

γ -Bestrahlte Ribosomen von *Micrococcus radiodurans* in einem System der zellfreien Proteinsynthese

γ -Irradiated Ribosomes from *Micrococcus radiodurans* in a Cell-Free Protein Synthesizing System

Roland Süssmuth und Annette Widmann

Institut für Mikrobiologie, Garbenstraße 30, D-7000 Stuttgart-Hohenheim

Z. Naturforsch. **34 c**, 565 – 569 (1979); eingegangen am 22. März/30. April 1979

Micrococcus radiodurans, Cell-Free Polyphenylalanine Synthesis, γ -Radiation Resistance, Magnesium Content

γ -irradiation inactivation of isolated ribosomes of *Micrococcus radiodurans* was studied by examining poly U directed synthesis of polyphenylalanine. Ribosomes of *M. radiodurans* did not show significant γ -radiation sensitivity up to a dose of approx. 11.6 k Gy. Cells of *M. radiodurans* take up more magnesium than *E. coli* cells under the same conditions. The magnesium content of ribosomes of *M. radiodurans* was 18% higher than that of *E. coli* ribosomes. A possible relation between Mg^{2+} -content and γ -resistance is discussed.

Einleitung

M. radiodurans wurde 1956 als gegen γ -Strahlen resistentes Bakterium von Anderson *et al.* aus bestrahltem Fleisch isoliert und zeigte sich bemerkenswert widerstandsfähig gegen Dosen von ultravioletter Strahlung, die bei anderen Bakterien abtötend wirken [1, 2]. Als Ursache für die hohe Resistenz gegen Gamma- und UV-Strahlung wurde ein sehr wirksamer DNA-Reparaturmechanismus nachgewiesen, der sogar Doppelstrangbrüche zu reparieren vermag [3–6]. Dem entspricht, daß selbst mit dem starken Mutagen N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin nur eine geringe Häufigkeit auxotropher Mutanten festgestellt wurde [7]. Weiterhin wurde ein hochwirksamer Strahlenschutzstoff von niedrigem Molekulargewicht aus *M. radiodurans* isoliert, der auch *E. coli* B/r gegen letale Wirkungen von Röntgenstrahlen schützt [8, 9]. Nach diesen Ergebnissen soll es sich bei dem Strahlenschutzstoff um Verbindungen mit Sulfhydrylgruppen handeln.

M. radiodurans wächst noch nach Behandlung mit Röntgenstrahlen hoher Dosen [10]. Dies läßt sich außer durch einen hoch wirksamen Reparaturmechanismus [11] auch durch eine Proteinsynthese erklären, die durch ionisierende Strahlen nicht gehemmt wird.

In dieser Arbeit untersuchten wir die Inaktivierung der Ribosomen von *M. radiodurans* durch

Gammastrahlen mit Hilfe der Poly U-abhängigen Polyphenylalaninsynthese nach einem modifizierten Verfahren von Nirenberg und Matthaei [12, 13].

Material und Methoden

Stämme

Micrococcus radiodurans wurde freundlicherweise von Prof. Dr. J. K. Setlow, Tenn. (USA), zur Verfügung gestellt. *E. coli* B.

Chemikalien

Polyuridylsäure wurde von Miles GmbH (Frankfurt/M.), L-3-Phenylalanin-[2,3- 3H] von Amersham Buchler (Braunschweig), ATP, Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase von Boehringer (Mannheim), GTP von Schwarz/Mann (Orangeburg) bezogen. tRNA wurde aus *E. coli* B isoliert. Die übrigen Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

Medien und Puffer

TGNC- und HNB-Medium wie früher beschrieben [13].

HG-Komplettmedium (Submerskultur von *E. coli* B): Auf 1 l dest. Wasser 6 g Yeast Extract (Oxoid), 10 g Glucose, 8,5 g K_2HPO_4 , 11,0 g KH_2PO_4 .

Waschpuffer: Auf 1 l dest. Wasser 12,1 g Tris/HCl, pH 7,8, 2,14 g $Mg(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$, 3,7 g KCl.

Reprint requests to Dr. R. Süssmuth.
0341-0382/79/0700-0565 \$ 01.00/0



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.

