

Initiation in einem Polyribosomen-abhängigen Protein-synthetisierenden zellfreien System aus *Saccharomyces*

Initiation in a Polyribosome-Dependent Protein-Synthesizing Cell-Free System from *Saccharomyces*

Bernd Schulz-Harder und Ernst-Randolf Lochmann

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

(Z. Naturforsch. 31 c, 169–173 [1976]; eingegangen am 10. November 1975)

Yeast, Polyribosomes, Cell-Free Protein Synthesis, Antibiotics, Ion-Conditions

A method to prepare polyribosomes from yeasts by using the french-press is described. The highest yield of polyribosomes was derived from late log-phase cells. These polyribosomes, incubated in a cell-free system, were able to reinitiate protein synthesis, which was shown by inhibiting aminoacid incorporation by aurintricarboxylic acid, edeine and sodiumfluoride. We developed the translational system in order to look for the optimal ion-conditions of a DNA-dependent protein-synthesizing system. We found out that at the optimal $MgCl_2$ -concentration (6 mm) protein synthesis was strongly inhibited by Mangan ions which are required for transcription in yeast. If protein-synthesis was carried out with 2 mm and 3 mm $MgCl_2$ maximal aminoacid incorporation was observed at 2 mm and 1.5 mm $MnCl_2$.

Einleitung

Hefezellen als einfache einzellige Eukaryonten sind ein geeignetes Modell für Untersuchungen der Regulation der Genexpression. Es wurden *in vitro* Systeme für die Transkription von Hefe-DNA¹ und Hefe-Chromatin² sowie für die Translation von künstlicher^{3,4} und natürlicher mRNA^{5,6} entwickelt. Die zellfreie DNA-gesteuerte Proteinsynthese, wie sie für *E. coli*-Systeme mit Phagen-⁷ und mitochondrialer Hefe-DNA⁸ beschrieben wurde, ist bisher aber noch nicht gelungen. Die Schwierigkeiten, die sich bei der Erstellung eines gekoppelten DNA-abhängigen Hefe-Systems ergeben, resultieren aus der Kompartimentierung der Eukaryontenzelle. Im Gegensatz zu Prokaryonten laufen in der Hefezelle Transkription und Translation nicht unter den gleichen Ionenbedingungen ab. *In vitro* Experimente haben gezeigt, daß Mangan für die Transkription und Magnesium für die Translation essentiell ist, während *E. coli*-Systeme in beiden Fällen Magnesium benötigen. Um den Einfluß von verschiedenen Ionenbedingungen auf die Translation untersuchen zu können, entwickelten wir ein durch endogene mRNA gesteuertes, zellfreies Hefe-System, das zur Reinitiation der Proteinsynthese befähigt ist.

Sonderdruckanforderungen an Bernd Schulz-Harder, Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik, Ehrenbergstraße 26–28, D-1000 Berlin 33.

Material und Methoden

Die *Saccharomyces*-Stämme 211 (diploid)⁹, R XII (diploid)¹⁰, 2200 (tetraploid)¹¹, 1000 (haploid)¹¹ wuchsen 12–15 h bei 30 °C (2 ml Vorkultur/5 l Medium) in einem Medium, das 2% Glucose, 1% Difco-Yeast Extrakt und 0,5% Pepton enthielt unter Rühren ohne zusätzliche Belüftung auf. Der *Schizosaccharomyces pombe* Stamm 975 (diploid)¹² wurde in Edinburg Minimal Medium¹³ mit Belüftung aufgezogen. Nach Zugabe von Eis wurden die Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen bei einer Trübung zwischen 0,2 und 0,65 (OD_{525 nm}, Lange Kolorimeter) geerntet und dreimal mit Puffer (30 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$) gewaschen. 15 g Zellen (Feuchtmasse) wurden mit Homogenisationspuffer (30 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 500 mM Saccharose, 6 mM 2-Mercaptoäthanol, 0,25 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerin) auf 40 ml aufgefüllt, 30 min bei 20 °C inkubiert und in einer French-Press-Zelle mit einem Gemisch aus Trockeneis und Äthanol eingefroren. Danach wurden die Hefen mit einem Druck von 20 000 pSi durch eine Kanüle mit 1,4 mm Innendurchmesser gepreßt. Die Isolierung der Polyribosomen erfolgte in Anlehnung an die von Falvey und Staehelin beschriebene Methode¹⁴. Das Homogenat wurde 10 min mit 18 000 × g zentrifugiert. Zu dem postmitochondrialen Überstand wurde Brij 58 (Endkonzentration 1%) gegeben, bevor er (20 ml) auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten von 1,8 M (8 ml) und 1 M (8 ml) (30 mM



