Zur Wirkung von Zn^{2+} auf die nucleare RNA- und Proteinbiosynthese der Rattenleber

Effect of Zn^{2+} on Nuclear RNA- and Protein-Biosynthesis in Rat Liver

U. WESER, S. SEEGER und P. WARNECKE

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, 74 Tübingen

(Z. Naturforschg. **24 b**, 866—869 [1969]; eingegangen am 7. Februar 1969)

Female rats have been employed for a study of the reactivity of zinc ions on RNA and protein biosynthesis of liver nuclei. Intraperitoneal injections of 20 μ moles of this metal ion have been found to stimulate RNA biosynthesis up to 80% and a 40% increase of protein synthesis was observed under the same conditions. The precursor for RNA synthesis was [$6\text{-}^{14}\text{C}$]-orotic acid and [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-DL-leucine served as a label for nuclear protein. Low Zn^{2+} -concentrations showed no reactivity, even when zinc-deficient rats were used.

DNA-dependent RNA-polymerase activity was progressively diminished when increasing amounts of Zn^{2+} -ions were added in vitro to the incubation mixtures. However, RNA-polymerase activity was strongly stimulated following a 10 h pulse of Zn^{2+} prior to the isolation of liver nuclei.

Die Reaktivität des Zn^{2+} ist mehrfach bei biochemischen Reaktionen von Proteinen und deren monomeren Bausteinen untersucht worden. Zinkionen können dort von stereochemischer Bedeutung sein, Metallbrückenbindungen von Enzymen zu den Substraten bilden oder direkt als Coenzym in die Reaktion eingreifen.

In den letzten Jahren sind die Kenntnisse über die Biosynthese von Nucleinsäuren immer umfassender geworden. Erstaunlich jedoch ist, daß der Einfluß von Spurenelementen hierbei nur wenig berücksichtigt wurde¹⁻⁶, obwohl schon beachtliche Angaben über die Reaktivität von Metallionen mit Nucleinsäuren vorliegen⁶. In dieser Arbeit werden daher Versuche zur Wirkungsweise von Zn^{2+} auf die Nucleinsäure-Biosynthese in Leberzellkernen von Ratten unternommen.

Im einzelnen wird an Ratten geprüft, wie die nucleare RNA- und Proteinbiosynthese der Leber in Gegenwart von Zn^{2+} verläuft. In vitro wird an intakten, enzymatisch aktiven Leberzellkernen die Reaktivität dieses Metallions auf die Aktivität der DNA-abhängigen RNA-Polymerase untersucht. Vergleichsweise wird die RNA-Polymeraseaktivität der

Leber bestimmt, nachdem den Ratten 10 h zuvor unterschiedliche Zn^{2+} -Konzentrationen intraperitoneal injiziert wurden.

Experimentelles

Chemikalien: [$6\text{-}^{14}\text{C}$]-Orotsäure (44,5 C/Mol) und [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-DL-Leucin (55,2 C/Mol) wurden vom Radiochemical Centre, Amersham, Great Britain, erworben. [^3H]-UTP (2,24 C/mMol) von Schwarz Bio Res. Co., Orangeburg, N. Y. Im übrigen wurden dieselben Substanzen verwendet, wie bereits berichtet (s. l. c.²).

Tiere: Weiße weibliche Wistar-Ratten mit durchschnittlichem Körpergewicht von 150 g wurden von Fa. Ivanovas, Kisslegg, Allgäu, bezogen. Die Tiere erhielten eine Normaldiät (Altromin, R-10) und Wasser *ad libitum*. Zn-Mangelratten wurden durch Verfütterung einer Diät aus analysenreinen Substanzen an 30 g schwere Ratten erhalten⁷. Diese Ratten wogen bei Versuchsende 70 g.

Markierung von RNA und Protein in Rattenleberkernen: Als RNA-Vorstufe fungierte [$6\text{-}^{14}\text{C}$]-Orotsäure (2 μC), die 20 Min. vor Versuchsende den Ratten i.p. injiziert wurde. Nach der Dekapitation wurden die Leberzellkerne isoliert¹. Die nucleare RNA der Leber wurde nach einer modifizierten Phenol-Dodecylsulfat-Methode erhalten^{1,8}. Die isolierte RNA wurde in

¹ U. WESER, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **349**, 989 [1968].

² U. WESER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **126**, 669 [1967].

³ U. WESER, P. WARNECKE u. S. SEEGER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **349**, 1264 [1968].

⁴ H. ALTMANN, F. FETTER u. K. KAINDL, Z. Naturforschg. **23 b**, 395 [1968].

⁵ U. WESER, S. SEEGER u. P. WARNECKE, Experientia [Basel] **25**, 489 [1969].

⁶ U. WESER, Structure and Bonding, **V**, 41, Springer-Verlag, Berlin 1968.