Ribosomenpuffer: Enthielt zusätzlich zum Waschpuffer 0,42 ml β -Mercaptoäthanol.

Zellzüchtung

M. radiodurans wurde in TGNC-Medium gezüchtet bis zur späten logarithmischen Phase (0,8–0,9 Nephelometriefilter 400–600 nm im Eppendorf-Photometer). Dann wurden die Zellen abzentrifugiert, einmal mit Waschpuffer gewaschen und bis zur Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

E. coli B wurde i. a. in HG-Medium gezüchtet. Die Zellen wurden geerntet wie früher beschrieben [13].

Präparation der Ribosomen und der S 100-Fraktion

von *M. radiodurans* und *E. coli* und die Charakterisierung der Ribosomen von *M. radiodurans* wurden bereits früher beschrieben [13].

Zur Erhöhung des Magnesiumgehaltes wurden die Ribosomen von *E. coli* B vor dem Einfrieren in Waschpuffer mit 0,03 M Magnesiumacetat dialysiert oder in diesem Puffer aufgeschlossen.

Bestrahlungsbedingungen

Portionen von 0,5 ml gefrorener Ribosomen in Zentrifugengläsern wurden in einem Dewarbecher mit festem CO_2 (-79°C) bestrahlt. Die Bestrahlungen wurden in einem Co^{60} -Gammatron-1 ausgeführt (Siemens, Germany, mittlere Energie 1,25 MeV). Die Dosisrate in den Zentrifugengläsern wurde mit der Kammer E28-Z 11-007 der Physikalisch-Technischen Werke Dr. Pöchlau KG//Freiburg, Germany, zu 3,35 Gy/min bestimmt. Die Expositionszeiten betrugen bis zu 57,6 Stunden. Hieraus errechnen sich Dosen bis zu 11,6 k Gy. Die Proben wurden sofort nach Beendigung der Bestrahlung aufgearbeitet.

Messung der Aktivität der Ribosomen

Die Aktivität der Ribosomen von *M. radiodurans* und *E. coli* B wurde in einem modifizierten zellfreien Proteinsynthesystem [14] bestimmt.

Unter Standardbedingungen enthielt das Reaktionsgemisch, Endvolumen 0,25 ml, in μmol : 37,5 Tris/HCl pH 7,8; 18,75 KCl; 2,5 bzw. 7,5 Magnesiumacetat; 3,5 β -Mercaptoäthanol; 1,36 ATP; 0,027 GTP; 1,5 Phosphoenolpyruvat; 5 μg Pyruvatkinase; 30 μg Poly (U), durchschnittliches Molekulargewicht

100 000; 0,25 μg *E. coli*-tRNA; 0,05 μmol L-[2,3- ^3H]-3-Phenylalanin (spezif. Aktivität 20 mCi/ μmol); 60 bzw. 80 μl (11 mg ribos. Protein/ml) der bestrahlten oder unbestrahlten Ribosomen von *M. radiodurans* bzw. *E. coli* B und 20 μl der S 100-Fraktion von *E. coli* B. Die Proben wurden 10 min bei 37°C inkubiert. 0,1 ml des Reaktionsgemisches wurden auf Filterblättchen aufgetragen und mit 10% Trichloressigsäure gefällt und wie früher beschrieben [13] weiterverarbeitet.

Im Vergleich der Neigung der Geraden wurden, wie üblich, die D_{37} -Werte angegeben. Der D_{37} -Wert entspricht der Dosis, bei der 37% der bestrahlten Objekte aktiv bleiben. Die Versuche wurden jeweils mindestens dreimal wiederholt. Die Fehlerbreite betrug maximal $\pm 14,4\%$.

Analytische Methoden

Protein wurde bestimmt nach der Methode von Lowry *et al.* [14]. Der Magnesiumgehalt wurde mit einem Selenreaktionsgemisch bestimmt (G. Hentschel, persönliche Mitteilung). 0,2 g lyophilisierte Zellextrakte oder Zellen von *M. radiodurans* bzw. *E. coli* B wurden mit 5 mg SeO_2 in 5 ml H_2SO_4 p. a. aufgenommen und 10 min am Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlung wurde mit 1 ml 30prozentigem H_2O_2 erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die klare Lösung mit NH_3 neutralisiert, verdünnt und der Magnesiumgehalt in einem Atomabsorptions-Spektralphotometer U4QIII (Zeiss, Oberkochen, Germany) bestimmt.

