ETH zürich

ETH Library

Charakterisierung der in vitro-Transkription in Zellkernen isoliert aus Concanavalin A stimulierten Lymphozyten

Doctoral Thesis

Author(s):
Wächter, Dieter E.

Publication date:
1979

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000230289

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Diss ETH 6466

CHARAKTERISIERUNG DER IN VITRO TRANSKRIPTION IN ZELLKERNEN ISOLIERT AUS CONCANAVALIN A STIMULIERTEN LYMPHOZYTEN.

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von
Dieter E. Wächter
Dipl. Natw. ETH
geboren am 22. September 1949
von Basel (Kt. Basel-Stadt)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. K.H. Winterhalter, Referent
Prof. Dr. G. Semenza, Korreferent

1979

KURZFASSUNG

T-Lymphozyten differenzieren nach mitogener Stimulierung mit ConcanavalinA zu Lymphoblasten. Dabei vergrössern sich die Lymphozyten, wobei vor allem der Zytoplasmaanteil zunimmt. Die RNA- und Proteinsyntheserate steigt schon kurz nach der Stimulation an. Etwa ein bis zwei Tage nach der mitogenen Aktivierung beginnt die DNA-Replikation, welche durch eine Mitose abgeschlossen wird. Während der Lymphozytendifferenzierung finden beträchtliche Veränderungen in der Genexpression statt. T-Zellfaktoren (Lymphokine) mit bestimmten Funktionen in der Immunantwort werden neu synthetisiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war, ein in vitro System zu entwickeln, in dem die Aenderungen in der Genexpression während der Lymphozytendifferenzierung studiert werden können. Es ist bekannt, dass die Genregulation wenigstens zum Teil auf dem Niveau der Transkription und der Reifung der primären Transkriptionsprodukte stattfindet. Zellkerne eignen sich für das Studium der Transkription sehr gut, da sie das Chromatin in nahezu intakter Form enthalten. Bei den üblichen Methoden der Zellkernisolation besteht die Gefahr, dass Faktoren, welche für die Transkription wichtig sind, aus den Zellkernen ausgewaschen werden. Um dies zu verhindern, wurde eine neue Zellkernisolationsmethode entwickelt. Dabei werden die Zellen auf einen diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten überschichtet. Während der Zentrifugation der Zellen durch die nächst untere Schicht mit detergenzhaltiger, hypertonischer Saccharoselösung werden die Zellen lysiert. Die nackten Zellkerne sedimentieren dann auf Grund ihrer höheren Dichte als einzige in die unterste Schicht mit detergenzfreier hypertonischer Saccharoselösung. Zellkerne, welche auf diese Art und Weise aus 50 Stunden mit ConcanavalinA stimulierten Lymphozyten isoliert worden sind, synthetisieren in einer DNA-abhängigen Reaktion RNA. Optimale in vitro RNA-Synthese wurde in Gegenwart von 100mM NaCl, sowie 4-5mM $MgAc_2$ gefunden. Die Aktivität der drei RNA-Polymerasen wurde durch differentielle Hemmung mit α-Amanitin bestimmt.

Es zeigte sich, dass etwa 50% der in vitro transkribierten RNA RNA-Polymerase II Produkte sind. Etwa 15% sind RNA-Polymerase III Produkte, der Rest RNA-Polymerase I Produkte. Als nächstes wurde die Aktivität der RNA-Polymerasen in Zellkernen gemessen, welche zu verschiedenen Zeitpunkten nach ConcanavalinA Stimulation aus Lymphozyten isoliert worden sind. Es konnte gezeigt werden, dass die RNA-Polymerase I Aktivität in den isolierten Zellkernen unmittelbar nach der ConcanavalinA Stimulation der Lymphozyten ansteigt und nach 55 Stunden ein Maximum erreicht. Die RNA-Polymerase II Aktivität dagegen verändert sich während der ersten 30 Stunden der ConcanavalinA Stimulation nicht, steigt dann aber stark an und erreicht ebenfalls nach 55 Stunden ein Maximum.

Im weiteren konnte ich zeigen, dass durch die RNA-Polymerasen I und II hochmolekulare RNA synthetisiert wird. Die in vitro Syntheseprodukte aus Zellkernen von ruhenden Lymphozyten sind von höherem Molekulargewicht als diejenigen aus Zellkernen von 50 Stunden mit ConcanavalinA stimulierten Lymphozyten. Dies deutet darauf hin, dass in ConcanavalinA stimulierten Lymphozyten die primären Transkriptionsprodukte in vermehrtem Masse in die reifen Produkte abgebaut werden. Es zeigte sich, dass die in vitro synthetisierte RNA nicht polyadenyliert wird und in einem in vitro Translationssystem nicht übersetzt werden kann.

ABSTRACT

Quiescent T-lymphocytes can be induced to proliferate by mitogenic stimulation with ConcanavalinA. During this activation significant morphologic and metabolic changes can be observed. RNA- and protein-synthesis increase shortly after the addition of the mitogen. DNA-replication begins after 24 to 48 hours, culminating in mitosis. It is known, that during lymphocyte differentiation considerable changes in the gene expression occurs. T-cell factors (lymphokines) regulating the immune response are synthesized. At least part of the gene-regulation takes place on the level of transcription and the processing of the primary transcripts. In vitro transcription experiments using isolated nuclei can be used to study transcriptional modulations occuring during lymphocyte differentiation. In order to prevent leakage of RNA-polymerase molecules or its regulatory factors from the nuclei, a new one step method for the isolation of intact nuclei was developped. Cells were lyzed by centrifugation through a 51% w/v sucrose layer containing 0.25% NP-40. The released nuclei were sedimented through a 68.5% w/v sucrose layer. Nuclei isolated by this method are highly active in synthesizing RNA in a DNA-dependent reaction. The activity of the RNA-polymerases I, II and III could be measured. Optimal ionic conditions for maximum RNA-synthetic activity were found.

The RNA-polymerase activities were measured in nuclei isolated at different times after stimulation of the lymphocytes with ConcanavalinA. Sequential activation of RNA-polymerases I and II was observed. RNA-polymerase I activity increased shortly after stimulation, reaching a maximum after 55 hours. RNA-polymerase II activity was low during the first 30 hours, increased afterwards and reached a maximum 55 hours after mitogenic stimulation. High molecular weight RNA was synthesized in vitro as shown by polyacrylamide-gelelectrophoresis of the isolated RNA after in vitro transcription. The in vitro synthesized RNA was not polyadenylated and could not be translated in a reticulocyte lysate cell-free system.