

Tagesrhythmus des Ribosomensystems der Rattenleber unter der Wirkung von Cycloheximid

Daily Rhythm of the Ribosomal System in Rat Liver after Application of Cycloheximide

LOTHAR DIEMINGER

I. Zoologisches Institut, Göttingen

(Z. Naturforsch. 28c, 72—74 [1973]; eingegangen am 2. August/27. November 1972)

Daily rhythm, ribosomes, rat liver, cycloheximide

Intraperitoneal injections of 2 mg or 5 mg cycloheximide per 100 g body weight into male Sprague-Dawley rats, 3 months old, induce a doubling of the amount of membrane-bound ribosomes after 1 hour. After 2—3 hours the control value is reached and a slow decrease in the number of bound ribosomes can be observed thereafter. The concentration of free ribosomes decreases very markedly during the first hour after injection and more slowly during the following time. Injections of cycloheximide (5 mg / 100 g; 20 min before sacrifice) at different times of day result in a bimodal curve of bound ribosomes with maxima at 9—12 h and 21 h, the maxima of free ribosomes appears at the same time as the maximum of the controls (9—12 h). Analysing the amount of bound ribosomes 3 hours after the injection of cycloheximide a bimodal rhythm can also be observed, the latter curve, however, is phaseshifted for 3—6 hours and appears at a lower level. No rhythm can be detected in the free ribosomal fraction after this treatment. Administration of cycloheximide causes a decrease in protein content of both free and bound ribosomes.

Einleitung

Im Zusammenhang mit den tagesrhythmischen Änderungen der RNA- und Proteinsynthese in der Rattenleber (Zusf. HARDELAND ¹) stehen tagesrhythmische Schwankungen der Menge freier Ribosomen und der Anheftung von Ribosomen an das endoplasmatische Reticulum unter dem Einfluß von Steroidhormonen (DIEMINGER ²). Die Tagesrhythmen des Ribosomensystems können nach dieser Unterscheidung einmal von der rhythmischen Degradationsrate der Ribosomen, zum anderen von der Rhythmik der RNA-Synthese und Transport abhängen, ferner von der Proteinsynthese und verschiedenen Faktoren der Membranbindung (DIEMINGER ²). Um die Einflüsse der Proteinsynthese auf das System weiter zu analysieren, wurde die Proteinsynthese mit Cycloheximid gehemmt und der Gehalt der Leber an freien und gebundenen Ribosomen während 24 Stdn. bestimmt. Außerdem wurde das RNA-Protein-Verhältnis unter der Wirkung dieses Antibiotikums zu verschiedenen Tageszeiten untersucht.

Material und Methoden

Sprague-Dawley Ratten wurden im Licht-Dunkel-Wechsel (LD 12 : 12 Stdn.; L 6—18⁰⁰) gehalten und bekamen Futter (Altromin Typ 1300) und Wasser *ad*

libitum. Zu den Versuchen verwendete ich männliche Tiere mit einem Gewicht von 250—350 g, die dann etwa drei Monate alt waren. Die Methode zur Isolierung der freien und gebundenen Ribosomen wurde von BLOBEL und POTTER ³, DAILLIE u. Mitarb. ⁴ und PRUDHOMME u. Mitarb. ⁵ übernommen. Dabei wurden die freien Ribosomen aus dem postmitochondrialen Überstand, die an das ER gebundenen Ribosomen aus dem Sediment durch Behandlung mit Desoxycholat gewonnen. Die quantitative Bestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm; vergl. DIEMINGER ².

Befunde

1. Zeitliche Änderung der Ribosomenmenge und der Bindungsverhältnisse nach Cycloheximidinjektion (Abb. 1)

Um den zeitlichen Verlauf der Wirkung von Cycloheximid genauer zu untersuchen, habe ich zu einer Tageszeit (9⁰⁰) 2 mg bzw. 5 mg Cycloheximid / 100 g Körpergewicht injiziert. Bei jeweils 6 Tieren habe ich 30 min, 1 Std., 1,5 Stdn., 2,5 Stdn., 3,5 Stdn., 4,5 Stdn. und 5,5 Stdn. bzw. 15 min, 30 min, 1 Std., 1,5 Stdn., 2 Stdn. und 3 Stdn. nach der Injektion die Ribosomen isoliert.

Sonderdruckanforderungen an L. DIEMINGER, I. Zool. Institut d. Univ., D-3400 Göttingen, Berliner Str. 28.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

