

Charakterisierung von Messenger-Ribonukleoproteiden aus Hefezellen

Characterization of Messenger Ribonucleoproteins from Yeasts

Hartmut Holz und Lerde Scholting

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

(Z. Naturforsch. 30 c, 516–519 [1975]; eingegangen am 29. November 1974/22. Januar 1975)

Yeast, Sphaeroplasts, mRNA, Messenger-Ribonucleoproteids

A method to produce in 15 min stable sphaeroplasts from yeasts of the early log-phase is described. This method was used to isolate polysomes, after specific radioactive labelling of mRNA. The mRNP *-particles, isolated from polysomes, have sedimentation-coefficients from 10 to 80S and a density of 1.4 g/cm³, the polysomes a density of 1.58 g/cm³ and the ribosomes a density of 1.61 g/cm³.

Einleitung

Spirin¹ beschrieb Messenger-Ribonukleoproteide (mRNP) aus Eukaryonten mit folgenden Eigenschaften: Sie sind Partikel mit Sedimentationskoefizienten hauptsächlich im Bereich von 20–75S. Die mRNP-Partikel bilden mehrere diskrete Banden im CsCl-Gradienten. Die Dichte der Hauptkomponente liegt um 1,4 g/cm³. Mehrere Autoren² haben die Proteine dieser mRNP charakterisiert. Jede untersuchte, polysomale mRNA ist mit Proteinen verbunden, die ein Molekulargewicht im Bereich von 47 000–52 000 und 73 000–78 500 haben^{3, 4}. MRNP-Bindungsproteine dieser Größenordnung wurden in Nervenzellen, Rattenleberzellen und Retikulocyten nachgewiesen. Wir untersuchten, ob die in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesenen mRNP^{5–7} eine für eukaryotische mRNP typische Dichte haben und somit ein wichtiges Kriterium der Spirinschen Informosomentheorie erfüllen.

Material und Methoden

Die Zellen des Stammes R XII⁸ (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden aufbewahrt und gezüchtet wie von Laskowski⁹ beschrieben. Die Sphaeroplastenherstellung erfolgte nach den Angaben von Kotyk. Dazu wurden Zellen aus der frühen logarithmischen Wachstumsphase ($2,5 \times 10^7$ Zellen/ml) geerntet, gewaschen und im Stabilisierungspuffer (0,6 M KCl, 0,011 M MgCl₂, 0,12 M Na₂HPO₄, 0,02 M Citro-

nensäure, 0,1 M Glucose und 0,001 M EDTA) aufgenommen ($7,5 \times 10^{10}$ Zellen/ml). Zur Hefesuspension wurde Schneckenenzym (Industrie Biologique Française, Gennevilliers), Endkonzentration 25%, gegeben, das bei 30 °C im Schüttelwasserbad einwirkte. Die Sphaeroplastenbildungsraten wurde durch Auszählen der in H₂O lysisfähigen Zellen bestimmt. Um die Einwirkung des Schneckenenzymes zu stoppen und die Zellen zu reinigen, wurden die Sphaeroplasten dreimal mit eiskaltem Stabilisatorpuffer gewaschen und in 2,5 min bei $650 \times g$ abzentrifugiert. Die Lysis erfolgte durch vorsichtige Resuspension der Zellen im Lysispuffer (0,01 M Triäthanolamin, 0,1 M NaCl, 0,0015 M MgCl₂, 0,5% Brij 58) im Eiswasserbad. (Zur Inaktivierung möglicherweise vorhandener RNAsen wurden alle benutzten Lösungen bei 115 °C autoklaviert, die Glassachen 3 h bei 180 °C im Heißluftsterilisator sterilisiert und alle weiteren Prozeduren bei 0–2 °C durchgeführt.) Die Zelltrümmer wurden 5 min bei $18000 \times g$ abzentrifugiert. Die Polysomen wurden 4 h mit $105000 \times g$ im Ti 50 durch ein Kissen aus 2 ml 2 M und 2 ml 0,5 M Saccharoselösung im Isolierungspuffer (0,01 M Triäthanolamin, 0,1 M NaCl, 0,0015 M MgCl₂) niedergeschlagen. Zur spezifischen Markierung der mRNA wurden fröhlogarithmische Zellen (Erntetiter: 2×10^7 Zellen/ml) im Vollmedium⁹ (Ansatz 1–3 $\times 10^8$ Zellen/ml) bei 30 °C für 70 min mit 100 µg/ml Cycloheximid (Fa. Serva, Heidelberg) inkubiert⁷. Anschließend erfolgte 10–15 min Markierung durch 0,25 µCi/ml [^{2,14}C]uracil (NEN). Zur Trennung der Polysomen in die ribosomalen Untereinheiten und die mRNA wurde die Polysomensuspension 12–24 h gegen 1–2 l Dialysepuffer (0,01 M Triäthanolamin, 10^{-6} M Mg-Acetat, pH 7,4) bei 4 °C dialysiert. Zur Phenolextraktion der RNA aus den Polysomen wurden 1–3 ml Poly-