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 digitized 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.

Tris-HCl pH 7,5, 200 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 6 mM 2-Mercaptoäthanol, 0,25 mM EDTA) geschichtet und in einem SW 27 Rotor 18 h mit 131 000 × g (0 °C) zentrifugiert wurde. Der gesamte Überstand wurde abgesaugt, der Niederschlag mit destilliertem Wasser gespült und in Puffer mit niedriger KCl-Konzentration (50 mM KCl, sonst wie oben) gelöst. Die Polyribosomensuspension wurde auf eine optische Dichte von 200 – 400 OD_{260 nm}/ml eingestellt und bei –25 °C aufbewahrt. Die Ausbeute aus 15 g Hefe betrug zwischen 50 mg und 70 mg Polyribosomen.

Die Charakterisierung der Polyribosomen erfolgte mit Hilfe von Sedimentationsanalysen. 10 bis 15 OD_{260 nm} wurden auf einen linearen Gradienten (20 – 45% Saccharose in Puffer mit niedriger KCl-Konzentration) aufgetragen und 5 h mit 131 000 × g im SW 27 Rotor bei 0 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 1,2 ml Fraktionen entnommen und ihre optische Dichte bei 260 nm bestimmt.

Die biologische Aktivität der Polyribosomen wurde im zellfreien Protein-synthetisierenden System getestet. Ein Ansatz von 0,1 ml enthielt 0,1 bis 0,5 mg Polyribosomen, 0,02 bis 0,03 mg Enzyme, 0,15 µmol Adenosintriphosphat (ATP), 0,03 µmol Guanosintriphosphat (GTP), 0,3 µmol Phosphoenolpyruvat (PEP), 0,5 µg PEP-Kinase und 0,1 µCi eines [¹⁴C]Aminosäuregemisches, das mit 5 nicht markierten Aminosäuren ergänzt wurde. Die Enzyme wurden durch 30 – 60% Ammoniumsulfatfällung des S100-Überstandes erhalten. Diese Fraktion enthielt neben Aminoacyl-tRNA-synthetasen, Initiations- und Elongationsfaktoren auch tRNA. Die Inkubation erfolgte in einem Puffer mit 30 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-Mercaptoäthanol und 0,2 mM EDTA bei 30 °C. Die Reaktion wurde mit 5% Trichloressigsäure (TCA) gestoppt. Die Proben wurden 15 min auf 90 °C erhitzt, um aminoacylierte tRNA zu zerstören. Der Niederschlag wurde an Selectron Glasfaserfilter Typ GF 92 (Schleicher und Schüll, Dassel) adsorbiert, mit 5% TCA sowie Äther/Aäthanol (1:1) gewaschen, getrocknet und zu 5 ml Scintillationsmix (4 g Omnifluor/1 l Toluol) gegeben. Die Radioaktivität wurde mit 90% Zählausbeute gemessen.

