomen auch nach 2stdg. Behandlung mit 10 µg/ml Ribonuklease A bei 0 °C noch erhalten bleibt und daß die gebundene tRNA gegen Verdauung mit Ribonuklease resistent ist. Die bei Gelelektrophorese beobachtete Aufspaltung der 70 S-Ribosomen in mehrere Banden ist mit Sicherheit nicht auf die Ribonukleasebehandlung zurückzuführen, da diese Heterogenität auch bei unbehandelten Ribosomen gefunden wird⁷.

In der Gelelektrophorese wurden 70 S-Ribosomen in drei Banden aufgespalten, von denen nur die beiden Hauptbanden *B* und *C* aktive Ribosomen enthielten. Ob es sich bei der am langsamsten wandernden Bande *A* um eine entfaltete Konfiguration oder um inaktive 70 S-Dimere handelt, kann auf Grund der bisherigen Experimente nicht entschieden werden. [³⁵S]fMet-tRNA- und [³H]Val-tRNA-Ribosomen-Komplexe findet man sowohl in Bande *B* als auch in Bande *C*. In einigen Experimenten wurde ein relatives Überwiegen der [³⁵S]fMet-tRNA-Ribosomen-Komplexe in Bande *B* gefunden (siehe Abb.); eine Interpretation dieser Beobachtung bedarf weiterer Untersuchungen.

Unter den von uns gewählten Bedingungen haben nur insgesamt 2,4% der Ribosomen Aminoacyl-tRNA gebunden. Diese Komplexe besitzen die gleiche elektrophoretische Mobilität wie die inaktiven Ribosomen. Es kann daher weder die Bindung von fMet-tRNA^{fMet}

an die Donorstelle noch die Bindung von Val-tRNA an die Akzeptorstelle einen starken Einfluß auf die Konformation des Ribosoms haben.

Diese Experimente stellen einen weiteren Beweis dafür dar, daß die von anderen Autoren beobachteten Differenzen im Sedimentationsverhalten ribosomaler Komplexe, die Aminoacyl-tRNA in der Donor- bzw. Akzeptorstelle gebunden haben, auf Artefakte der Zentrifugation zurückgehen⁸⁻¹³. Strukturunterschiede, die zu einer im Saccharose-Gradienten beobachtbaren Änderung in der Sedimentationskonstante führen, sollten zweifellos in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese erkennbar sein. Der von *Chuang* und *Simpson*⁸ beobachtete erhöhte Tritiumaustausch während der Translokation scheint daher primär auf dynamische Vorgänge während des Transports von Peptidyl-tRNA und messenger-RNA zurückzuführen zu sein.

Diese Arbeit wurde vom Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung gefördert. Wir danken Herrn Prof. Dr. *H. Tuppy* für wertvolle Anregungen und Diskussionen.

Literatur

- ¹ *G. R. Craven, P. Voynow, S. J. S. Hardy* und *C. G. Kurland*, *Biochem.* **8**, 2906 (1969).
- ² *H. J. Weber*, *Molec. gen. Genet.* **119**, 233 (1972).
- ³ *E. Deusser*, *Molec. gen. Genet.* **119**, 249 (1972).
- ⁴ *E. Deusser* und *H. G. Wittmann*, *Nature* **238**, 269 (1972).
- ⁵ *A. E. Dahlberg, C. W. Dingman* und *A. C. Peacock*, *J. Mol. Biol.* **41**, 139 (1969).
- ⁶ *J. Talens, F. Kalousek* und *L. Bosch*, *FEBS Lett.* **12**, 4 (1970).
- ⁷ *A. Talens, O. P. van Diggelen, M. Brongers, L. M. Popa* und *L. Bosch*, *Eur. J. Biochem.* **37**, 121 (1973).
- ⁸ *D. M. Chuang* und *M. V. Simpson*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**, 1474 (1971).
- ⁹ *J. Waterson, M. L. Sopori, S. L. Gupta* und *P. Lengyel*, *Biochem.* **11**, 1377 (1972).
- ¹⁰ *A. A. Infante* und *R. Baierlein*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**, 1780 (1971).
- ¹¹ *A. A. Infante* und *M. Krauss*, *Biochim. Biophys. Acta* **246**, 81 (1971).
- ¹² *O. P. van Diggelen, H. Oostrom* und *L. Bosch*, *FEBS Lett.* **19**, 115 (1971).
- ¹³ *M. Noll, B. Hapke, M. H. Schreier* und *H. Noll*, *J. Mol. Biol.* **75**, 281 (1973).
- ¹⁴ *E. Küchler* und *A. Rich*, *Nature* **225**, 920 (1970).
- ¹⁵ *J. Gordon, J. Lucas-Lenard* und *F. Lipmann*, *Methods Enzymol.* **20**, 281 (1971).
- ¹⁶ *S. L. Gupta, J. Waterson, M. L. Sopori, S. M. Weissmann* und *P. Lengyel*, *Biochem.* **10**, 4410 (1971).
- ¹⁷ *P. Leder*, *Methods Enzymol.* **12**, 725 (1968).
- ¹⁸ *U. Loening* und *J. Ingle*, *Nature* **215**, 363 (1967).

- ¹⁹ *P. Leder* und *H. Bursztyn*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **25**, 233 (1966).
- ²⁰ *J. Lucas-Lenard* und *F. Lipmann*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **55**, 1562 (1966).
- ²¹ *N. De Groot*, *A. Panet* und *Y. Lapidot*, *Eur. J. Biochem.* **23**, 523 (1971).
- ²² *E. Kuchler*, *K. Bauer* und *A. Rich*, *Biochim. Biophys. Acta* **277**, 615 (1972).

Dr. E. Kuchler
Institut für Biochemie
Universität Wien
Währinger Straße 17
A-1090 Wien
Österreich