

Chromosomale Strukturen von *Pseudomonas testosteroni*.

II. Aktivität der endogenen RNA-Polymerase

Chromosomal Structure of *Pseudomonas testosteroni*.

II. Activity of the Endogenous RNA-Polymerase

Günter Reimer und Dusan Drahovsky

Zentrum der Biologischen Chemie, Abteilung für Therapeutische Biochemie
der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforsch. **31 c**, 601—605 [1976]; eingegangen am 24. Februar/9. Juni, 1976)

Bacterial Chromosome, Endogenous RNA-Polymerase, RNA-Polymerase Binding

After careful lysis the nucleoid of *Pseudomonas testosteroni* can be isolated in three different forms with compact and unfolded DNA structures¹. The released nucleoids contain endogenous DNA-dependent RNA-polymerase activity using the chromosomal DNA as a template. RNA synthesis is proportional to duration of RNA-polymerase reaction and amount of DNA-protein-complexes. The sensitivity towards ionic strength and rifampicin indicates that a part of RNA-polymerase activity is tightly bound to the chromosomal DNA.

Mit einer vorsichtigen Lyse können aus *P. testosteroni* drei verschiedene chromosomale Strukturen isoliert werden¹, die sich ähnlich wie die aus *E. coli* isolierten Chromosomen verhalten^{2, 3}. Diese DNA-Protein-Komplexe werden nach zwei Modifikationen der Lyse von Stonington und Pettijohn² gewonnen und unterscheiden sich durch Sedimentationsgeschwindigkeit, Proteingehalt und Empfindlichkeit gegenüber RNase und DNase¹. Die charakteristischen Unterschiede der proteinreichen kompakten Komplexe (a), der proteinreichen Komplexe (b) mit einer expandiert angeordneten DNA sowie der proteinarmen und ebenfalls kompakten Form (c) sind in Tab. I zusammengestellt.

Nach der Isolierung sind die chromosomalen Strukturen relativ stabil und verändern nicht ihre Eigen-

schaft nach längerer Inkubation bei 30 °C und bei 80 mM NaCl-Konzentration¹. Dadurch ist es möglich, die Anwesenheit verschiedener DNA-abhängiger enzymatischer Aktivitäten in diesen chromosomalen Komplexen zu untersuchen. In dieser Arbeit beschreiben wir die Eigenschaften der RNA-Polymerase, die mit den chromosomalen Komplexen assoziiert ist.

Material und Methoden

Isolierung der DNA-Protein-Komplexe

P. testosteroni (ATCC 11996) werden in Hefemedium kultiviert und aus den Bakterien die chromosomalen Komplexe wie beschrieben nach Methode I bzw. II freigesetzt¹. Durch Zentrifugation im

Tab. I. Eigenschaften der isolierten chromosomalen Strukturen von *P. testosteroni*.

	Komplex (a)	Komplex (b)	Komplex (c)
Isolierung nach Methode	I	I	II
Sedimentation im 5—25% Saccharose-Gradienten bei	6000 rpm	6000 rpm	20000 rpm
Protein/DNA-Verhältnis	2—4,5 : 1 (proteinreich)	2—4,5 : 1 (proteinreich)	0,5 : 1 (proteinarm)
DNA-Anordnung	kompakt	expandiert	kompakt
Inkubation mit			
RNAase ¹	keine Wirkung	keine Wirkung	Viskositätsanstieg
Pronase ¹	keine Wirkung	keine Wirkung	keine Wirkung
Sarkosin	auf Membranbindung hinweisend	— — —	keine Wirkung

SW 25-Rotor für 15 min bei 6000 rpm (ad Methode I) bzw. 20000 (ad Methode II) werden die verschiedenen DNA-Protein-Komplexe von den restlichen Zellbestandteilen abgetrennt¹.

Bestimmung der Proteine und der DNA

Die Gradientenfractionen mit den chromosomalen Strukturen sowie die RNA-Polymerase-Fraktion wurden vor der Bestimmung der Proteine (Lowry *et al.*⁵) und der DNA (Dische⁶) gründlich gegen 20 mM Tris-HCl pH 7,5 dialysiert.