Ergebnisse

Die Empfindlichkeit der Ribosomen von *M. radiodurans* gegen γ -Strahlen wurde durch Bestrahlung der 70S-Ribosomen mit einer Co^{60} -Strahlenquelle und anschließende Bestimmung ihrer Aktivität durch die zellfreie Polyphenylalaninsynthese untersucht. Die S 100-Fraktion von *M. radiodurans* wirkte auf Ribosomen von *M. radiodurans* und *E. coli* B hemmend und führte nur zu geringen Einbau-raten [15]. Mit der S 100-Fraktion von *E. coli* ließ sich jedoch mit *M. radiodurans*-Ribosomen eine Einbauaktivität erzielen, die einen ausreichend empfindlichen Test auf die Aktivität der Ribosomen bietet. Wie Tab. I zeigt, wurde die Polyphenylalaninsynthese durch die Ribosomen, Polyuridylsäure, den Enzymextrakt von *E. coli* und ATP stimuliert. Die

Tab. I. Das System der Polyphenylalaninsynthese mit *M. radiodurans*-Ribosomen. Inkubation 10 min bei 37 °C. Komplet bedeutet jeweils *M. radiodurans*-Ribosomen + S100-Extrakt aus *E. coli*. Die einzelnen Komponenten (Poly U etc.) wurden jeweils durch die entsprechende Menge Puffer ersetzt.

Reaktionsgemisch	Aktivität in [cpm/mg ribos. Protein]
komplett	1050
komplett ohne Poly U	205
komplett ohne ATP	89
komplett ohne Ribosomen	57
komplett ohne S 100	80

Tab. II. Mg^{2+} -Gehalt der Ribosomen und D_{37} -Werte nach γ -Bestrahlung von *M. radiodurans* und *E. coli* B.

Ribosomen	mg Mg^{2+} /g Trockengewicht der Ribosomen	D_{37} in [k Gy]
<i>E. coli</i>	$13,7 \pm 0,8$	$7,05 \pm 0,17$
<i>E. coli</i> (nach Mg^{2+} -Behandlung)	$15,5 \pm 0,6$	$> 43,5$
<i>M. radiodurans</i>	$16,1 \pm 0,8$	$> 43,5$

Tab. III. Mg^{2+} -Gehalt des HG- und TGNC-Mediums und von darin kultivierten Zellen. Die Zellen wurden bei 37 °C geschüttelt bis zur späten logarithmischen Phase und dann abzentrifugiert. Sie wurden lyophilisiert, und der Mg^{2+} -Gehalt wurde durch Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt.

Stamm	Medium	mg Mg^{2+} /g Medium (Trockengewicht)	mg Mg^{2+} /g Zellen (Trockengewicht)
<i>E. coli</i>	HG	$8,2 \pm 0,6$	$7,82 \pm 0,16$
<i>E. coli</i>	TGNC	$1,14 \pm 0,1$	$7,98 \pm 0,14$
<i>M. radiodurans</i>	TGNC	$1,14 \pm 0,1$	$10,80 \pm 0,26$

Synthese des Polyphenylalanins erfolgte proportional zur Ribosomenkonzentration (Abb. 1). Damit ist eine Angabe der Aktivität des nicht inaktivierten Teils der bestrahlten Ribosomen möglich. Optimale Einbauraten wurden bei 10 min langer Inkubation des Reaktionsgemisches bei 37 °C erzielt. Die Bestrahlung der Ribosomen wurde in tiefgefrorenem Zustand (–79 °C) vorgenommen, in dem die Strahlenwirkung verringert wird [15]. Als Kontrolle diente die Polypeptidsyntheseaktivität unbestrahlter Ribosomen. Die erhaltenen Dosis-Effekt-Kurven folgten der Ein-Treffer-Kinetik.

