

DIE MODULERING VAN PROTEÏENSINTESE IN DIE
ROTUTERUS DEUR 17 β -ESTRADIOL

deur

PETRUS JACOBUS PRETORIUS

Proefskrif voorgelê ter voldoening aan die
vereistes vir die graad Doctor Scientiae
(Biochemie) aan die Potchefstroomse Univer=
siteit vir Christelike Hoër Onderwys.

PROMOTOR: DR. C.J. REINECKE

Potchefstroom

Januarie 1980

Ps.102:11 en 12.

6801068
Heer, die aarde en hemelboë
is die werk van u vermoë.
Hul is saam, in hul verband,
kunswerk van u wyse hand.
Maar hul almal moet verderwe,
U alleen, U sal nie sterwe;
soos 'nkleed sal hul verslyt,
maar U bly in ewigheid.

Heer, in plaas van droef te klae
sien ons ongemete dae,
wanneer eind'lik kroos en kind
lewensvolheid by U vind.

Vir Wilna en die kleinspan.

INHOUDSOPGAVE

HOOFSTUK 1

Inleiding	1
------------------	---

HOOFSTUK 2

Literatuuroorsig	7
2.1 Inleiding	7
2.2 Die invloed van 17 β -estradiol op DNA-, RNA- en proteïensintese in die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot	10
2.2.1 DNA-sintese.. . . .	10
2.2.2 RNA-sintese	13
2.2.2.1 Inleiding	13
2.2.2.2 Sintese van mRNA.	17
2.2.2.3 Die invloed van 17 β -estradiol op die aard van die uterus-RNA	21
2.2.2.4 Poli-adenilering van uterus-mRNA.	23
2.2.2.5 Metilering van uterus-mRNA... ..	27
2.2.2.6 Sintese van rRNA en tRNA.	28
2.2.3 Proteïensintese... ..	31
2.2.3.1 Inleiding	31
2.2.3.2 Die inkorporering van aminosure in uteruspro- teïene na hormoontoediening.. . . .	31
2.2.3.3 Die akkumulering van die uterusribosome na 17 β -estradioltoediening.. . . .	35
2.2.3.4 Die invloed van 17 β -estradiol op die monosoom: polisoom-verhouding.. . . .	39
2.2.3.4.1 Inleiding	39
2.2.3.4.2 Ultrastrukturele morfologie ten opsigte van ribosome.	39

2.2.3.4.3	Die sedimentasiekarakteristieke van uterus=	
	ribosome	46
2.2.3.5	Die indusering van die sintese van spesifie=	
	ke proteïene deur 17 β -estradiol.	50
2.2.3.5.1	"Induced Protein" (IP)	50
2.2.3.5.2	Ander proteïene.	52
2.3	Terreinafbakening en benaderingswyse	55
2.3.1	Doelstellings	55
2.3.2	Eksperimentele benaderingswyse	56

HOOFSTUK 3

	Die trofiese effek van 17 β -estradiol op die	
	uterus van die geovariotomeerde volwasse rot	59
3.1	Inleiding... ..	61
3.2	Metodes	61
3.2.1	Vorbereiding van die proefdiere	61
3.2.2	Hormoontoediening	62
3.2.3	Massabepaling van die uteri	62
3.2.4	Isolering van rotuterusspierooteïene	63
3.3	Resultate... ..	63
3.4	Samevatting.	67

HOOFSTUK 4

	Die isolering en karakterisering van riboso=	
	me uit die uterus van die geovariotomeerde	
	volwasse rot	69
4.1	Inleiding	71
4.2	Metodes	72
4.2.1	Isolering van uterusribosome van geovarioto=	
	meerde rotte	72
4.2.2	Selvrye sisteem	73
4.2.2.1	Bereiding van ensiemfraksie.	73

4.2.2.2	<i>In vitro</i> proteïensintese	73
4.2.3	Gradiëntanalise van die uterusribosome	74
4.3	Resultate... ..	74
4.3.1	Sedimentasie-eienskappe van ribosome geïsoleer uit die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot.	74
4.3.2	Die verskynsel van dimerisering van monomere	77
4.3.3	<i>In vitro</i> proteïensintese	84
4.4	Samevatting.	86

HOOFSTUK 5

	Die invloed van 17β -estradiol op die sedimentasie-eienskappe en aktiwiteit van uterusribosome van die geovariotomeerde volwasse rot... ..	87
5.1	Inleiding	89
5.2	Metodes	89
5.2.1	Kwantifisering van die effek van <i>in vivo</i> hormoontoediening op die sedimentasie-eienskappe van uterusribosome	89
5.2.2	Bepaling van die aantal aktiewe ribosome in die ribosomale bereidings	90
5.2.3	Translering van rotuterusribosome in oösite van <i>Xenopus laevis</i>	91
5.3	Resultate... ..	91
5.3.1	Invloed van 17β -estradiol op die sedimentasie-eienskappe van rotuterusribosome	91
5.3.2	Tydsafhanklike verandering in die sedimentasieprofile van rotuterusribosome na 'n enkele hormoontoediening	96
5.3.2.1	Vroë veranderinge in die sedimentasieprofile.. ..	96

5.3.2.2	Veranderinge in die sedimentasieprofiële oor langer tye na hormoon-toediening	97
5.3.3	Proteïensintese met rotuterusribosome	106
5.4	Samevatting	116

HOOFSTUK 6

	Invloed van 17β -estradiol op die hoeveel- heid en eienskappe van die polisomale poliA(+)RNA in die uterus van die geovario= tomeerde volwasse rot..	119
6.1	Inleiding..	121
6.2	Metodes	121
6.2.1	Isolering van Polisomale PoliA(+)RNA... ..	121
6.2.1.1	Metode van Aviv & Leder (1972).....	121
6.2.1.2	Metode van Krystosek et al, (1975).	122
6.2	$\{^3\text{H}\}$ Poli(U)-hibridisering	124
6.2.3	<i>In situ</i> merking van poliA(+)RNA	124
6.2.4	Gradiëntanalise van poliA(+)RNA	125
6.3.1	Isolering van polisomale poliA(+)RNA... ..	125
6.3.2	Die invloed van 17β -estradiol op die inhoud van polisomale RNA aan poliA(+)RNA.	128
6.3.3	$\{^3\text{H}\}$ Poli(U)-hibridisering met polisomale poliA(+)RNA	129
6.3.4	Polisomale distribusie van poliA(+)RNA. ...	135
6.3.5	Sedimentasie-eienskappe van polisomale poliA(+)RNA	139
6.4	Samevatting	144

HOOFSTUK 7

	Bespreking.	145
7.1	Inleiding..	147
7.2	Monosome en polisome in die uterus.	147

7.2.1	Ribosome in die geatrofeerde uterus van die geovariotomeerde volwasse rot	149
7.2.2	Dimerisering van uterusribosome..	149
7.2.3	Ribosome in die uterus na toediening van 17 β - estradiol	151
7.2.3.1	Verandering in die monosoom:polisoomverhou= ding	151
7.2.3.2	Tipes ribosome wat vir polisoomvorming benut word	154
7.2.3.3	Polisoomvorming by onvolwasse rotte	156
7.3	Verandering in die <i>in vitro</i> aktiwiteit van die uterusribosome	157
7.4	Die rol van poliA(+)RNA in die modulering van proteïensintese..	159
7.4.1	Akkumulering van veranderinge in die struktu= rele eienskappe van polisomale poliA(+)RNA...	159
7.5	Poli(A)-polimerase... ..	165

HOOFSTUK 8

Opsomming	169
Summary	169
Literatuurverwysings.	179
Bedankings... ..	191
Afkortings... ..	192

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Die meganisme en die regulering van proteïensintese in die eukariotiese sel is tans sekerlik een van die onderwerpe wat die meeste in die brandpunt staan. 'n Belangrike rede hiervoor is veral die modulering van mRNA en die invloed wat dit op proteïensintese het. Dit word beklemtoon deur die volgende aanhalings wat uit 'n oorsigartikel van Revel & Groner (1978) geneem is:

In eukaryotic cells, genetic information flows from nucleus to cytoplasm as RNA transcripts of the DNA. These transcripts, called pre-mRNA, are combined with proteins and undergo processing and modifications to become translatable mRNAs. Processing includes cleavage of large transcripts, capping and methylation of the 5' end, internal methylation, and addition of poly(A) to the 3' end. An exciting recent discovery has been that different segments of pre-mRNA can be spliced and rejoined to form the final nucleotide message that will be translated into proteins. Extensive control of gene expression may occur post-transcriptionally at the level of mRNA maturation.... en it appears that these post-transcriptional modifications control translation both by a positive effect - increasing mRNA affinity for ribosomes, and by a negative effect - preventing breakdown of mRNA.

