

# Proteinsynthese mit Zellextrakten von *Micrococcus radiodurans*

Protein Synthesis with Cell Extracts of *Micrococcus radiodurans*

Annette Widmann und Roland Süssmuth

Institut für Mikrobiologie, Stuttgart-Hohenheim

Z. Naturforsch. 33 c, 948–954 (1978) ; eingegangen am 11. Juli, 1978

*Micrococcus radiodurans*, Cell-Free Protein Synthesis

Pure active ribosomes of cells of *Micrococcus radiodurans* could be obtained when cultivated in trypton, glucose and nutrient broth by adding natrium citrate. The optimal conditions for a cell-free protein synthesis were investigated at the (polyuridylic acid) dependent polyphenylalanine synthesis. When exchanging ribosomes and S100-fractions with the corresponding fractions of *E. coli*, we found that the enzyme fractions of *M. radiodurans* extremely inhibit the ribosomal activity. The incorporation rates in the cell-free system of *M. radiodurans* yield, at comparable conditions, in relation to *E. coli* under 10%.

## Einleitung

*M. radiodurans* wurde erstmals 1956 aus Fleisch isoliert, das zur Entkeimung mit 2–3 Mrad ionisierender Strahlung behandelt worden war [1]. Neben der hohen Widerstandsfähigkeit gegen  $\gamma$ -Strahlung (bis 6 Mrad) wurde auch eine hohe Resistenz gegen UV-Licht festgestellt [2–4]. Es konnte nachgewiesen werden, daß *M. radiodurans* eine beträchtliche Zahl von DNA-Doppelstrangbrüchen zu reparieren vermag [5, 6]. Im Gegensatz zu anderen *Micrococcus*-Arten weist das Bakterium eine Reihe weiterer Eigenschaften auf wie Salztoleranz, hohe Katalaseaktivitäten und Fähigkeit zur Caseinproteolyse und Nitratreduktion [1, 7]. Die Zellwand des an sich grampositiven *Micrococcus radiodurans* ist mit ihrem hohen Lipidgehalt atypisch und zeigt Ähnlichkeit mit dem Zellaufbau gramnegativer Spirillen [8, 9]. In der DNA konnten weder methylierte Basen gefunden werden, noch ließ sich eine Methylasenaktivität nachweisen [10]. Da im Zusammenhang mit der Strahlenresistenz eine Untersuchung der Ribosomen von *M. radiodurans* von Interesse ist, haben wir uns mit der Frage befaßt, unter welchen Bedingungen die zellfreie Proteinsynthese am Beispiel der Polyuridylsäure-abhängigen Polyphenylalaninsynthese möglich ist.

## Material und Methoden

### Stämme:

*M. radiodurans*, freundlicherweise von J. K. Setlow, Tenn., USA, zur Verfügung gestellt;  
*E. coli* B  
*M. lysodeikticus*.

Sonderdruckanforderungen an Dr. R. Süssmuth, Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim, Garbenstraße 30, D-7000 Stuttgart 70.

## Chemikalien

L-3-Phenyl[2,3-<sup>3</sup>H]alanin, 5 Ci/mmol wurde von Amersham Buchler, Braunschweig; Polyuridylsäure von Miles GmbH Frankfurt; Alcoa (Aluminiumoxid) von der Alcoa Deutschland GmbH, Frankfurt/M; ATP, GTP, PEP, Pyruvatkinase von Boehringer, Mannheim; Bactotrypton und Nutrient Broth von Difco Laboratories, Detroit (USA); Pepton und Yeast Extract von Oxoid, Wesel; Visking-Dialyseschlauch von der Firma Serva Feinbiochemica, Heidelberg, bezogen. Übrige Chemikalien stammten von der Firma Merck, Darmstadt.

## Medien und Puffer

**HNB-Komplettmedium** (Plattenkulturen der drei Stämme und Submerskultur von *E. coli* B): Auf 1 l dest. Wasser 10 g Nutrient Broth, 5 g Yeast Extract, 5 g NaCl, für Platten 20 g Agar.

**TGN-Medium** (Submerskultur von *M. radiodurans*): Auf 1 l dest. Wasser 1 g Nutrient Broth, 5 g Trypton, 1 g Glucose, pH 7,2.

**TGNC-Medium** (Submerskultur von *M. radiodurans*): enthielt zusätzlich zum TGN-Medium 0,9 g Natriumcitrat pro l.

**PNYC-Medium** (Submerskultur von *M. lysodeikticus*): Auf 1 l dest. Wasser 10 g Pepton, 10 g Yeast Extract, 0,8 g Glucose, 5 g NaCl, 0,9 g Natriumcitrat, pH 7,3.