Sonderdruckanforderungen an Hartmut Holz, Institut für Biologie III, D-7800 Freiburg i. Br., Schänzlestraße 9–11.
* mRNP: Messenger-Ribonukleoproteide.

somensuspension in TMA-Puffer (0,03 M Tris, 0,0085 M MgCH_3COOH , 0,22 M NH_4Cl , 0,001 M Mercaptoäthanol, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Bentonit, pH 7,4) mit dem gleichen Volumen frisch destilliertem, wasser-gesättigtem Phenol gemischt. Dann wurden 0,25 Volumen 10-prozentiger SDS-Lösung zugegeben. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation mit $2000 \times g$ erreicht. Die wäßrige Phase wurde ein zweitesmal mit Phenol extrahiert und anschließend mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Äther und wäßrige Phase wurden im Scheidetrichter getrennt und der Restäther durch einen Luftstrom ausgetrieben. Die Sedimentationsanalyse der RNA wurde in 15 h bei 22 000 rpm im SW 39 (5–20% Saccharosegradienten im TMA-Puffer) durchgeführt.

Zur Dichteanalyse der Polysomen und der poly-somalen Untereinheiten wurden die im Isolierungs-puffer resuspendierten Polysomen und die im Dia-lysepuffer suspendierten polysomalen Untereinhei-ten 20–24 h mit 6% Formaldehyd fixiert¹⁰ und anschließend auf eine Dichte von 1,5 g/cm³ mit CsCl eingestellt und 48–72 h im Ti 75 bei 163 000 $\times g$ oder im Ti 50 bei 105 000 $\times g$, bei 25 °C zentrifu-giert. Nach der Zentrifugation wurden 8 Tropfen-faktionen entnommen und deren optische Dichte, Radioaktivität und Brechungsindex bestimmt, wie bei Knöbel und Tiedeman¹⁰ angegeben.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Che-mikalien von der Fa. Merck bezogen.

Ergebnisse und Diskussion

Frühlogarithmische Zellen des Stammes R XII wurden im Stabilisierungspuffer aufgenommen. Die Suspension wurde anschließend auf 25% Schnecken-

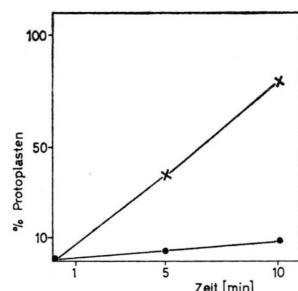


Abb. 1. Sphaeroplastenherstellung mit frühlogarithmischen Zellen des Stammes R XII. Die Zellen wurden im Stabilisatorpuffer aufgenommen und mit Schneckenenzym (Endkonzentration: 25%) bei 30 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Zahl der gebildeten Sphaeroplasten wurde durch Suspension von 0,1 ml Probe in 5 ml H_2O bestimmt ($\times - \times$). Die Zahl der im Stabilisatorpuffer geplatteten Sphaeroplasten wurde durch Auszählen von 0,1 ml Proben aus dem Stabilisatorpuffer bestimmt ($\bullet - \bullet$).

enzym eingestellt und bei 30 °C inkubiert. Nach 10 min waren 80% aller Zellen in Sphaeroplasten abgebaut (Abb. 1). Diese Methode erlaubt die Herstellung stabiler Sphaeroplasten aus allen Bereichen der Wachstumskurve einer Hefekultur des Stammes R XII. Es können auch stationäre Zellen (Ernte-titer: 2×10^8 Zellen/ml, Inkubations-titer 1×10^{10} Zellen/ml) in 60 min nahezu vollständig zu Sphaero-plasten abgebaut werden¹¹. Die für den Stamm R XII gewählten Bedingungen sind jedoch nicht für jeden Stamm anwendbar. Sphaeroplasten des Stam-mes 211⁹ sind unter den obigen Bedingungen zwar ebenso schnell zu bilden, aber nicht zu stabilisie-ren¹¹. Nach der Methode von Hutchison und Hart-well¹² benötigten wir dagegen 3 h, um 80% der Zellen einer frühlogarithmischen Hefesuspension des Stammes 211 in Sphaeroplasten abzubauen. Im Gegensatz zu den von Hutchison und Hartwell be-schriebenen Verlusten an Sphaeroplasten während der Waschung können die Sphaeroplasten des Stam-mes R XII ohne Lysisverluste im Stabilisierungs-puffer abzentrifugiert und resuspendiert werden¹¹.