Modulering van proteïensintese in die eukariotiese sel bestaan in hoofsaak uit die verandering van die hoeveelheid en aktiwiteit van die subsellulêre komponente wat by proteïensintese betrokke is. Hierdie veranderinge kan op een of meer van die vlakke waaruit hierdie komplekse proses bestaan, geskied. Die hoeveelheid van die subsellulêre komponente word hoofsaaklik bepaal deur die transkripsie van spesifieke gene en die ver-

werking van hierdie transkripte tot funksionele sellulêre komponente van die proteïensintese-apparaat, byvoorbeeld mRNA en ribosome. Hierbenewens kan die proteïensintese aktiwiteit verander word deurdat die verskillende fases van die translasieproses as sulks beïnvloed kan word.

Daar is verskillende benaderingswyses waarvolgens die vraagstuk van die meganisme en regulering van proteïensintese bestudeer kan word. Een hiervan is die werking van groei-stimulerende hormone in hul teikenorgane. Hierdie is 'n benaderingswyse met groot potensiaal omdat dié effek van hierdie hormone via die modulering van die molekulêre biologie van die selle van die teikenorgane geskied. Dit laat die moontlikheid om die proses van proteïensintese in 'n rustende en 'n aktief-groeiende orgaan te bestudeer sowel as die verloop van die molekulêre gebeure wat resulteer in die aktief-proteïnsintetiserende orgaan.

In hierdie studie is enkele fasette van die modulering van proteïensintese deur estrogeniese hormone bestudeer. Vir hierdie doel is geovariotomeerde volwasse rotte gebruik waarin die trofiese effek van 17β -estradiol op die uterus getoon is (Hoofstuk 3). Hierdie sisteem is as model gekies omdat hierdie effek van 17β -estradiol via die modulering van die molekulêre biologie van die uterus geskied (Hamilton, 1968). 'n Verdere motivering was weens teenstrydighede en leemtes wat in die literatuur bestaan veral ten opsigte van die effek van dié hormoon op die *in vivo* organisasie van die ribosome. Hierdie studie is daarom veral toegespits op die ribosome as die setel van proteïensintese in die sel. Die organisasie en aktiwiteit van die uterusribosome in die atrofiese uterus is gekarakteriseer (Hoofstuk 4) ten einde die invloed van 17β -estradiol daarop te kon ondersoek (Hoofstuk 5). Ten opsigte

van die moontlike rol van poliA(+)RNA(mRNA) in die modulering van proteïensintese in die uterus, is die effek van hormoon= behandeling op die akkumulering en sekere strukturele eien= skappe van die polisomale poliA(+)RNA bestudeer. Die resul= tate van hierdie ondersoek word in hul onderlinge verband in Hoofstuk 7 bespreek.

HOOFTUK 2

LITERATUURORSIG

2.1 Inleiding

Die titel van hierdie proefskrif, naamlik "Die Modulering van Proteïensintese in die Rotuterus deur 17β -Estradiol" het 'n relatief ruim karakter. Daar sal daarom gepoog word om 'n oorsig te gee van die mees toonaangewende publikasies wat by hierdie onderwerp aansluit. Die doel hiervan is enersyds om tot 'n terreinverkenning te kom en daardeur leemtes en teenstrydighede in die literatuur te identifiseer. Hierna kan dan 'n terreinafbakening gevorm word waarin die konkrete doelstellings van hierdie ondersoek geformuleer word (2.3.1), asook die eksperimentele benaderingswyse gegee word om hierdie doelstellings te bereik (2.3.2).

Die fisiologiese reaksie van die uterus teenoor 'n enkele toediening van 17β -estradiol sluit 'n wye verskeidenheid van gebeure in, waaronder die vrystelling van histamien (Szego, 1965), die imbibisie van water wat bydra tot die vroeë massa-toename van die uterus (Mueller et al, 1972), veranderinge in die aktiwiteit van adenielsiklase en sikliese-AMP vlakke (Szego & Davis, 1967), 'n verhoogde glukosemetabolisme (Smith & Gorski, 1968), veranderinge in ornitiendekarboksilase-aktiwiteit met gevolglike veranderinge in poliamiensintese (Hernandez et al, 1973) en modulering van die sintese van DNA, RNA en proteïene (Hamilton et al, 1971; Katzenellenbogen & Gorski, 1975). Om hierdie reaksies te kan inisiëer, moet die hormoon die selle van die uterus eers binnegaan. In die sitoplasma bind die hormoon aan 'n spesifieke reseptor en beweeg na die kern as 'n geaktiveerde hormoon-reseptorkompleks. In die kern vind 'n spesifieke interaksie met die chromatienmateriaal plaas wat uitloop op die fisiologiese effek van die hormoon (Gorski & Gannon, 1976). Dit mag wees dat sekere van die effekte van die

hormoon langs ander weë getnisiëer word.

Omdat die gebeure rondom die inbeweeg van die hormoon in die sel en die selkern, asook die interaksie daarvan met die chromatiemateriaal buite die eksperimentele terrein van hierdie ondersoek val, word dit nie verder bespreek nie. Onlangse oorsigartikels beskryf hierdie gebeure volledig (Gorski & Gannon, 1976; Buller & O'Malley, 1976; Yamamoto & Alberts, 1976). In die res van die literatuuroorsig word die bespreking verder beperk tot die invloed van 'n enkele dosis 17β -estradiol op die sintese van DNA, RNA en proteïene met meer spesifieke aandag aan proteïnsintese.

2.2 Die invloed van 17β -estradiol op DNA-, RNA- en proteïensintese in die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot

2.2.1 DNA-sintese

Die DNA-inhoud van die uterus van die volwasse rot neem min af na ovariectomie en min veranderinge in die DNA-inhoud vind tydens die estrus siklus plaas. Dit mag dui op 'n lae DNA-omset in die selle van die teikenorgaan (Hamilton, 1968). Die toediening van 'n enkele dosis van $10\mu\text{g}$ 17β -estradiol in die geovariotomeerde volwasse rot het nie 'n baie groot invloed op die akkumulering van DNA in die uterus nie. Dit word deur die gegewens van tabel 2.1 geïllustreer.

Tydens die eerste 12 uur na hormoon toediening neem die DNA-inhoud aanvanklik af waarna dit begin toeneem tot 'n waarde 25% hoër as die kontrolewaarde na 36 uur. In hierdie tydinterval neem die uterus massa meer dramaties en sonder 'n merk-

bare sloerfase toe. Alhoewel die imbibisie van water tydens die vroeë stadiums van die trofiese reaksie die uterusmassa beïnvloed, is dit duidelik uit hierdie gegewens dat DNA-sintese nie 'n belangrike komponent in die vroeë reaksie van die uterus op 17β -estradiol is nie.

