

# Einfluß trägergebundener Ribonuclease auf die zellfreie Proteinsynthese im Weizensystem

Influence of Immobilized Ribonuclease on the Cell-free Protein Synthesis in the Wheat System

Hartmut Kern

Institut für Botanik und Mikrobiologie, Kernforschungsanlage Jülich

(Z. Naturforsch. 30 c, 227–232 [1975]; eingegangen am 4. November/6. Dezember 1974)

Ribonuclease, Cell-free Protein Synthesis

In order to increase the efficiency of different mRNAs from wheat seedlings in carrying out cell-free protein synthesis in the wheat system, efforts were made to remove endogenous mRNA. In this direction, we checked the possibility of using immobilized RNAase. Treatment of the cell-free system or its components with this enzyme caused a large decrease in the efficiency of poly U-directed incorporation of labeled amino acids. This effect did not coincide with an equivalent degradation of RNA, as has been shown by analysis of ribosomes and polysomes. The results are discussed in the light of recent findings of some authors.

## Einleitung

Unterschiedliche Genaktivitäten während bestimmter Differenzierungsvorgänge der Zelle lassen sich auf der Basis von Transkription und Translation beschreiben und in kausale Beziehung zueinander bringen. Die dabei neugebildete informative RNA (Messenger RNA) kann durch entsprechende Pulsmarkierung mit der Tracer-Methode nachgewiesen werden. Darüber hinaus aber ist auch eine funktionelle Charakterisierung der jeweiligen mRNA wünschenswert, die in Einzelfällen durch Translation unter zellfreien Bedingungen möglich ist. Eigene Arbeiten, die sich mit Keimung und Zellwachstum im Zusammenhang mit der Einwirkung von Phytohormonen beschäftigten<sup>1–3</sup>, waren Veranlassung, die zellfreie Proteinsynthese als Funktionstest für die während bestimmter Entwicklungsstadien keimender Weizenembryonen gebildete mRNA in Betracht zu ziehen.

Für dieses Vorhaben bietet sich das von Marcus *et al.*<sup>4, 5</sup> aus Weizenembryonen entwickelte zellfreie System an, das in letzter Zeit in teils modifizierter Form für die *in vitro* Translation natürlicher Messenger Anwendung gefunden hat. So gelang die Synthese von Hüllproteinen des Tabakmosaikvirus (TMV)<sup>6</sup>, des Satelliten-Nekrose-Virus aus Tabak (STNV)<sup>7</sup> und auch der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des Globu-

lins mit der entsprechenden RNA aus Viren bzw. mit mRNA aus Retikulozyten<sup>8</sup>. Die hohe Effektivität dieses Systems nimmt zur Zeit unter denen pflanzlicher Herkunft eine Sonderstellung ein<sup>6</sup>. Im Gegensatz zu den erwähnten Messengern ist arteigene mRNA weniger effektiv. Wie Schultz *et al.*<sup>9</sup> nachgewiesen haben, verfügen ruhende Weizenembryonen über endogene mRNA, die in Ribosomenpräparaten als 90S- und 45S-Partikel niedergelegt ist. Für die beabsichtigte Prüfung verschiedener mRNAs aus Weizenkeimlingen aber ist die Abwesenheit dieser konservierten mRNA notwendig, da sie mit der Initiierung von Proteinsynthesen durch zugesetzte mRNA mit anderen genetischen Informationen in Konkurrenz treten kann. Es wurde daher versucht, durch Vorinkubation und Stripping-off-Methoden die endogene Templateaktivität zu verringern.

Eine weitere Möglichkeit hierfür schien durch die Arbeiten von Grove *et al.*<sup>16</sup> gegeben zu sein. Diese Autoren wiesen nach, daß Ribosomen nach Behandlung mit Ribonuclease (RNase) in gelöster Form noch 80–90% ihrer Aktivität in bezug auf die zellfreie Proteinsynthese durch Polyuridylsäure (Poly U) entfalten, obwohl ihre 28S und 18S RNA bis zu 98% hydrolysiert war. Demnach ist intakte ribosomale RNA für den Aufbau der Ribosomen, nicht aber für deren Funktion bei der Proteinsynthese wichtig<sup>16</sup>. Da mRNA ohnehin sehr empfindlich gegenüber RNase ist, müßte eine kurze Behandlung der Ribosomen mit diesem Enzym die Beseitigung der konservierten mRNA zur Folge haben,

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Kern, Institut für Botanik und Mikrobiologie, Kernforschungsanlage Jülich, D-5170 Jülich, Postfach 365.



