

Größenvergleich der Poly(A)-RNA aus Polysomen und aus Kernen bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Size Comparison of Poly(A)-RNA from Polysomes and from Nuclei
of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Kornelia Angermann, Ulrich Grundmann und Hartmut Holz

Freie Universität Berlin, Zentralinstitut V für Biochemie und Biophysik,
Arbeitsgruppe Molekularbiologie

(Z. Naturforsch. 31 c, 85–90 [1976]; eingegangen am 19. September/17. Oktober 1975)

Yeast, Polysomes, Nuclei, Poly(A)-RNA

The size of poly(A)-RNA from polysomes and cell nuclei of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was investigated. Pulslabelled cells ($[^{14}\text{C}]$ adenin) were cracked by the French press; polysomes and nuclei were separately isolated and the RNA was finally extracted with phenol. The separation of poly(A)-containing and poly(A)-lacking fractions was achieved by oligo(dT)cellulose. These fractions were characterized by sedimentation analysis. The main portion of polysomal poly(A)-RNA sedimented with a rate of 8 to 14S, whereas the poly(A)-RNA of nuclei exhibited a sedimentation rate of 12 to 17S. Thus nuclear poly(A)-RNA is about 20–30% larger than polysomal poly(A)-RNA.

Einleitung

Ein wesentliches Merkmal der in Kernen von Säugerzellen nachgewiesenen HnRNA (heterogenous nuclear RNA) ist ihr Größenunterschied (10–100 S) im Vergleich zur cytoplasmatischen, ebenfalls Poly(A)-Sequenzen enthaltenden mRNA (6–30 S)^{1–4}.

Wir untersuchten, ob im Kern des unicellulären Eukaryonten *Saccharomyces cerevisiae* eine in ihrem Sedimentationsverhalten der HnRNA entsprechende Molekülklasse nachgewiesen werden kann. Folgende Untersuchungen sprachen dafür, daß in diesem Organismus eine wesentlich kleinere Poly(A)-haltige Kern-RNA existiert: Udem und Warner⁵ zeigten im Rahmen ihrer Arbeiten über rRNA-Vorläufermoleküle, daß Hefe keine HnRNA besitzt, die größer als 35S ist. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Firtel und Lodish⁶ bei der Untersuchung des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum*. Dieser in seinem Entwicklungsstadium mit der Hefe vergleichbare Eukaryont enthält im Kern Poly(A)-RNA, die nur um 20% größer ist als die cytoplasmatische mRNA.

Sonderdruckanforderungen an Kornelia Angermann, Pharmakologisches Institut der Freien Universität Berlin – Embryonal-Pharmakologie –, Thielalle 69–73, D-1000 Berlin 33.

Abkürzung: Poly(A)-RNA, RNA mit Poly-Adennukleotidketten.

Material und Methoden

a. Stamm, Zellanzucht

Für alle Versuche wurde der diploide Stamm RXII der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* benutzt. Aufbewahrung bei 4 °C auf Schrägagar, Vorkulturen für 24 h in 5 ml Vollmedium (2% Glucose, 1% Yeast Extract (Difco), 0,5% Pepton in entionisiertem H₂O). Die Hauptkultur wuchs bei 30 °C in 2,5 l GYNP-Medium (2% Glucose, 10% Yeast Nitrogen Base (Difco), 0,5% Pepton in entionisiertem H₂O) auf.