Tabel 2.1 Veranderinge in die DNA-inhoud en die uterusmassa na hormoon-toediening*

Tyd na hormoon-toediening (uur)	DNA-inhoud (mg)	Uterusmassa (mg)
0	0,98	68
1	0,85	79
2	0,96	87
4	0,92	102
12	0,97	117
24	1,10	130
36	1,22	135

* Gegewens saamgevat uit Hamilton (1968).

In teenstelling met die situasie by die volwasse rot, is die invloed van 17β -estradiol op DNA-sintese by die onvolwasse rot afhanklik van die ouderdom van die proefdier. In uteri van proefdiere jonger as 15 dae word geen toename in DNA-sintese waargeneem nie, maar die uteri van 20 dae-oue rotte toon wel 'n aansienlike toename. Die maksimum mate van DNA-sintese in die uteri van 20 dae-oue rotte kom 24 uur na 'n enkele toediening van 17β -estradiol voor en neem daarna weer af (Kay et al, 1972). Namate die ouderdom van die rotte verder toeneem, neem die mate van DNA-sintese in hul uteri na hormoon-

toediening af (Kay et al, 1972). Dit sluit aan by bogenoemde bespreking wat daarop mag dui dat die volwasse uterus 'n lae aktiwiteit ten opsigte van DNA-sintese in reaksie op 17β -estradiol vertoon.

Die wyse van hormoon-toediening is eweneens van belang ten opsigte van die stimulering van DNA-sintese. Volgehoue toedienings van 17β -estradiol veroorsaak 'n refraktêre periode wat DNA-sintese betref (Stormshak et al, 1976). Sodanige refraktêre periode word nie waargeneem na 'n enkele toediening van 17β -estradiol nie. Die hormoon word op twee diskrete tye na hormoon-toediening benodig om DNA-sintese te induseer. Aanvanklik (0 tot 3-9 uur) om voorbereiding vir DNA-sintese te inisiëer en dan na 9-15 uur sodat die volledige groeiproses kan plaasvind. Hierdie twee fases word bepaal deur die mate waartoe die hormoon-reseptorkompleks in die kern teruggehou word. 'n Hormoon met 'n lae estrogeniese potensiaal, byvoorbeeld estriol, het net die eerste fase tot gevolg omdat hierdie kompleks nie vir langer tye in die kern teruggehou word nie (Harris & Gorski, 1976 & 1978 a). RNA-sintese word tydens die eerste 12 uur na hormoon-toediening benodig vir 'n verhoging in DNA-polimerase-aktiwiteit (Harris & Gorski, 1978 b). Waarskynlik is RNA-sintese nodig vir die sintese van die mRNA's sodat die DNA-polimerases in hierdie tyd gesintetiseer kan word. Hormoon-toediening het 'n toename in die aktiwiteit van die DNA-polimerases tot gevolg en 'n maksimum word tussen 24 en 30 uur bereik. Die toename in die aktiwiteit van die DNA-polimerases is hoofsaaklik as gevolg van 'n toename in die aktiwiteit van DNA-polimerase- α (Harris & Gorski, 1978 b). Die onvermoë van rotte jonger as 15 dae tot DNA-sintese na hormoon-toediening, is moontlik te wyte aan hul onvermoë tot DNA-polimerase- α aktiwiteit (Walker et al, 1978).

Daar is egter nog heelwat leemtes in die kennis ten opsigte van die invloed van 17β -estradiol op DNA-sintese in die uterus. Voorbeelde hiervan is:

1. Is die geringe verandering in die DNA-inhoud van die uterus na hormoon-toediening betekenisvol vir die trofiese reaksie van die uterus?
2. Wat is die onderliggende redes vir die refraktêre periode na volgehoue hormoon-toediening?
3. Waarom is daar 'n ouderdomsafhanklike afname in die vermoë van die uterus tot DNA-sintese?
4. Waarom vertoon die jong uterus 'n onvermoë tot DNA-sintese?

2.2.2 RNA-sintese

2.2.2.1 Inleiding

In die eukariotiese sel begin die sintese van al die sellulêre RNA's wat nodig is vir proteïnsintese, deur die transkripsie van hoë molekulêre massa voorganger-RNA's. Die sintese van hierdie voorganger-RNA's (primêre transkripte) word teweeggebring deur die RNA-polimerases. Hierdie ensieme het nie net verskillende funksies nie maar ook verskillende sellulêre lokaliteite. Dit word in tabel 2.2 aangetoon.

Die primêre transkripte word na-transkripsioneel verwerk tot hul onderskeie funksionele sellulêre RNA's. Dit vind plaas deur die werking van 'n versameling van ensimatieuse reaksies wat endo- en eksonukleases insluit. Die sellulêre inhoud van

enige tipe RNA word bepaal deur die relatiewe tempo's van transkripsie en verwerking van sy voorganger, asook deur die stabiliteit van die betrokke RNA (Revel & Groner, 1978). Die hoofmomente van hierdie na-transkripsionele gebeure word in figuur 2.1 voorgestel. 'n Breë bespreking van die basiese meganismes wat hierin optree val buite die bestek van hierdie proefskrif. Vir sodanige besprekings word verwys na onlangse oorsigsartikels (Revel & Groner, 1978; Hadjiolov & Nikolaev, 1976; Abelson, 1979).

Tabel 2.2 Subsellulêre lokaliteit en funksie van die verskillende RNA-polimerases¹

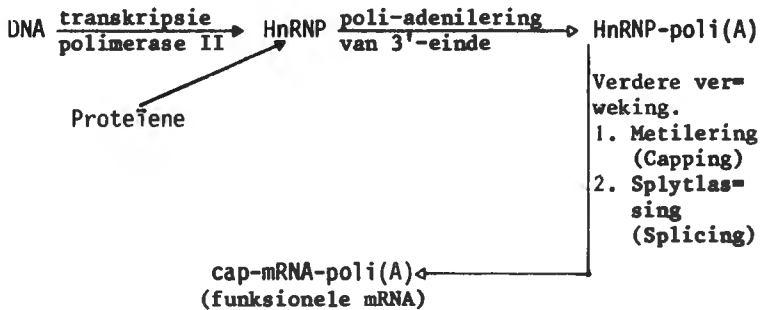
RNA-polimerase	Subsellulêre lokaliteit	Transkripsieproduk ²
I	nukleolus	45Spre-rRNA(rRNA)
II	nukleoplasma	HnRNA(mRNA)
III	nukleoplasma	tRNA,5SRNA

¹ Gegewens saamgevat uit Roeder (1976).

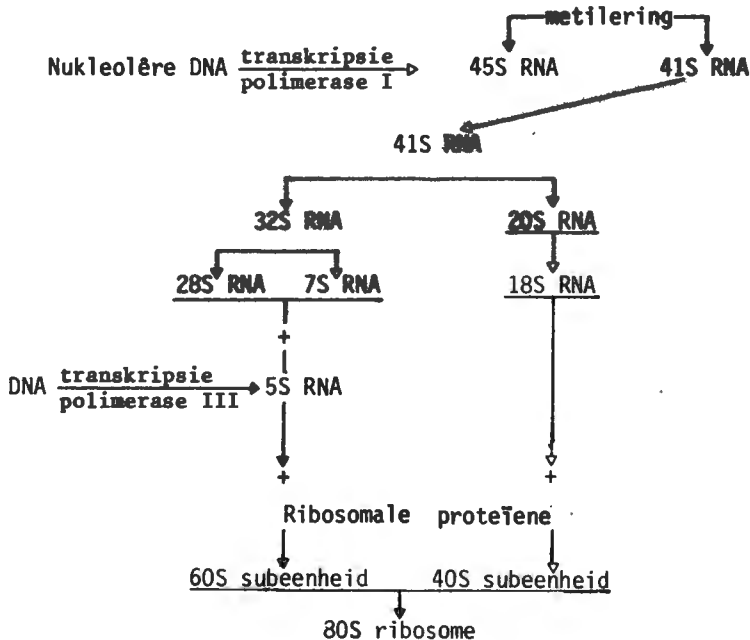
² Produk in hakies is die sellulêre eindproduk van die voorganger.