**Waschpuffer**: Auf 1 l dest. Wasser 12,1 g Tris/HCl, pH 7,8, 2,14 g Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·4 H<sub>2</sub>O, 3,7 g KCl.

**Extraktionspuffer**: Enthielt zusätzlich zum Waschpuffer 0,42 ml  $\beta$ -Mercaptoäthanol.



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.

### Bakterienzüchtung

*M. radiodurans* wurde in 10 l Fermentoren unter starker Belüftung bei 37 °C in TGN bzw. TGNC-Medium gezüchtet und in verschiedenen Wachstumsphasen geerntet. Das Wachstum wurde durch Trübungsmessung im Eppendorf-Photometer verfolgt (Filter 400–600 nm). *E. coli* B und *M. lysodeikticus* wurden in HNB- bzw. PNYC-Medium bei 37 °C bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase gezüchtet und dann geerntet. Zur Ernte wurden die Bakterien auf 4 °C abgekühlt und in einer Beckman-Kühlzentrifuge J 21 10 min bei 4 °C und 8000 g zentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit Waschlösung gewaschen und bei –20 °C aufbewahrt.

### Präparation der Ribosomen und S100-Extrakte

Der Aufschluß der Bakterien erfolgte durch Zerkleinern mit Alcoa: a g Bakterien, 2 a g Alcoa und 2 a ml Extraktionspuffer wurden im vorgekühlten Mörser 30 min bei 4 °C zu einer cremigen Paste zerrieben. Bei *M. radiodurans* wurden a g Bakterien mit 2,5 a g Alcoa und 1,5 a ml Extraktionspuffer behandelt. Die Homogenisate wurden dann 20 min bei 30 000 g und 2 °C in einer Beckman-Kühlzentrifuge J 21 zentrifugiert. Der Überstand wurde 5 min mit 3 µg DNase/ml behandelt und erneut 20 min bei 30 000 g zentrifugiert. 4/5 des klaren Überstandes wurden als S30-Fraktion abpipettiert: Diese wurde 2 Stunden bei 2 °C und 105 000 g im Ti 50-Rotor der Ultrazentrifuge Spinco (Beckman) zentrifugiert. Vom Überstand wurden die oberen 4/5 bei *E. coli* bzw. das obere Drittel bei *M. radiodurans* gegen Extraktionspuffer 5 Stunden im Visking-Schlauch (Serva) dialysiert und als S100-Fraktion bei –20 °C aufbewahrt. Die restliche S100-Fraktion wurde verworfen. Die sedimentierten Ribosomen wurden in Extraktionspuffer (1/4 des Volumens der S30-Fraktion) suspendiert und 90 min zentrifugiert. Die so gewaschenen Ribosomen wurden in Extraktionspuffer aufgenommen in einer Menge, die bei *E. coli* B und *M. lysodeikticus* einem Viertel, bei *M. radiodurans* einem Achtel des Volumens der S100-Fraktion entsprach und in kleinen Portionen bei –20 °C aufbewahrt.

### Zellfreie Proteinsynthese

Die Proteinsynthese *in vitro* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, wie früher beschrieben [11, 12].

Das Inkubationsvolumen (250 µl) enthielt, wenn nicht anders vermerkt, 10 µl L-3-Phenyl[2,3-<sup>3</sup>H]-alanin, 100 µCi/ml; 10 µl Poly U, (*i. a.* 2 mg/ml) durchschnittliches Molekulargewicht 100 000 d; 10 µl tRNA (25 mg/ml), aus *E. coli* isoliert; 20 µl Zusatzlösung, sofern nicht anders vermerkt, deion. H<sub>2</sub>O; 100 µl ATP-Puffer (69 mg ATP, 26 mg PEP, 1,4 mg GTP und 0,5 mg PEP-Kinase, gelöst in 10 ml Puffer aus 0,15 M Tris/HCl, pH 7,8, 0,015 M Magnesiumacetat, 0,075 M KCl, 0,01 M β-Mercaptoäthanol, 100 µl eines Gemisches aus 60 µl Ribosomensuspension (durchschnittlich 11 mg Protein/ml) und 40 µl S100-Extrakt (durchschnittlich 12 mg Protein/ml). Bei *E. coli* wurden 100 µl eines Gemisches aus 80 µl Ribosomensuspension und 20 µl S100-Extrakt entsprechenden Proteingehalts eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 5 oder 10 Minuten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 µl entnommen, auf Chromatographiepapier (2,5 cm × 2,5 cm) aufgetragen und nach R. J. Mans und G. D. Novelli [13] und, wie früher angegeben [12], gewaschen und im Toluol-Szintillator im Liquid-Scintillation-Counter (Intertechnique) gemessen. Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt und gemittelt, wobei die Ergebnisse mit Ribosomen und S100-Extrakten verschiedener Zellaufschlüsse verglichen wurden. Die Einbauraten schwankten je nach Aufschlußqualität. Die Blindwerte wurden in den einzelnen Versuchen jeweils abgezogen. RNA-Bestimmung erfolgte nach Bial in der Modifizierung von W. Majbaum [14] und Proteinbestimmung wie früher beschrieben [12].