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.

ohne dadurch die Funktion der Ribosomen zu beeinträchtigen. Voraussetzung hierfür ist, daß die restlose Entfernung der RNase gelingt. Um deren Einwirkung unter Kontrolle zu halten, prüften wir die Möglichkeit, durch die Verwendung trägergebundener RNase die endogene Templateaktivität im zellfreien Weizensystem auszuschalten und dadurch die Effektivität der zu prüfenden exogenen mRNA zu erhöhen.

### Material und Methoden

Für die Präparation zellfreier Ansätze für die Proteinsynthese wurden Embryonen aus Winterweizen, *Triticum aestivum*, Sorte LP 3950 (F. v. Lochow-Petkus GmbH, Stöckheim) durch Schroten, Sieben und Handverlesen<sup>1</sup> isoliert und nach den Angaben von Marcus *et al.*<sup>4,5</sup> aufgearbeitet. Dabei wurde das „S-23“-System<sup>5</sup> hergestellt, das als Überstand einer Zentrifugation eines Homogenates bei  $23500 \times g$  mit deacylierter Transfer-RNA, GTP, Dithiothreitol, ATP, Kreatinphosphat, Kreatin-Kinase, unmarkierten Aminosäuren komplettiert wird und in Gegenwart <sup>14</sup>C-markierter Aminosäuren und entsprechender Messenger in den meisten Fällen 45 min bei 30 °C inkubiert wird (s. Tab. I und Tab. II, Serie A). In entsprechender Weise wurde eine Fraktionierung des Systems in Ribosomen und hochtourigen Überstand – „S-100“ vorgenommen. Die Gewinnung von einmal gewaschenen Ribosomen bzw. von „S-100“ erfolgte nach den Beschreibungen von Marcus *et al.*<sup>4</sup>. Die Entfernung von Transfer-RNA aus der „S-100“-Fraktion durch DEAE-Cellulose<sup>4</sup> führte zu einer höheren Effektivität in der Einbaureate markierter Aminosäuren. Daher verwendeten wir vorwiegend „S-100-DEAE“-Präparationen. Im „S-23“-System betrug das Gesamtvolumen 280 µl und im fraktionierten 400 µl. Die Inkubationen wurden wie üblich mit Trichloressigsäure gestoppt, das Präzipitat abzentrifugiert, mit heißer TCA (90 °C) behandelt, zur Bestimmung der Radioaktivität auf Millipore-Filter übergeführt, getrocknet und in einem POPOP-PPO-Toluol-Gemisch im Tri-Carb gemessen.

Die Isolierung von Tabakmosaikviren (TMV) aus infizierten Tabakblättern erfolgte unter Verwendung von Butanol-Chloroform<sup>21</sup>. Die Extraktion von TMV-RNA geschah nach der Methode von Marcus<sup>5</sup>. Dabei war es wichtig, die TMV-Partikeln vor Beginn der RNA-Extraktion mit Phenol-EDTA-Laurylsulfat ca. 16 h in 20 mM EDTA bei 30 °C zu inkubieren. Für die Darstellung von „mRNA“ wurden verschiedene methodische Wege eingeschla-

gen, die hier nicht näher beschrieben werden. Die in Tab. I angeführte „mRNA“ wurde aus Polysomen von 48 h alten Weizenkeimlingen gewonnen und dabei Phenol-Chloroform-Laurylsulfat<sup>10</sup> benutzt. In diesem Falle wurde eine Anreicherung von Poly A-haltiger RNA durch Adsorption an Cellulose vorgenommen. Isolierung von Polysomen, Herstellung der Saccharosegradienten und Zentrifugation erfolgte in Anlehnung an Stutz und Noll<sup>11</sup> und die Durchführung der Elektrophorese auf Polyacrylamid nach Bishop *et al.*<sup>12</sup>. Die Freisetzung von RNA aus Ribosomen und Polysomen nahmen wir durch Behandlung mit Laurylsulfat und EDTA (Endkonzentration 2% bzw. 0,03 M) vor und applizierten die Proben nach 30 sec Erwärmung auf 37 °C sofort auf Polyacrylamid-Gele (2,4%) oder Saccharosegradienten.