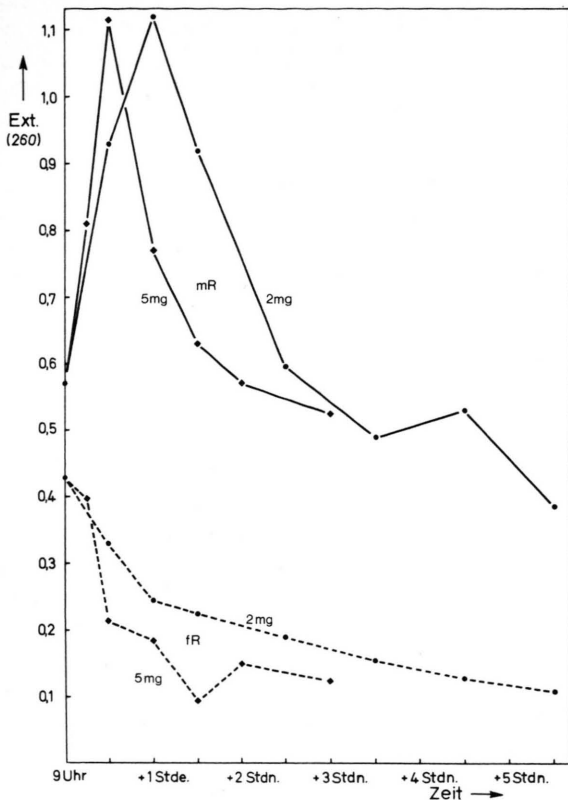


Abb. 1. Zeitliche Änderung der freien (---, fR) und der membrangebundenen (—, mR) Ribosomen nach Cycloheximidinjektion. \blacklozenge 5 mg/100 g, \bullet 2 mg Cycloheximid auf 100 g Körpergewicht. Injektionen um 9⁰⁰, Abszisse: Zeit nach der Injektion, Ordinate: Extinktion der Ribosomensuspension bei 260 nm.

Es ergibt sich für beide Dosierungen bei den gebundenen Ribosomen ein steiler Anstieg der Extinktion, die erst nach etwa 2—3 Std. den Ausgangswert wieder erreicht. Bei den freien Ribosomen nimmt die Extinktion gleich nach der Injektion ab und liegt nach 2—3 Std. bei etwa 1/3 des Ausgangswertes.

2. Freie und gebundene Ribosomen nach Cycloheximidinjektion während 24 Std.

Von besonderem Interesse war die Frage, wie sich die Wirkung des Cycloheximids auf das Ribosomensystem im Laufe des Tages ändert. Zu jedem Zeitpunkt wurden neun Tieren jeweils 2 mg Cycloheximid / 100 g Körpergewicht *i. p.* injiziert. Bei allen Versuchen mit Cycloheximid habe ich die injizierten Tiere von den nicht injizierten Kontrollen isoliert (vgl. DIEMINGER²), sonst aber unter gleichen Bedingungen gehalten.

20 min nach der Injektion von Cycloheximid (Abb. 2) liegen die Extinktionswerte für die freien Ribosomen insgesamt etwas niedriger als bei den Kontrollen, der Rhythmus ist in der Phasenlage aber nicht wesentlich verändert. Das breite Minimum liegt bei 15—21⁰⁰. Dagegen ist die Extinktion für die gebundenen Ribosomen zu bestimmten Zeiten den Kontrollen gegenüber deutlich angestiegen (DIEMINGER²), liegt jedoch um 18⁰⁰ darunter. Der Verlauf ist zweigipflig: Minima liegen bei 6 und 18⁰⁰.

3 Std. nach Injektion von 2 mg Cycloheximid / 100 g Körpergewicht ist folgende Reaktion zu beobachten (Abb. 3): Der Rhythmus der freien Ribosomen verschwindet nun vollständig und die Werte liegen alle erheblich unter den Kontrollen. Die gebundenen Ribosomen zeigen einen ähnlichen Verlauf wie 20 min nach der Injektion. Die Extinktionswerte liegen jedoch niedriger und sind in ihrem Rhythmus um 3-6 Std. phasenverschoben. So liegen die Minima bei 9 und 21⁰⁰.

3. RNA-Protein-Verhältnis

Einen Hinweis auf die Faktoren, die für tagesrhythmische Änderungen der Ribosomenbindung verant-

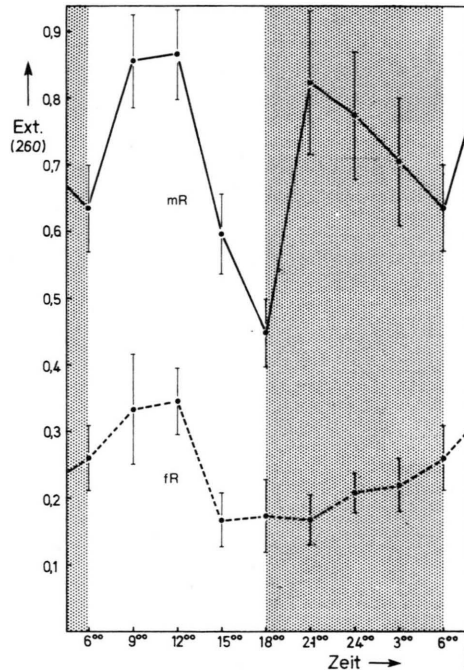


Abb. 2. Freie (fR) und membrangebundene (mR) Ribosomen 20 min. nach der Injektion von 2 mg Cycloheximid auf 100 g Körpergewicht. Abszisse: Tötungszeit, Ordinate: wie in Abb. 1, senkrechte Striche: dreifacher mittlerer Fehler.

