

Über den Gehalt an membrangebundenen und freien Ribosomen in *Saccharomyces*-Zellen nach Hemmung der Proteinsynthese mit Cycloheximid

The Content of Membrane-Bound and Free Ribosomes in *Saccharomyces* after the Inhibition of Protein Synthesis with Cycloheximid

Joan Kraft-Creech, Ingrid Pietsch und Ernst-Randolf Lochmann

Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Freie Universität Berlin

Z. Naturforsch. 33 c, 299–300 (1978);
eingegangen am 2. November 1977/1. Januar 1978

Protein Synthesis, Cycloheximid, Membrane-Bound and Free Ribosomes

After the inhibition of protein synthesis in *Saccharomyces* cells with cycloheximid, the content of membrane-bound ribosomes decreases significantly, whereas the content of free ribosomes remains the same as the untreated control for a longer period of time. This is further evidence that in yeast cells protein synthesis takes place only on membrane-bound ribosomes.

Seit längerer Zeit ist bekannt, daß in Eukaryontenzellen Ribosomen sowohl frei als auch membrangebunden vorkommen [1]. In zahlreichen Arbeiten wird berichtet, daß in Eukaryonten Proteinsynthese sowohl an membrangebundenen als auch an freien Ribosomen stattfindet, und daß an jeder Ribosomenart spezifische Proteine synthetisiert werden (vgl. zahlreiche Zitate in l. c. [2–4]).

Eingehende Untersuchungen mit Hefezellen, die in den letzten Jahren durchgeführt wurden, ließen jedoch Zweifel aufkommen, daß in diesen Zellen Proteinsynthese *in vivo* an freien Ribosomen stattfindet. Es konnten unter *in vivo*-Bedingungen bisher nur Hinweise für eine Proteinsynthese-Aktivität an membrangebundenen Ribosomen gefunden werden [5–8].

Um weitere Hinweise zu diesem Problem zu bekommen, untersuchten wir u. a. den Einfluß von Proteinsynthese-Hemmern auf die Membranbindung der Ribosomen in synchron wachsenden *Saccharomyces*-Zellen.

Die durchgeführten Experimente mußten sich auf die Anwendung von Cycloheximid beschränken,

da fast alle bekannten Hemmstoffe der Proteinsynthese (ähnlich wie auch die meisten Hemmstoffe der RNS-Synthese) das Wachstum und die Proteinsynthese *in vivo* bei Hefezellen nicht beeinflussen, wahrscheinlich weil diese Verbindungen Zellwand bzw. Zellmembran der Hefezelle nicht durchdringen können [7].

Neben Cycloheximid zeigte nur NaF in hohen Konzentrationen (>20 mM) Wirkung auf Wachstum und Proteinsyntheserate in Hefezellen. Da NaF aber nicht primär und spezifisch auf die Proteinsynthese einwirkt [7], wurden die Experimente mit NaF nicht in diese Untersuchungen einbezogen. Kontrollversuche mit Chloramphenicol zeigten, daß unter unseren Kultivierungsbedingungen [5–7] der Mitochondrienanteil und daher auch die Proteinsyntheserate an mitochondrialen Ribosomen sehr

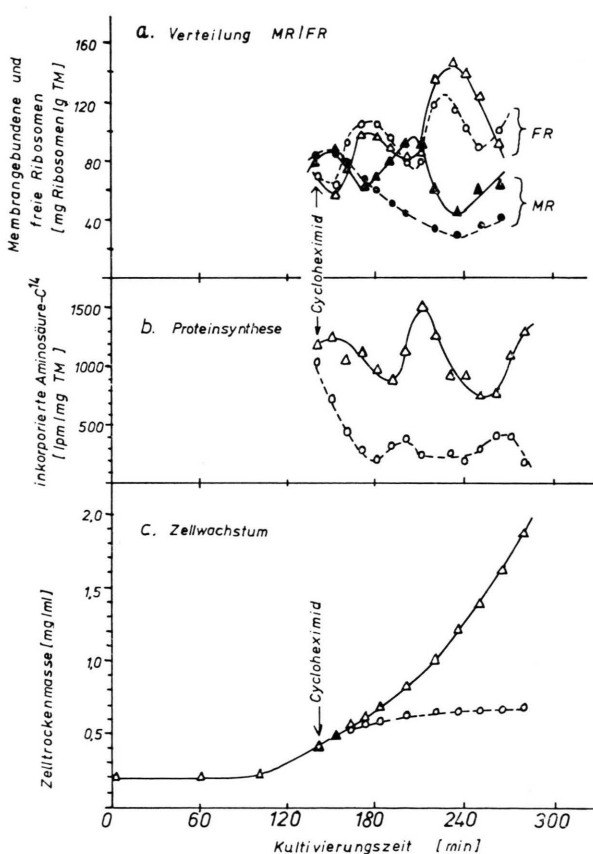


Abb. 1. Gehalt an membrangebundenen (MR) und freien (FR) Ribosomen (a), Proteinsyntheserate (b) und Zellwachstum (c) in einer synchron wachsenden Hefekultur nach Hemmung mit Cycloheximid. (— Δ Δ — unbehandelte Kontrollen, --- \circ \bullet --- nach Cycloheximid-Behandlung.)