Für den Nachweis der mRNA ist unter unseren Versuchsbedingungen ihre spezifische radioaktive Markierung notwendig. Der in den hier beschrie-benen Versuchen benutzte Ansatz wurde aus den An-gaben von Hartwell *et al.*⁷ entwickelt. Werden Poly-somen mit spezifisch radioaktiv markierter mRNA phenolisiert und die Nukleinsäuren sedimentiert, so sind die rRNA- und tRNA-Moleküle als Maxima der optischen Dichte bei 25S, 18S und 4S zu erkennen. Die mRNA verteilt sich über den Bereich von 4–25S (Abb. 2). Diese Größenverteilung wurde für mRNA aus Hefe-^{5, 6}, Rattenleber-¹³ und HeLa-Zellenpoly-

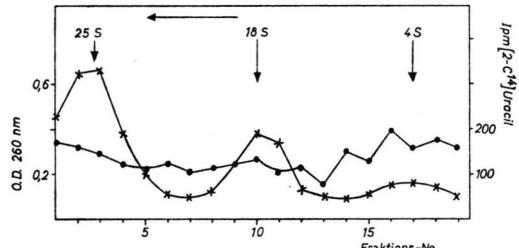


Abb. 2. Sedimentation polysomaler RNA. Frühlogarithmische Zellen vom Stamm R XII wurden 70 min im Vollmedium mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cycloheximid und anschließend 10 min mit 0,25 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ [$2\text{-}^{14}\text{C}$]uracil, inkubiert. Die Zellen wurden ly-siert, die Polysomen niedergeschlagen (3 mg/ml) und die polysomalen Nukleinsäuren durch Phenolextraktion isoliert. Die Sedimentation wurde 15 h bei 22 000 rpm im SW 39 im 5–20% Saccharosegradienten im TMA-Puffer durchge-führt (Sedimentation in Pfeilrichtung). $\times - \times$, O.D. 260 nm; $\bullet - \bullet$, Ipm [$2\text{-}^{14}\text{C}$]uracil.

somen¹⁴ nachgewiesen. Bei der hier benutzten Methode zur spezifischen Markierung ist die mRNA nur niedrig markiert. Diese Markierung ist ausreichend, um eine Trennung der rRNA und mRNA durch Poly-T-Cellulose nachzuweisen. Durch Variation des pH-Wertes und des Ionenmilieus des benutzten Phenols¹⁵ war eine wesentlich höhere Markierung der mRNA nicht zu erreichen (persönliche Mitteilung von Angermann und Grundmann).

Durch Dialyse der Polysomensuspension gegen einen Puffer mit sehr niedriger Magnesiumkonzentration (10^{-6} M) zerfallen die Polysomen in die ribosomalen Untereinheiten und in die mRNP. Wird das Dialysat sedimentiert, sind die 40S und 60S ribosomalen Untereinheiten als 2 Maxima der optischen Dichte zu erkennen. Die mRNP verteilen sich über den Sedimentationsbereich der ribosomalen Untereinheiten (Abb. 3). Diese Größenverteil-

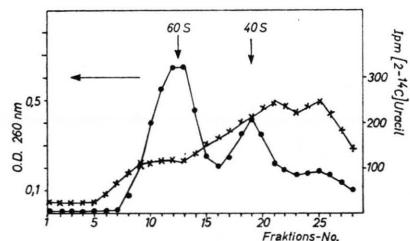


Abb. 3. Sedimentation polysomaler Untereinheiten. Zellen wurden 70 min mit Cycloheximid und 10 min mit [$2\text{-}^{14}\text{C}$] uracil inkubiert. Die Polysomen wurden isoliert und 12 h gegen 0,01 M Tris und 10^{-6} M Mg^{2+} dialysiert. Das Dialysat wurde 8 h bei 24 000 rpm im SW 39 in 5–20% Saccharosegradienten im Dialysepuffer sedimentiert. ●—●, O.D. 260 nm; ×—×, Ipm [$2\text{-}^{14}\text{C}$]uracil.

lung ist typisch für mRNP aus Eukaryontenzellen^{5, 6, 13, 17}. Um die Dichte von Ribosomen und Polysomen zu ermitteln, wurde eine Polysomensuspension fixiert und im Dichtegradienten zentrifugiert. Ribosomen haben eine Dichte von 1,61 g/cm³, Polysomen, die aus mRNP und Ribosomen bestehen, haben wegen ihres höheren Proteinanteils die etwas geringere Dichte von 1,58 g/cm³ (Abb. 4). MRNP-Partikel, die durch die Dialyse aus den Polysomen freigesetzt wurden, haben die für Informosomen charakteristische Dichte¹ von 1,40 g/cm³ (Abb. 5).