* TES: Tris, ÄDTA und NaCl-Puffer.

⁷ U. WESER, S. SEEGER u. P. WARNECKE, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **179**, 422 [1969].

⁸ K. HIGASHI u. H. BUSCH, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **103**, 339 [1965].

TES*-Puffer⁹ gelöst. Spuren von Phenol wurden durch 4-fache Extraktion mit Äther entfernt. Die so behandelte RNA zeichnete sich durch einen hohen Reinheitsgrad aus, da der Quotient $\frac{OD_{280}}{OD_{260}}$ nahezu dem theoretischen Wert von 0,49 entsprach. Für die Bestimmung der Radioaktivität wurde ein polarer Szintillator auf Dioxan-Basis verwendet¹⁰, dem aliquote Mengen [^{14}C]-markierter RNA-Lösungen bekannter OD_{260} zugesetzt wurden.

Die Proteinfraction des Leberzellkerns wurde mit jeweils 2 μC [^{14}C]-DL-Leucin markiert¹¹⁻¹³. 30 Min. vor Versuchsende wurde den Ratten diese Proteinvorstufe ebenfalls i.p. injiziert. Aliquote Mengen der isolierten Leberzellkerne wurden mit 2%-Perchlorsäure ausgefällt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von LOWRY¹⁴. Die Radioaktivität der Kerne wurde nach dem Gefriertrocknen der Proben und Lösen in „Hyamine“ in einem Toluolszintillator gemessen¹. Alle radioaktiven Proben wurden in einem „Packard Tri Carb“ (Serie 3003) untersucht.

RNA-Polymerase: Die Aktivitätsbestimmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase erfolgte nach einer modifizierten Methode von MC GREGOR und MAHLER¹⁵. [3H]-UTP wurde als RNA-Vorstufe verwendet. Kurz vor der Perchlorsäure-Fällung wurden die Proben mit überschüssigem kaltem UTP versetzt, um Einschlußverbindungen an [3H]-UTP zu verringern. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bereits beschrieben¹. Die Kernsuspensionen von Ratten, denen zuvor Zn^{2+} injiziert wurde, wurden vor der RNA-Polymerasebestimmung auf gleiche OD_{600} gebracht. Die Meßwerte bei OD_{600} stimmten sehr gut mit den DNA-Konzentrationen der jeweiligen Proben überein. Diese Maßnahme erlaubte einen direkten Vergleich der RNA-Polymerase-Aktivität von Leberzellkernen verschiedener Einzeltiere.

Ergebnisse

5 Gruppen zu je 4 Ratten erhielten 10 h vor Versuchsende unterschiedliche Zn-Konzentrationen intraperitoneal injiziert. Jedes Tier jeder Gruppe erhielt zusätzlich 2 μC [^{14}C]-Orotsäure 20 Min. vor der Dekapitation ebenfalls i.p. injiziert. Die nucleare RNA wurde sofort isoliert und die Radioaktivität aliquoter Volumina bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Die meisten Zn^{2+} -Konzentrationen zeigten keinen Effekt auf die Einbauraten von [^{14}C]-Orotsäure. 20 μMol Zn^{2+} bewirkten jedoch eine beachtliche Sti-

Injiziertes $ZnCl_2$ [μMol]	$\frac{OD_{280}}{OD_{260}}$	$\frac{cpm}{ml \cdot OD_{260}}$	Stimulierung [%]
0	0,517	915 ± 123	—
0,2	0,509	805 ± 143	—
2	0,498	783 ± 153	—
20	0,504	1720 ± 225	88 $p < 0,01$
100	0,512	750 ± 183	—

Tab. 1. [^{14}C]-Orotsäure-Inkorporation in die nucleare RNA der Leber von 150 g schweren Ratten, denen 10 h zuvor unterschiedliche Mengen an $ZnCl_2$ injiziert wurden.

mulierung der RNA-Biosynthese. Steigt die Zn^{2+} -Konzentration weiter, so bleibt dieser Effekt aus. Wahrscheinlich wirken 100 μMol $ZnCl_2$ bereits toxisch.

Im nächsten Versuch wurde geprüft, zu welchem Zeitpunkt $ZnCl_2$ die RNA-Liosynthese beeinflusst. Von drei Gruppen zu je 4 Ratten erhielten zwei Gruppen außer den [^{14}C]-Orotsäure-Injektionen jeweils 20 μMol $ZnCl_2$ i.p. injiziert. Das $ZnCl_2$ wurde 1 h bzw. 10 h vor Versuchsende injiziert. Die nucleare RNA wurde wie bereits beschrieben (s. Material und Methoden) isoliert und die Radioaktivität gemessen. In Tab. 2 sind die Ergebnisse aufgeführt.

