

ZUR STREPTOMYCININDUZIERTEN BILDUNG VON 70 S-MONOSOMEN UND VON OLIGOMEREN IN *CHLAMYDOMONAS REINHARDI*

Arminio BOSCHETTI, Stefan BOGDANOV, Martin BRÜGGER und Eva FREI

Institut für organische Chemie, Universität Bern, Länggassstr. 7, CH-3000 Bern, Switzerland

Received 7 August 1973

Under ionic conditions, where the 70 S ribosomes but not the 80 S ribosomes partly dissociate into the subunits, in three mutants of *Chlamydomonas reinhardi* streptomycin causes in vivo at first an increase, later a decrease of the 70 S ribosome fraction. This behaviour can be explained, if streptomycin acts on the ribosome cycle of the organelle ribosomes of eukaryotes in the same way as on the ribosome cycle of *E. coli*.

Streptomycin also induces the formation of dimers and oligomers from 80 S cytoplasmic ribosomes. The kinetics of this formation is similar to that of the 70 S ribosomes. However, this effect of streptomycin does not seem to influence the functional capacity of the 80 S ribosomes.

1. Einleitung

Während die Wirkung von Streptomycin auf Prokaryonten und besonders auf deren Ribosomen gut untersucht ist, ist über den Einfluss von Streptomycin auf eukaryotische Zellen wenig bekannt. Bei der Ergrünung etiologierter *Euglenen* hatte Schiff eine selektive Hemmung der Chloroplastenribosomen durch Streptomycin beschrieben [1]. Wir konnten bei Mutanten der Grünalge *Chlamydomonas reinhardi* sowohl eine analoge Hemmung der Chloroplastenribosomen, als auch einen Einfluss von Streptomycin auf das Dissoziationsverhalten der 70 S Organellenribosomen in vivo nachweisen [2]. Wie bei *E. coli* dissoziieren die 70 S Ribosomen eines streptomycin-sensitiven Stammes (ss) dieser Alge in Gegenwart von Streptomycin weniger gut in die Untereinheiten als ohne Streptomycin. Dieser Unterschied des Dissoziationsgrades mit und ohne Streptomycin wird als "sticking effect" [3] bezeichnet. Bei einer chromosomalen, streptomycin-resistenten Mutante (sr₃) ist dieser "70 S sticking effect" weniger ausgeprägt und bei einer uniparentalen, streptomycin-resistenten Mutante (sr₃₅) gering.

Bei jeder der drei Mutanten wurde auch der Anteil an Di- und Oligomeren in den Ribosomenpräparationen durch Streptomycin unter unseren Versuchsbedingungen erhöht.

In der vorliegenden Arbeit haben wir nun einerseits

zeigen können, dass die Di- und Oligomeren aus cytoplasmatischen 80 S Ribosomen entstanden sind, so dass wir einen Einfluss von Streptomycin auf die Assoziation von 80 S Ribosomen annehmen müssen und in Form eines "Dimer sticking effects" neu definieren können. Andererseits haben wir den zeitlichen Verlauf des "70 S-" und des "Dimer sticking effects" in Abhängigkeit der Einwirkungsdauer von Streptomycin auf die Zellen, untersucht. Die Resultate deuten darauf, dass der Wirkungsmechanismus von Streptomycin auf die Organellenribosomen von Eukaryonten analog demjenigen auf *E. coli*-Ribosomen ist.

2. Experimentelles

Die drei Stämme ss, sr₃ und sr₃₅ von *C. reinhardi* wurden bereits früher beschrieben [4]. Zur Untersuchung des Streptomycineinflusses auf die Ribosomen in Abhängigkeit der Einwirkungsdauer des Antibiotikums wurden die Stämme gemäss Boschetti und Bogdanov [2] in 4 l-Ansätzen kultiviert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde 50 µg/ml Streptomycinsulfat zugegeben und nach 0, 5, 15, 30, 60 und 120 Min. Proben entnommen. Die Proben wurden zum raschen Abstoppen des Metabolismus auf Eis gegossen und in der Kälte sofort zentrifugiert. Aus dem Zellsediment wurden die Ribosomen wie früher isoliert und in der