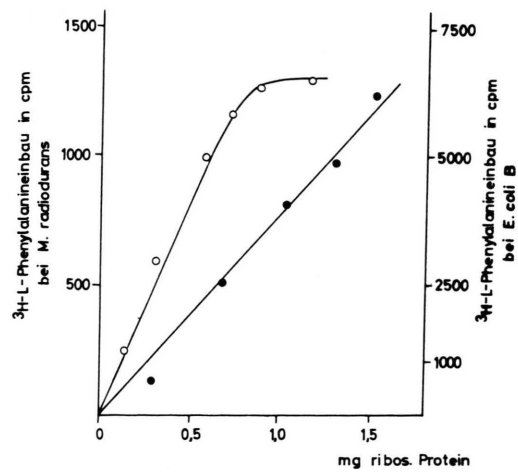


Abb. 1. Abhängigkeit der Polyphenylalaninsynthese von der Ribosomenkonzentration bei *M. radiodurans* ○—○ und *E. coli* B ●—● in mg ribosomales Protein pro Versuchsansatz (0,25 ml).

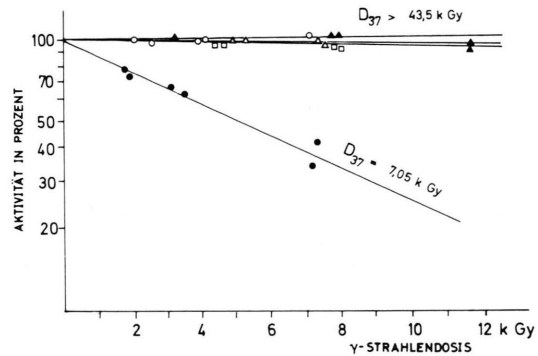


Abb. 2. Die Aktivität der Polyphenylalaninsynthese in *M. radiodurans* und *E. coli* B in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Die Ribosomen wurden in Puffern verschiedener Mg^{2+} -Konzentration bestrahlt: *M. radiodurans*: 0,01 M Mg^{2+} ▲—▲, 0,03 M Mg^{2+} △—△; *E. coli* B: 0,01 M Mg^{2+} ●—●, 0,03 M Mg^{2+} ○—○ oder nach Dialyse in 0,01 M Mg^{2+} □—□.

Nach γ -Bestrahlung von *M. radiodurans*-Ribosomen bis zu einer Dosis von 11,6 k Gy konnte gegenüber der unbestrahlten Kontrolle keine signifikante Verringerung des Phenylalanineinbaus festgestellt werden ($D_{37} > 43,5$ k Gy) (Abb. 2). Die Verringerung der Ribosomenaktivität um durchschnittlich 7% bei 11,6 k Gy liegt innerhalb der Fehlerbreite. Ribosomen von *E. coli* B dagegen zeigten unter den gleichen Bedingungen (0,01 M Mg^{2+}) eine starke Inaktivierung mit einem D_{37} -Wert von 7,05 k Gy (Abb. 2).

Zur Prüfung, ob ein Zusammenhang zwischen dem höheren Magnesiumgehalt der Ribosomen und