b. Aufnahmeversuche

Die in der späten log-Phase (10⁸ Zellen/ml) geernteten Zellen wurden in Glucose-Citratpuffer (2% Glucose, 17,5 mM Citronensäure, 32,5 mM Natriumcitrat, pH 5) aufgenommen. Einstellung des Zelltiters auf 2 × 10⁸ Zellen/ml, 4 × 10⁸ Zellen/ml und 8 × 10⁸ Zellen/ml. Die Ansätze wurden bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Vom Zeitpunkt 0 an wurden alle 15 min Proben entnommen und 0,25 µCi/ml [¹⁴C] Adenin (spez. Akt. 52 mCi/mm) (CIS) zugegeben. Nach 5 min Markierung wurde die Aufnahme des radioaktiven Adenin durch Zugabe von Eis gestoppt. Die Zellen wurden bei 3000 × g, 0 °C niedergeschlagen. Eine Probe des Überstandes wurde zur Radioaktivitätsmessung entnommen. Die pelletierten Zellen wurden in Glucose-Citratpuffer resuspendiert und ihre Radioaktivität bestimmt. Während des gesamten Versuchsablaufs wurden alle 15 min



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.

Proben zur Bestimmung der optischen Dichte der Zellsuspension (Titerbestimmung im Lange-Kolorimeter) entnommen.

c. Pulsmarkierung und Polysomenisolierung⁷

Die Zellen wurden in der frühen log-Phase (4×10^7 Zellen/ml) geerntet, gewaschen und in Glucose-Citratpuffer aufgenommen (Titer 2×10^8 Zellen/ml). Nach einer Stunde Vorinkubation bei 30 °C wurden sie für 5 min mit 0,2 µCi/ml [¹⁴C] Adenin (spez. Akt. 260 mCi/mM) (CIS) pulsmarkiert. Die Aufnahme der radioaktiven Substanz wurde durch Abkühlen auf 0 °C und Zugabe von 200 µg/ml Actidion (Serva) gestoppt. Nach 30 min wurden die abzentrifugierten Zellen im Homogenisationspuffer (30 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 500 mM Saccharose, 20% Glycerin (v/v), 10 mM Mercaptoäthanol, 0,25 mM EDTA, pH 7,5) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in French-Press-Zellen (Colora) bei -180 °C in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und mit der French Press bei einem Druck von 1260 psi aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei $17\,300 \times g$, 0 °C 10 min pelletiert. Der Überstand wurde mit 4-prozentigem, frisch angesetztem Brij 58 in Lysispuffer (30 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM Mg-acetat, 10 mM Mercaptoäthanol, 0,25 mM EDTA, pH 7,5) versetzt (Endkonz. 1% Brij 58). Die Polysomen wurden 4 h bei 0 °C und $105\,000 \times g$ im TI 50 durch ein Kissen von 1 ml 1,8 M und 1 ml 1 M Saccharose in Puffer R₂ (30 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, 5 mM Mg-acetat, 10 mM Mercaptoäthanol, 0,25 mM EDTA, pH 7,5) niedergeschlagen. Das Polysomenpellet wurde in aqua bidest auf 100 OD_{260nm}/ml eingestellt.

d. Isolierung von Hefekernen⁸⁻¹⁰

Die Zellen wurden in der späten log-Phase (10^8 Zellen/ml) geerntet, gewaschen und in Glucose-Citratpuffer aufgenommen (Titer 2×10^8 Zellen/ml). Nach 1 h Vorinkubation bei 30 °C wurden sie für 2 min mit 0,125 µCi/ml [¹⁴C] Adenin (spez. Akt. 260 mCi/mM) markiert. Nach Kühlung auf 0 °C und Zugabe von 200 µg/ml Actidion wurden die Zellen im Homogenisationsmedium (5% PVP 40 (Fluka), 20% Glycerin (v/v), 1 M Sorbitol, pH 4) aufgenommen (1 Teil Homogenisationsmedium/1 Teil Zellsuspension). Nach Aufschluß der Zellen mit der French Press wurde die aufgetaute Suspension mit Homogenisationsmedium aufgefüllt und bei $1500 \times g$, 0 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und nochmals unter den gleichen Bedingungen behandelt. Weitere Reinigung des Überstandes erfolgte auf einem Stufengradienten bestehend aus 4 ml 61% Saccharose (w/w), 4 ml 54% Saccharose (w/w) + 0,2% Triton X-100, 4 ml 40% Saccharose