Behandlung mit trägergebundener Ribonuclease: In sämtlichen Versuchen verwendeten wir pankreatische Ribonuclease in trägergebundener Form (Ribonuclease polyallomer gebunden an CM-Cellulose, Merck Nr. 24571). Im folgenden wird dieses Präparat als Enzymgel bezeichnet. Je 100 mg Enzymgel wurde in dest. Wasser suspendiert, in einer Fritte gründlich mit Wasser gewaschen und zuletzt mit dem Suspensionspuffer für Ribosomen<sup>4</sup> (2 mM Tris, pH 7,4, 20 mM KCl, 1 mM Magnesiumacetat, 3 mM 2-Mercaptoäthanol) äquilibriert. Portionen von 0,1 ml der Suspension (ca. 5 mg Enzymgel) wurden entnommen, in konischen Zentrifugengläsern abzentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt, die jeweiligen Sedimente in den betreffenden Serien mit gleichen Volumina von Ribosomen oder „S-100“-Präparaten suspendiert und bei Raumtemperatur in der angegebenen Zeit geschüttelt. In Serie A (Tab. II) wurde der „S-23“-Ansatz vor Beginn der Inkubation mit Poly U und [<sup>14</sup>C]Phenylalanin durch eine Mikrosäule von ca. 20 mg Enzymgel passiert. In allen übrigen Serien wurde nach Behandlung mit Enzymgel abzentrifugiert (Mikrofuge, Beckman) und die Überstände in den entsprechenden zellfreien Ansätzen verwendet. Im Falle der Ribosomen wurden jeweils 5 OD<sub>260</sub> pro Ansatz verwendet. Die „S-100“-Präparate wurden vor der Dialyse<sup>4</sup> behandelt. Zur Kontrolle verwendeten wir inaktiviertes Enzymgel. Hierbei wurde es in 0,15 M Natrium-Jodacetat – 0,1 M Natriumacetat in  $2 \times$  SSC bei pH 5,2 suspendiert, 40 min bei 54 °C inkubiert<sup>13</sup>, danach ausgewaschen und in gleicher Weise wie oben behandelt.

### Ergebnisse und Diskussion

In eigenen Untersuchungen erwiesen sich zellfreie Systeme aus trockenen Weizenembryonen als sehr

effektiv, wenn Polyuridylsäure (Poly U) als künstlicher bzw. RNA aus TMV als natürlicher Messenger eingesetzt und die Erhöhung des Einbaues radioaktiver Aminosäuren ( $[^{14}\text{C}]$ Phenylalanin,  $[^{14}\text{C}]$ Leucin bzw.  $^{14}\text{C}$ -markierte Aminosäuren von Algenhydrolysaten) in säurefällbare Syntheseprodukte nachgewiesen wurde. Dem stimulierten Aminosäureeinbau geht die Bildung von Polysomen *in vitro* parallel, die in beiden Fällen nach Ultrazentrifugation des Inkubationsgemisches im Saccharosegradienten durch die Verteilung der Radioaktivität und auch im UV-Absorptionsprofil nachweisbar sind (Abb. 1).

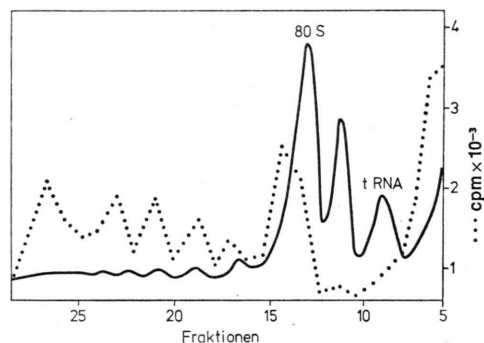


Abb. 1. Bildung von Polysomen im zellfreien System<sup>5</sup>. Inkubation von 27  $\mu\text{g}$  RNA aus TMV in Gegenwart von  $[^{14}\text{C}]$ Leucin, 30 min, 30 °C. Aliquote Teile des Ansatzes wurden nach Versuchsende direkt auf einen exponentiellen Saccharosegradienten (0,3–1,0 M) appliziert und 2,5 h bei 35000 rpm (SW 41, Beckman) zentrifugiert. —, UV-Absorption ( $E_{260}$ ); ····, Radioaktivität TCA-gefällter 0,4 ml-Fraktionen. Sedimentation von rechts nach links.