### Saccharosegradient

0,2 ml Ribosomensuspension wurden auf einen Saccharose-Gradienten (5 → 20%) aufgetragen und 135 min bei 38 000 rpm im Rotor SW 40 der Ultrazentrifuge Spinco (Beckman) zentrifugiert, sofort fraktioniert und bei 260 nm im Spektralphotometer PMQ 3 (Zeiss) gemessen.

### Ergebnisse

Eine eingangs in Submerskulturen durchgeführte Bestimmung der optimalen Wachstumstemperatur von *Micrococcus radiodurans* im Temperaturbereich zwischen 24 °C und 44 °C ergab 37 °C.

Wurde *M. radiodurans* in dem Medium TGN gezüchtet, so erwies sich das Ribosomensediment der 105 000 g-Zentrifugation als inhomogen. Eine un-

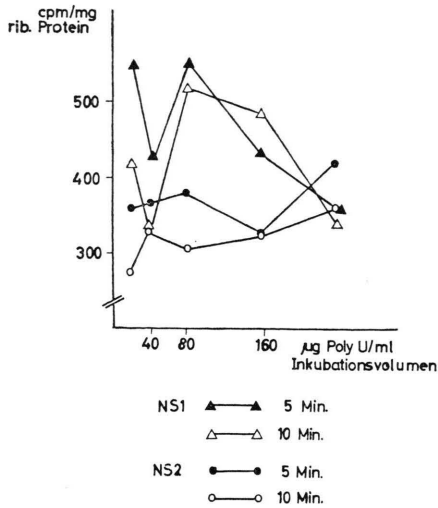


Abb. 1. Polypeptidsynthese in Abhängigkeit von der Poly U-Konzentration mit suspendierten Niederschlägen NS1 bzw. NS2 und S100-Fraktion im Verhältnis 60/40. Inkubationszeit 5 und 10 min bei 37 °C.

tere klare, honiggelbe, in Lösung opaleszierende Schicht (NS1) und eine obere rote Schicht (NS2) ließen sich unterscheiden. Wurden beide Schichten gemischt und als Ribosomensuspension im zellfreien Proteinsynthesystem eingesetzt, erhielt man nicht reproduzierbare Ergebnisse. Das zeigte sich auch, wenn die Schichten NS1 und NS2 getrennt aufgearbeitet wurden. Abb. 1 zeigt in Abhängigkeit von der Poly U-Konzentration, daß der rote leichtere Niederschlag NS2 eine geringere Proteinsyntheseaktivität aufweist als der Niederschlag NS1. Dies änderte sich entscheidend durch einen Zusatz von Citrat zum Kulturmedium TGN. Da Citrat nach Gorini *et al.* [15, 16] die Proteinase durch Komplexbildung mit  $\text{Ca}^{2+}$  inaktiviert, wurde zur Verringerung einer Proteinaseaktivität Citrat zugesetzt. Zellen, die in einer Submerskultur im TGNC-Medium wuchsen, führten zu einer völlig homogenen Ribosomenfraktion. Das kompakte Ribosomensediment war gelblich und die Ribosomensuspension weißlich opaleszierend ohne jede rötliche Färbung. Die roten Partikel befanden sich über dem Ribosomensediment in Lösung und waren leicht weschwemmbar. Nach der Protein- und RNA-Bestimmung zeigten die Ribosomen  $(64,2 \pm 0,9)\%$  RNA. Die Ribosomenausbeute war um 75% kleiner als die bei *E. coli* unter vergleichbaren Aufschlußbedingungen. Im TGNC-Medium wuchsen die Bakterien mit einer Generationszeit von 1,2 Stunden etwas

Tab. I. Einbau von Phenylalanin in Polypeptide in cpm/mg ribos. Protein in Abhängigkeit von den Medien, in denen die Zellen gezüchtet wurden und in Abhängigkeit von der Wachstumsphase der Zellen, aus denen jeweils die Ribosomen isoliert wurden. Inkubation 5 min bei 37 °C.