Die einddoel van hierdie na-transkripsionele verwerking van die onderskeie RNA-voorgangers is om te verseker dat genoegsame hoeveelhede van al die sellulêre RNA's op 'n gegewe tyd in die sitoplasma teenwoordig sal wees sodat proteïensintese optimaal kan plaasvind. Die modulering van die tempo van hierdie verwerkingsweë kan dus 'n belangrike rol speel om die proteïensintesevermoë van 'n sel onder verskillende fisiologiese toestande, te bepaal.

1. Vorming van mRNA



2. Vorming van ribosome



3. Vorming van tRNA



Figuur 2.1 'n Skematiese voorstelling van na-transkripsionele gebuere in die eukariotiese sel.

Die stabiliteit of funksionele leeftyd van 'n mRNA-molekule word bepaal deur sy gevoeligheid vir sellulêre RNase (kyk na die bespreking van die rol van die poli(A)-segment, 2.2.2.4). In hierdie verband kan veranderinge in die aktiwiteit van sellulêre RNase, beide vrye en ribosoomgebonde RNases (Lynch & Klein, 1978; Bransgrove & Cosquer, 1978), 'n belangrike rol speel. Veranderinge in die ewewig tussen die RNases en die RNase-inhibeerder (Kraft & Shortman, 1970) na fisiologiese veranderinge mag eweneens belangrik wees.

'n Kenmerkende effek van die groei stimulerende hormone is die opvallende stimulering van RNA-sintese wat hulle in hul teikenorgane tot gevolg het (Manchester, 1975). Dit is ook een van die vroegste reaksies van die uterus van die onvolwasse en geovariotomeerde volwasse rot na 'n enkele toediening van 17β -estra-diol (Hamilton, 1968; Katzenellenbogen & Gorski, 1975). Die molekulêre gebeure wat onderliggend is aan die trofiese reaksie van die uterus na hormoon-toediening, vereis 'n bepaalde hoeveelheid van elke tipe sellulêre RNA op enige tyd, sodat die trofiese reaksie korrek en volledig kan verloop. Die sellulêre konsentrasies van al die RNA-tipes sal dus op enige tydstip na hormoon-toediening bepaal word deur die ewewig wat bestaan tussen die tempo van sintese en verwerking aan die een kant en hul stabiliteit, aan die anderkant.

In die rotuterus vind die stimulering van RNA-sintese deur 17β -estradiol in twee fases plaas. Die eerste fase word gekenmerk deur die sintese van 'n hoë molekulêre massa RNA wat so vroeg as 30 minute na hormoon-toediening, waarneembaar is. Die vroeë inkorporering (binne 1 uur) van radio-aktiewe nukleotiede in die RNA van HnRNP-partikels wat uit die kerne van onvolwasse rotte berei is (Knowler, 1976) en veral in die

poliA(+)-RNA-fraksie van die HnRNA (Catelli & Baulieu, 1976; Aziz & Knowler, 1978) dui daarop dat een van die vroegste reaksies van die uterus op hormoon-toediening, die sintese van HnRNA(mRNA) is. Hierdie fase word gevolg deur die sintese van rRNA en tRNA wat 1-2 uur na hormoon-toediening 'n aanvang neem. Hierdie reaksie is afhanklik van die RNA-sintese van die eerste fase (Munns & Katzman, 1971 b; Luck & Hamilton, 1972 en 1975; Katzenellenbogen & Gorski, 1975).

In-die verdere bespreking van die invloed van 17β -estradiol op RNA-sintese in die rotuterus, sal agtereenvolgens gelet word op die sintese van mRNA, die grootte van die gesintetiseerde RNA, adenilering en metilering van die uterus-RNA na hormoon-behandeling en laastens, op die sintese van rRNA.

2.2.2.2 Sintese van mRNA

Die afwesigheid van indusering deur 17β -estradiol van die sintese van 'n enkele spesifieke mRNA (Catelli & Baulieu, 1976; Frolik & Gorski, 1977), bemoeilik die bestudering van mRNA-sintese in die uterus aansienlik. Dit is waarskynlik die rede waarom die invloed van 17β -estradiol op mRNA-sintese in die uterus hoofsaaklik uitgevoer is deur die bestudering HnRNA-sintese. Sodanige ondersoek, elk met 'n eie eksperimentele en analitiese benadering, is deur Catelli & Baulieu (1976) en Aziz & Knowler (1978) op onvolwasse rotte uitgevoer. 'n Eenstemmige waarneming is dat sintese van HnRNA die vroegste reaksie ten opsigte van RNA-sintese in die rotuterus, na hormoon-toediening, is.

Aziz & Knowler (1977) het totale HnRNA uit die totale uterus-RNA met behulp van poli-akrielamiedgelelektroforese geïsoleer.

Hieruit is gesien dat die vroegste inkorporering van ^3H -uridien in die totale-HnRNA van die uterus en die poliA(+)RNA-fraksie wat daaruit berei is, so vroeg as 30 minute na hormoon-toediening waargeneem kon word. Op hierdie stadium is die toename in merking van die poliA(+)RNA-fraksie groter as dié van die HnRNA. Na 2 uur is die merking van die HnRNA soveel as 1 000% bo die kontrolewaarde terwyl dié van die poliA(+)RNA-fraksie slegs 600% bo die kontrolewaarde is. Die relatiewe afplatting in die verloop van die merking van poliA(+)RNA-fraksie, kan dui op die verwerking daarvan tot sellulêre mRNA's. Na 'n aanvanklike stadige toename, neem die toename in die merking van die poliA(-)RNA-fraksie in die tydsverloop van 1 tot 2 uur na hormoon-toediening ook toe tot 1 000% bo die kontrolewaardes. Gelelektroforese-analise van hierdie RNA-tipe dui daarop dat dit nie rRNA is nie, maar waarskynlik voorgangers van poliA(-)mRNA's. Die verskil in die verloop van die merking van die poliA(+)- en poliA(-)RNA-fraksies wat uit die HnRNA berei is, mag beteken dat poliA(+)mRNA's vroeër gesintetiseer en verwerk word as die poliA(-)RNA-fraksie. Hierdie vroeë sintese van HnRNA en die verwerking daarvan tot mRNA's, word verder bevestig deur die vroeë inkorporering van RNA-voorgangers in die RNA van HnRNP-partikels wat uit die kerne van rotuteri geëkstraheer is (Knowler, 1976). Die vorming van HnRNP-partikels uit HnRNA is een van die stappe in die verwerkingsweg van HnRNA tot sellulêre mRNA's (figuur 2.1). Dat hormoon-toediening die sintese en verwerking van HnRNA versnel, word bevestig deur die ondersoek van Catelli & Baulieu (1976). (Hulle het die RNA uit die hele uterus deur middel van 'n fenol-ekstrasieprosedure by toenemende temperatuur in drie hoofgroepe geïsoleer, naamlik 'n HnRNA-, 'n intermediêre RNA- en 'n sitoplasmiese RNA-klas. 'n PoliA(+)RNA-fraksie is uit elkeen van hierdie groepe berei). Die toename in die inkorporering van ^3H -uridien in hierdie RNA-

fraksie, 3 uur na 'n enkele hormoontoediening is soos volg:

1. Totale HnRNA, 410%; totale intermediêre RNA, 146%; totale sitoplasmiese RNA, 303%.
2. PoliA(+)-fraksie van die HnRNA, 434%; poliA(+)-fraksie van die intermediêre RNA, 141%; poliA(+)-fraksie van die sitoplasmiese RNA, 300%. Dit beteken dat, binne 3 uur na hormoontoediening, in beide die totale en die poliA(+)-fraksies, die HnRNA en die sitoplasmiese RNA by voorkeur gemerk word.