analytischen Ultrazentrifuge analysiert [2]. Aus den Peakflächen der Schlierenaufnahmen wurden die "sticking effects" nach folgenden Formeln berechnet:

$$\% \text{ 70 S sticking effect} = \left(\frac{70 \text{ S}}{50 \text{ S} + 70 \text{ S}} \right) \times 100 \text{ mit Strept.}$$

$$- \left(\frac{70 \text{ S}}{50 \text{ S} + 70 \text{ S}} \right) \times 100 \text{ ohne Strept.}$$

$$\% \text{ Dimer sticking effect} = \left(\frac{\text{Dimer}}{80 \text{ S} + \text{Dimer}} \right) \times 100 \text{ mit Strept.}$$

$$- \left(\frac{\text{Dimer}}{80 \text{ S} + \text{Dimer}} \right) \times 100 \text{ ohne Strept.}$$

Zur präparativen Auftrennung der Ribosomenfraktion wurde das Ribosomensediment in einem Puffer von 0,025 M Tris-HCl pH 7,5 und 0,015 M MgCl₂ suspendiert. Ein linearer Saccharosegradient (13%–43% Saccharose in obigem Puffer) wurde mit 10–100 A₂₆₀-Einheiten der Ribosomensuspension in einem inversen Konzentrationsgradienten überschichtet und 14 h in SW 27 Rotor der Spinco-Zentrifuge bei 23000 Upm zentrifugiert. Der Gradient wurde mit 45% iger Saccharoselösung aus dem Zentrifugenbecher verdrängt, das Sedimentationsprofil in der Durchflussküvette des Uvicord I bei 254 nm registriert. Die Fraktionen wurden aufgefangen und nach Verdünnung sedimentiert. Die gelelektrophoretische Untersuchung der rRNS geschah im wesentlichen nach Loening [5].

3. Resultate und Diskussion

Da wir festgestellt hatten [2], dass Streptomycin unter unseren Bedingungen zu vermehrter Bildung von Oligomeren Ribosomen Anlass gibt, war es wichtig zu wissen, ob diese Oligomeren aus den 70 S Ribosomen der Organellen oder aus den cytoplasmatischen 80 S Ribosomen entstanden sind. Daher wurden aus einem Saccharosegradienten (Fig. 1) die oligomeren Fraktionen A und B isoliert und deren rRNS elektrophoretisch untersucht (Fig. 2). Es zeigte sich, dass die Oligomeren nur 25 S und 18 S rRNS enthalten. Die 23 S und 16 S rRNS der Organellenribosomen fehlen vollständig. Zudem entspricht das Verhältnis von 25 S zu 18 S

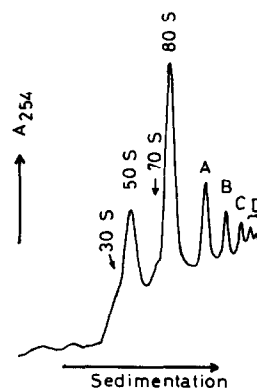


Fig. 1. Beispiel eines Sedimentationsprofils isolierter Ribosomen. Die Ribosomen entstammen einer Kultur des Stammes sr₃, die 30 Min. mit 50 µg/ml Streptomycinsulfat behandelt worden war. Sedimentationsbedingungen siehe Experimentelles. Die angeführten s-Werte sind Gruppenbezeichnungen (generic names); die genauen Werte wurden früher bestimmt [2]. In Sedimentationsprofilen von Ribosomen analog behandelter Kulturen der Stämme ss und sr₃₅ sind die 30 S- und 70 S-Fractionen als kleine Peaks zu erkennen.

rRNS demjenigen von freien 80 S Ribosomen. Somit sind diese Oligomeren – entgegen unserer früheren, auf Literaturangaben [6, 7] beruhenden Annahme [2] – durch Assoziation von ganzen 80 S Ribosomen entstanden. Wir haben daher von früheren, aus der analytischen Ultrazentrifugation gewonnenen Daten [2] den "Dimer sticking effect" neu nach den Formeln unter Experimentellem berechnet und in Fig. 3 dem "70 S sticking effect" gegenübergestellt. Eine Berechnung des "70 S sticking effects" vom präparativen Gradientenprofil (Fig. 1) ist wegen schlechter Auflösung der Peaks unter unseren ionischen Bedingungen nicht möglich.