Wachstumsphase	Medium TGNC	Medium TGN
Beschleunigungsphase	347	—
Logarithmische Phase	389	280
Ruhephase	375	293

langsamer als im TGN-Medium mit einer Generationszeit von 0,8 Stunden. Tabelle I zeigt den Aminosäureeinbau, wenn die Ribosomen aus Zellen isoliert wurden, die in TGNC-Medium wuchsen. Die Einbaurrate war nicht höher als bei Einbauversuchen mit den Niederschlägen von NS1 oder NS2, jedoch verlief die Proteinsynthese ohne Schwankungen, und die Versuche waren reproduzierbar. Es konnten keine nennenswerten Einbauunterschiede festgestellt werden, ob die Ribosomen aus Zellen der Beschleunigungsphase, der logarithmischen Phase oder der Ruhephase stammten (Tab. I).

Die Einbauaktivität frisch aufgearbeiteter Extrakte war genauso groß wie von eingefrorenen 24 Stunden älteren, während für *E. coli* durch Einfrieren von Ribosomen- und Enzymextrakten ein Aktivitätsverlust von etwa 30% gefunden wurde. Eine Dialyse der S100-Fraktion gegen Extraktionspuffer brachte keine Verbesserung der Einbauaktivität.

Die Untersuchung der Einbauaktivität in Abhängigkeit von der Zeit zeigte (Abb. 2), daß sich

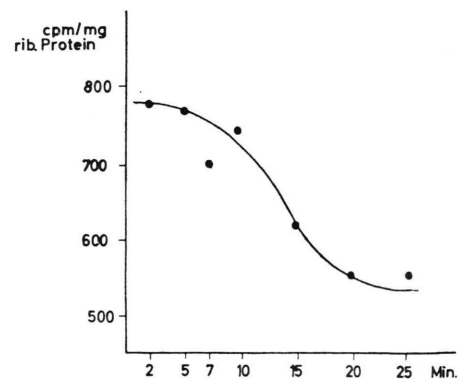


Abb. 2. Einbau von  $[^3\text{H}]$ Phenylalanin in Abhängigkeit von der Zeit. Ribosomen/S100-Fraktion 60/40. Inkubation bei 37 °C.

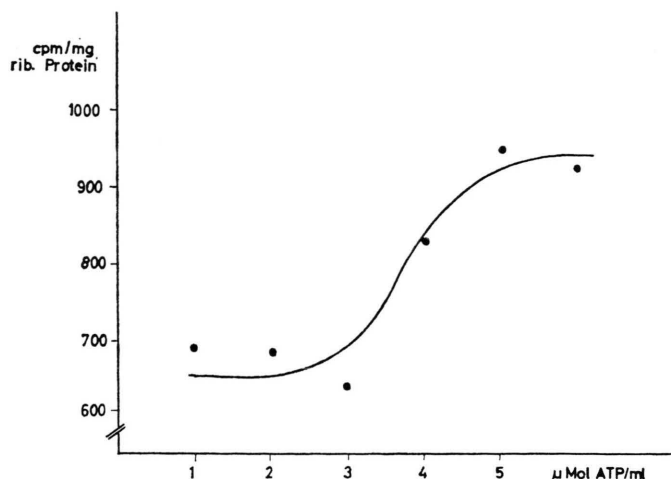


Abb. 3. Abhängigkeit der Einbauaktivität von der ATP-Konzentration. Ribosomen/S100-Fraktion 60/40. 10 min Inkubation bei 37 °C. ATP-Konzentration in  $\mu\text{mol ATP/ml}$  Inkubationsvolumen.

bei einer Inkubationsdauer über 10 min der Einbau radioaktiven Phenylalanins stark verringert im Gegensatz zu den bekannten Ergebnissen von *E. coli*-Bakterien, bei denen ein Plateau zu beobachten ist [11]. Die optimale Konzentration an Poly U als mRNA liegt unter den gegebenen Bedingungen bei 120  $\mu\text{g}$  Poly U/ml (Tab. II). Die für *E. coli* häufig angewandte ATP-Konzentration von 5  $\mu\text{mol/ml}$  erwies sich auch bei *M. radiodurans* als optimal (Abb. 3). Für die zellfreie Proteinsynthese ist ein optimales Verhältnis  $\text{ATP/Mg}^{2+}$  wesentlich [15]. Eine Variation der Magnesium-Konzentration er-

Tab. II. Einbau von [ $^3\text{H}$ ]Phenylalanin mit *M. radiodurans*-Extrakten bei verschiedenen Poly U-Konzentrationen. Inkubation 5 min bei 37 °C. Poly U in  $\mu\text{g/ml}$  Inkubationsvolumen.