Saccharose, Ammoniumsulfat, ATP, GTP, Chloramphenicol und Cycloheximid wurden von der Firma Serva, PEP, PEP-Kinase und Ribonuklease (RNase) aus Rinderpankreas von Boehringer Mannheim und das [¹⁴C]Aminosäuregemisch (140 Ci/mol) von der Firma Isotopen Dienst West, Spandlingen, bezogen. Omnifluor wurde von NEN Chemicals, Dreieichenhain, Aurintricarboxylic Acid von Sigma (St. Louis, USA) und Edeine von Calbio-

chem (Luzern, Schweiz) geliefert. Alle anderen Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

Ergebnisse und Diskussion

Der Aufschluß von Hefezellen mit der French-Press ist eine schonende Methode, die es erlaubt, so fragile Zellkomponenten wie Kerne¹⁵ und Polyribosomen zu isolieren. Dieses Verfahren hat gegenüber der Herstellung und Lysis von Sphaeroplasten^{16–18} den Vorteil, daß es von den Wachstums- und Inkubationsbedingungen sowie von den Eigenschaften des Hefestammes unabhängig ist. Polyribosomen konnten aus Zellen der *Saccharomyces*-Stämme 211 (diploid), R XII (diploid), 2200 (tetraploid), 1000 (haploid) und aus dem *Schizosaccharomyces pombe* Stamm 975 (diploid) isoliert werden. Für die Experimente dieser Arbeit wurde der *Saccharomyces*-Stamm 211 benutzt.

Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen wurden vor dem Aufbrechen mit der French-Press in Homogenisationspuffer aufgenommen und 30 min bei 20 °C inkubiert. Es ist wichtig, frische Zellen zu nehmen, da ein Einfrieren und Auftauen der Hefen ohne Homogenisationspuffer zur teilweisen Zerstörung der Polyribosomen in der Zelle führt. Um die Bildung von unspezifischen Polyribosomen-Protein-Komplexen zu verhindern, wurde zur Isolierung ein Puffer mit hoher Salzkonzentration (200 mM) gewählt. Zur Anreicherung der Polyribosomen wurde der postmitochondriale Überstand auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten (1,8 M/l M Saccharose) geschichtet und 18 h mit 131 000 × g zentrifugiert. Der Niederschlag enthielt bis zu 95% Polyribosomen, deren Anteil an der gesamten Ribosomenmenge betrug aber nur ca. 15%.

Für den Nachweis von Polyribosomen wurden Sedimentationsanalysen, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Da bekannt ist, daß Polyribosomen RNase-sensitiv sind^{19, 20}, wurde eine Inkubation mit niedriger RNase-Konzentration vorgenommen. Abb. 1 zeigt ein typisches Polyribosomen-Profil. Nach 10 min Inkubation bei 35 °C nahm der Anteil schwerer Polyribosomen zugunsten von Oligoribosomen und Monoribosomen ab. Mit 0,2 µg RNase/ml inkubierte Polyribosomen wurden vollständig zu Monoribosomen abgebaut.

In dem Experiment, dessen Ergebnis in Abb. 2 dargestellt ist, wurde der Polyribosomengehalt der Hefen in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

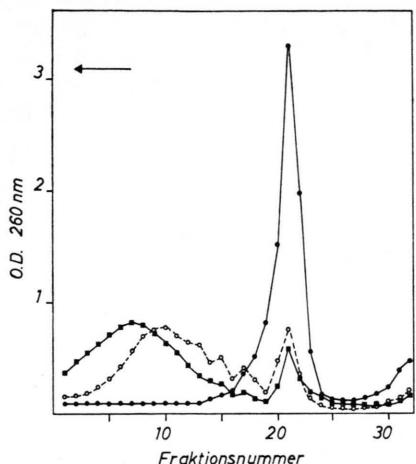


Abb. 1. Sedimentation RNase-behandelter Polyribosomen. Polyribosomen wurden mit $0,2 \mu\text{g}$ RNase/ml 10 min bei 35°C inkubiert. Die Sedimentation wurde 5 h mit $131\,000 \times g$ im SW 27 Rotor durchgeführt (20–45% Saccharosegradient). ■—■, Nicht inkubierte Polyribosomen; ○—○, ohne RNase inkubiert; ●—●, mit RNase inkubiert.