Man findet in allen drei untersuchten Stämmen nach 15 minütiger Einwirkung von 50 µg/ml Streptomycinsulfat eine eindeutig erhöhte Assoziation von 80 S Ribosomen unter Bildung von Oligomeren (Fig. 3). In Vergleich zum "70 S sticking effect" ist allerdings dieser "Dimer sticking effect" weniger ausgeprägt und man kann keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Stämmen feststellen. Obwohl allgemein angenommen wird, dass Streptomycin nicht auf die cytoplasmatischen Ribosomen von Eukaryonten wirkt, zeigt das Resultat, dass Streptomycin auch in rel. kleinen Dosen nicht nur die Organellenribosomen,

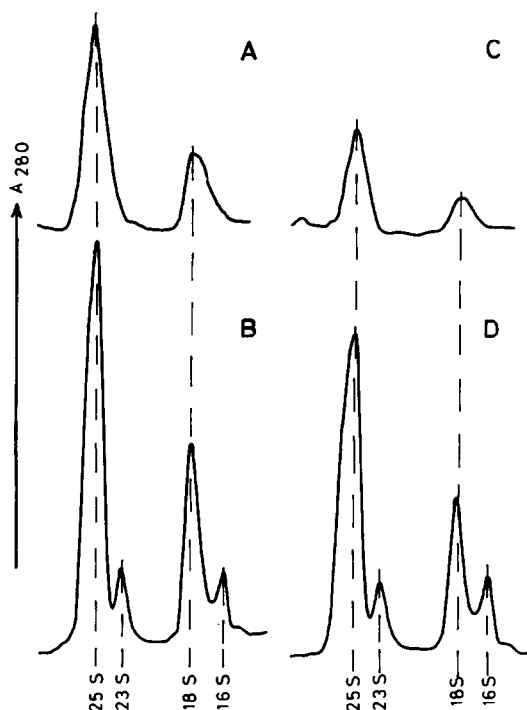


Fig. 2. Elektropherogramme ribosomaler RNA aus den Oligomerfraktionen der Fig. 1. Die 2,4%igen Polyacrylamidgele wurden mit ca. 20 µg Ribosomen in 2% SDS-Lösung beladen und nach Elektrophorese in einem Zeiss Spektrophotometer PQ II mit Gel-Sanner-Zusatz ausgemessen. Elektrophorese-richtung von links nach rechts. Die s-Werte wurden nach Eichung mit rRNA aus *E. coli*-Ribosomen zugeordnet. A: Fraktionen A der Fig. 1; B: Fraktion A + Gesamt-Ribosomen (2+1); C: Fraktion B der Fig. 1; D: Fraktion B + Gesamt-Ribosomen (2+1).

sondern in geringerem Masse auch die 80 S Ribosomen beeinflusst. Auch Ullah und Keller haben eine Beeinflussung der 80 S Ribosomen durch Streptomycin bei *C. reinhardtii* beschrieben [8]. Sie fanden sowohl streptomycinbedingte Veränderungen von physico-chemischen Eigenschaften der Ribosomen des Wildtyps, als auch veränderte 80 S Ribosomen in einer streptomycin-abhängigen Mutante (sd-3).

Da der "70 S sticking effect" nur auftritt, wenn wachsende Kulturen mit Streptomycin behandelt werden [2], scheint für die spezifische Wirkung von Streptomycin auf die Organellenribosomen ein funktioneller Ribosomencycclus notwendig zu sein. Wenn das zutrifft, müsste sich der sticking effect, wie bei *E. coli*, zeitlich entsprechend der Behandlungsdauer