Poly U	30	40	80	120	160
cpm/mg rib. Protein	553	637	675	735	528

Tab. III. Charakteristik des Einbausystems von *M. radiodurans*. Inkubationszeit 10 min bei 37 °C. 60  $\mu\text{l}$  Ribosomen-suspension und 40  $\mu\text{l}$  S100-Extrakt.

Einbausystem	cpm/mg ribos. Protein
komplett	836
komplett — Poly U	435
komplett — tRNA	355
komplett — ATP	364
komplett — Ribosomen	220
komplett — S100	188

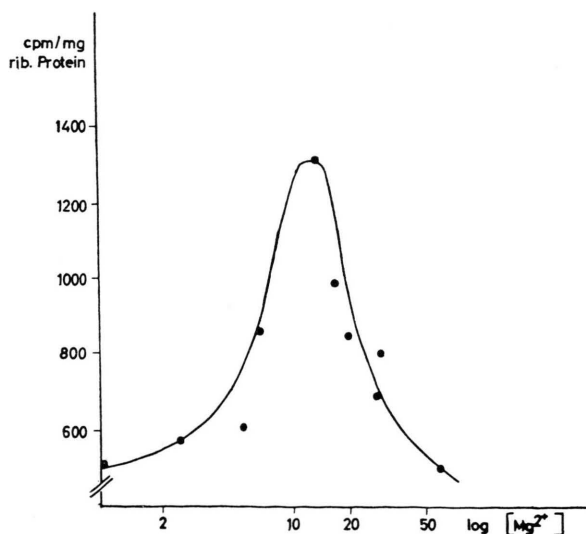


Abb. 4. Abhängigkeit der Einbauaktivität von der Magnesiumionenkonzentration. Ribosomen/S100-Fraktion 60/40. 10 min Inkubation bei 37 °C. Magnesiumacetatkonzentration in  $\mu\text{mol Mg}^{2+}/\text{ml}$  Inkubationsvolumen.

gab bei Verwendung von 5  $\mu\text{M}$  ATP-Puffer beste Einbauraten bei einer  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration von 16  $\mu\text{mol/ml}$  Inkubationsansatz (Abb. 4). Die Polyamine Spermidintrichlorid und Sperminetrachlorid sind als Aktivoren der Proteinsynthese bekannt [20]. Die Einbaurate des Spermidin-freien Kontrollwertes war jedoch im Proteinsynthesystem von *M. radiodurans* nicht zu übertreffen.

Tab. III zeigt eine allgemeine Charakteristik des Einbausystems von *M. radiodurans*. Aus den Ergebnissen geht hervor, daß ohne Ribosomen der Einbau radioaktiven Phenylalanins 26,3% beträgt und auch ohne Polyuridylsäure als mRNA ein beträcht-

Tab. IV. Phenylalanineinbau mit Ribosomen und S100-Extrakten der log-Phase verschiedener Herkunft unter vergleichbaren Bedingungen. Ribosomen/S100=60/40, 10 min Inkubation. Angaben in cpm/mg ribos. Protein.

	S100 <i>E. coli</i>	S100 <i>M. radiodurans</i>	S100 <i>M. lysodeikticus</i>
Rib. <i>E. coli</i>	4177	975	1787
Rib. <i>M. radiodurans</i>	924	448	485
Rib. <i>M. lysodeikticus</i>	997	497	495

licher Einbau erfolgt. Eine Variation der Ribosomenkonzentration mit Extrakten von verschiedenen Aufschlüssen von Zellen der logarithmischen Wachstumsphase ergab optimale Einbaubedingungen bei 60  $\mu$ l Ribosomensuspension und 40  $\mu$ l S100-Extrakt, d. h. bei 2,6 bzw. 1,9 mg Protein/ml Inkubationsvolumen.

Die Rate der Proteinsynthese durch Ribosomen von *M. radiodurans* läßt sich mit einem S100-Extrakt von *E. coli* um 100% erhöhen (Tab. IV). Daraus kann man schließen, daß die Ribosomen in ihrer Aktivität nicht erschöpft sind, sondern gehemmt werden. Diese Annahme wird durch Verwendung des S100-Extraktes von *M. radiodurans* bei der Proteinsynthese mit Ribosomen aus *E. coli* bestätigt. Tab. IV zeigt, daß der Einbau durch *E. coli*-Ribosomen mit S100-Extrakten von *M. radiodurans* auf 23% des kompletten *E. coli*-Systems verringert wird, bei S100-Extrakten aus *M. lysodeikticus* auf 43%.

