

Charakterisierung von RNA aus synchron wachsender Bäcker-Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) bei Trennung mit der Methylalbumin-Kieselgur(MAK)-Säule

Characterisation of RNA from Synchronously Growing Yeast Cells (*Saccharomyces cerevisiae*) as Separated by Columns of Methylated Albumin on Kieselgur (MAK)

R. Braun

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg (Lahn),
(Direktor: Prof. Dr. W. Schmid)

(Z. Naturforsch. 30 c, 248–251 [1975]; eingegangen am 16. Dezember 1974)

Synchronized Yeast Cells, Yeast-RNA

Total RNA, extracted from synchronously growing yeast cells by the method of Georgiev-Mantieva, was separated by columns of methylated albumin on Kieselgur (MAK). By comparison with defined RNA's in disc electrophoresis and after pulse labelling with [³H]methionine the following fractions are identified: t-RNA, 5.8S RNA, m-RNA, 18S and 25S r-RNA and their precursors 20S, 27S and 35S. High molecular fractions of RNA between 40S and 70S were also found.

Einleitung

Ein Verfahren zur Gewinnung ausreichend großer Mengen synchron wachsender und sich vermehrender Hefezellen¹ ermöglicht es, repräsentative Querschnitte über das Verhalten einzelner Zellkomponenten während verschiedener Zellentwicklungsphasen und unter Einwirkung von Fremdstoffen zu erhalten. Im folgenden wird über die Analyse der erschöpfend extrahierten RNA aus wachsender Hefe nach Trennung über eine Methyl-Albumin-Kieselgur-(MAK)-Säule berichtet. Diese hatte sich in vorausgegangenen Versuchen⁸ für eine RNA-Fraktionierung nach funktionellen Gesichtspunkten als sehr geeignet erwiesen. Die Charakterisierung einzelner Peaks erfolgte mit vergleichender Disk-Gelelektrophorese und mit Methylierung nach Pulsmarkierung mit [³H]Methionin.

Methoden und Materialien

Zellaufschluß

1 g Hefe wird in einem Becher von 18 ml Inhalt einer Zelmühle (Fa. Bühler, Tübingen) mit 3 ml Puffer C, der 0,03% Polyvinylsulfat (PVS) enthält, suspendiert. Dazu werden 13 ml Glasperlen (0,5 mm Durchmesser, Fa. Serva, Heidelberg) gefügt und das Gemisch 10 min unter Eiskühlung bei ca. 1200 Tou-

ren geschüttelt. Anschließend wird der Inhalt in ein Schüttelgefäß überführt. Der Becher wird zunächst mit 7 ml und dann mit 10 ml Puffer C + PVS nachgespült. Die Pufferlösungen werden mit der Hefesuspension vereinigt. In dieser Aufschwemmung sind mikroskopisch keine intakten Zellen mehr zu erkennen.

Phenolextraktion

Die Suspension des Hefezellaufschlusses wird einer Phenolextraktion nach Georgiev und Mantieva^{2,3} unterworfen. Die Extraktionstemperaturen betragen 20, 55 und 65 °C. Dabei werden aus 1 g Hefe etwa 20 mg RNA erhalten, die sich wie folgt auf die einzelnen Extrakte verteilen:

20 °C	–	13 – 15 mg	(65 – 75%)
55 °C	–	4 – 5 mg	(20 – 25%)
65 °C	–	1 – 2 mg	(5 – 10%)

Der DNA-Gehalt der so isolierten RNA betrug weniger als ein Prozent, Protein ist nicht nachzuweisen.

MAK-Säulen-Chromatographie

Die Präparation des Methylalbumins und der Kieselgelsäule wird, wie bei Mandell und Hershey⁴ beschrieben, durchgeführt. Die Methylalbuminlösungen werden kurz vor der Verwendung frisch bereit (Koch und Kubinski⁵).

Die oben erhaltenen RNA-Fällungen werden in 10 ml Puffer C bei 4 °C sorgfältig gelöst und so viel der Lösung auf die MAK-Säule aufgetragen, daß die RNA-Menge etwa 7 mg entspricht. Die Konzentration

Sonderdruckanforderungen an Dr. R. Braun, D-3550 Marburg/Lahn, Institut für Pharmakologie, Lahnberge.

der Lösung wird spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt.