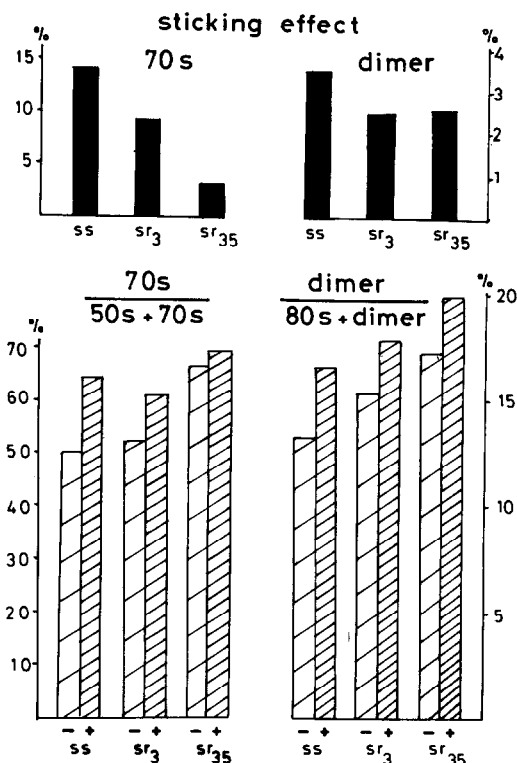


Fig. 3. Gegenüberstellung des "70 S-" und des "Dimer sticking effects". Mittelwerte aus je 3 unabhängigen Messungen mittels der analytischen Ultrazentrifuge. Die Werte für den "70 S-sticking effect" entstammen einer früheren Arbeit [2], diejenigen für den "Dimer sticking effect" wurden neu berechnet. +: Kulturen wurden 15 Min. mit 50 µg/ml Streptomycinsulfat behandelt; -: ohne Streptomycinbehandlung.

der Zellen mit Streptomycin, verändern. Bei *E. coli* nimmt innerhalb von 40 Min. unter Streptomycineinfluss die 70 S Monosomenfraktion auf Kosten der Untereinheiten und der Polysomen bis zu einem Sättigungswert zu [3, 9]. Die Zunahme der 70 S Monosomen wurde durch die Bildung aberranter Initiationskomplexe, sog. str-Monosomen (mit Peptidyl-tRNS und mRNS [9], oder unter Verlust der Aminoacyl-tRNS [10]) gedeutet. Gegenwärtig werden noch verschiedene andere Mechanismen der Streptomycin-Wirkung diskutiert [11, 12]. Offenbar ist aber die Zusammensetzung der 70 S Monosomenfraktion aus Streptomycin-behandelten Zellen uneinheitlich und verändert sich mit der Zeitdauer der Streptomycin-Einwirkung. Kogut und Prizant [13] fanden nämlich,

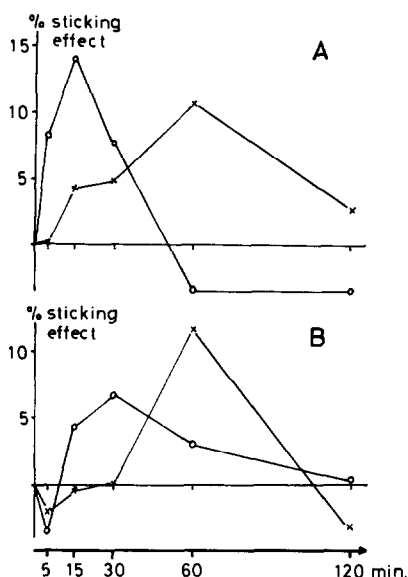


Fig. 4. "Sticking effect" in Abhängigkeit der Zeitdauer, während welcher die Kulturen 50 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycinsulfat ausgesetzt waren. Mittelwerte aus je 2 unabhängigen Bestimmungen. A: "70 S sticking effect"; B: "Dimer sticking effect"; ○: Stamm sr₃; ×: Stamm sr₃₅.