Hierdie eksperimentele waarnemings dui op 'n hoër tempo van HnRNA-sintese en -verwerking asook 'n hoër tempo van transport van die verwerkingsprodukte (mRNA) na die sitoplasma. Alhoewel hierdie eksperimentele gegewens op 'n verhoogde mRNA-sintese dui, is geen akkumulering van poliA(+)RNA gedurende 'n tydsverloop van 6 uur na hormoontoediening, waargeneem nie (Catelli & Baulieu, 1976). Dit lyk vreemd, enersyds in die lig van die eksperimentele waarnemings van beide Aziz & Knowler (1978) en Catelli & Baulieu (1976), en andersyds dat die mate van proteïen-sintese op hierdie tydstip alreeds aansienlik hoër is as in die kontrolediere (Whelly, et al, 1973).

By 'n evaluering van die sintese en akkumulering van RNA in die uterus, soos deur Catelli en Baulieu (1976) en Aziz & Knowler (1978) uitgevoer is, blyk dat, nieteenstaande ooreenkomste, ook sekere teenstrydighede en beperkings bestaan:

1. Omdat hierdie resultate verkry is deur gebruik te maak van RNA wat uit die uterus as geheel geïsoleer is, kan die herkoms van die HnRNA, byvoorbeeld nukleoplasmies, nukleolêr of sitoplasmies, nie presies gedefiniëer word nie. Isolering van hierdie HnRNA uit kerne sal die definiëring van

die herkoms daarvan heelwat vergemaklik. Gelyktydige monitor van die akkumulering van polisomale poliA(+)RNA na hormoon-toediening, kan heelwat lig werp op die invloed van die verwerking van die HnRNA tot mRNA's.

2. Die fraksioneringsmetode van Catelli & Baulieu (1976) het die tekortkoming dat die RNA-fraksies met RNA's van onge-definiëerde herkoms, gekontamineer mag wees.
3. Dit is baie opmerklik dat aansienlike verskille in die waarnemings van die twee groepe voorkom. Die merking van die totale uterus HnRNA is volgens Catelli & Baulieu, 410% na 3 uur terwyl Aziz & Knowler, 1 000% na 2 uur vind. Vir die poliA(+)-fraksie van hierdie RNA vind Catelli & Baulieu, 434% na 3 uur en Aziz & Knowler ongeveer 600% na 2 uur.

Nieteenstaande hierdie beperkings en verskille is dit opvallend dat daar 'n parallele verloop is tussen die waargenome sintese van HnRNA en die aktiwiteit van RNA-polimerase II ná hormoon-toediening. Die vroegste toename in die aktiwiteit van polimerase II word na 10-15 minute na hormoon-toediening waargeneem (Glasser et al, 1972; Borthwick & Smellie, 1975). 'n Maksimum word na 30 minute bereik en na 1 tot 2 uur neem die aktiwiteit af tot die kontrolewaardes. Na ongeveer 6 tot 8 uur word 'n tweede maksimum bereik wat heelwat hoër is as die eerste. Hierdie verloop in die aktiwiteit van polimerase II word bepaal deur die estrogeniese potensiaal van die hormoon. Die bereiking van die tweede maksimum is noodsaaklik om te verseker dat die trofiese reaksie van die uterus teenoor 17β -estradiol volledig verloop (Hardin et al, 1976). Dit hang saam met die tydperk wat 'n hormoon-reseptorkompleks in die uterus-kerne teruggehou word. Die vroeë sintese van mRNA's tydens die

eerste styging in die aktiwiteit van polimerase II mag nodig wees vir die sintese van proteïene wat noodsaaklik is vir die gevolglike toename in proteïnsintese. Van hierdie proteïene mag nodig wees vir die latere toename in polimerase II asook van polimerase I (2.2.2.6). Hierdie gebeure resulteer dan in die trofiese respons van die uterus na hormoon-toediening.

2.2.2.3 Die invloed van 17 β -estradiol op die aard van die uterus-RNA

Die invloed van 17 β -estradiol op die kenmerke van die tipe RNA wat in die uterus gesintetiseer word, word in tabel 2.3 saamgevat. Ribosomale RNA word nie in die tabel ingesluit nie.

Die belangrikste gegewens wat na vore kom uit die resultate wat in hierdie tabel saamgevat is, is:

1. Daar is 'n variasie ten opsigte van die grootte van die selfde RNA-tipes wat deur die verskillende outeurs waargeneem is. Dit is moontlik toe te skryf aan die verskillende eksperimentele kondisies ten opsigte van elektroforetiese analise en die bereiding van die poliA(+)RNA-fraksies. Behalwe Aziz & Knowler (1978) wat poli(U)-Sephadex vir die bereiding van die poliA(+)-fraksie gebruik het, het al die ander oligo(dT)-sellulose gebruik. Poli(U)-Sephadex het 'n voordeel bo oligo(dT)-sellulose omdat dit meer betroubaar en stabiler is vir algemene laboratoriumgebruik en die mRNA wat daarmee berei word, 'n hoër translasië-aktiwiteit het (Busch, 1976).
2. Geen direkte vergelyking tussen nukleêre en sitoplasmiese RNA-tipes is gedoen nie. Die RNA van die HnRNP-partikels,

Tabel 2.3 Invloed van 17β -estradiol op die aard van die uterus-RNA¹

Tipe RNA	Metode van Karakterisering	Grootte	Effek van 17β -estradiol	Verwysing
HnRNA uit totale RNA berei	3% Page ²	4 - 45S gem. 30S	Slegs 'n toename in merking na 3 uur	Catelli & Baulieu (1976)
Pol(A ⁺)RNA uit totale RNA berei	3% Page	9 - 35S gem. 28S	Slegs 'n toename in merking na 3 en 6 uur	Catelli & Baulieu (1976)
RNA uit nukleêre HnRNP partikels	2,7% Page	4 - 25S gem. 14S	Slegs 'n toename in merking na 2 en 4 uur	Knowler (1976)
Totale uterus RNA	2% Page 0,5% Agarose	4 - 45S gem. 16S	Slegs 'n toename in merking na 30 en 300 minute	Frolík & Gorski (1977) ³
Pol(A ⁺)RNA uit totale RNA berei	4% Page	Heterogene verspreiding. Meer materiaal by hoër molekulêre massa gebied	Slegs 'n toename in merking na 15 en 300 minute	Frolík & Gorski (1977)
HnRNA berei uit totale RNA	2,7% Page	Klein pieke van ongeveer 45S en 32S. Heterogene voorkoms in gebied van lae molekulêre massa gebied	Toename in merking van veral hoër molekulêre massa pieke na 2 uur. Geen nuwe pieke sigbaar nie.	Aziz & Knowler (1978)
Pol(A ⁺)RNA berei uit totale HnRNA. Pol(A)-segmente van 80-160 residue	2,7% Page	Klein pieke van ongeveer 45S en 32S. Ongedefinieerde pieke van 15-25S.	Toename in merking van al die pieke na 2 uur	Aziz & Knowler (1978)

¹ Hierdie gegevens is slegs ten opsigte van onvolwasse rotte.² Poli-akriselamedgelelektroforese.³ Hierdie outeurs het van die dubbele-merkingstegniek gebruik gemaak. Dit is, die kontrole is met ³H-adenosien en die proef met ¹⁴C-adenosien in situ gemerk. Die ¹⁴C/³H-verhouding het geen nuwe pieke aangedui nie.

ondersoek deur Knowler (1976), is waarskynlik 'n verwer=
kingsprodukt van HnRNA. Die grootte daarvan is soortgelyk
aan die RNA wat Frolik & Gorski (1977), waargeneem het.