ihrer Strahlenresistenz besteht, wurden *E. coli*-Zellen in Ribosomenpuffer mit 0,01 M Mg^{2+} aufgeschlossen und dann 5 Stunden gegen Ribosomenpuffer mit 0,01 M Mg^{2+} dialysiert. Dadurch stieg der Mg^{2+} -Gehalt von 13,7 auf 15,5 mg Mg^{2+} /g Ribosomentrockengewicht (Tab. II). Die so vorbehandelten Ribosomen behielten nach γ -Bestrahlung eine erheblich höhere Aktivität gegenüber dem unbestrahlten Kontrollwert (Abb. 2). Der D_{37} -Wert lag über 43,5 k Gy. In einem weiteren Versuch wurden die Ribosomen von *E. coli* in einem Puffer mit 0,03 M Mg^{2+} suspendiert und dann bestrahlt (Abb. 2). In diesem Puffer zeigten die Ribosomen von *E. coli* ebenfalls keine signifikante Aktivitätsverminderung nach γ -Bestrahlung ($D_{37} > 43,5$ k Gy). Um festzustellen, ob die höhere Magnesiumkonzentration in den Ribosomen vor oder nach der Bestrahlung die Resistenz gegen γ -Strahlen beeinflusst, wurden Ribosomen sowohl vor als auch nach der Bestrahlung mit Magnesiumpuffer behandelt. Dabei zeigte sich, daß ein Magnesiumzusatz nach der Bestrahlung die Inaktivierung nicht verringerte. Obwohl der Magnesiumgehalt im kompletten Versuchsansatz doppelt so hoch war, blieben die D_{37} -Werte gleich. Lediglich der Gesamteinbau an Phenylalanin wurde erhöht. Eine Untersuchung des Magnesiumgehalts der *M. radiodurans*-Ribosomen ergab mit 16,1 mg Mg^{2+} /g Ribosomentrockengewicht einen um 18% höheren Wert als bei *E. coli*-Ribosomen, die, unter gleichen Bedingungen isoliert, nur einen Magnesiumgehalt von 13,7 mg Mg^{2+} /g Ribosomentrockengewicht aufwiesen (Tab. II).

Zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen höherem Magnesiumgehalt der Ribosomen und der Magnesiumaufnahme wurden *M. radiodurans* und *E. coli* in verschiedenen Medien kultiviert. Tab. III zeigt die Mg^{2+} -Gehalte von lyophilisierten Zellen der beiden Stämme. Die Werte für *E. coli* stimmen mit den Ergebnissen von Lusk *et al.* [16] überein. Zellen von *E. coli* nehmen in HG-Medium und TGNC-Medium etwa gleiche Mengen an Mg^{2+} auf. Zellen von *M. radiodurans* dagegen zeigen in TGNC-Medium eine um 38% höhere Magnesiumaufnahme. Obwohl das HG-Medium gegenüber dem TGNC-Medium einen 7fachen Mg^{2+} -Gehalt aufweist, nimmt *E. coli* in TGNC-Medium die gleiche Menge Magnesium auf. Da *M. radiodurans* in HG-Medium sehr schlecht wächst, wurde eine Mg^{2+} -Bestimmung von in HG-Medium gezüchteten Zellen nicht vorgenommen.

Diskussion

γ -Strahlen schwächen die Aktivität der Ribosomen von *M. radiodurans* bis zu einer Dosis von 11,6 k Gy nicht wesentlich, wie Versuche mit der zellfreien Proteinsynthese ergaben. Aktive Ribosomen aber ermöglichen die ständige Synthese der DNA-Reparaturenzyme, auf denen die Strahlenresistenz wesentlich beruht. Wird andererseits aber die Synthese der Reparaturenzyme gehemmt, sind die Bakterien gegen Strahlen empfindlich. Das zeigten Beobachtungen, nach denen Zellen von *M. radiodurans* durch Inkubation mit Chloramphenicol, einem an den Ribosomen angreifenden Proteinsynthesenhemmer, gegen Röntgenstrahlen sensibilisiert werden können [6]. Es konnte festgestellt werden, daß Chloramphenicol die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen blockiert [18]. Die Strahlenresistenz von *M. radiodurans* wird also durch strahlenresistente Ribosomen mitbedingt.

Auf einen Einfluß des Magnesiumgehalts der Ribosomen auf die γ -Strahlenresistenz weisen Versuche von Ž. Kučan hin [17]. Er fand eine erheblich geringere Empfindlichkeit der 50S- und 30S-Ribosomenuntereinheiten in Puffern einer Mg^{2+} -Konzentration von 10^{-2} M als bei einer von 10^{-4} M. Wir konnten die Abhängigkeit der Strahlenresistenz vom Magnesiumgehalt auch bei 70S-Ribosomen von *E. coli* feststellen. Eine Erhöhung des Magnesiumgehalts nach der Bestrahlung beeinflusste die Empfindlichkeit der Ribosomen nicht. Da sich in Ribosomen von *M. radiodurans* ein höherer Mg^{2+} -Gehalt gegenüber Ribosomen von *E. coli* nachweisen ließ, kann die Strahlenresistenz der Ribosomen auf einen höheren Mg^{2+} -Gehalt zurückgeführt werden. Der dadurch gegebene erhöhte Mg^{2+} -Bedarf wird durch eine erhöhte Mg^{2+} -Aufnahme gedeckt, wie Versuche zeigten, nach denen *M. radiodurans*-Zellen aus dem gleichen Medium mehr Mg^{2+} aufnehmen als *E. coli*-Zellen.