Die Prüfung der Abhängigkeit der Stabilität der Ribosomen von *M. radiodurans* von der  $Mg^{2+}$ -Konzentration mittels Zonengradientenzentrifugation erstreckte sich auf den Konzentrationsbereich zwischen 0,0003 – 0,04 mol/l. Bei  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen unter 0,01 mol/l liegen keine 70S-Ribosomen mehr vor (Abb. 5). Bei  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen von 0,03 – 0,04 mol/l erwiesen sich die 70S-Ribosomen am stabilsten.

Im KCl- und  $NH_4Cl$ -Konzentrationsbereich von 0 – 0,5 mol/l war bei *M. radiodurans*-Ribosomen keine wesentliche Steigerung der 70S-Ribosomenstabilität zu beobachten. Während die für *E. coli* üblichen  $K^+$ - und  $NH_4^+$ -Konzentrationen auf die Ribosomen nur geringen Einfluß haben, wirken höhere Tris-Konzentrationen bei *M. radiodurans* anders als bei *E. coli* so auf die Ribosomen, daß bei 0,1 mol Tris/l 50S-Ribosomen vorliegen, während bei 0,01 mol Tris/l 70S-Ribosomen überwiegen (Abb. 6).

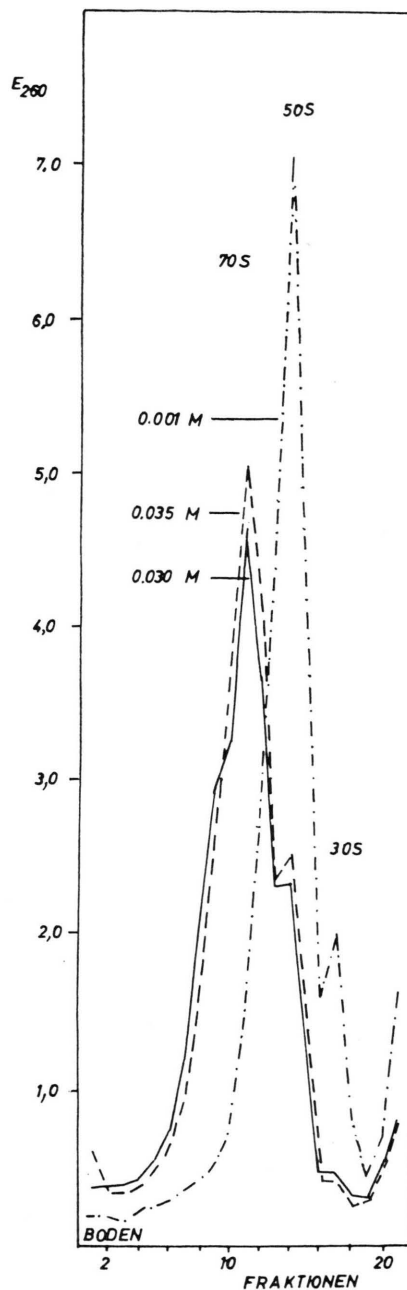


Abb. 5. Saccharosegradient (5 → 20%) von *M. radiodurans*-Ribosomen in Puffern mit verschiedenen Magnesiumionenkonzentrationen: 0,001 M, 0,03 M und 0,035 M Magnesiumacetat. Zentrifugation bei 4 °C 135 min in Rotor SW40 der Beckman-Ultrazentrifuge. Fraktionen zu 34 Tropfen.

Bei einer  $Mg^{2+}$ -Konzentration von 0,01 mol/l läßt sich die Proteinsyntheseaktivität in Gegenwart von  $K^+$  anstelle von  $NH_4^+$ -Ionen um das 1,4fache steigern. Bei einer  $Mg^{2+}$ -Konzentration von