(w/w) + 0,2% Triton X-100 in Mg-acetat-Puffer (10 mM Tris-HCl, 4 mM Mg-acetat, pH 7,8). Die Zentrifugation erfolgte im SW 27 für 15 min bei 5000 rpm und nachfolgend für 90 min bei 27 000 rpm, 0 °C. Das aus Kernen bestehende Pellet wurde in aqua bidest resuspendiert. Die Kernsuspension wurde mit 1/10 Vol. 0,1 M MgCl₂, 0,1 M Tris-HCl, pH 7,6 und 20 µg/ml DNase I (reinst, Serva) versetzt. Nach 30 min Inkubation bei Zimmertemperatur wurde die Enzymreaktion durch Kühlung auf 0 °C gestoppt.

e. Phenolextraktionen

Die RNA der Polysomenfraktion wurde bei 4 °C nach der Methode von Brawerman^{11,12} mit Phenol extrahiert. Die Phenolextraktion der Kernsuspension erfolgte bei 60 °C nach einer Methode von Girard¹³. Die extrahierte RNA wurde mit 2,5 Vol. Äthanol abs. und 0,1 Vol. 1 M NaCl über Nacht bei -20 °C gefällt.

f. Trennung von rRNA und Poly(A)-RNA

Die Trennung der beiden RNA-Spezies erfolgte nach einer Methode von Nakazato und Edmonds^{14,15} unter Benutzung von Poly(dT) Cellulose (Searle). Dazu wurde die gefällte RNA 25 min bei $3000 \times g$, 0 °C pelletiert und in 2,5 ml des von Nakazato angegebenen Puffers aufgenommen. Wir arbeiteten mit einer Konzentration von 20–25 Absorptionseinheiten RNA/ml.

g. Sedimentationsbedingungen

Die getrennten Fraktionen wurden durch kontinuierliche Saccharosegradienten, bestehend aus 5 bis 30% Saccharose, in 20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, pH 7,6 charakterisiert. Die Zentrifugation erfolgte im SW 27 bei 27 000 rpm, 5 °C für 15 h in der Beckman Ultrazentrifuge LB 65.

h. Radioaktivitätsbestimmung

Die Radioaktivitätsmessungen erfolgten mit 5 ml Bray-Solution/1 ml Probe (6% Naphthalin, 0,4% Omnifluor (NEN), 2% Äthylenglykol, 10% Methanol abs., gelöst in Dioxan) im Beckman LS 233 Liquid Scintillation Counter.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Substanzen von der Firma Merck bezogen.

Ergebnisse und Diskussion

a. Versuche zur Prüfung des optimalen Zeitpunkts der Radioaktivitätsaufnahme ([¹⁴C] Adenin) der Hefezellen

Da die Poly(A)-RNA nur einen Bruchteil der Gesamt-RNA der Zelle ausmacht, wurden Versuche zur