Gegenüber diesen Messengern bewirken RNA-Präparationen mit angereicherter mRNA, aus Weizen selbst, nur einen sehr geringen Einbau von Aminosäuren. Die Gewinnung von „mRNA“ aus gekeimten Weizenpflanzen erfolgte nach verschiedenen Methoden, wobei die Affinität der endständigen Polyadenylsäure-Segmente (Poly A) in der mRNA gegenüber Cellulose<sup>14</sup>, Oligo dT-Cellulose<sup>15</sup> u. a.

Tab. I. Effektivität natürlicher und künstlicher Messenger im zellfreien „S-23“-System<sup>5</sup> aus Weizen.

Messenger	$^{14}\text{C}$ -markierte Aminosäure	Back-ground [cpm]	Einbau [cpm]
TMV-RNA (27 $\mu\text{g}$ )	Leucin	350	89600
Poly U (100 $\mu\text{g}$ )	Phenylalanin	200	100400
Poly U (100 $\mu\text{g}$ )	Algenhydrolysat	1175	48100
„mRNA“ aus Polysomen (40 $\mu\text{g}$ )	Algenhydrolysat	1175	2600

ausgenutzt wurde. Wie aus der Zusammenstellung repräsentativer Einbauversuche in Tab. I hervorgeht, liegt bei einem Angebot arteigener „mRNA“ die Einbaurate im besten Falle 120% über dem Background. Die Tätigkeit der erwähnten endogenen mRNA<sup>9</sup> drückt sich in einem höheren Background der Ansätze aus, wenn ein natürliches Gemisch von Aminosäuren (Algenhydrolysate) in Abwesenheit eines exogenen Messengers verwendet wird. Für eine kompetitive Interaktion zwischen endogener mRNA und applizierter „mRNA“ aus Weizenkeimlingen sprach die Feststellung, daß es bei einem Angebot solcher „mRNA“-Präparate häufig zu einer Depression des endogen bedingten Einbaues kam, der sich in einem niedrigeren Background ausdrückte. Toxische Einwirkungen z. B. von Phenol u. a. aus dem Präparationsgang für die Gewinnung von „mRNA“ konnten dabei ausgeschlossen werden.

Aus bereits erörterten Gründen versuchten wir, durch trägergebundene Ribonuclease die endogene Templateaktivität zu beseitigen. Eine Behandlung zellfreier Ansätze<sup>5</sup> mit RNase (Enzymgel) wirkte sich jedoch als stark hemmend aus, wenn nach seiner Entfernung der Einbau von Phenylalanin in Gegenwart von Poly U bestimmt wurde (Tab. II, zellfreier Ansätze<sup>5</sup> mit RNase (Enzymgel) wirkte Serie A). Zur Aufklärung dieses Effektes wurde das System in seine Hauptkomponenten – „S-100“-Überstand und Ribosomen – zerlegt, diese mit Enzymgel behandelt und gegeneinander im entsprechend komplettierten Ansatz ausgetestet. Wie erwähnt, verwendeten wir in den meisten Fällen „S-100-DEAE“-Präparate, die durch Passage durch DEAE-Cellulose von endogener Transfer-RNA befreit wurden<sup>4</sup>. Außerdem prüften wir unter gleichen Bedingungen Polysomen aus 48 h alten Weizenkeimlingen in Abwesenheit exogener Messenger (Poly U) auf ihre Aktivität hinsichtlich ihrer Translation unter zellfreien Bedingungen. Die Ergebnisse von verschiedenen Versuchsreihen sind in Tab. II zusammengestellt. Die jeweiligen Einbauraten beziehen sich dabei auf unbehandelte Kontrollen, die als 100% gesetzt wurden. Um außerdem die Wirkung des Trägermaterials von Enzymgel von der gebundenen RNase zu diskriminieren, benutzten wir inaktiviertes Enzymgel als zusätzliche Kontrolle<sup>13</sup>.