Sonderdruckanforderungen an Joan Kraft-Creech, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Freie Universität Berlin, Ehrenbergstraße 26–28, D-1000 Berlin 33.



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.

gering ist, d. h. die hier bestimmten Werte der Proteinsyntheserate sind fast ausschließlich Ergebnisse der Synthese an 80S-Ribosomen [7].

Den Verlauf von Zellwachstum, Proteinsyntheserate und dem jeweiligen Anteil von membrangebundenen (MR) und freien (FR) Ribosomen nach Zugabe von 0,2 mM Cycloheximid im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen zeigen die Abb. 1 a–c. Es ist zu erkennen, daß nach Zugabe von Cycloheximid zu einer synchron wachsenden Hefekultur [7] das Zellwachstum und die Proteinsyntheserate rasch gestoppt werden. Der Gehalt an MR sinkt ca. 30 min nach Zugabe von Cycloheximid stark unter die Kontrollwerte ab. Die periodischen Schwankungen des MR-Anteils der Zellen, die bei synchron wachsenden Kontrollzellen deutlich erkennbar sind (vgl. l. c. [5–7] und Abb. 1 a), sind nach Cycloheximid-Behandlung nicht mehr erkennbar. Der Gehalt an FR bleibt noch längere Zeit dem von unbehandelten Kontrollzellen etwa gleich und wird erst nach ca. 60–80 min verringert.

Die hier wiedergegebenen Ergebnisse werden von uns im Zusammenhang mit früher publizierten Werten [5–8] als weiterer Hinweis für die Tatsache gewertet, daß in Hefezellen Proteinsynthese vorwiegend oder sogar ausschließlich an membrangebundenen Ribosomen stattfindet.

Weitere autoradiographische und elektronenoptische Untersuchungen zu diesem Problem sind im Gange.

Experimentelles

Für die Untersuchungen wurde der tetraploide *Saccharomyces*-Stamm 2200 verwendet [9]. Kontrollexperimente zeigten, daß verwandte Stämme mit anderem Plodieggrad (haploid oder diploid) gleiche Ergebnisse ergeben.

Das verwendete Cycloheximid ist ein Produkt der Fa. Serva, Heidelberg.

Zur Durchführung der Versuche wurden 8 l Vollmedium (2% Glukose, 1% Difco-Yeast-Extrakt, 0,5% Pepton) mit einer stationären, mindestens 48 Stunden alten Vorkultur zu einem hohen Anfangs-Titer ($2,1 \times 10^7$ Zellen/ml beimpft. Nach der lag-Phase und einer Verdopplung der Zellmasse wurde die Kultur auf 2 Kultivierungsgefäße aufgeteilt und in ein Gefäß 0,2 mM Cycloheximid gegeben. Über 2 Stunden lang wurden nun aus beiden Gefäßen Proben entnommen und die Proteinsyntheserate durch Pulsmarkierung (5 min) mit [14 C]-Aminosäure-Gemisch bestimmt. Außerdem wurden in bestimmten Abständen aus gleich großen Zellmengen (jeweils 250 mg Zelltrockenmasse) die membrangebundenen und freien Ribosomen isoliert und quantitativ bestimmt.

Die Methoden zur Untersuchung der Proteinsyntheserate und des Gehalts an MR und FR in wachsenden Hefezellen wurden früher beschrieben [5–8].

Frau Elisabeth Schneider danken wir für ausführliche, hilfreiche Diskussionen der Ergebnisse.

- [1] G. E. Pallade u. P. Siekevitz, J. Biophys. Biochem. Cytol. **2**, 171–200 (1956).
- [2] F. S. Rolleston, Sub.-Cell. Biochem. **3**, 91–117 (1974).
- [3] P. R. McIntosh u. K. O'Toole, Biochim. Biophys. Acta **457**, 171–212 (1976).
- [4] G. C. Shore u. I. R. Tata, Biochim. Biophys. Acta **472**, 197–236 (1976).
- [5] E. Schneider, E.-R. Lochmann u. H. Lothar, Biochim. Biophys. Acta **432**, 92–97 (1976).
- [6] E. Schneider, Dissertation, Freie Universität Berlin 1977.
- [7] J. Kraft-Creech, Dissertation, Freie Universität Berlin 1977.
- [8] J. Kraft-Creech u. E.-R. Lochmann, Biochim. Biophys. Acta (1978), im Druck.
- [9] U. Reichert, Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkde. Infektionskr. Hyg. Abt. I, Org. **205**, 63–67 (1967).