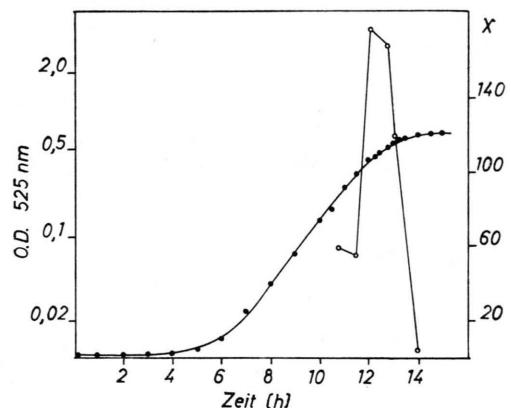


Abb. 2. Polyribosomengehalt von Hefezellen Stamm 211 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase. Polyribosomen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, isoliert und 5 h mit $131\,000 \times g$ im SW 27 Rotor sedimentiert (20–45% Saccharosegradient). Aus den Sedimentationsprofilen wurde der Anteil von Polyribosomen (Fraktion 1 bis 17) und Monoribosomen (Fraktion 21–23) bestimmt.

$$\begin{aligned} n=18 & \sum_{n=1}^{18} \text{OD}_{260 \text{ nm}} \times (18-n) \\ \bullet-\bullet, \chi = & \frac{\sum_{n=23}^{23} \text{OD}_{260 \text{ nm}}}{\sum_{n=21}^{21} \text{OD}_{260 \text{ nm}}} ; \\ \bullet-\bullet, \text{Wachstumskurve Stamm } 211 & (\text{OD } 525 \text{ nm}). \end{aligned}$$

untersucht. Aus Sedimentationsanalysen wurde das Verhältnis von Polyribosomen ($\text{OD}_{260 \text{ nm}}$ der Fraktionen 1 bis 17) zu Monoribosomen ($\text{OD}_{260 \text{ nm}}$ der Fraktionen 21 bis 23) bestimmt. Unterschiede in der Verteilung innerhalb des Polyribosomenbereichs

wurden durch Gewichtung der Polyribosomenfraktionen berücksichtigt. Schwere Polyribosomen wurden gegenüber leichten stärker gewichtet. Es hat sich gezeigt, daß während der spätlogarithmischen Wachstumsphase der Anteil der Polyribosomen am höchsten ist. Dagegen überwiegt der Anteil der Monoribosomen besonders stark in der stationären Phase. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen von Rock und Johnson²¹, die nachweisen konnten, daß der RNase-Gehalt von stationären Zellen besonders groß ist. Außerdem fanden Lucas *et al.*²² sowie Dietz *et al.*²³, daß Ribosomen aus logarithmischen Zellen die höchste biologische Aktivität besitzen. Für die weiteren Untersuchungen wurden nur Zellen aus der spätlogarithmischen Wachstumsphase verwendet. Werden Polyribosomen im zellfreien System inkubiert und dann sedimentiert, so sind wachsende Polypeptidketten an Polyribosomen und Monoribosomen zu erkennen (Abb. 3). Die Zunahme der markierten Peptide im Monoribosombereich deutet darauf hin, daß ein Teil der synthetisierten Peptide nicht von den Ribosomen