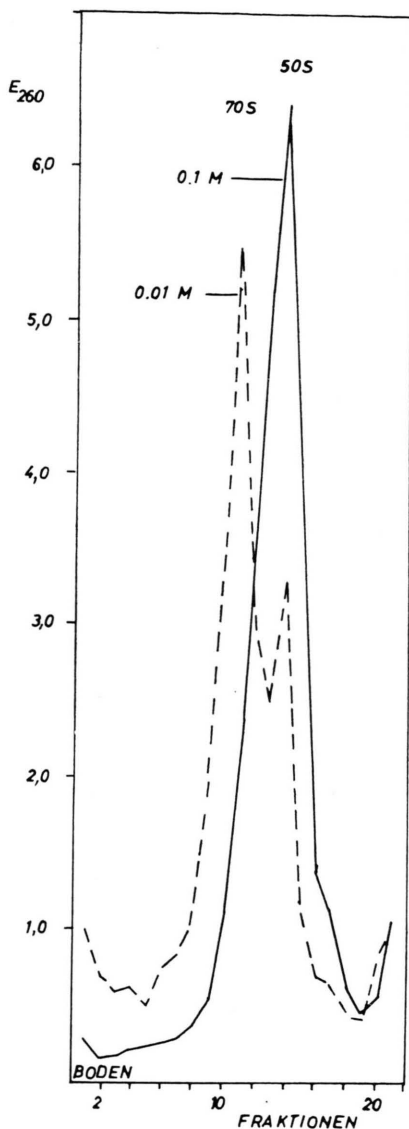


Abb. 6. Saccharosegradient (5 → 20%) von *M. radiodurans*-Ribosomen in Puffern mit verschiedenen Tris-Konzentrationen: 0,01 M Tris und 0,1 M Tris. Bedingungen wie Abb. 5.

Tab. V. Proteinsynthese mit *M. radiodurans*-Extrakten in verschiedenen Aufschlußpuffern bei 2 Poly U-Konzentrationen in cpm/mg ribos. Protein, 10 min Inkubation.

Poly U [mg/ml]	0,01 M Mg <sup>2+</sup> 0,05 M NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,03 M Mg <sup>2+</sup> 0,05 M NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,01 M Mg <sup>2+</sup> 0,05 M K <sup>+</sup>	0,03 M Mg <sup>2+</sup> 0,05 M K <sup>+</sup>
2	191	382	270	373
4	288	529	385	555

0,03 mol/l wird der Einbau gegenüber der geringeren Mg<sup>2+</sup>-Konzentration um 80–100% erhöht (Tab. V); jedoch bleibt der Einfluß von K<sup>+</sup>- bzw. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Ionen gleich.

Eine Prüfung der Abhängigkeit der Einbaurate vom pH-Wert zeigte im pH-Bereich von 7,4–8,0 keine Veränderung der Proteinsyntheseaktivität (Tab. VI).

Tab. VI. Proteinsynthese mit *M. radiodurans*-Extrakten bei verschiedenen pH-Werten in cpm/mg ribos. Protein, 10 min Inkubation bei 37 °C.

Inkubationsdauer [min]	pH-Werte				
	7,2	7,4	7,6	7,8	8,0
5	121	227	242	245	259
10	111	235	236	235	235

## Diskussion

Die zellfreie Proteinsynthese wurde bei vielen Bakterienarten untersucht [20–22]. Bei *B. subtilis* wurden Einbauten von 10% des Systems von *E. coli* erhalten [17]. Hier wurde ein störender Einfluß durch Nucleasen und Proteasen nachgewiesen. Diese Enzyme werden vorwiegend in älteren Zellen gefunden, und durch eine Veränderung der Wachstumsphase ließ sich eine beträchtliche Steigerung der Proteinsyntheseaktivität erzielen. Bei *M. radiodurans* jedoch konnten zwischen den einzelnen Wachstumsphasen keine wesentlichen Unterschiede in der Einbaurate festgestellt werden. Auf Grund der günstigen Zellausbeute und der Züchtungszeit empfahl sich die Ernte von *M. radiodurans*-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase. Zur Gewinnung reiner und aktiver Ribosomen war der Zusatz von Citrat zum Kulturmedium von Bedeutung. Die Proteinsyntheserate blieb unter vergleichbaren Bedingungen höchstens um 10% der von *E. coli* B. Neben einer Proteasenaktivität, die durch Citratzusatz offenbar verringert werden konnte, scheint ein weiterer Hemmstoff im S100-Überstand die Proteinsynthese zu limitieren. Die Einbauraten konnten durch Zugabe von Polyuridylsäure nur verdoppelt werden. Während bei einer Variation der Poly U-Konzentration für den Phenylalanineinbau Sättigungskurven bekannt sind [11], treten solche bei *M. radiodurans* nicht auf.