Da bekannt ist, daß bei der Lysis der Zellen in Puffern mit niedriger Ionenstärke eine unspezifische RNA-Proteinkontamination auftritt¹⁶, wurden die Polysomen und mRNP-Isolierungen mit einem Puffer höherer Ionenstärke (0,15 M NaCl, 0,01 M

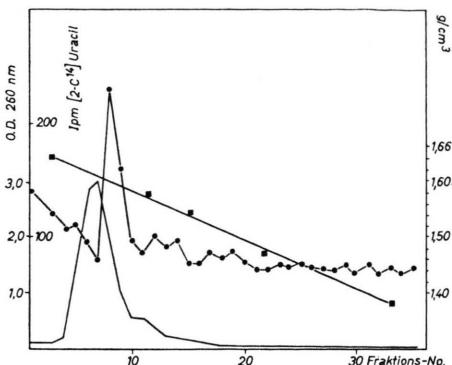


Abb. 4. Dichtetest der Polysomen. Frühlogarithmische Zellen vom Stamm R XII wurden 70 min mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cycloheximid inkubiert und 10 min mit 0,25 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ [$2\text{-}^{14}\text{C}$]uracil. Die Polysomen wurden isoliert, mit 6% Formaldehyd fixiert, anschließend auf eine Dichte von 1,5 g/cm³ CsCl eingestellt und 72 h bei 160 000 $\times g$, 25 °C, zentrifugiert. Die optische Dichte, Dichte und Radioaktivität wurde in 8 Tropfenfraktionen bestimmt. —, O.D. 260 nm; ●—●, Ipm [$2\text{-}^{14}\text{C}$]uracil; ■—■, g/cm³.

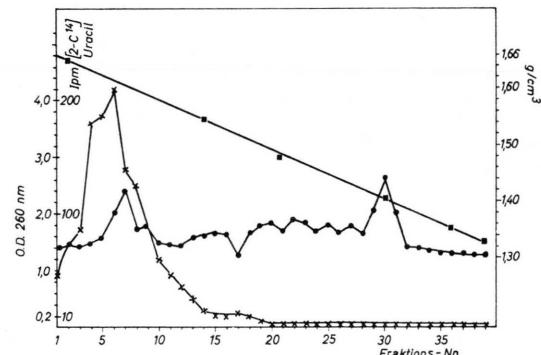


Abb. 5. Dichtetest polysomaler Untereinheiten. Frühlogarithmische Zellen vom Stamm R XII wurden 70 min mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cycloheximid inkubiert und 10 min mit 0,25 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ [$2\text{-}^{14}\text{C}$]uracil. Die Polysomen wurden isoliert, im Dialysepuffer aufgenommen und 12 h dialysiert und anschließend 20 h mit 6% Formaldehyd fixiert. Danach wurde eine Dichte von 1,5 g/cm³ mit CsCl eingestellt und das Material 72 h bei 160 000 $\times g$, 25 °C, zentrifugiert. Die optische Dichte, Dichte und Radioaktivität wurde in 8 Tropfenfraktionen bestimmt¹⁰. ×—×, O.D. 260 nm; ●—●, Ipm [$2\text{-}^{14}\text{C}$]uracil; ■—■, g/cm³.

Triäthanolamin, pH 7,8, 1,5 mM MgCl²)¹⁶ wiederholt, ohne daß sich Unterschiede in der Dichte der mRNP ergaben.

Wir danken E.-R. Lochmann und D. Beyersmann für ihre Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

- ¹ A. S. Spirin, The Mechanism of Proteinsynthesis and its Regulation, p. 515, North-Holland Publ., Amsterdam 1972.
- ² R. Williamson, FEBS-Letters **37**, 1 [1973].
- ³ R. N. Bryan u. M. Hayashi, Nature New Biology **244**, 271 [1973].
- ⁴ G. Blobel, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **70**, 924 [1973].
- ⁵ C. McLaughlin *et al.*, J. Biol. Chem. **248**, 1466 [1973].
- ⁶ J. Reed u. E. Wintersberger, FEBS Letters **32**, 213 [1973].
- ⁷ L. Hartwell *et al.*, Molec. Gen. Genetics **106**, 347 [1970].
- ⁸ Der Stamm wurde uns von A. Kotyk, Prag, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
- ⁹ W. Laskowski, Z. Naturforsch. **15b**, 495 [1960].
- ¹⁰ W. Knöchel u. H. Tiedemann, Biochim. Biophys. Acta **269**, 104 [1972].
- ¹¹ H. Holz, Dissertation, Freie Universität Berlin 1974.
- ¹² H. T. Hutchison u. L. H. Hartwell, J. Bacteriol. **94**, 1697 [1967].
- ¹³ E. C. Henshaw, J. Mol. Biol. **36**, 401 [1968].
- ¹⁴ U. Wiegers u. H. Hilz, FEBS-Letters **23**, 77 [1972].
- ¹⁵ G. Brawermann, Methods Enzymol. **XXX**, 605 [1974].
- ¹⁶ A. Kumar u. U. Lindberg, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **69**, 681 [1972].