Eluiert wird zunächst mit einem linearen Kochsalzgradienten, bestehend aus je 300 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 nach Sörensen, der 0,1 bzw. 1,25 mol Natriumchlorid/Liter enthält. Der Flow beträgt 30 ml pro Stunde und die Temperatur wird durch Verwendung einer Mantelsäule bei 35 °C konstant gehalten. Danach wird bei Zimmertemperatur mit einem stärkeren Kochsalzgradienten, der zugleich ein pH-Gradient ist, weitereluiert. I: 150 ml 0,1 M Trishydroxymethylaminomethan-HCl-Lsg. pH 8,5 + 1,5 M NaCl; II: 150 ml 1 M NH₃-Lsg. pH 11,5 + 4,0 M NaCl. Der Flow beträgt auch hier 30 ml pro Stunde. Das Eluat wird in Fraktionen von je 6 ml aufgefangen. Vom ersten Eluat werden 90 und vom zweiten 50 Proben gesammelt.

Disk-Gelelektrophorese

Die einzelnen MAK-Fraktionen werden gefriergetrocknet, der Rückstand in wenig destilliertem Wasser aufgenommen und die Lösungen unter Eiskühlung durch Ultrafiltration eingengt. Es wird ein Filter verwendet, dessen Porengröße Moleküle mit mehr als 10000 Dalton zurückhält. Der RNA-Gehalt wird photometrisch bei 260 nm bestimmt. In der Fraktion 1 befindet sich nach Filtration keine RNA mehr, was auf Vorliegen von Oligonukleotiden und sehr kurzen RNA-Ketten schließen läßt.

Zur Gel-Elektrophorese werden zylindrische Gele von 8 cm Länge und 6 mm ϕ aus Acrylamid und Bisacrylamid gemäß der Methode von Loening⁶ verwendet. Die Gele werden mit 10–15 μ l (15–20S RNA) des Ultrafiltrates überschichtet und die Laufzeit beträgt 2,5 Stunden bei 5 mA pro Gel-Röhrchen. Als Marker dient eine 0,01-prozentige Bromphenolblau-Lösung. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Gele in 2 N Essigsäure fixiert und in einem in eigener Werkstatt⁷ als Scanner umgebauten Spektrophotometer (PM Q II, Fa. Zeiss, Oberkochen) bei 260 nm gemessen.

Methylierung

1,8 g synchronisierte Hefe wachsen in 600 ml Nährlösung bei 30 °C unter reichlicher Luftzufuhr (mit Hilfe einer Membranpumpe und eines Magnetrührers). Nach 2 Stunden werden 5 mCi [Methyl-³H]Methionin hinzugefügt. Nach einer Minute werden 200 ml der Lösung abgenommen, rasch über ein Membranfilter (Porengröße 3 μ m) zugegeben, der Filtrationsrückstand mit eiskaltem Wasser gewaschen, vom Filter abgehoben und bei –20 °C aufbewahrt. Nach der Abnahme dieser Probe werden sofort zu dem Rest der Nährlösung 1 g kaltes Me-

thionin gegeben. Die nächsten Proben werden nach 3 bzw. 20 min entnommen und, wie oben, die Hefezellen geerntet.

Die Hefezellen werden aufgeschlossen, einer Phenolextraktion unterworfen und der Extrakt an der MAK-Säule aufgetrennt.

Material für Gelelektrophorese

Grundpuffer C: Trishydroxymethylaminomethan-HCl 48,46 g (0,4 mol), Natriumacetat 27,22 g (0,2 mol), EDTA (Titriplex III) 7,44 g (0,02 mol), Aqua dest, ad 1000 ml.

Laufpuffer: Grundpuffer C 100 ml, Aqua dest. ad 1000 ml.

Beide Lösungen werden mit konz. Essigsäure auf pH 7,4 eingestellt.

Gelanfertigung 2,4%: a. Acrylamidlösung 20-prozentig 6,0 ml, b. Bisacrylamidlösung 1-prozentig 6,0 ml, c. Grundpuffer 5,0 ml, d. Aqua dest. 33,0 ml, e. Tetramethyläthylendiamin 0,05 ml, f. Ammoniumpersulfat 10-prozentig 0,25 ml.

Die Lösungen a. – d. werden zusammengegeben und im Vakuum unter Rühren entgast. Anschließend gibt man das Amin und die frisch bereitete Lösung f. unter kräftigem, kurzen Umschütteln hinzu. Die Mischung wird umgehend in die Gel-Röhrchen gefüllt. Nach 30 min ist die Polymerisation beendet. Die frischen Gele werden vor Gebrauch etwa für 1 Stunde einem Vorlauf bei 5 mA pro Gel unterzogen, um die Polymerisationskatalysatoren zu entfernen.

Ergebnisse

MAK-Säule

Das Eluationsprofil (Abb. 1) wurde in 18 Abschnitte unterteilt, deren RNA-Anteil bei wachsender Hefe aus Tab. I hervorgeht.