Bei der Untersuchung der Pufferzusammensetzung war vor allem die Hemmung der Proteinsynthese durch eine höhere Tris-Konzentration (0,1 M) auffallend. Cammak, Miller und Grinstead beschrieben die Abhängigkeit der S-Werte von  $\text{Na}^+$ - und Tris-Konzentrationen [19]. Hohe Konzentrationen einwertiger Kationen verdrängen einen Teil der  $\text{Mg}^{2+}$  und Polyamine aus den Ribosomen und bewirken dadurch eine Dissoziation der 70S-Partikel. Diese Beobachtung in Verbindung mit der Feststellung, daß bei Erhöhung des Tris-Gehaltes 50S-Ribosomenuntereinheiten auftreten, läßt annehmen, daß Tris-Ionen auch hier die Magnesiumionen aus den Bindungsstellen drängen, so daß die 70S-Ribosomen dissoziieren. Die Ribosomen von *M. radiodurans* erweisen sich somit gegenüber Tris empfindlicher als *E. coli*-Ribosomen.

Eine Untersuchung der Enzymaktivität des S100-Überstandes zeigte in Systemen von *E. coli* und

*M. lysodeikticus* deutliche Einbauhemmungen, die auch im reinen *M. radiodurans*-System voll wirksam werden. Durch eine Dialyse ließ sich dieser Hemmeffekt nicht beseitigen. Nach Optimierung des Systems wäre eine weitere Steigerung der Proteinsynthese von *M. radiodurans* durch eine geeignete tRNA noch möglich. Es zeigte sich, daß eine aus *M. radiodurans* isolierte tRNA, die wir bisher noch nicht rein erhalten haben, eine erheblich höhere Aktivität als die aus *E. coli* aufwies.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die durchschnittlichen Einbauraten im kompletten zellfreien Proteinsynthesystem von *M. radiodurans* gegenüber denen von *E. coli* unter vergleichbaren Bedingungen unter 10% bleiben.

Herrn Prof. Dr. F. Lingens danken wir für großzügige Förderung der Arbeit und Herrn K. Kapasakalis für wertvolle technische Mitarbeit.

- [1] A. W. Anderson, H. C. Nordan, R. F. Cain, G. Parrish u. D. Duggan, *Food Technology* **10**, 575–578 (1956).
- [2] D. E. Duggan, A. W. Anderson, P. R. Elliker u. R. F. Cain, *Food Res.* **24**, 376–382 (1959).
- [3] D. E. Duggan, A. W. Anderson u. P. R. Elliker, *Appl. Microbiol.* **11**, 398–403 (1963).
- [4] D. E. Duggan, A. W. Anderson u. P. R. Elliker, *Appl. Microbiol.* **11**, 413–417 (1963).
- [5] S. Kitayama u. A. Matsuyama, *Agr. Biol. Chem.* **35**, 644–652 (1971).
- [6] A. D. Burrell, P. Feldschreiber u. C. J. Dean, *Biochim. Biophys. Acta* **247**, 38–53 (1971).
- [7] A. W. Anderson, K. E. Rash u. P. R. Elliker, *Bacteriol. Proc.* **1961**, 56.
- [8] M. J. Thornley, R. W. Horne u. A. M. Glauert, *Arch. Microbiol.* **51**, 267–289 (1965).
- [9] E. Work, *Nature* **201**, 1107–1109 (1964).
- [10] A. Schein, B. J. Berdahl, M. Low u. E. Borek, *Biochim. Biophys. Acta* **272**, 481–485 (1972).
- [11] M. W. Nirenberg u. J. H. Matthaei, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **47**, 1588–1602 (1961).
- [12] P. Chandra, A. Wacker, R. Süssmuth u. F. Lingens, *Z. Naturforsch.* **22b**, 512–517 (1967).
- [13] R. J. Mans u. G. D. Novelli, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**, 540–543 (1960).
- [14] W. Majbaum, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **258**, 117–120 (1939).
- [15] L. Gorini, *Biochim. Biophys. Acta* **6**, 237–255 (1950).
- [16] L. Gorini u. C. Fromageot, *Biochim. Biophys. Acta* **5**, 524–534 (1950).
- [17] R. H. Doi, *Protein Biosynthesis in Bacterial Systems, Methods in Molecular Biology* (J. A. Last u. A. I. Laskin, eds.), S. 68–88, Marcel Dekker, Inc. New York 1971.
- [18] R. G. Martin u. B. N. Ames, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **48**, 2171–2178 (1962).
- [19] K. A. Cammak, D. S. Miller u. K. H. Grinstead, *Biochem. J.* **117**, 745–755 (1970).
- [20] J. W. Davies, *Biochim. Biophys. Acta* **174**, 686–695 (1969).
- [21] A. Hirashima, K. Asano u. A. Tsugita, *Biochim. Biophys. Acta* **134**, 165–173 (1967).
- [22] S. T. Bayley, *Protein Synthesis Systems from Halophilic Bacteria*, s. Literaturstelle [17] S. 89–110.