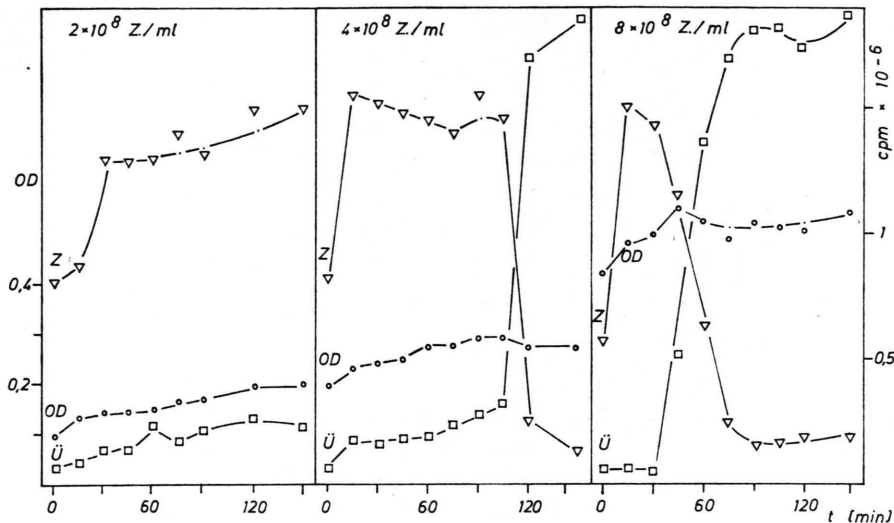


Abb. 1. Untersuchung zum Aufnahmeverhalten der Hefezellen bei Zugabe von $[^{14}\text{C}]$ Adenin nach unterschiedlichen Vorinkubationszeiten. Die Zellen wurden in GYNP-Medium aufgezogen und in Glucose-Citrat-Puffer auf den entsprechenden Zelltitern eingestellt. Nach einer Vorinkubation wurden alle 15 min Proben entnommen und radioaktiv markiert ($[^{14}\text{C}]$ Adenin). Die Radioaktivität der abzentrifugierten Zellen (Z) und des Überstandes (Ü) wurde bestimmt. Das Wachstum der Zellen wurde im Lange-Kolorimeter durch Ermittlung der optischen Dichte (OD) verfolgt, $-\bigcirc-$; cpm der Zellen: $-\triangle-$; cpm des Überstandes: $-\square-$.

optimalen Pulsmarkierung der Hefezellen unternommen. In mehreren Versuchsreihen wurden der optimale Zelltitern und die günstigste Vorinkubationszeit ermittelt.

Es ergab sich, daß eine Vorinkubationszeit von mindestens 30 min vor der Radioaktivitätszugabe notwendig war, um einen stoffwechselaktiven Zustand der Zellen zu erreichen. Weiterhin wurde festgestellt, daß die Dauer der optimalen Aufnahme-fähigkeit der Zellen für Adenin vom Zelltitern abhängig war. Ein Anfangstiter von 2×10^8 Zellen/ml Puffer erwies sich als für unsere Zwecke günstigste Zellmenge, denn so konnte die höchste spezifische Markierung der Zellen erreicht werden. Die Vorinkubationszeit wurde auf 1 h festgelegt.

Die in diesen Versuchen durchgeführte Pulsmarkierung in Glucose-Citratpuffer erbrachte eine höhere radioaktive Markierung der Zellen als methodisch entsprechende Aufnahmeversuche in Vollmedium¹⁶ und eine höhere radioaktive Markierung der Poly(A)-RNA als die in früheren Experimenten benutzte Methode nach vorheriger Cycloheximidbehandlung^{17, 18} der Zellen.

b. Isolierung von Poly(A)-RNA aus Polysomen

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigte sich mehrere Jahre mit der Ausarbeitung einer geeigneten Methode zur Polysomenisolierung aus Hefezellen. Es wur-

de eine Isolierungsmethode aus Protoplasten erprobt, die sich jedoch als zeitlich zu aufwendig erwies^{17, 18}. Mit Hilfe der French Press konnten einfach und reproduzierbar größere Mengen gut erhaltener Polysomen isoliert werden⁷. Zur RNA-Isolierung benutzten wir die für mRNA geeignetste Phenolextraktion nach Brawerman¹². Ein Vergleich verschiedener Methoden zur mRNA-Isolierung aus Hefepolysomen wurde in unserem Labor durchgeführt¹⁹.

Nach Trennung von rRNA (nicht an Poly(dT)-Cellulose bindend) und Poly(A)-RNA wurden beide Fraktionen sowie polysomale RNA als Kontrolle durch Sedimentationsanalysen charakterisiert.