3. Die belangrikste waarneming wat gemaak is, is dat geen nu=
we mRNA-tipe gesintetiseer word nie. Hormoontoediening het
dus heelwaarskynlik 'n algemene stimulerings van HnRNA(mRNA)-
sintese tot gevolg. Dit sluit goed aan by die opmerking
van Catelli & Baulieu (1976) dat "*...the results obtained
do not support the hypothesis that estradiol stimulates
early and exclusively the expression of a limited portion
of the genome*".

2.2.2.4 Poli-adenilering van uterus-mRNA

Poli-adenilering spesifiek van HnRNA en mRNA is nog nie in die
literatuur vir die uterus beskryf nie. Frolik & Gorski (1977)
het egter die *in situ* inkorporering van ³H-adenosien in die
totale RNA van die uterus van onvolwasse rotte bestudeer. Hier=
die RNA is in 'n poli(A)-ryke en poli(A)-arme fraksie verdeel
waarna 82-89% van die radio-aktiwiteit in die poli(A)-ryke-frak=
sie aangetref is. Hormoontoediening verhoog die inkorporering
van adenosienresidue in die totale uterus-RNA aansienlik. Al=
hoewel adenosienresidue ook intern in die RNA-molekules geïnk=
orporeer kon wees, dui hierdie eksperimentele gegewens, alhoe=
wel indirek, op 'n verhoogde poli-adenilering van die totale
uterus-RNA na hormoontoediening.

In ander eukariotiese sisteme is heelwat gegewens oor poli=
adenilering van HnRNA- en mRNA-molekules beskikbaar. Omdat
die gegewens eweneens vir die uterus van belang mag wees, sal
'n bespreking daarvan gegee word.

'n Poli(A)-segment van 200-250 adenienresidue word na-transkripsioneel aan die 3'-einde van die primêre transkrip (HnRNA) van baie mRNA's in die eukariotiese sel toegevoeg deur die werking van die poli(A)-polimerases (Molloy & Puckett, 1976; Edmonds & Winters, 1976). Na gelang die HnRNA verwerk word en die mRNA na die sitoplasma beweeg, verkort die lengte van die poli(A)-segment (Brawerman, 1976). 'n Spesifieke lengte van die poli(A)-segment word in die sitoplasma gehandhaaf maar, namate die mRNA verouder, neem die lengte daarvan af (Sheiness & Darnell, 1973). Die vraag wat ontstaan is, wat bepaal die lengte van die poli(A)-segment van 'n bepaalde mRNA op 'n gegewe tyd en wat is die betekenis van die poli(A)-segment in die struktuur en funksie van die mRNA-molekule?

In die sel is beide adenilerings- en de-adenilerings-enseme teenwoordig (Jacob & Rose, 1978; Adams & Jeffery, 1978). Die netto gemiddelde lengte van die poli(A)-segmente van 'n mRNA-populasie, op 'n gegewe tyd, word heel waarskynlik bepaal deur die relatiewe aktiwiteite van die adenilerings- en de-adenilerings-enseme in die sitoplasma. 'n Spesifieke poli(A)-bindingsproteïen (Bergman & Brawerman, 1977; Rose et al, 1979) mag 'n belangrike rol in hierdie verband speel. Daarom kan verwag word dat, namate 'n sel groei en verskillende proteïene gesintetiseer word, 'n heterogene populasie van poli(A)-segmente aan die sitoplasmiese mRNA's aangetref sal word. Dit is inderdaad aangetoon dat dit die geval is, byvoorbeeld vir muis globien-mRNA (Gorski et al, 1974), tydens die embrioniese ontwikkeling van slakke (Clark & Kidder, 1977) en die mRNA van α_2 -globulien in die rotlewer (Desphande et al, 1979).

Nieteenstaande die voorkoms van die poli(A)-segment by so 'n groot verskeidenheid eukariotiese mRNA's (Carlin, 1978) en die

baie navorsing wat alreeds gedoen is, is die betekenis van poli-adenilering in die funksionering en struktuur van die mRNA-molekule nog nie opgeklaar nie. Heelwat moontlike funksies is al aan die poli(A)-segment toegeskryf:

1. Beskerming van die HnRNA teen nukleases. Die veronderstelling is dat in hierdie geval die HnRNA's wat geadenileer is, nie in die kern afgebreek word nie maar verder tot funksionele mRNA's verwerk word (Lewin, 1975; Molloy & Puckett, 1976).
2. Die poli(A)-segment mag betrokke by die transport van die mRNA's uit die kern na die sitoplasma wees (Mendecki et al, 1972; Darnell et al, 1971).
3. Die poli(A)-segment mag die mRNA teen nukleolitiese aktiwiteit beskerm (Hieter et al, 1976; Karpetsky et al, 1977).
4. Die poli(A)-segment is waarskynlik noodsaaklik vir die doeltreffende translasing van mRNA (Doel & Carey, 1976). Hierteenoor is daar eksperimentele gegewens wat daarop dui dat die poli(A)-segment geen rol speel in die funksionele aktiwiteit van die mRNA-molekule nie (Cann et al, 1974; Bard et al, 1974; Seghal et al, 1978).
5. Die poli(A)-segment mag dien as 'n bron van ATP tydens proteïensintese (Abraham & Pihl, 1978).
6. Die poli(A)-segment mag 'n rol speel in die polisoom-membraaninteraksie van membraangebonde ribosome (Shore & Tata, 1977).

7. Heywood en sy medewerkers het 'n rol vir die poli(A)-segmente tydens die translasiëproses, voorgestel (Heywood & Kennedy, 1976). In hierdie model tree 'n oligo(U)-ryke RNA-molekule (tcRNA-"translational control RNA") as 'n translasië-inhibeerder op deur met die poli(A)-segment te assosieër.
8. Daar is ook aanduidings dat die poli(A)-segment 'n rol speel in die molekulêre konformasie van mRNA (Brentani et al, 1979).
9. Die mees waarskynlike funksie wat ook deur baie eksperimentele gegewens ondersteun word, is dat die poli(A)-segment 'n rol speel in die funksionele stabiliteit van die mRNA.

Hierdie gevolgtrekking volg uit eksperimentele ondersoeke waar die invloed van die lengte van die poli(A)-segment op die funksionele stabiliteit van mRNA-molekules gedoen is (Marbaix et al, 1975; Nudel et al, 1976; Wilson et al, 1978, Avadhani, 1979; Hruby, 1978). In hierdie ondersoeke is gevind dat die translasië van die mRNA nie afhanklik is van die teenwoordigheid van, of van 'n sekere kritiese lengte van die poli(A)-segment nie. Die poli(A)-segment speel eerder 'n rol in die bepaling van die funksionele leeftyd van die mRNA molekule. Hierdie verband tussen die lengte van die poli(A)-segment en funksionele leeftyd is vir 'n groot aantal mRNA's vergelyk (Carlin, 1978). Hierdeur is nie net die geldigheid van hierdie verband bevestig nie, maar is ook aangetoon dat 'n kritiese lengte van ongeveer 21 adenien residue teenwoordig moet wees voordat die poli(A)-segment enige stabiliserende rol speel. Die wyse waarvolgens die poli(A)-segment so 'n funksie kan vervul, is onbekend en daarvoor kan net gespekuleer word: die poli(A)-segment mag in samewerking met

die geassosieëerde proteïen, of deur middel van die voorgestelde rol daarvan in die konformasie van die mRNA-molekule, die mRNA teen nukleolitiese afbreking beskerm. Hierdie funksie van die poli(A)-segment word heelwaarskynlik vervul deur 'n kombinasie van die funksies wat voorgestel is, waarvan die belangrikste heelwaarskynlik die beskermende rol daarvan teen nukleolitiese afbreking van die mRNA-molekule is.