Es ist ersichtlich, daß „S-100“ bzw. „S-100-DEAE“ gegenüber Ribosomen und Polysomen zwar eine stärkere Reduzierung ihrer Effektivität erfahren, jedoch alle Komponenten des Systems stark in-

Hochtouriger Überstand	Enzymgel [min]	Ribosomen (5 OD <sub>260</sub> )	Enzymgel [min]	Poly U [100 µg] [cpm]	% Einbau von <sup>14</sup> C-markierter Aminosäure
A)					
Kompl. System „S-23“	—	—	—	+	55000 100
	+	—	—	+	1100 2
B)					
S 100	—	Ribosomen	—	+	22681 100
S 100	5	Ribosomen	—	+	1667 7,4
C)					
S 100-DEAE	—	Ribosomen	—	+	40237 100
S 100-DEAE	—	Ribosomen	1	+	31884 79
S 100-DEAE	—	Ribosomen	3	+	27572 68
S 100-DEAE	—	Ribosomen	4	+	25086 62
S 100-DEAE	—	Ribosomen	5	+	20804 52
S 100-DEAE	5	Ribosomen	—	+	18130 45
S 100-DEAE	inaktiviertes Enzymgel, 5 min	Ribosomen	—	+	35802 90
D)					
S 100-DEAE	—	Ribosomen	—	+	85077 100
S 100-DEAE	5	Ribosomen	—	+	18426 21,7
S 100-DEAE	—	Ribosomen	1	+	49931 58,7
S 100-DEAE	—	Ribosomen	5	+	35624 41,9
E)					
S 100-DEAE	—	Polysomen	—	—	37510 100
S 100-DEAE	—	Polysomen	1	—	30440 81,2
S 100-DEAE	—	Polysomen	3	—	23995 64
S 100-DEAE	—	Polysomen	5	—	18622 49,7
S 100-DEAE	5	Polysomen	—	—	17656 47
S 100-DEAE	inaktiviertes Enzymgel, 5 min	Polysomen	—	—	32036 85,4

Tab. II. Einwirkung von Enzymgel auf die zellfreie Proteinsynthese bei Weizen. Serie A: komplettes „S-23“-System<sup>5</sup>; alle anderen Serien wurden nach Marcus *et al.*<sup>4</sup> durchgeführt: Ribosomen bzw. Polysomen 5 OD<sub>260</sub> + bzw. — Poly U, 80 µl „S-100-DEAE“<sup>4</sup> und <sup>14</sup>C-markierte Aminosäuren in 400 µl Gesamtvolumen. In Serie A und D wurde [<sup>14</sup>C]-Phenylalanin (0,16 µCi/Ansatz) und in B, C und E ein natürliches Gemisch von <sup>14</sup>C-markierten Aminosäuren (1 µCi Algenhydrolysat / Ansatz) verwendet. Inkubationen 45 min bei 30 °C.

hibiert werden. Die Annahme, daß möglicherweise freigesetzte RNase oder eine Adsorption an die Matrix von Enzymgel hierfür verantwortlich sein könnten, wird eingeschränkt durch die gründliche Auswaschung der gebundenen RNase vor Gebrauch und die kurze Einwirkungsdauer auf die betreffenden Fraktionen. Für den Fall, daß geringe Mengen RNase freigesetzt und während der Proteinsynthese *in vitro* wirksam werden, führten wir ein Kontroll-experiment durch. Hierbei wurden Ribosomen 10 min mit Enzymgel behandelt, dieses danach entfernt, die Ribosomen durch Ultrazentrifugation sedimentiert und anschließend im zellfreien System getestet. Verglichen mit einer Kontrolle und jeweils gleichen Mengen an Ribosomen (5 OD<sub>260</sub>) betrug der Aminosäureeinbau durch Poly U nur ca. 20%. Außerdem verwendeten wir zur Kontrolle inaktiviertes Enzymgel, das unter unseren Versuchsbedingungen eine Reduzierung der Effektivität von 10–14% bewirkte.