Auf Grund der Pulsmarkierung war die rRNA nur wenig markiert, sie zeigte aber auffällig viel Aktivität in den Fraktionen 15–22. Da in diesem Bereich der Hauptteil der Poly(A)-RNA bandete (Abb. 2 c), ist es wahrscheinlich, daß es sich dabei um mRNA-Material handelte, das entweder ohne Poly(A)-Anteil vorlag oder um Poly(A)-RNA, die nicht an die Poly(dT)-Cellulose gebunden wurde. Für mRNA aus HeLa-Zellen wurde das Vorhandensein einer Population von mRNA-Molekülen ohne Poly(A)-Anteil nachgewiesen²⁰.

Abb. 2 c zeigt die Poly(A)-RNA-Fraktion. Bei einer Größenverteilung von 4–25S lag das Maximum im Bereich von 8–14S. Aus dem Vergleich der Gesamt-Impulse von polysomaler RNA und

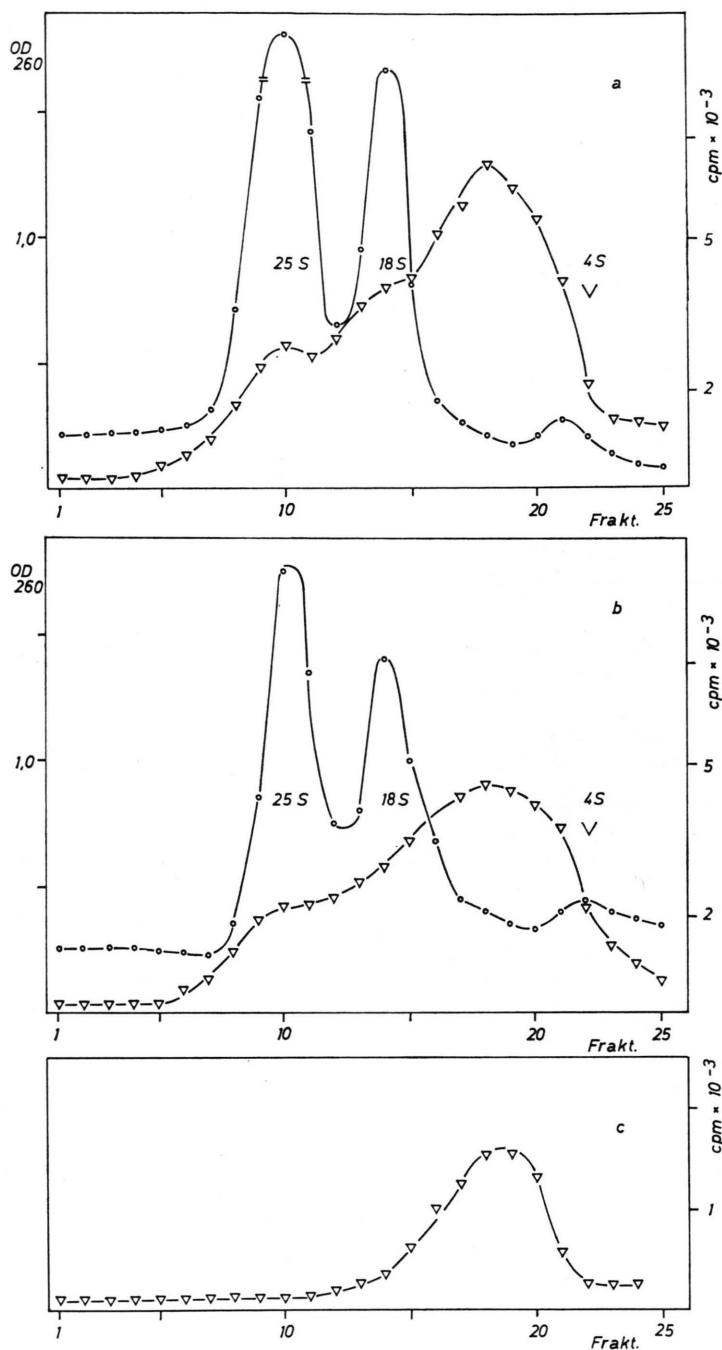


Abb. 2, a–c. Sedimentation von rRNA und Poly(A)-RNA nach Trennung durch Oligo(dT)Cellulose (RNA aus Polysomen). Hefezellen wurden nach einstündiger Vorinkubation in Glucose-Citrat-Puffer 5 min mit [¹⁴C]-Adenin pulsmarkiert. Die Zellen wurden mit der French Press aufgeschlossen. Die Polysomen wurden pelletiert und daraus die polysomale RNA durch Phenolextraktion bei pH 9 isoliert. Sie wurde durch Oligo(dT)Cellulose in rRNA und Poly(A)-RNA getrennt. Die Sedimentation der Fraktionen erfolgte im Saccharosegradienten (5–30% Saccharose in Gradientenpuffer, s. Material und Methode) 15 h bei 5 °C, 27000 rpm im SW 27. Sedimentation von a. Polysomaler RNA, Auftrag 625 µg RNA, b. rRNA, Auftrag 500 µg RNA; c. Poly(A)-RNA, OD nicht meßbar. cpm: —△—; OD₂₆₀ nm: —○—.

Poly(A)-RNA ergab sich ein Anteil von $\pm 10\%$ der Poly(A)-RNA-Fraktion.

c. Isolierung von Poly(A)-RNA aus dem Zellkern

Zur Isolierung von Poly(A)-RNA aus Hefekernen wurden die für die cytoplasmatische mRNA-Isolierung

angewandten Methoden variiert^{8,9}. Der Einsatz von DNase erwies sich als nützlich, obwohl die Hefezelle im Vergleich zur Säugerzelle relativ wenig DNA enthält. Die RNA-Ausbeute konnte durch enzymatischen Abbau der DNA um 13% gesteigert werden. Die Anwendung der Hot-Phenol-SDS-Methode