Veranderinge in die poli-adenilering van HnRNA(mRNA)-molekules mag dus 'n rol speel in die bepaling van of die hoeveelheid mRNA wat in die sitoplasma verskyn, of die leeftyd van die sellulêre mRNA, of beide.

2.2.2.5 Metilering van uterus-mRNA

In die eukariotiese sel kom gemetileerde nukleotiede in baie van die HnRNA's en mRNA's voor as interne gemetileerde adenienresidue en op die 5'-einde van hierdie RNA's as die sogenaamde "CAP"-struktuur (Rottman et al, 1976). In die geval van die rotuterus is dit bekend dat metilering van RNA na hormoonontodiening plaasvind. Metilering van die totale uterus-RNA van die onvolwasse (Munns & Katzman, 1971 a & b) en die geovariotomeerde volwasse rot (Luck & Hamilton, 1975) is vroeg na hormoonontodiening waarneembaar. Dit is hoofsaaklik nuut-gesintetiseerde RNA wat gemetileer word. 'n Toename in die metilering van 'n hoë molekulêre massa RNA-fraksie wat met behulp van differensiële oplosbaarheid in litiumchloried en sinkasetaat berei is, is binne 1 uur na hormoonontodiening waarneembaar. Hierdie fraksie bestaan hoofsaaklik uit nukleêre en rRNA (Schauer & Smith, 1977). Die vroeg gesintetiseerde hoë molekulêre massa RNA wat gemetileer word mag HnRNA(mRNA)-molekules insluit want dit is gedurende hierdie tyd dat HnRNA

gesintetiseer word. Die metilering van RNA wat Munns & Katzman (1971 a & b) en Luck & Hamilton (1975) waargeneem het, blyk hoofsaaklik rRNA- en tRNA-voorgangers te wees (2.2.2.6). Dit beteken dat daar, behalwe moontlik van 'n gedeelte van die hoë molekulêre massa RNA van Schauer & Smith (1977), daar geen aanduidings van die metilering HnRNA en mRNA in die uterus na hormoon-toediening is nie. Geen aanduiding van die metilering van polIA(+)RNA in die rotuterus as gevolg van hormoonbehandeling kom in die beskikbare literatuur voor nie.

Die eksperimentele gegewens ten opsigte van mRNA-sintese in die uterus as reaksie op 17β -estradiol pas in breë trekke in, in die voorgestelde sintese- en verwerkingsweg vir die vorming van mRNA (figuur 2.1). Daar is egter leemtes ten opsigte van bykans elke stap in hierdie vormingsweg.

2.2.2.6 Sintese van rRNA en tRNA

Die ribosome is die setel van proteïensintese in die sel en daarom kan 'n tekort aan ribosome op 'n gegewe tyd 'n snelheidsbepalende stap in die proteïensintesevermoë van die uterus wees. Soos reeds gemeld, vind die vorming van rRNA's ook uit 'n groot primêre transkrip plaas. Dit verloop volgens 'n hoogs geordende uitsnyding van die nie-rRNA's uit die 45S-voorganger. Tydens hierdie verwerkingsproses is metilering van veral die rRNA-gedeeltes in die voorganger van groot belang (Maden, 1976). Die kinetiek van die biogenese van ribosome en regulering daarvan is dus van kardinale belang tydens die trofiese reaksie van die uterus. Omdat die invloed van 17β -estradiol op die sintese van rRNA hand-aan-hand gaan met die akkumulering van ribosome in die sitoplasma, word hier=

28

die bespreking beperk tot die vroeë gebeure ten opsigte van rRNA-sintese na hormoon-toediening. Vir 'n bespreking van die akkumulering van ribosome na hormoon-toediening word verwys na 2.2.3.3.

Volledig gesintetiseerde ribosome verskyn binne 4 uur na 'n enkele hormoon-toediening in die sitoplasma en die hoeveelheid neem tydens die volgende 12 uur weer vinnig toe (Moore & Hamilton, 1964). Dit beteken dat die sintese van die voorgangers en die verwerking daarvan binne 'n redelike kort tyd plaasvind. Hierdie gebeure word eerstens weerspieël in die veranderinge in die aktiwiteit van RNA-polimerase I. Die aktiwiteit daarvan neem geleidelik toe tot 12 uur na hormoon-toediening. Die vroegste styging is na 30-60 minute waargeneem (Glasser et al, 1972; Hardin et al, 1976). Vervolgens vind die verwerking van die rRNA-voorgangers tot rRNA's, ook binne hierdie tydsvloer na 'n enkele hormoon-toediening plaas. Wanneer ^3H -uridien tesame met 17β -estradiol in die geovariotomeerde volwasse rot toegedien word en die totale uterus-RNA op suikro-gradiënte geanaliseer word, word al die radio-aktiwiteit binne 8 uur met die rRNA's en 4S RNA geassosieër (Luck & Hamilton, 1972). Soos vroeër gemeld, speel metilering van die rRNA-fraksies in die voorganger in belangrike rol tydens verwerking van die voorganger. Die mate van metilering van die verskillende rRNA's met vloer van tyd na hormoon-toediening, kan as 'n goeie maatstaf dien vir die bepaling van die tempo van verwerking van die rRNA-voorganger. Wanneer ^{14}C -metielmetionien *in vivo* in die geovariotomeerde rot toegedien word, en die totale uterus-RNA met behulp van suikrogradiënte geanaliseer word, is min metilering van die rRNA's waargeneem. Die meeste RNA wat binne 3 uur na hormoon-toediening gemerk word, is rRNA sowel as tRNA. Metilering van hierdie RNA's is binne 1 uur na hormoon-toediening waar-

waarneembaar, maar is meer uitgesproke na 2 en 3 uur (Luck & Hamilton, 1975). Dieselfde patroon van metilering word waargeneem as hierdie RNA met behulp van poli-akrielamiedgelelektroforese geanaliseer word (Knecht & Luck, 1977). In die geïntrofeerde uterus word die meeste radio-aktiwiteit in rRNA-voorgangers waargeneem. Met verloop van tyd na hormoon-toediening, verskuif die radio-aktiwiteit vanaf die voorgangers na die rRNA's. Binne 4 uur na hormoon-toediening word bykans vier keer meer nuutgesintetiseerde 28S en 18S rRNA's uit die voorgangers gevorm.

Hierdie verloop van metilering na hormoon-toediening van uterus-RNA in die volwasse rot, stem ooreen met waarnemings wat in die uterus van die onvolwasse rot gemaak is. Die mate van metilering van die totale uterus-RNA neem met verloop van tyd na hormoon-toediening toe en gepaardgaande hiermee verskuif die mate van metilering vanaf hoofsaaklik die rRNA-voorgangers na die selulêre rRNA's (Knowler & Smellie, 1971; Munns & Katzman, 1971 a & b). Metilering van die totale uterus-RNA in die onvolwasse uterus begin vroeër as die akkumulering van die totale RNA. Metilering bereik 'n maksimum 12 uur na hormoon-toediening terwyl die akkumulering van totale RNA steeds toeneem (Munns & Katzman, 1971 a). Dit is hoofsaaklik rRNA en tRNA wat gemetileer word (Munns & Katzman, 1971 b). Hierdie parallele metilering (sintese) van rRNA en tRNA na hormoon-toediening word gereflekteer in die parallele verloop van RNA-polimerase I en III (Weill et al, 1977). Dit mag dui op 'n gekoördineerde sintese van rRNA en tRNA na hormoon-toediening. Die aktiwiteit van die tRNA-metieltransferases neem ook vroeg na hormoon-toediening toe (Munns et al, 1975; Baliga & Borek, 1974).