dass nach ca. 70 Min. Dihydrostreptomycin-Behandlung der Zellen die 70 S Fraktion weitgehend noch aus str-Monosomen bestehen, die auch bei kleiner Mg^{2+} -Konzentration stabil bleiben. Mit fortdauernder Dihydrostreptomycin-Behandlung (bis 2 h) treten auf Kosten der str-Monosomen überwiegend run-off-ähnliche Ribosomen auf, die nun bei kleiner Mg^{2+} -Konzentration leicht in die Untereinheiten dissoziieren. Um zu prüfen, ob durch Streptomycin in den Organellen von Eukaryonten der Ribosomencyclus in gleicher Weise beeinflusst wird wie in *E. coli*, haben wir den zeitlichen Verlauf der "sticking effects" in unseren Mutanten untersucht. Dabei haben wir die ionischen Bedingungen so gewählt [2], dass die 70 S Ribosomen normalerweise zur Hälfte in die Untereinheiten dissoziieren, die 80 S Ribosomen jedoch nicht. Unter diesen Bedingungen erwarteten wir zuerst eine Zunahme der 70 S Ribosomenfraktion, d.h. eine Zunahme des "70 sticking effects", was der Bildung der stabilen str-Monosomen bei *E. coli* entspricht, dann eine Abnahme des "sticking effects", was der Umwandlung in die dissoziierbaren, run-off-ähnlichen Ribosomen entspricht.

Tatsächlich haben wir in den untersuchten Stämmen sr₃ und sr₃₅ den erwarteten zeitlichen Verlauf des "70 S sticking effects" feststellen können (Fig. 4). Die Lage des Maximums kann allerdings von Versuch zu Versuch bis 15 Min., und die Höhe bis um die Hälfte variieren. Die Unterschiede zwischen den Kurven der drei Stämme sind also nicht gesichert. Dennoch zeigt sich im Vergleich mit *E. coli* eine überraschende Übereinstimmung in der Zeitdauer, nach welcher auch bei *Chlamydomonas reinhardtii* das Maximum des "70 S sticking effects" errichtet wurde. Es scheint also, dass die Wirkung von Streptomycin auf die Organellenribosomen von Eukaryonten ähnlich derjenigen auf prokaryotische Ribosomen ist. In Fig. 4 ist auch die Kinetik der "Dimer-sticking effect" dargestellt. Erstaunlicherweise ist der Verlauf der Kurve ähnlich wie beim "70 S sticking effect". Dass Ausmass ist allerdings geringer und das Maximum tritt meist auch später auf als beim "70 S sticking effect". Da einerseits der "Dimer-sticking effect" nur auftritt, wenn lebende Zellen mit Streptomycin behandelt werden [2] und andererseits die 80 S Ribosomen kein Dihydrostreptomycin binden [14], nehmen wir an, dass der Einfluss von Streptomycin auf die 80 S Ribosomen indirekt ist.

Danksagung

Diese Arbeit wurde zum Teil vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der Wissenschaften unterstützt.

Literatur

- [1] Schiff, J.A. (1970) in: Control of Organelle Development (Miller, P.L., ed.), pp. 277–301, University Press, Cambridge.
- [2] Boschetti, A. und Bogdanov, S. (1973) European J. Biochem. 35, 482–488.
- [3] Herzog, A. (1964) Biochem. Biophys. Res. Commun. 15, 172–176.
- [4] Boschetti, A. und Walz, A. (1973) Arch. Mikrobiol. 89, 1–14.
- [5] Loening, U.E. (1968) J. Mol. Biol. 38, 355–365.
- [6] Spirin, A.S. und Gavrilova, L.P. (1969) in: The Ribosome, pp. 64, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [7] Pakhamova, M.V., Zaitseva, G.N. und Stepanenko, S.Yu. (1968) Biochemistry 33, 878–882.

- [8] Ullah, A.H. und Keller, S.J. (1972) J. Cell Biol. 55, 264a.
- [9] Luzzatto, L., Apirion, D. und Schlessinger, D. (1969) J. Mol. Biol. 42, 315–335.
- [10] Modolell, J. und Davis, B.D. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 67, 1148–1155.
- [11] Wallace, B.J., Tai, P.C. und Davis, B.D. (1973) J. Mol. Biol. 75, 391–400.
- [12] Miskin, R. und Zamir, A. (1972) Nature New Biol. 238, 78–80.
- [13] Kogut, M. und Prizant, E. (1970) FEBS Letters 12, 17–20.
- [14] Boschetti, A. und Bogdanov, S., in Vorbereitung.