RNA-Polymerase-Test

Die RNA-Syntheserate der endogenen RNA-Polymerase der verschiedenen chromosomalen Komplexe wurde in einem Test-System mit je 0,15 mM nicht-radioaktivem Nukleosidtriphosphat und 0,5 μ Ci [³H]ATP (12,4, 13,4 bzw. 32,6 Ci/mM, New England Nuclear) in 0,25 ml Standardpuffer (40 mM Tris-HCl pH 7,9, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM Dithiothreitol) bestimmt. Je nach Versuch werden verschiedene Mengen an entsprechenden chromosomalen DNA-Protein-Komplexen von *P. testosteronei* hinzugegeben. Nach einer Inkubation bei 30 °C wird 0,4 ml Rinderserumalbumin-Lösung (1 mg/ml) zugegeben und mit 3 ml 5% Trichloressigsäure (TCA) die Makromoleküle gefällt. Das Präzipitat wird auf Glasfaserfilter (Whatman GF/C) abgesaugt, mit 2% TCA in 20 mM Natrium-pyrophosphat-Lösung gründlich gewaschen und mit Toluol-Scintillator die eingebaute Radioaktivität gemessen.

Isolierung der RNA-Polymerase aus *P. testosteronei*

Logarithmisch gewachsene *P. testosteronei* werden mit Ultraschall (3 × 20 sec, Branson Sonifier) auf-

geschlossen und das Homogenat 2 h lang bei 72000 × g zentrifugiert. Der Überstand wird bei 35–55-prozentiger Sättigung an Ammoniumsulfat präzipitiert und anschließend in Standardpuffer mit 30% (v/v) Glycerin gelöst. Das Ammoniumsulfat wird mit einer Sephadex G 200-Säule (equilibriert mit Standardpuffer in 30% Glycerin) entfernt. Die RNA-Polymerase-Aktivität befindet sich im Ausschlußvolumen der Säule. Es ist uns nicht gelungen, mit einer DNA-Cellulose-Säule nach Alberts⁴ die RNA-Polymerase aus *P. testosteronei* analog einer *E. coli*-RNA-Polymerase weiter zu reinigen. Wir verwendeten daher eine DEAE-Sephadex-Säule (equilibriert mit Standardpuffer in 30% Glycerin). Die DNA-abhängige RNA-synthetisierende Fraktion wird bei einer 0,25 M NaCl-Konzentration eluiert.

Ergebnisse

Bei Inkubation der DNA-Protein-Komplexe von *P. testosteronei* mit Ribonukleotidtriphosphaten konnte eine endogene RNA-Polymerase-Aktivität festgestellt werden. Die isolierten chromosomalen Strukturen besitzen somit eine aktive RNA-Polymerase, die in einem *in vitro*-System die endogene DNA transkribiert.

Bei der RNA-Polymerase-Reaktion bleibt die kompakt angeordnete DNA der Komplexe (a) und (c) offenbar in ihrer kondensierten Form erhalten, da diese Komplexe wieder an der gleichen Stelle des 5–25-prozentigen Saccharose-Gradienten sedimentieren (Abb. 1).

Die RNA-Syntheserate ist direkt abhängig von den im Test anwesenden DNA-Protein-Komplexen