Da diese Ergebnisse schwer zu interpretieren sind, wurden die folgenden Analysen durchgeführt. Zu-

nächst ergab die elektrophoretische Trennung von RNA aus den entsprechenden Ribosomen ähnliche Resultate wie sie von Grove *et al.*<sup>16</sup> erhalten wurden (Abb. 2): Eine im UV erkennbare 25S RNA, die gefolgt wird von einer „Verschmierung“, die die 18S RNA vollständig überdeckt. In diesem Zu-

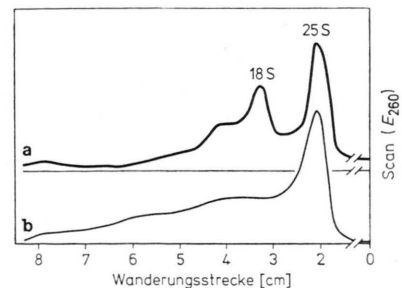


Abb. 2. Elektrophoretische Trennung von RNA aus unbehandelten und behandelten Ribosomen. Die Behandlung der Ribosomen aus ruhenden Embryonen<sup>4</sup> erfolgte mit trägergebundener Ribonuclease (ca. 5 mg Enzymgel in 0,4 ml Ribosomensuspension) für 5 min bei Raumtemperatur und die Freisetzung der RNA mit Laurylsulfat und EDTA. Die Elektrophorese wurde auf 2,4% Polyacrylamid-Gelen während 2,5 h bei 5 mA/Gel durchgeführt.

sammenhang sei erwähnt, daß diese Erscheinung oft auftritt, wenn wie hier die Freisetzung der Nucleinsäuren mit EDTA und Laurylsulfat ohne Phenolbehandlung erfolgt. Daß im vorliegenden Falle nicht auf eine weitgehende Degradation von 18S RNA geschlossen werden darf, ergaben Fraktionierungen der Nucleinsäuren durch Ultrazentrifugation im Saccharosegradienten (Abb. 3). Es läßt sich hierbei lediglich feststellen, daß 18S RNA gegenüber 25S RNA als Folge der Behandlung mit

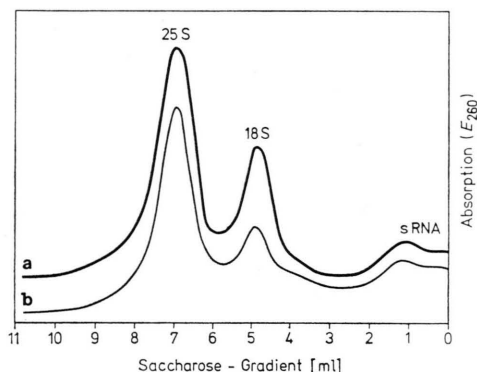


Abb. 3. Zentrifugation ribosomaler RNA im exponentiellen Saccharosegradienten bei gleichen Bedingungen wie in Abb. 2. a: unbehandelte Ribosomen; b: Behandlung der Ribosomen mit Enzymgel für 5 min. Die Zentrifugation erfolgte bei 35 000 rpm während 16 h im SW 41 Rotor<sup>11</sup>.

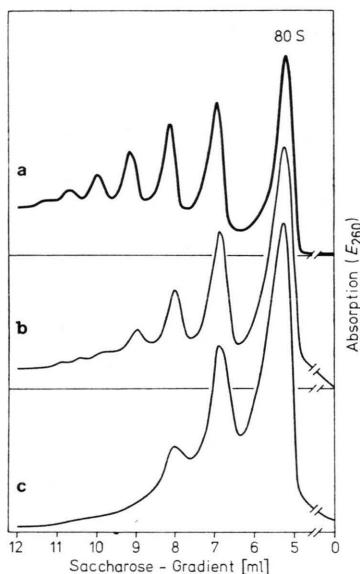


Abb. 4. Sedimentation von Polysomen im Saccharosegradienten nach Ultrazentrifugation (s. Abb. 1). a: Unbehandelte Polysomen aus 48 h alten Weizenkeimlingen; b: Gleiche Polysomen nach 3 min Einwirkung von Enzymgel; c: Behandlung der Polysomen mit gelöster Ribonuclease (0,1 µg/ml) unmittelbar vor der Zentrifugation bei +2 °C.