Gel-Elektrophorese

Die Größeneinteilung der RNA in den einzelnen Fraktionen erfolgte durch Vergleich mit käuflicher Hefe-t-RNA, frisch extrahierter Leber-RNA (18S und 28S) und Coli-RNA (16S und 23S). Bei den Gel-Trennungen erwies sich keine MAK-Fraktion einheitlich, sondern jede Probe enthielt noch gewisse Anteile der vorherigen oder nachfolgenden Fraktion (ca. 10–20%). Trotzdem ist jedoch aus Tab. I eindeutig zu sehen, daß die MAK-Fraktionen mit zunehmender Eluationszeit immer größere RNA-Moleküle enthalten.

Die Fraktionen 13–18 konnten nach dieser Methode nicht untersucht werden, da die Ribonukleinsäuren auf Grund des ammoniakhaltigen Eluats

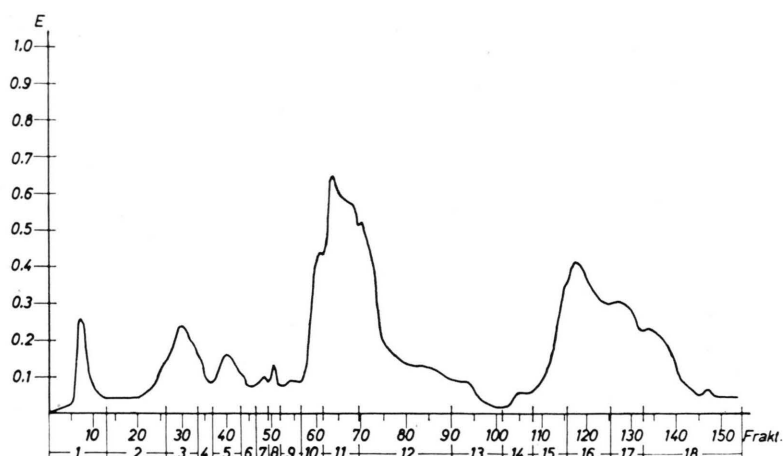


Abb. 1. Auftrennung von Hefegesamt-RNA über die MAK-Säule (Erläuterung s. Text und Tab. I).

Frakt. No.	Prozentualer Anteil	Größe nach Gel-Elektrophorese	Vergleichs-RNA	Charakteristik mit $[^3\text{H}]$ Methionin	Spez. Akt. $[^{14}\text{C}]$ Uracil $[10^3 \text{ dpm/mg}]$	
					1'	10'
1	3,4	Oligonucleotide			50	386
2	2,5	4S			16	67
3	3,8	4–5S	t-RNA (Hefe)	t-RNA	7	61
4	2,1	4–6S			2	220
5	2,6	5–6S		5,8S r-RNA	8	92
6	0,9				8	103
7	1,0	6–16S		m-RNA	7	59
8	1,3				5	60
9	1,8				15	317
10	3,4	16–20S	16S-RNA (Coli)	20S	13	101
11	29,7	18–28S	18S-RNA (Leber) 23S-RNA (Coli)	18,25S r-RNA	11	77
12	14,3	25–30S	28S-RNA (Leber)	27S	17	126
13	1,7				9	147
14	1,4				15	49
15	4,4				29	598
16	10,8	35S		35S	37	200
17	6,2				38	242
18	8,8				28	167

trotz Eiskühlung rasch abgebaut wurden. Beim Vergleich einer Probe der Fraktion 12 mit einem Hefegesamtextrakt traten jedoch noch drei weitere höhermolekulare Banden auf (Abb. 2), die folglich dem Alkalipeak der MAK-Säule zugehörig sein sollten. Dabei blieb ein Peak unterhalb der hochmolekularen Leber-RNA (45S–70S) und die beiden anderen in diesem Bereich. Diese Größenzuordnung läßt den Schluß zu, daß sich in den MAK-Fractionen 2–4 t-RNA und kleinstmolekulare r-RNA (4S–5S) befinden. In der Fraktion 5 befindet sich eine RNA mit einer Größe von 5S–6S. Die Fraktionen 6–9 enthalten kleinere m-RNA und vermutlich geringe Anteile von Abbauprodukten größerer RNA-Arten. Die Proben 10–12 bestehen aus r-RNA (18S und 25S) und deren Vorstufen (20S und 27S). In der Probe

12 sind möglicherweise auch noch größere m-RNA enthalten. Die Fraktionen 16–18 sollten die 3 Banden in der Gel-Elektrophorese ausmachen, wobei 16 der kleineren der 3 Banden entspricht, wenn man die mengenmäßige Verteilung mit heranzieht. Sie könnte der 35S r-RNA entsprechen. Bei 17 und 18 handelt es sich wohl um eine labile unspezifische RNA⁸.