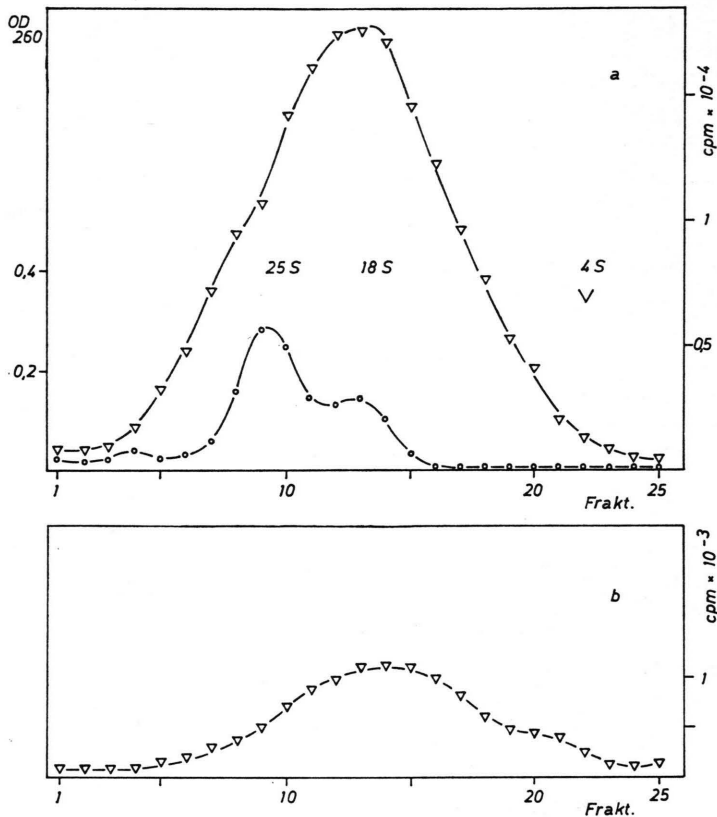


Abb. 3, a u. b: Sedimentation von GesamtkernRNA und Poly(A)-RNA aus Hefekernen nach Trennung durch Oligo(dT) Cellulose. Hefezellen wurden nach einstündiger Vorinkubation in Glucose-Citratpuffer 2 min mit [14 C]-Adenin pulsmarkiert. Die Zellen wurden mit der French Press aufgeschlossen. Die Zellkerne wurden über Saccharose-Stufengradienten (mit 0,2% Triton X-100) gewonnen. Nach DNase-Behandlung und Phenolextraktion (s. Material und Methode) wurde Poly(A)-RNA von der Kern-RNA durch Oligo(dT) Cellulose abgetrennt. Die Sedimentation der Fraktionen erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 2: 5–30% Saccharose in Gradientenpuffer, 15 h bei 5 °C, 2700 rpm im SW 27. Sedimentation der a. Gesamt-KernRNA, Auftrag 250 μ g RNA, b. Poly(A)-RNA, OD nicht meßbar. cpm: \triangle —; OD_{260 nm}: \circ —.

zur Phenolextraktion¹³ erhöhte den RNA-Anteil nicht wesentlich, hier wurde aber der größte Teil der sonst vorhandenen DNA nicht mitisoliert (statt 42% DNA-Anteil bei kalter Phenolextraktion nur noch 6% DNA-Anteil).

Durch eine Poly(dT)-Cellulose-Säulenchromatographie²¹ konnte Poly(A)-RNA in der RNA-Frak-

tion des Zellkerns nachgewiesen werden. Die Trennung von rRNA und Poly(A)-RNA wurde entsprechend der oben für die Polysomen beschriebenen Methode¹⁵ durchgeführt.