gebundener RNase verringert wird. Keinesfalls aber ist eine Hydrolyse von RNA in dem Ausmaß festzustellen, wie sie von Grove *et al.*<sup>16</sup> an den Ribosomen aus Hirnzellen der Maus nach Einwirkung freier RNase beschrieben wurde. Polysomen werden nach Behandlung mit Enzymgel in ihrer Sedimentation etwas verändert, dies kommt im Verlust von Polysomen mit höheren Polymeren zum Ausdruck (Abb. 4). Das Sedimentationsprofil von Polysomen – nach kurzer Einwirkung von gelöster RNase (0,1 µg/ml) – dagegen macht die unterschiedlichen Effekte von freier und gebundener RNase deutlich. Ähnlich wie bei den Ribosomen läßt auch die polysomale RNA nur eine Reduzierung im Gehalt an 18S RNA erkennen (Abb. 5). In beiden Fällen (Abb. 3 und 5) wurden jeweils

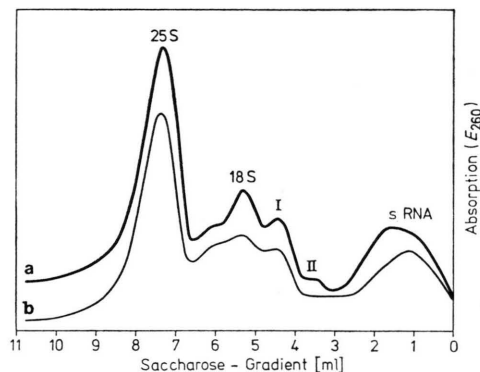


Abb. 5. Ultrazentrifugation polysomaler RNA im Saccharosegradienten. a: RNA aus Polysomen wie in Abb. 4 a; b: RNA aus Polysomen wie in Abb. 4 b. Gleiche Bedingungen wie in Abb. 3.

gleiche Mengen an Ribosomen bzw. Polysomen (5 OD<sub>260</sub>) analysiert. Die UV-Absorptionskurven wurden zur Verdeutlichung auf der Ordinate gegeneinander verschoben. Die in Abb. 5 auftretenden Fraktionen I und II sind regelmäßig in der polysomalen RNA aus Weizen anzutreffen. Sie werden z. Z. näher analysiert. Ergänzend sei erwähnt, daß auch die Monosomen aus trockenen Weizenembryonen unter dem Einfluß von Enzymgel keine Veränderungen ihrer Sedimentation erkennen lassen. Sie haben die gleiche Charakteristik wie von Schultz *et al.*<sup>9</sup> beschrieben wurde.

Die Anwendung von trägergebundener RNase für unsere Zwecke erwies sich wegen der unerwarteten Reduzierung der Effektivität von Ribosomen, Polysomen und des hochtourigen Überstandes im zellfreien System als aussichtslos. Wir stellten fest,

daß nur ein geringfügiger Abbau von 18S RNA erfolgt. Dies spricht für eine stärkere Anfälligkeit der 40S Untereinheiten der Ribosomen. Die Wirkung von Enzymgel müßte sich auf RNase-empfindliche Strukturen an der Oberfläche der Ribosomen erstrecken<sup>17, 18</sup>, die für die Synthese von Polyphenylalanin durch Poly U wichtig sind. Da die Reichweite der gebundenen RNase begrenzt ist, erklärt sich auch das Verhalten der Polysomen. Vermutlich ist eine Interaktion zwischen ihrer mRNA und der RNase durch die räumliche Anordnung der Ribosomen im Polysomenverband erschwert und läßt nur solche Reaktionen zu, wie sie auch bei den Monosomen erfolgen. Zum anderen könnte sich die mRNA, von der angenommen wird, daß sie von Protein umgeben ist<sup>19</sup>, dem Angriff der RNase entziehen. Dafür spricht die relative Stabilität der Polysomen gegenüber Enzymgel und die Ähnlichkeit der Veränderungen von 18S RNA in Ribosomen und Polysomen. In beiden Fällen kommt es aber zur Inhibierung der Translation von Poly U bzw. der endogenen mRNA. Wenn durch RNase in gelöster Form zwar die ribosomale RNA hydrolysiert, aber die Effektivität der betreffenden Ribosomen unter zellfreien Bedingungen nicht wesentlich beeinträchtigt wird<sup>16</sup>, so stehen unsere Ergebnisse im Widerspruch hierzu. Es wäre nämlich eher zu erwarten, daß gelöste RNase tiefergreifende Schädigungen ausüben müßte als gebundene. Ebenso unklar bleibt die Einwirkung gebundener RNase auf die „S-100“-Fraktion. Wenn es hierbei zu einem Abbau von RNA kommt, so würde Transfer-RNA hierfür nicht in Betracht kommen, da diese durch DEAE-Cellulose beseitigt („S-100-DEAE“) und die Inkubationen mit Poly U und intakter tRNA vorgenommen wurden. Wieweit niedermolekulare RNAs, wie sie kürzlich von Bogdanovsky *et al.*<sup>20</sup> nachgewiesen wurden, eine Rolle spielen, wäre zu klären. Allerdings müßte dann angenommen werden, daß diese keine Bindung an DEAE-Cellulose eingehen. Es bliebe noch die Möglichkeit, daß die Trägermatrix selbst die Ursache für die reduzierte Effektivität der untersuchten Komponenten des Systems ist. Um diese einzuengen, führten wir eine Inaktivierung der gebundenen RNase durch Behandlung mit Natrium-Jodacetat durch<sup>13</sup>. Es wäre denkbar, daß dadurch die Eigenschaften des Trägers verändert werden.