Radioaktive Methylierung

Zur eigentlichen Identifizierung der Transfer-RNA und der ribosomalen RNA wurde die Methionin-Methode⁹ verwendet. Wie aus Abb. 3 hervorgeht, läßt sich schon nach einer Minute in allen Fraktionen eine Aktivität feststellen. Ausgenommen ist die Fraktion 8. Besonders hoch ist die Markierung in der

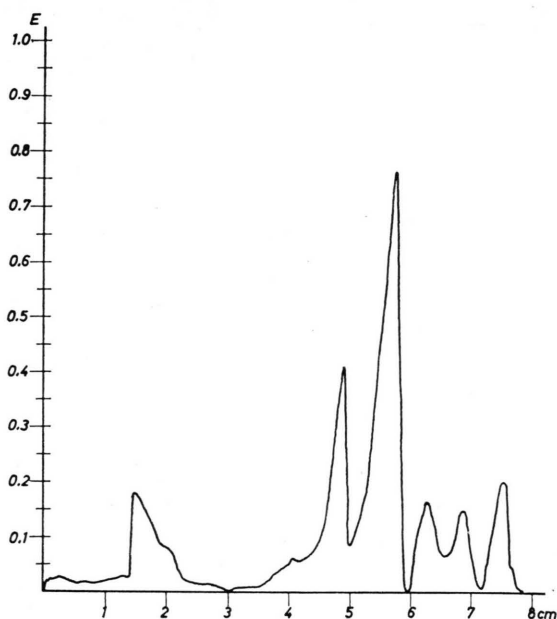


Abb. 2. Auftrennung von Hefegesamt-RNA durch Disk-Gelelektrophorese (Erläuterung s. Text und Tab. I).

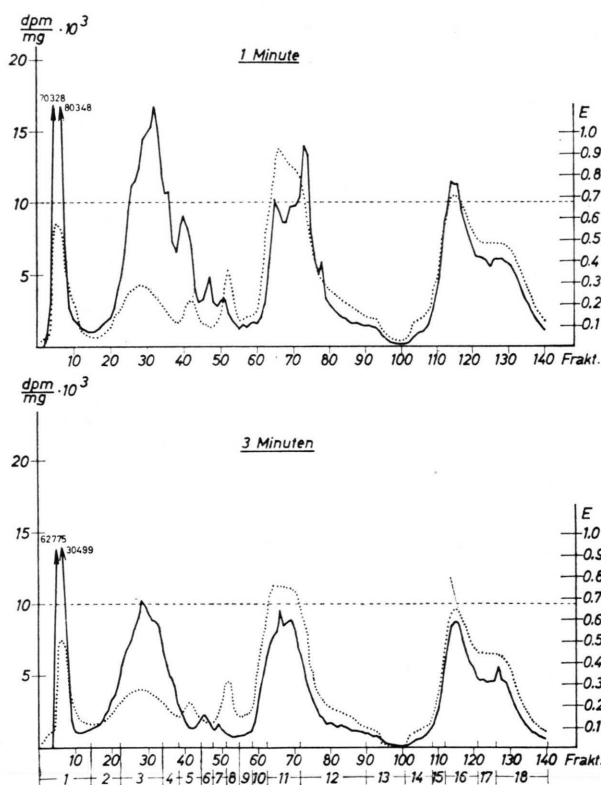


Abb. 3. Methylierung von RNA bei synchron wachsender Hefe mit Hilfe von [Methyl- ^3H]methionin (5 mCi/600 ml): —, spez. Aktivität; ·····, OD.

Probe 1, die vorwiegend Oligonukleotide enthält, und in 3, die t-RNA enthält. Letzteres ist gut erklärlich, wenn man berücksichtigt, daß t-RNA ca. 10% methylierte Basen enthält. In den beiden Fraktionen sowie in 5, 10, 12 und 16 nimmt die spezifische Aktivität schon nach 3 min ab, was auf einen schnellen Umsatz schließen läßt. Dies stimmt mit den Befunden von Udem und Warner⁹ überein, die mit Hilfe der Disk-Gelelektrophorese zeigen konnten, daß die 35S (16), 27S (12) und 20S (10) r-RNA sehr rasch markiert werden. Im Zuge der Reifung der r-RNA entsteht dann aus ihnen 18S und 25S (Fraktion 11), deren spezifische Aktivität nach 3 min nicht abgenommen hat. Auffallend ist auch die starke Aktivitätsabnahme in Peak 5, in dem die von Udem und Warner diskutierte 5,8S RNA sich befinden muß. Die Basenanalyse dieser Fraktion stimmt mit denen von 11 und 12 überein, so daß auf das Vorliegen einer kleineren r-RNA geschlossen werden darf. Der Aktivitätsverlust steht jedoch im Widerspruch zu den Befunden von Udem und Warner, die eine verzögerte Markierung festgestellt haben.