Die Sedimentationsanalyse ergab, daß sich in der Gesamt-KernRNA-Fraktion die rRNA und ihre Vorstufen befanden. Das wurde im Sedimentationsprofil

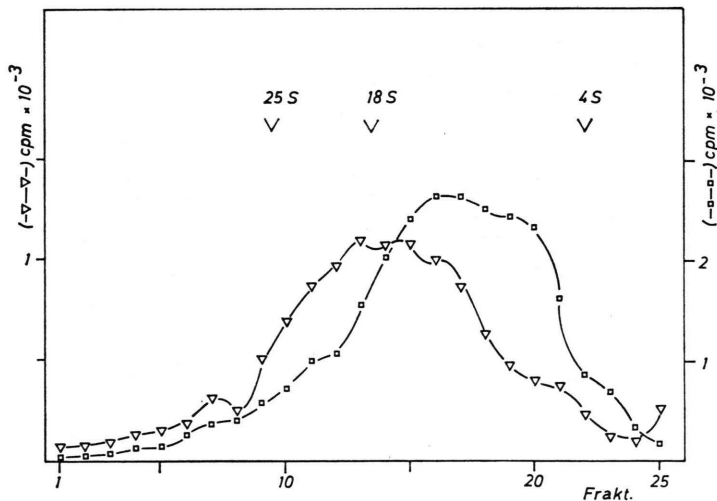


Abb. 4. Vergleichssedimentation von Poly(A)-RNA aus Polysomen (Abb. 2 c) und aus Kernen (Abb. 3 b). Die Poly(A)-RNA wurde jeweils durch Oligo(dT) Cellulose abgetrennt. Sedimentationsbedingungen: 5–30% Saccharose in Gradientenpuffer, 15 h bei 5 °C, 27000 rpm im SW 27. Poly(A)-RNA aus Polysomen: \square —; Poly(A)-RNA aus dem Zellkern: \triangle —.

durch die Verteilung der optischen Dichte wenig, durch die breitere Sedimentationsverteilung des radioaktiven Materials jedoch besser sichtbar (Abb. 3 a). Eine elektrophoretische Analyse dieser Fraktion zeigte die von Udem und Warner⁵ postulierten Vorstufen (20S, 27S, 35S) (ohne Abb.). Der Hauptteil der radioaktiven rRNA sedimentierte mit 18S bei einer Verteilung von 4 – 35S. Die mit Hilfe von Poly(dT)-Cellulose getrennte Poly(A)-RNA (Abb. 3 b) sedimentierte zwischen 4 und 25 S mit einem Maximum zwischen 12 und 17S. Eine Vergleichssedimentation von Poly(A)-RNA des Zellkerns und des Cytoplasmas zeigte deutlich einen Größenunterschied von 20 – 30%.