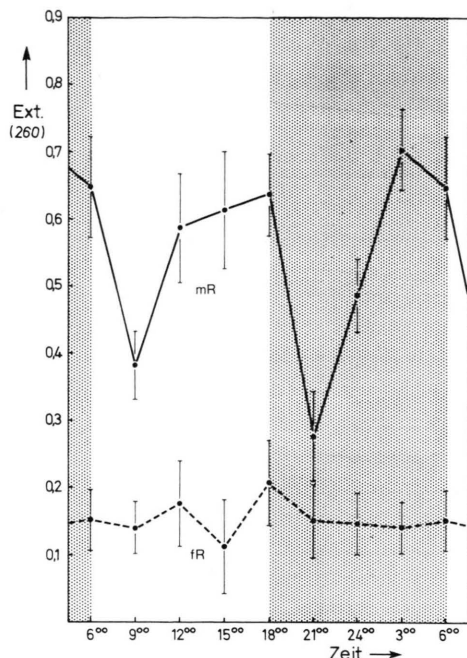


Abb. 3. Freie (fR) und membrangebundene (mR) Ribosomen 3 Std. nach der Injektion von Cycloheximid (2 mg/100 g). Abszisse und Ordinate wie in Abb. 2.

wortlich sein könnten, kann man von der Analyse des RNA-Protein-Verhältnisses bei freien und gebundenen Ribosomen im Laufe von 24 Std. erwarten und von den möglichen Änderungen durch Behandlung mit Cycloheximid. Dazu habe ich jeweils an zwei Tages-

Tab. I. Prozentuale Verteilung von RNA und Protein auf Ribosomen.

	Tötungszeit	gebundene Ribosomen		freie Ribosomen	
		RNA	Prot.	RNA	Prot.
Kontr.	6 ⁰⁰	31	69	32	68
	18 ⁰⁰	32	68	45	55
Cyclo.	6 ⁰⁰	37	63	43	57
	21 ⁰⁰	38	62	52	48

zeiten den RNA- und Protein-Anteil der isolierten Ribosomen von je acht Tieren bestimmt. Die Injektion von 2 mg Cycloheximid / 100 g Körpergewicht erfolgte 3 Std. vor der Tötung.

Dabei ergibt sich eine Erhöhung des RNA-Protein-Quotienten sowohl bei gebundenen als auch bei freien Ribosomen, die auf einer Verminderung des Proteinanteils beruht. Tageszeitliche Veränderungen des Verhältnisses sind nur bei den freien Ribosomen zu beobachten.

Diskussion

Der zeitliche Verlauf sowie die tageszeitlich verschiedene Wirkung von Cycloheximidinjektionen sind bisher nicht eindeutig zu interpretieren. Nach den Befunden von DÖRING u. RENSING⁶ und TABER u. VINCENT⁷ folgt auf die Injektion von Cycloheximid in den ersten 15 min eine Akkumulation von RNA im Kern, die in den folgenden 15–30 min stark vermindert wird (vgl. MURAMATSU u. Mitarb.⁸). Dieser Schub von ribosomaler RNA aus dem Kern, möglicherweise eine Kompensationsreaktion, könnte dann zu dem hier beobachteten Maximum von gebundenen Ribosomen führen, wenn man annimmt, daß gleichzeitig durch Cycloheximid eine Membranbindung stimuliert wird. Denkbar wäre beispielsweise eine spezielle Hemmung von Faktoren, die für die Ablösung von Ribosomen vom ER verantwortlich sind. Die absolute Zunahme der gesamten Ribosomenmenge zwischen 9 und 12⁰⁰ könnte durch tagesrhythmisch vermehrte Ausschüttung aus dem Nucleolus und eine erhöhte Transportrate zu dieser Tageszeit (vgl. DÖRING u. RENSING⁶) gedeutet werden.

Während Hydrocortison bei gebundenen und freien Ribosomen jeweils eine Erhöhung des relativen Proteinanteils um etwa 6–10 % bewirkt (DIEMINGER²), senkt Cycloheximid den Anteil um 6–10 %. Da trotzdem zeitweise ein gleichgerichteter Effekt auf die ER-Bindung zu beobachten ist, liegt der Schluß nahe, daß durch Cycloheximid Proteine abgelöst werden, die nicht die Bindung betreffen.

¹ R. HARDELAND, D. HOHMANN u. L. RENSING, J. interdiscipl. Cycle Res., im Druck.

² L. DIEMINGER, Z. Naturforsch. **28c**, [1973].

³ G. BLOBEL, VAN R. POTTER, J. molecular Biol. **26**, 279 [1967].

⁴ J. DAILLIE, L. GRASSET, J. C. PRUDHOMME, J. P. BECK, J. P. EBEL, FEBS letters **13**, 321 [1971].

⁵ J. C. PRUDHOMME, M. GUELIN, L. GRASSET, J. DAILLIE, Exp. Cell Res. **63**, 373 [1970].

⁶ R. DÖRING, L. RENSING, Comparat. Biochem. Physiol., im Druck.

⁷ R. L. TABER jr., W. S. VINCENT, Biochem. biophysic. Res. Commun. **34**, 488 [1969].

⁸ MURAMATSU, M., N. SHIMADA, T. HAYASHINAKAGAWA, J. molecular Biol. **53**, 91 [1970].