Es geht auch klar hervor, daß sich in 8 unmarkierte m-RNA befindet. Neben der m-RNA enthält 8 aber auch geringe Mengen von DNA (ca. 5–15%), wie aus der Bestimmung nach Burton¹⁰ hervorging. Nach 20 min trat kein wesentlicher Unterschied im Vergleich zu 3 min mehr auf.

Diskussion

Auf Grund der Befunde von W. Hennig *et al.*¹¹ über die optimale Extraktion von RNA aus Mäuseleber entschlossen wir uns für die temperaturabhängige, fraktionierte Phenolextraktion nach Georgiev³. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen an der Leber konnte jedoch nach Trennung der einzelnen Temperaturfraktionen über die MAK-Säule an der Hefe keine unterschiedliche Zusammensetzung gefunden werden, so daß es sich bei den 55°- und 65°-Fraktionen hauptsächlich um Nachextraktionen handelt. Infolgedessen können die einzelnen Phenolausschüttelungen vereinigt werden. Dieser Umstand hängt vermutlich mit der Homogenisierung der Hefezellen zusammen, bei der nicht nur die Zellwand zerstört, sondern auch bereits der Kerninhalt freigesetzt wird, der im Leberhomogenat nach Pottern noch weitgehend intakt bleibt. Die Menge der so isolierten RNA entspricht bei Hefe, die sich in der G 1-Phase befindet, etwa 2% des Erntegewichtes. Dieser Wert

wird auch allgemein in der Literatur diskutiert. Homogenisierung mit gereinigtem Seesand ergab stark unterschiedliche Werte, die zudem unter zwei Prozent blieben.

Für die RNA-Trennung über die MAK-Säule entschieden wir uns, da es hier möglich ist, größere Mengen (5–10 mg) aufzutrennen und die isolierten Fraktionen nach Gefriertrocknung und Dialyse bzw. Ultrafiltration für weitere Untersuchungen wie Rechromatographie, Basenanalyse und Aktivitätsbestimmungen in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Von entscheidender Bedeutung bei dieser Chromatographie ist die alkalische Eluierung, wie Kunz *et al.*⁸ bezüglich schnell markierter hochmole-

kularer Leber- und Hefe-RNA zeigen konnten. Durch Umwandlung des Elutionsmittels (1 N NH₃) in einen Alkaligradienten, der mit einem Salzgradienten gekoppelt ist, konnte noch eine weitere Auftrennung erreicht werden. Auch wurde durch Abflachen des ersten Salzgradienten eine bessere Differenzierung erreicht.

Mit Hilfe der Methioninmethode konnten die r-RNA- und t-RNA-Fraktionen identifiziert werden. Durch zeitliche Verfolgung der einmal eingebauten Aktivität wurde die Lage von ribosomalen Vorstufen- und funktioneller r-RNA lokalisiert. Mit diesen Ergebnissen stimmte die Größenbestimmung durch die Gelelektrophorese überein.

¹ R. Braun, W. Schmid u. K. Stossek, Z. Naturforsch., im Druck.

² G. P. Georgiev u. V. L. Mantieva, Biochim. Biophys. Acta **61**, 153 [1962].

³ G. P. Georgiev, O. P. Samarina, M. T. Lerman, M. M. Smirnov u. A. N. Severtzov, Nature **23**, 1291 [1963].

⁴ J. D. Mandell u. J. A. Hershey, Biochemistry Easton **1**, 66 [1960].

⁵ G. Koch u. H. Kubinski, Z. Naturforsch. **19b**, 683 [1964].

⁶ U. E. Loening, Biochem. J. **102**, 251 [1967].

⁷ P. Koch, Zeiss-Mitteilungen **4**, 397 [1968].

⁸ W. Kunz, J. Niessing, B. Schnieders u. C. E. Sekeris, Biochem. J. **116**, 563 [1970].

⁹ S. A. Udem u. J. R. Warner, J. Mol. Biol. **65**, 227 [1972].

¹⁰ K. Burton, Biochem. J. **62**, 315 [1956].

¹¹ W. Hennig, W. Kunz, B. Schnieders u. K. Williams, Z. Naturforsch. **26b**, 235 [1971].