Dieses Ergebnis stimmt mit den von Firtel und Lodish⁶ publizierten Ergebnissen überein. Bei Dic-

tyostelium disc. wurde Poly(A)-RNA im Kern und in den Polysomen mit derselben Größendifferenz festgestellt.

Sripati und Warner²² haben in einem kurzen Bericht mitgeteilt, daß die Poly(A)-RNA des Kernes bei *Saccharomyces cerevisiae* maximal um den Faktor 2 größer ist als cytoplasmatische mRNA.

Während der Vorbereitung dieses Manuskripts erschien eine Veröffentlichung über Poly(A)-RNA in Hefe-Sphäroplasten, in der die mitgeteilten Größenunterschiede von cytoplasmatischen und Kern-Poly(A)-RNA in der Größenordnung mit den von uns erzielten Ergebnissen übereinstimmen²³.

Wir danken E.-R. Lochmann für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

- ¹ G. Brawerman, *Ann. Rev. Biochem.* **360**, 621 [1974].
- ² J. Darnell, W. R. Jelinek u. G. R. Molloy, *Science* **181**, 1215 [1973].
- ³ J. R. Greenberg, *J. Cell Biol.* **64**, 269 [1975].
- ⁴ R. A. Weinberg, *Ann. Rev. Biochem.* **325**, 329 [1973].
- ⁵ S. A. Udem u. J. R. Warner, *J. Mol. Biol.* **65**, 227 [1972].
- ⁶ R. Firtel u. H. F. Lodish, *J. Mol. Biol.* **79**, 295 [1973].
- ⁷ B. Schulz-Harder, Dissertation Freie Universität Berlin 1975.
- ⁸ M. M. Bhargava u. H. O. Halvorson, *J. Cell Biol.* **49**, 423 [1971].
- ⁹ A. Micheler, persönliche Mitteilung.
- ¹⁰ U. Wintersberger, P. Smith u. K. Letnansky, *Eur. J. Biochem.* **33**, 123 [1973].
- ¹¹ G. Brawerman, J. Mendecki u. S. Y. Lee, *Biochemistry* **11**, 637 [1972].
- ¹² G. Brawerman, *Methods in Enzymology*, **XXX**, Part F, 605 [1974].
- ¹³ M. Girard, *Methods in Enzymology*, **XII**, Part A, 581 [1967].
- ¹⁴ H. Nakazato u. M. Edmonds, *J. Biol. Chem.* **247**, 3365 [1972].
- ¹⁵ H. Nakazato u. M. Edmonds, *Methods in Enzymology* **XXIX**, 431 [1974].
- ¹⁶ K. Angermann, Diplomarbeit Freie Universität Berlin 1975.
- ¹⁷ H. Holz, Dissertation Freie Universität Berlin 1974.
- ¹⁸ H. Holz u. L. Scholing, *Z. Naturforsch.* **30 c**, 516 [1975].
- ¹⁹ U. Grundmann, Diplomarbeit Freie Universität Berlin 1975.
- ²⁰ C. Milcarek, R. Price u. S. Penman, *Cell* **3**, 1 [1974].
- ²¹ C. H. Faust, H. Diggelmann u. B. Mach, *Biochemistry* **12**, 925 [1973].
- ²² C. E. Sripati u. J. R. Warner, *J. Cell Biol.* **63**, 330 [1974].
- ²³ B. Groner u. St. L. Phillips, *J. Biol. Chem.* **250**, 5640 [1975].