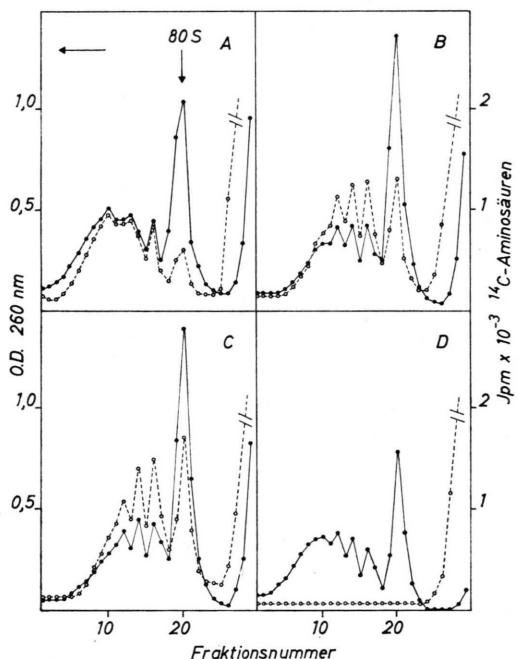


Abb. 3. *In vitro* Synthese von Polypeptiden an Polyribosomen. Polyribosomen wurden im zellfreien System 10, 30 und 50 min inkubiert (Inkubationsbedingungen siehe Material und Methoden) und anschließend 5 h mit $131\,000 \times g$ im SW 27 Rotor sedimentiert (20–45% Saccharose). A, 10 min; B, 20 min; C, 50 min; D, 50 min ohne ATP, GTP, PEP und PEP-Kinase. ●—●, OD 260 nm ; ○—○, $[^{14}\text{C}]$ Aminosäuren.

entlassen wurde. Der gleiche Effekt wurde auch von Mager und Planta⁵ beschrieben. Zum Nachweis von freien Polypeptiden wurden die Ribosomen nach der Inkubation abzentrifugiert. Wir fanden, daß nach

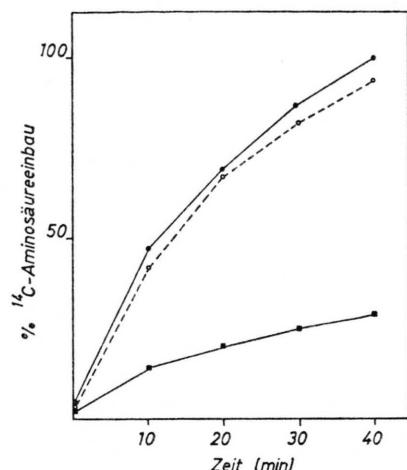


Abb. 4. Hemmung der zellfreien Proteinbiosynthese mit Cycloheximid und Chloramphenicol. Die Inkubation wurde, wie unter Material und Methoden beschrieben, durchgeführt.
●—●, Kontrolle; ■—■, 1 mM Cycloheximid; ○—○, 1 mM Chloramphenicol.

40 min ca. 20% und nach 80 min ca. 40% des säureunlöslichen Materials im Überstand enthalten waren.

Um zu testen, ob der durch endogene mRNA gesteuerte Aminosäureeinbau auf Initiation und Elongation oder nur auf Elongation der Proteinbiosynthese von cytoplasmatischen Ribosomen zurückzuführen ist, wurden dem zellfreien System spezifisch wirkende Antibiotika zugefügt. Cycloheximid, das die Elongation an den Ribosomen vom 80S-Typ

blockiert²⁴, inhibierte das System zu 70% (Abb. 4). Dagegen bewirkte Chloramphenicol²⁴ nur eine Hemmung von 6%, was zu der Annahme berechtigt, daß keine oder nur eine sehr geringe Kontamination mit mitochondrialen 70S-Ribosomen stattgefunden hat. Die Initiation der Proteinbiosynthese kann auf mehreren Stufen blockiert werden²⁴. Während geringe Konzentrationen von Aurintricarboxylic Acid (ATA) die Anlagerung der mRNA an die 40S-Untereinheit verhindert, wird durch Edeine die Bindung der Met-tRNA_F an das Initiationscodon beeinflußt. Natriumfluorid (NaF) behindert die Bindung der 60S-Untereinheit an den Initiationskomplex. Wie aus Abb. 5 zu ersehen ist, wird der Aminosäureeinbau durch Aurintricarboxylic Acid, Edeine und Natriumfluorid gehemmt. Damit konnten wir zeigen, daß in einem von hoch gereinigten Polyribosomen abhängigen zellfreien System Reinitiation stattfindet.