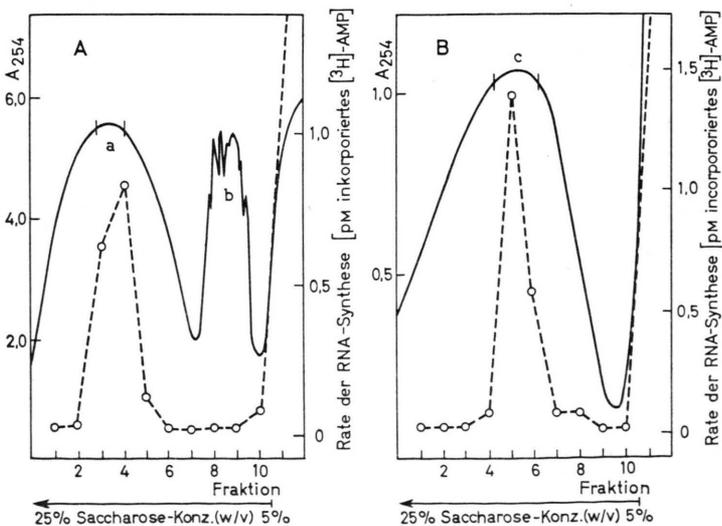


Abb. 1. Rezentrifugation der kompakten DNA-Protein-Komplexe nach einer RNA-Polymerase-Reaktion. *P. testosteronei* werden wie beschrieben³ nach Methode I (A) bzw. II (B) lysiert und im 5–25% Saccharose-Gradienten während 15 min Zentrifugation bei 6000 rpm (A) bzw. 20000 rpm (B) im SW 25-Rotor fraktioniert. Von der DNA-Protein-Komplexe enthaltene Fraktion (—) werden 0,5 ml mit 2,0 ml 0,15 mM Nukleotidtriphosphaten und 5,0 μ Ci [³H]ATP (17,5 Ci/mM, NEN) in Standardpuffer 15 min lang bei 30 °C inkubiert. Das Testgemisch wird sofort abgekühlt und im gleichen Gradienten bei entsprechenden Bedingungen aufgetrennt. Die in den einzelnen Fraktionen enthaltene ³H-Radioaktivität (---○---) wird wie beim RNA-Polymerase-Test durch Säurepräzipitation bestimmt.

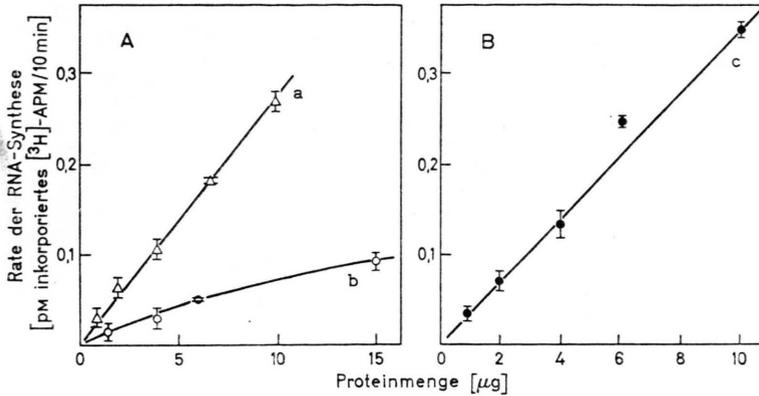


Abb. 2. Endogene RNA-Polymerase-Aktivität chromosomaler Komplexe in Abhängigkeit von der Proteinmenge. Aus log. gewachsenen *P. testosteronei* werden nach Methode I (A) bzw. II (B) die chromosomalen Komplexe (a \circ — \circ —, b \triangle — \triangle — und c \bullet — \bullet —) isoliert³. Im RNA-Polymerase-Test wird der Einbau an ^3H -AMP in TCA-präzipitierbare Nucleinsäuren in Abhängigkeit von der Proteinmenge gemessen. Die nach Methode I (A) isolierten Komplexe besitzen $0,25 \mu\text{g DNA}/\mu\text{g Protein}$, nach Methode II (B) isolierten Komplexe besitzen $2 \mu\text{g DNA}/\mu\text{g Protein}$.

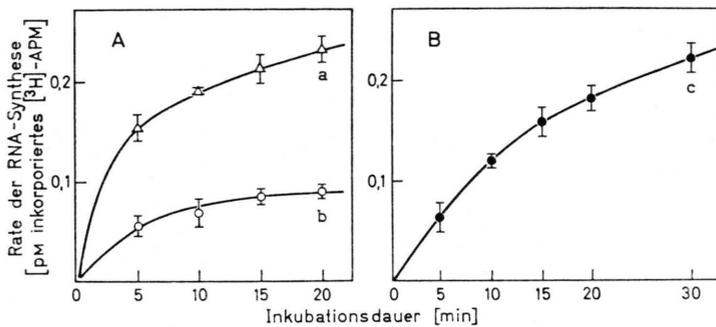


Abb. 3. Endogene RNA-Polymerase-Aktivität chromosomaler Komplexe in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Nach Methode I (A) bzw. II (B) werden aus *P. testosteronei* die chromosomalen DNA-Protein-Komplexe (a \circ — \circ —, b \triangle — \triangle — und c \bullet — \bullet —) isoliert³. Im RNA-Polymerase-Test wird der Einbau an ^3H -AMP (A $12,4 \text{ Ci}/\text{mm}$, B $32,6 \text{ Ci}/\text{mm}$, NEN) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit gemessen. Die RNA-Syntheserate der DNA-Protein-Komplexe ist auf $4 \mu\text{g Protein}$ je Ansatz berechnet, um die RNA-Polymerase-Aktivitäten vergleichen zu können.

(ausgedrückt durch Proteinmenge) und zeigt eine für jede chromosomale Struktur charakteristische Syntheserate (Abb. 2).

Kinetische Studien der RNA-Syntheserate in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer ergeben einen biphasischen Verlauf; die DNA wird in den ersten 5 bis 10 min relativ rasch transkribiert, während bei einer weiteren Inkubation bis 20 bzw. 30 min die RNA-Syntheserate nur mit einer geringeren Geschwindigkeit ansteigt (Abb. 3).