Magnesiumionen wirken offenbar auf die Ribosomen stabilisierend, so daß deren Funktionsfähigkeit auch unter Strahleneinwirkung erhalten bleibt. Durch höhere Mg^{2+} -Konzentrationen werden lokale Verzerrungen vermieden, die nach Strangbrüchen der RNA zum Verlust der Ribosomenaktivität führen würden. Die stabilisierende Rolle von Magnesium ist bei ribosomaler RNA und Homopolyribonucleotiden auch bei thermischer Behandlung bekannt [19, 20]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß

die Strahlenresistenz von *M. radiodurans* auch durch Mangan zu beeinflussen ist [21].

Danksagung

Herrn Prof. Dr. F. Lingens danken wir für großzügige Förderung der Arbeit. Den Herren H. J. Schop-

ka und E. Schmohl, Katharinenhospital Stuttgart, danken wir für freundliche Unterstützung und Bereitstellung des ^{60}Co -Gammatrons, Herrn Dr. Richard Schmid, Universität Hohenheim, für die Durchführung der Magnesiumbestimmungen und Herrn K. Kapassakalis für wertvolle technische Mitarbeit.

- [1] A. W. Anderson, H. C. Nordan, R. F. Cain, G. Parrish und D. E. Duggan, *Food Technology* **10**, 575–578 (1956).
- [2] D. E. Duggan, A. W. Anderson, P. R. Elliker und R. F. Cain, *Food Research* **24**, 376–382 (1959).
- [3] J. K. Setlow und D. E. Duggan, *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 664–668 (1964).
- [4] M. E. Boling und J. E. Setlow, *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 26–33 (1966).
- [5] C. J. Dean, P. Feldschreiber und J. T. Lett, *Nature* **209**, 49–52 (1966).
- [6] A. D. Burrell, P. Feldschreiber und C. J. Dean, *Biochim. Biophys. Acta* **247**, 38–53 (1971).
- [7] R. Süssmuth, unveröffentlicht.
- [8] R. W. Serianni und A. K. Bruce, *Nature* **218**, 485–487 (1968).
- [9] A. K. Bruce, P. A. Sansone und T. J. MacVittie, *Radiation Research* **38**, 95–108 (1969).
- [10] R. W. Serianni und A. K. Bruce, *Radiation Research* **36**, 193–207 (1968).
- [11] S. Kitayama und A. Matsuyama, *Agr. Biol. Chem.* **35**, 644–652 (1971).
- [12] M. W. Nirenberg und J. H. Matthaei, *Proc. Nat. Ac. Sci.* **47**, 1588–1602 (1961).
- [13] A. Widmann und R. Süssmuth, *Z. Naturforsch.* **330**, 948–954 (1978).
- [14] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
- [15] Ø. Øksmo und T. Brustad, *Z. Naturforsch.* **23 b**, 962–968 (1968).
- [16] J. E. Lusk, R. J. P. Williams und E. P. Kennedy, *J. Biol. Chem.* **243**, 2618–2624 (1968).
- [17] Ž. Kučan, *Radiat. Research* **27**, 229–236 (1966).
- [18] S. Kitayama und A. Matsuyama, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **33**, 418–422 (1968).
- [19] D. H. Hayes, M. Grunberg-Manago und M. F. Guérin, *J. Mol. Biol.* **18**, 477–498 (1966).
- [20] K. A. Cammack, D. S. Miller und K. M. Grinstead, *Biochem. J.* **117**, 745–755 (1970).
- [21] P. J. Leibowitz, L. S. Schwartzberg und A. K. Bruce, *Photochem. Photobiol.* **23**, 45–50 (1976).