Mit diesem System untersuchten wir den Einfluß verschiedener Ionenbedingungen auf die Translation, um Möglichkeiten für eine DNA-abhängige *in vitro* Proteinbiosynthese zu finden. Übereinstimmend mit der Arbeit von Gallis und Young⁶ wurde der maximale Aminosäureeinbau mit 6 mM MgCl₂ erreicht (Abb. 6A). Im Gegensatz zur Translation sind für die Transkription von Hefe-DNA im zellfreien System Manganionen essentiell. Ponta *et al.*¹ fanden eine optimale Konzentration von 1,6 mM MnCl₂. Es war deshalb für uns von besonderem Interesse herauszufinden, ob die Möglichkeit besteht, in unserem System Magnesiumionen ganz oder teilweise durch Manganionen zu ersetzen. Die Abhängigkeit der Proteinbiosynthese von der MnCl₂-Konzentration wurde bei 2 mM, 3 mM und 6 mM MgCl₂

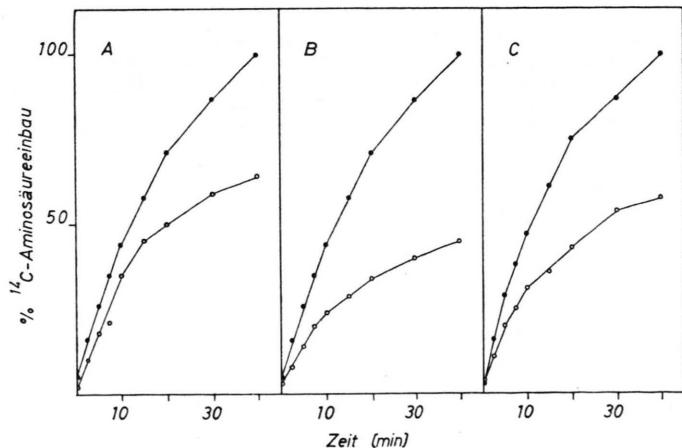


Abb. 5. Hemmung der Initiation der Proteinbiosynthese im zellfreien System (Inkubationsbedingungen siehe Material und Methoden) mit 75 µM ATA (A), 5 mM Edeine (B) und 5 mM NaF (C). ●—●, Kontrolle; ○—○, mit Antibiotika.

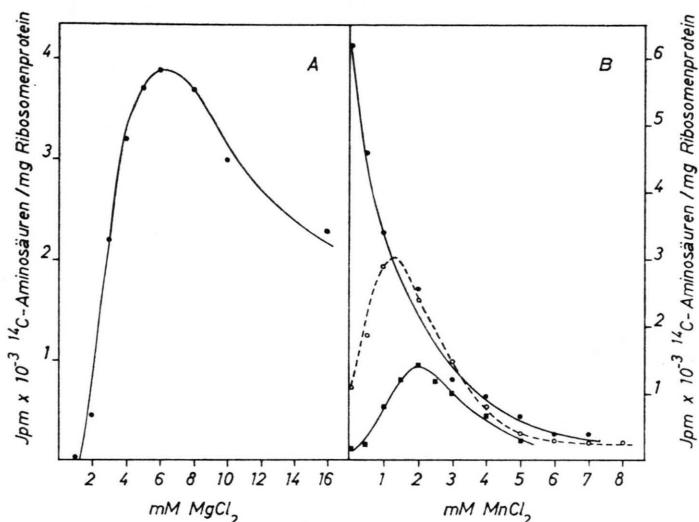


Abb. 6. Einfluß von Magnesium und Manganionen auf die zellfreie Proteinbiosynthese. (A) Abhängigkeit des Aminosäureeinbaus von der MgCl_2 -Konzentration. (B) Abhängigkeit des Aminosäureeinbaus von der MnCl_2 -Konzentration bei \bullet — \bullet 6 mM MgCl_2 , \circ — \circ 3 mM MgCl_2 , \blacksquare — \blacksquare 2 mM MgCl_2 .

getestet. Wird mit 6 mM MgCl_2 inkubiert (Abb. 6B), nimmt die Aminosäureeinbaurate mit steigender MnCl_2 -Konzentration stark ab. Dagegen werden mit 2 mM und 3 mM MgCl_2 Maxima bei 2 mM bzw. 1,5 mM MnCl_2 erreicht. Diese Werte liegen aber 50% bzw. 75% unter der Syntheserate des Mangan-freien Ansatzes. Neben divalenten Ionen werden Kalium- oder Ammoniumionen für die zellfreie mRNA- und Proteinsynthese benötigt. Die Polyribosomen waren über einen weiten Bereich der KCl-Konzentration,

mit einem Maximum bei 50 mM KCl, aktiv. Auch die *in vitro* Transkription zeigt keine kritische Abhängigkeit von der Ammoniumsulfatkonzentration¹.