Die Darstellung der RNA-Syntheserate in Abhängigkeit von der Temperatur und der Ionenstärke ermöglicht eine Aussage über die Bindung der RNA-Polymerase an die verschiedenen chromosomalen Strukturen. Aus früheren Versuchen ist bekannt, daß auch die freie, nicht an die DNA gebundene Polymerase, von *P. testosteronei* ebenso wie die RNA-Polymerase von *E. coli*⁷ erst bei einer Temperatur von über 20°C die homologe DNA transkribiert (unveröffentlicht). Da schon bei geringeren Temperaturen als 20°C eine RNA-Synthese stattfindet, ist hieraus auf fest an die chromosomale DNA gebundene RNA-Polymerase zu schließen (Abb. 4). Das Temperaturoptimum der RNA-Polymerase-Aktivität liegt bei 30°C und wird bis 37°C etwas geringer.

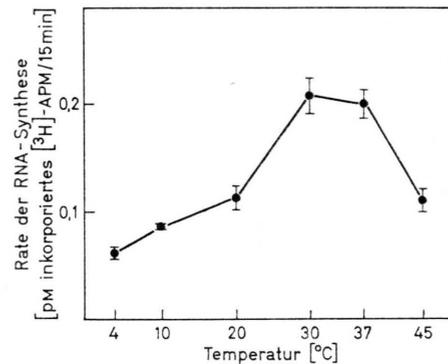


Abb. 4. Endogene RNA-Polymerase-Aktivität in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur. Aus logarithmisch gewachsenen *P. testosteronei* werden nach Methode II die proteinärmeren, kompakten Komplexe (c \bullet — \bullet —) isoliert³. Im RNA-Polymerase-Test wird die endogene Aktivität des Komplexes ($3,5 \mu\text{g Protein}$ und $7,0 \mu\text{g DNA}$ je Ansatz) durch den Einbau an ^3H -AMP ($32,3 \text{ Ci}/\text{mm}$, NEN) in 15 min bei verschiedenen Temperaturen gemessen.

Dies entspricht auch der Wachstumsgeschwindigkeit einer *P. testosteronei*-Kultur in diesem Temperaturbereich.

Vorhergehende Versuche zeigten weiterhin, daß die RNA-Polymerase von *P. testosteronei* ebenso wie die von *E. coli*⁷ bei höherer Ionenstärke als 150 mM

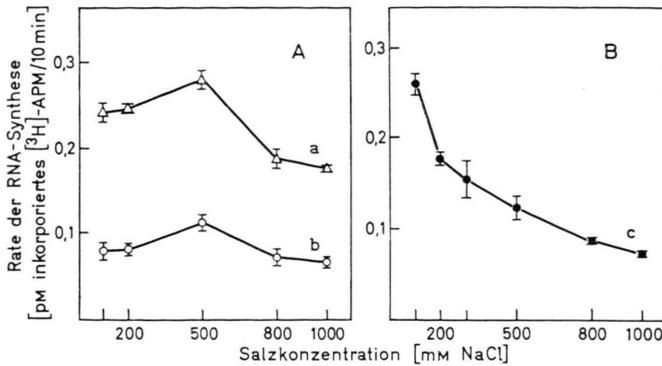


Abb. 5. Endogene RNA-Polymerase-Aktivität in Abhängigkeit von der Ionenstärke. Log. gewachsene *P. testosteroni* werden nach Methode I (A) bzw. II (B) lysiert und die chromosomalen Komplexe (a $\circ-\circ-$, b $\triangle-\triangle-$ und c $\bullet-\bullet-$) isoliert³. Der Einbau von [³H]AMP (A 13,6 Ci/mM, B 32,6 Ci/mM, NEN) wird innerhalb von 10 min bei den proteinreichen Strukturen (a und b: 3,8 μ g Protein und 1,3 μ g DNA je Ansatz) und den proteinärmeren Komplexen (c: 3,6 μ g Protein und 7,2 μ g DNA je Ansatz) bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen ermittelt.

NaCl nicht mehr fest an die DNA bindet; bereits fest gebundene RNA-Polymerase hingegen vermag die DNA zu transkribieren (unveröffentlicht).