Injiziertes $ZnCl_2$	$\frac{OD_{280}}{OD_{260}}$	$\frac{cpm}{ml \cdot OD_{260}}$	Stimulierung [%]
0	0,512	1040 ± 232	—
20 μMol $ZnCl_2$ 1 h zuvor	0,521	835 ± 173	—
20 μMol $ZnCl_2$ 10 h zuvor	0,523	1753 ± 218	68 $p < 0,01$

Tab. 2. Einbau von [^{14}C]-Orotsäure in die nucleare RNA der Leber von Ratten (150 g) nach zeitlich verschiedenen $ZnCl_2$ -Injektionen.

Nach einer Std. konnte keine unterschiedliche ^{14}C -Inkorporationsrate festgestellt werden. Erst eine 10-stdg. Vorinjektion von Zn^{2+} erbrachte die bereits in Tab. 1 berichtete Stimulierung der RNA-Biosynthese.

⁹ H. R. MAHLER u. G. DUTTON, J. molecular Biol. **10**, 157 [1964].

¹⁰ J. ELOVSON, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **84**, 275 [1964].

¹¹ V. G. ALLFREY, A. E. MIRSKY u. S. OSAWA, J. gen. Physiol. **40**, 451 [1957].

¹² T. UETE, J. Biochem. [Tokyo] **61**, 251 [1967].

¹³ H. ONO u. H. TERAYAMA, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **166**, 175 [1968].

¹⁴ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR u. R. J. DANDALL, J. biol. Chemistry **193**, 265 [1951].

¹⁵ R. R. MC GREGOR u. H. R. MAHLER, Arch. Biochem. Biophysics **120**, 136 [1967].

Da Zink zu den biochemisch essentiellen Spurenelementen zählt, wurde an Zn-Mangelratten geprüft, ob bereits sehr niedere Zn^{2+} -Konzentrationen die RNA-Biosynthese beeinflussen können. 3 Gruppen zu je 4 Zn-Mangelratten erhielten außer einem 20-Min.-[6- ^{14}C]-Orotsäure-Puls, unterschiedliche Zn^{2+} -Injektionen 10 h vor Versuchsende. Zwischen den jeweiligen Gruppen konnte in der isolierten nuclearen Leber-RNA jedoch keinerlei Unterschied der ^{14}C -Einbausraten festgestellt werden. (Tab. 3).

Injiziertes ZnCl_2 [μMol]	$\frac{OD_{280}}{OD_{260}}$	$\frac{cpm}{OD_{260} \cdot \text{ml}}$
0	0,508	3290 ± 420
0,1	0,499	3090 ± 412
1,0	0,488	3180 ± 280

Tab. 3. [6- ^{14}C]-Orotsäure-Inkorporierung in die nucleare RNA der Leber von 70 g schweren Zn-Mangel-Ratten nach vorausgegangener (10 h) Zn-Injektion.

Inwieweit die Proteinbiosyntheserate des Leberzellkernes durch Zn^{2+} beeinflusst werden kann, wurde in einem weiteren in-vivo-Versuch geprüft. Auch hier wurden unterschiedliche Zn^{2+} -Konzentrationen den 4 Gruppen zu je 4 Ratten 10 h vor der Dekapitation i.p. injiziert. 30 Min. vor Versuchsende erfolgte ein [1- ^{14}C]-DL-Leucin-Puls. Die ^{14}C -Einbausraten in das nucleare Protein der Leber sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Injiziertes ZnCl_2 [μMol]	$cpm/\text{mg Protein}$	Stimulierung [%]
0	770 ± 77	—
2	760 ± 78	—
20	1080 ± 183	40 $p < 0,05$
100	690 ± 14	—

Tab. 4. [1- ^{14}C]-DL-Leucin-Einbau in die Leberkerne von Ratten (150 g) nach vorausgegangener Zn^{2+} -Injektion.

Trotz der sehr kleinen Proteinbiosyntheserate des Leberkerns kann eine verstärkte ^{14}C -Einbausrate nach vorausgegangener Injektion von 20 $\mu\text{Mol ZnCl}_2$ festgestellt werden.