Obwohl die optimalen Ionenkonzentrationen von Transkription und Translation bei Hefen sehr verschieden sind, zeigen die Untersuchungen, daß es doch möglich ist, Ionenbedingungen zu finden, unter denen sowohl die mRNA-Synthese als auch der Aminosäureeinbau in einem zellfreien System nebeneinander ablaufen können.

- ¹ H. Ponta, U. Ponta, V. Kraft u. E. Wintersberger, Eur. J. Biochem. **46**, 473–479 [1974].
- ² U. Wintersberger, P. Smith u. K. Letnansky, Eur. J. Biochem. **33**, 123–130 [1973].
- ³ B. A. M. van der Zeijst, K. M. J. Engel u. H. P. J. Bloemers, Biochim. Biophys. Acta **294**, 517–526 [1973].
- ⁴ R. K. Brethauer, L. Marcus, J. Chaloupka, H. O. Halvorson u. R. M. Bock, Biochemistry **2**, 1079–1084 [1963].
- ⁵ W. H. Mager u. R. J. Planta, Biochim. Biophys. Acta **402**, 105–112 [1975].
- ⁶ B. M. Gallis u. E. T. Young, J. Bacteriol. **122**, 719–726 [1975].
- ⁷ P. Herrlich u. M. Schweiger, Methods in Enzymology **XXX**, 654–669 [1974].
- ⁸ A. H. Scragg u. D. Y. Thomas, Eur. J. Biochem. **56**, 183–192 [1975].
- ⁹ W. Laskowski, Z. Naturforsch. **17b**, 93–108 [1962].
- ¹⁰ Der Stamm wurde uns freundlicherweise von A. Kotyk, Prag, zur Verfügung gestellt.
- ¹¹ U. Reichert, Zbl. Bakteriol. Parasitenk. Abt. I. Org. **205**, 63–68 [1967].
- ¹² Der Stamm wurde uns freundlicherweise von R. Schmidt, Berlin, zur Verfügung gestellt.
- ¹³ J. M. Mitchison u. P. R. Gross, Exp. Cell Res. **37**, 259–277 [1965].
- ¹⁴ A. K. Falvey u. T. Staehelin, J. Mol. Biol. **53**, 1–19 [1970].
- ¹⁵ M. M. Bhargava u. H. O. Halvorson, J. Cell Biol. **49**, 423–429 [1971].
- ¹⁶ H. T. Hutchison u. L. H. Hartwell, J. Bacteriol. **94**, 1697–1705 [1967].
- ¹⁷ M. M. Shahin, J. Bacteriol. **110**, 769–771 [1972].
- ¹⁸ H. Holz u. L. Scholting, Z. Naturforsch. **30c**, 516–519 [1975].
- ¹⁹ T. Staehelin, C. C. Brinton, F. O. Wettstein u. H. Noll, Nature **199**, 865–870 [1963].
- ²⁰ F. O. Wettstein, T. Staehelin u. H. Noll, Nature **197**, 430–435 [1963].
- ²¹ G. D. Rock u. B. F. Johnson, Can. J. Microbiol. **16**, 187–191 [1970].
- ²² J. M. Lucas, A. H. W. M. Schuurs u. M. V. Simpson, Biochemistry **3**, 959–967 [1964].
- ²³ G. W. Dietz, B. R. Reid u. M. V. Simpson, Biochemistry **4**, 2340–2350 [1965].
- ²⁴ D. Vazques, FEBS-Letters **40**, Supplement, 63–84 [1974].