Aus Abb. 5 ist zu ersehen, daß auch bei 1,0 M NaCl-Konzentration eine relativ hohe RNA-Synthese stattfindet und somit auf fest an die chromosomale DNA gebundene RNA-Polymerase hinweist. Bemerkenswert ist die erhöhte Einbaurate bei 0,5 M NaCl bei den Komplexen (a) und (b), die mit den bisherigen Ergebnissen nicht erklärt werden kann.

Die Aktivität der endogenen RNA-Polymerase des proteinärmeren Komplexes (c) wird hingegen stärker von der Salzkonzentration beeinflusst. Insbesondere im Bereich von 100 bis 400 mM NaCl ist eine starke Abnahme der RNA-Synthese durch Erhöhung der Ionenstärke festzustellen.

Ebenso wie durch höhere Ionenstärke wird beim Komplex (c) durch Rifampicin (50 μ g/ml), einem spezifischen Hemmstoff der Initiation der Transkription⁸, die RNA-Syntheserate erheblich gesenkt. Die gleiche Konzentration an Rifampicin verhindert hingegen in einem adäquaten Ansatz die Initiation der

Transkription gereinigter *P. testosteroni*-DNA durch eine aus *P. testosteroni* isolierte RNA-Polymerase vollständig (Tab. II).

Durch Zugabe von isolierter *P. testosteroni*-RNA-Polymerase zu der chromosomalen Struktur (c) kann die RNA-Synthese erheblich erhöht werden. Hierdurch wird deutlich, daß an der kompakt angeordneten DNA noch genügend Bindungsstellen für weitere, freie RNA-Polymerase zur Verfügung steht (Tab. II).

Diskussion

Bei der Untersuchung der aus *P. testosteroni* isolierten chromosomalen Komplexe auf kosedimentierende Enzymaktivitäten konnte eine endogene RNA-Polymerase nachgewiesen werden. Jeder der drei verschiedenen Komplexe zeigt im *in vitro*-Test eine für ihn charakteristische RNA-Syntheserate. Dies dürfte weniger auf einer unterschiedlichen Syntheseaktivität der RNA-Polymerase oder unterschiedlichem Gehalt an RNA-Polymerase der einzelnen chromosomalen

Tab. II. RNA-Polymerase-Aktivität des isolierten Enzyms und des DNA-Protein-Komplexes (c).

RNA-Polymerase-Ansatz	RNA-Synthese (10 ⁻¹⁴ M inkorp. [³ H]AMP/10 min)	Bemerkungen
a) RNA-Polymerase alleine (10 μ g Protein)	0,27 \pm 0,13	
+ <i>P. testosteroni</i> -DNA (19 μ g DNA)	25,0 \pm 0,10	DNA-abhängige RNA-Synthese
+ Rifampicin (12,5 μ g) und <i>P. testosteroni</i> -DNA (19 μ g DNA)	0,80 \pm 0,10	Hemmung der Initiation ⁸
b) DNA-Protein-Komplex (c) alleine (10 μ g Protein, 20 μ g DNA)	18,4 \pm 0,11	Endogene RNA-Synthese
+ Rifampicin (12,5 μ g)	12,6 \pm 0,13	32% Hemmung
c) DNA-Protein-Komplex (c) alleine (10 μ g Protein, 20 μ g DNA)	18,6 \pm 0,11	
+ RNA-Polymerase (10 μ g Protein)	34,1 \pm 0,09	Endogene RNA-Synthese um 15,5 \pm 0,10 erhöht

Komplexe beruhen, als auf einer unterschiedlich gut zugänglichen DNA.

Bei Inkubation der verschiedenen chromosomalen Strukturen mit DNase konnte gezeigt werden, daß die DNA der verschiedenen Komplexe in unterschiedlichem Maße frei vorliegen und Bindungsstellen für Enzyme bieten¹. Analog zu diesem Versuch dürfte die kompakt angeordnete DNA des proteinreichen Komplexes (a) nur in beschränktem Maße für eine Transkription zugänglich sein. Die ebenfalls kompakt angeordnete Struktur (c) wird hingegen durch die endogene RNA-Polymerase weitaus besser transkribiert; die RNA-Syntheserate dieser kompakten Struktur ist sogar etwas höher als bei dem proteinreichen Komplex (c) mit seiner expandierten DNA-Anordnung.

Wie aus Tab. II hervorgeht, besitzt der proteinarme Komplex (c) noch weitere Bindungsstellen für exogene, aus *P. testosteronei* isolierter RNA-Polymerase. Ebenso wie die Chromosomen von *E. coli*⁹ kann diese chromosomale Form als template benutzt werden.