Zur näheren Charakterisierung der biochemischen Reaktivität des Zn^{2+} wurde die Wirkung dieses Metallions auf die Aktivität der DNA-abhängigen RNA-Polymerase enzymatisch aktiver Leberzellkerne untersucht. Isolierte Leberzellkerne wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von ZnCl_2 ver-

setzt und die Polymeraseaktivität gemessen. Als radioaktive Vorstufe diente [^3H]-UTP. Abb. 1 zeigt die Kinetik der Polymerisation:

Geringe Zn^{2+} -Konzentrationen zeigen keine Wirkung. Steigt der Gehalt an ZnCl_2 an, so nimmt die

Abb. 1. Kinetik der DNA-abhängigen RNA-Polymerase enzymatisch aktiver Leberzellkerne in Gegenwart unterschiedlicher Zn^{2+} -Konzentrationen. Zusammensetzung des kompletten Inkubationsmediums: 50 mM Tris-Puffer pH 8,5; 5,6 mM Spermidin·3 HCl; 8 mM NaF; 2,5 mM Phosphoenolpyruvat; 1,5 mM MgCl_2 ; 45 μM GTP, CTP und ATP; 0,45 μM [^3H] UTP (1 μCi); Leberkerne (ungefähr 0,6 mg nucleare DNA); 1–2 Einheiten Pyruvatkinase; 10^{-6} bis 10^{-4} M Zn^{2+} . Inkubationsmenge 0,8 ml.

Abb. 2. RNA-Polymerisations-Geschwindigkeit enzymatisch aktiver Leberkerne von 150 g schweren Ratten, denen 10 h zuvor unterschiedliche Zn^{2+} -Mengen (an den Kurven angegeben) injiziert wurden. Inkubationsmedium: s. Abb. 1.

Polymerisationsgeschwindigkeit ab. Die stärkste Hemmung ist hier bei 10^{-4}M ZnCl_2 zu beobachten.

Ein völlig anderes Bild entsteht, wenn 150 g schweren Ratten 10 h vorher unterschiedliche Zn^{2+} -Konzentrationen injiziert werden. Wird die RNA-Polymeraseaktivität der isolierten Kerne zwischen den jeweiligen Gruppen verglichen, so verläuft die RNA-Polymerisation wie folgt (Abb. 2):

Diskussion

Aus den Meßdaten geht hervor, daß Zn^{2+} im Nucleinsäurestoffwechsel zu den biochemisch aktiven Metallionen zu zählen ist. Als optimale Zn^{2+} -Konzentration haben sich in diesen Versuchen $20\text{ }\mu\text{Mol}$ Zn^{2+} pro 150 g Ratten erwiesen. Injektionen dieser Größenordnung bewirken eine beachtliche Stimulierung der RNA-Biosynthese. Offensichtlich scheinen aber 10 h Inkubationszeit notwendig zu sein, da kurzzeitige Zn^{2+} -Injektionen keinen Einfluß auf die RNA-Biosyntheserate haben. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit unseren Beobachtungen über die langsame intrazelluläre Verteilung von radioaktiv markiertem $^{65}\text{Zn}^{2+}$ ¹⁶. Der genaue Wirkungsmechanismus dieser in-vivo-Effekte bedarf jedoch noch der Klärung.

In vitro zugesetztes Zn^{2+} zu enzymatisch aktiven Zellkernen ergab eine Hemmung der RNA-Poly-

meraseaktivität. Mehrere Möglichkeiten stehen hier zur Diskussion. Entweder reagiert das Zn^{2+} mit der Pyruvat-Kinase, der RNA-Polymerase, oder den Nucleotidphosphaten. Auch könnte die Permeabilität der Kernmembran durch Zn^{2+} irreversibel verändert sein, so daß keine Polymerase mehr in das Inkubationsmedium eindringen kann.

Ein völlig verschiedenes Bild der Polymerisations-Geschwindigkeit ergibt sich, wenn Ratten vor der Leberkernisolierung ZnCl_2 injiziert wird. Hier ist die anschließende RNA-Biosynthese in vitro sehr stark angeregt. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten wäre in der komplexchemischen Reaktion des Zn^{2+} mit der nuclearen DNA zu suchen¹⁷⁻¹⁹. Die H-Brückenbindungen zwischen den Basenpaaren würde durch Zn^{2+} -Ionen aufgespalten und dadurch könnte eine partiell einsträngige DNA entstehen, die im Gegensatz zur doppelsträngigen DNA wesentlich höhere „Priming“-Eigenschaften besitzt²⁰. Diese Theorie bedarf jedoch noch der experimentellen Unterstützung. Entsprechende Versuche sind darüber im Gange.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für eine Beihilfe. Fräulein M. ICKELSHEIMER, Herrn G. HOLZBACH und W. BOHNENKAMP sind wir für die ausgezeichnete experimentelle Mitarbeit zu Dank verpflichtet.

¹⁶ E. BISCHOFF, Diplomarbeit, Tübingen 1969.

¹⁷ Y. A. SHIN u. G. L. EICHORN, *Biochemistry* **7**, 1026 [1968].

¹⁸ R. H. JENSEN u. N. DAVIDSON, *Biopolymers* **4**, 17 [1966].

¹⁹ R. PHILLIPS u. G. GEORGE, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **162**, 73 [1968].

²⁰ S. T. JACOB, E. M. SAJDEL u. H. N. MUNRO, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **32**, 831 [1968].