Da unsere Ergebnisse vielleicht zur Klärung der Verhältnisse im zellfreien System beitragen könnten, jedoch im Augenblick nur unbefriedigend zu deuten sind, stellen wir sie zur Diskussion.

Herrn Th. Bötdecker spreche ich an dieser Stelle meinen Dank für verlässliche technische Mitarbeit aus.

<sup>1</sup> H. Kern, Biol. Plant., im Druck.

<sup>2</sup> H. Kern, Z. Pflanzenphysiol., im Druck.

<sup>3</sup> H. Kern, Physiol. Plant., im Druck.

<sup>4</sup> A. Marcus, Protein Biosynthesis in Non-bacterial Systems (A. I. Laskin and J. A. Last, eds.), M. Dekker, New York 1972.

<sup>5</sup> A. Marcus, D. Efron, and D. P. Weeks, Methods in Enzymology, Part E, (eds. L. Grossman and K. Moldave), 1973.

<sup>6</sup> B. E. Roberts, J. Mol. Biol. **80**, 733 [1973].

<sup>7</sup> W. H. Klein, Ch. Nolan, J. M. Lazar, and J. M. Chark jr., Biochemistry **11**, 2009 [1972].

<sup>8</sup> D. Efron and A. Marcus, FEBS Letters **33**, 23 [1973].

<sup>9</sup> G. A. Schultz, D. Chen, and E. Katchalski, J. Mol. Biol. **66**, 379 [1972].

<sup>10</sup> R. A. Firtel, A. Jacobson, and H. F. Lodish, Nature New Biol. **239**, 225 [1972].

<sup>11</sup> E. Stutz and H. Noll, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **57**, 774 [1967].

<sup>12</sup> D. H. L. Bishop, J. R. Claybrook, and S. Spiegelman, J. Mol. Biol. **26**, 373 [1967].

<sup>13</sup> K. Bøvre and W. Szybalski, Methods in Enzymology, Part D, Vol. **XXI**, (eds. L. Grossman and K. Moldave), 1971.

<sup>14</sup> G. Schutz, M. Beato, and P. Feigelson, Biochem. Biophys. Res. Commun. **49**, 680 [1972].

<sup>15</sup> M. Edmons, Procedures in Nucleic Acid Research, (G. L. Cantoni and D. R. Davies, eds.), Vol. **2**, p. 629, Harper & Row, New York 1971.

<sup>16</sup> B. K. Grove and T. C. Johnson, Biochem. Biophys. Res. Commun. **55**, 45 [1973].

<sup>17</sup> M. Santer, Science **141**, 1049 [1963].

<sup>18</sup> K. A. Hartman, J. Amaya, and E. M. Schachter, Science **170**, 171 [1970].

<sup>19</sup> E. C. Henshaw, J. Mol. Biol. **36**, 401 [1968].

<sup>20</sup> D. Bogdanovsky, W. Herman, and G. Schapira, Biochem. Biophys. Res. Commun. **54**, 25 [1973].

<sup>21</sup> C. I. Kado and H. O. Agrawal, eds., Principles and Techniques in Plant Virology, Van Nostrand Reinhold Comp., New York 1972.