Die an die chromosomalen Formen (a) und (b) assoziierte RNA-Polymerase ist zum überwiegenden Teil fest an die DNA gebunden. Eine RNA-Syntheserate bei geringeren Temperaturen und eine vergleichbare RNA-Polymerase-Aktivität bei geringerer sowie bei hoher Ionenstärke deuten darauf hin.

Bei dem proteinarmen, nach der Methode II¹ isolierten Komplex (c) wird hingegen durch höhere Ionenstärke sowie Rifampicin die RNA-Syntheserate erheblich erniedrigt. Diese Beobachtung kann einerseits auf locker gebundene („loose-bound“) bzw. freie RNA-Polymerase beruhen. Da jedoch die im *in vitro*-System aktive RNA-Polymerase mit den Komplexen in dem Dichtegradient sedimentiert, ist anzunehmen, daß die RNA-Polymerase an die chromosomale DNA assoziiert ist, zumal ungebundenes

Enzym im Überstand verbleibt. Andererseits können im Gegensatz zum *E. coli*-Chromosom² am DNA-Protein-Komplex von *P. testosteronei* σ -Untereinheiten der RNA-Polymerase assoziiert sein. Diese für die Initiation der Transkription benötigte Untereinheit¹⁰ könnte es der fest gebundenen, transkribierenden RNA-Polymerase ermöglichen, sich nach der Termination der RNA-Synthese erneut an die DNA zu binden. Diese Reinitiation wird durch hohe Ionenstärke sowie Rifampicin gehemmt.

Weiterhin könnte die RNA-Polymerase von *P. testosteronei* eine zum typischen *E. coli*-Enzym heterogene Form darstellen. Vergebliche Versuche, die RNA-Polymerase aus *P. testosteronei* mit einer von Alberts⁴ beschriebenen DNA-Cellulose-Säule zu isolieren, weisen darauf hin; eine heterogene RNA-Polymerase von *E. coli* mit veränderter σ -Untereinheit bindet sich ebenfalls nicht an die DNA-Cellulose¹¹. Elektrophoretische Auftrennung der Proteine der chromosomalen Komplexe sowie der gereinigten RNA-Polymerase von *P. testosteronei* werden hier weitere Anhaltspunkte geben.

Durch die Möglichkeit der RNA-Synthese *in vitro* an der kompakt angeordneten, chromosomalen DNA stellen die isolierten DNA-Protein-Komplexe ein Modell für die Untersuchung der Transkriptionsregulation dar. Für solche Untersuchungen sind die isolierten DNA-Protein-Komplexe von besonderem Interesse, da bei *P. testosteronei* durch Testosteron eine *de novo*-Synthese von mehreren Enzymen bewirkt wird¹².

Herrn Prof. Dr. A. Wacker möchten wir für sein Interesse an der Durchführung dieser Arbeit danken. Ein Teil dieser Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Dr 104/4) unterstützt. Diese Arbeit ist Teil einer Dissertation (G. R.) im Fachbereich Biologie der Universität Frankfurt am Main.

¹ G. Reimer u. D. Drahovsky, Z. Naturforsch. **31 c**, 91–97 [1976].

² O. G. Stonington u. D. E. Pettijohn, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **68**, 6 [1971].

³ A. Worcel u. E. Burgi, J. Mol. Biol. **82**, 91 [1974].

⁴ F. J. A. Alberts, M. Jenkins, E. D. Gutman u. F. L. Ferris, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **33**, 289 [1968].

⁵ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr u. R. J. Randall, J. Biol. Chem. **193**, 265 [1951].

⁶ Z. Dische, Nucleic Acids Vol. **I**, p. 286, Academic Press Inc., New York 1955.

⁷ D. C. Hinkel u. M. Chamberlin, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **35**, 65 [1970].

⁸ R. E. Kerrich-Santo u. G. R. Hartmann, Europ. J. Biochem. **43**, 521 [1974].

⁹ R. Giorno, T. Stomato, B. Lyderson u. D. Pettijohn, J. Mol. Biol. **96**, 217 [1975].

¹⁰ D. Berg, K. Borret, D. Hinkel, J. McGrath u. M. Chamberlin, Fed. Proc. **28**, 659 [1969].

¹¹ R. Fukuda, A. Iwakura u. A. Ishihama, J. Mol. Biol. **83**, 352 [1974].

¹² A. Wacker, J. Drews, L. Pratt, K. Laurent u. K. Petzold, Z. Naturforsch. **20 b**, 547 [1965].