Hierdie waarnemings in beide die onvolwasse en geovariotomeerde volwasse rotuterus dui daarop dat hormoon-toediening nie net die

30

tempo van die sintese van die rRNA-en tRNA-voorgangers versnel nie, maak ook die tempo en doeltreffendheid van hul verwerking tot sellulêre rRNA en tRNA. Die gebeure ten opsigte van rRNA-sintese in die uterus na hormoontoediening pas dus goed in in die skema wat in figuur 2.1 voorgestel is vir rRNA- en tRNA-sintese in die eukariotiese sel.

2.2.3 Proteïensintese

2.2.3.1 Inleiding

In die bespreking van die invloed van 17 β -estradiol op die sintese van proteïene in die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot, sal agtereenvolgens op die volgende gelet word: die inkorporering van aminosure in uterusproteïene van hormoontoediening, die akkumulering van die uterusribosome na hormoontoediening, veranderinge in die ultrastrukturele morfologie met betrekking tot die ribosome, die sedimentasie-eienskappe van die uterusribosome en laastens die sintese van spesifieke proteïene in die uterus in reaksie op hormoontoediening.

2.2.3.2 Die inkorporering van aminosure in uterusproteïene na hormoontoediening

'n Algemene toename in die inkorporering van radio-aktief gemerkte aminosure, wat *in vivo* toegedien is, word in die totale proteïene van die uterus van die geovariotomeerde volwasse en onvolwasse rot binne 2-4 uur na 'n enkele toediening van 17 β -estradiol waargeneem (Noteboom & Gorski, 1963; Hamilton, 1968). 'n Toename in die proteïeninhoud van die uterus vind egter eers na 12-18 uur plaas (Hamilton, 1968; Katzenellenbogen & Gorski, 1975). Die inkorporering van radio-aktief gemerkte aminosure,

wat *in vivo* na 'n enkele hormoon toegedien is, is in verskillende subcellulêre fraksies van die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot bestudeer. Aanvanklik vind 'n afname in die inkorporering plaas wat tot 2 uur duur en daarna vind inkorporering in 'n spesifieke volgorde plaas (Means & Hamilton, 1966). Eers vind inkorporering in die kernproteïene plaas (na 4-8 uur), dan in die sitoplasmiese proteïene (na 8 uur) en vanaf 8-24 uur handhaaf laasgenoemde hul spesifieke aktiwiteit terwyl dié van eersgenoemde afneem. Volgens Hamilton (1968) is hierdie vroeë sintese van kernproteïene moontlik verantwoordelik vir die produksie van proteïene wat betrokke mag wees by die verwerking en transport van die nuutgesintetiseerde RNA uit die kern na die sitoplasma. Die vroeë stimulerings van proteïensintese in die uterus is noodsaaklik vir die uiteindelijke fisiologiese effek van 17β -estradiol want inhibering van hierdie vroeë sintese blokkeer die verdere verloop van die gebeure na hormoontoediening (Teng & Hamilton, 1967 b; Mueller et al, 1972).

Met behulp van selvrye sisteme is aangetoon dat die *in vitro* aktiwiteit van die uterusribosome toeneem na 'n enkele *in vivo* hormoontoediening: die vroegste toename is reeds 15 minute na hormoontoediening in die geval van die geovariotomeerde volwasse rot waargeneem (Whelly et al, 1973; Whelly & Barker, 1974). Die verdere verloop in die *in vitro* aktiwiteit van die selvrye sisteem is bifasies, naamlik 'n maksimum (268% bo die kontrole) wat na 1 uur bereik word, gevolg deur 'n afname tot 4 uur na hormoontoediening (180%). Hierna volg weer 'n geleidelike toename in die aktiwiteit en bereik 'n tweede maksimum (210%, wat laer is as die eerste) na 12-18 uur voordat die aktiwiteit weer afneem. Hierdie verloop van die veranderinge in die aktiwiteit na hormoontoediening volg baie dieselfde patroon as die aktiwiteit van RNA-polimerase II (Glasser et al, 1972) wat verantwoor-

delik is vir mRNA-sintese. In 'n soortgelyke ondersoek is hier= die bifasiese verloop in die aktiwiteit van die selvrye sisteem na hormoon-toediening nie waargeneem nie (Teng & Hamilton, 1967 b). 'n Toename van 30% in die aktiwiteit is 2 uur na hormoon-toediening deur hulle waargeneem. Na 8-12 uur het die waarde gestyg tot 'n maksimum, naamlik 100% bo die kontrolewaarde. Na 72 uur het die aktiwiteit afgeneem tot 'n vlak laer as in die geval van die onbehandelde diere. Selfs 'n tweede toediening van 17 β -estradiol 36 uur na die eerste laat die aktiwiteit van hul selvrye sisteem verder afneem. Teng & Hamilton (1967 b) maak dan die gevolgtrekking dat 'n ewewig bestaan tussen ribosoomvorming en ribosoomaktiwiteit in die latere stadiums na hormoon-toediening (36-72 uur). Hierdie ewewig word volgens hulle in 'n omgekeerde verhouding gehandhaaf, dit wil sê hoe laer die aktiwiteit van die ribosome, hoe meer ribosome word geproduseer.

Die toename in proteïensintese na hormoonbehandeling is duidelik nie 'n gevolg van direkte invloede van die hormoon op die ribosome nie. Byvoeging van 17 β -estradiol tot 'n selvrye sisteem wat uit uteri berei is, het geen effek op die aktiwiteit daarvan nie (Teng & Hamilton, 1967 b), tewens hoë konsentrasies is inhiberend. Die toename in die *in vitro* translasieremoë van selvrye sisteme wat uit rotuteri na hormoon-toediening berei is, moet dan via 'n ander meganisme geskied as deur 'n direkte deelname van die hormoon, met ander woorde dit is 'n sekondêre effek van die hormoon wat hierdie verskynsel tot gevolg het. Dit kan onder andere ook geleë wees op die vlak van die translasijsyklus self. 'n Toename in beide die inisiasie- en die verlengings-tempo is in 'n selvrye sisteem wat uit die uteri van geovariotomiseerde marmotte berei is, na hormoon-toediening waargeneem (Suvatte & Hagerman, 1970). Die tyd na hormoon-toediening wanneer hierdie verandering in inisiasie (na 6 uur) en translokasie

(na 12-18 uur) waargeneem is, is myns insiens te laat in die stimuleringsgebeure om 'n hoogs betekenisvolle bydrae in hierdie verband te lewer. Tog ondersteun die werk van Whelly et al (1973) en Whelly & Barker (1974) bogenoemde resultate tot 'n groot mate. Hulle vind dat, behalwe na 1 uur, die toename in die aantal aktiewe ribosome en die tempo van sintese parallel toeneem en dat die tempo van kettingverlenging, 1 uur na hormoon-toediening, vinniger toeneem as die inisiasie van nuwe polipeptiedkettings. Tewens, inisiasie of re-inisiasie van proteïensintese vind nie op hierdie tydstip plaas nie (Whelly & Barker, 1974). Hierdie outeurs vind dat slegs 15% van die totale ribosome in die onbehandelde uteri aktief by proteïensintese betrokke is en dat hierdie hoeveelheid tot ongeveer 32% toeneem 12 uur na hormoon-toediening. Uit die bespreking van hul resultate wil dit voorkom asof hierdie toename in die aantal aktiewe ribosome op sigself nie genoegsaam is om die toename in die *in vitro* translasieremoë van die ribosome na hormoon-toediening te ondersteun nie.

'n Goeie eksperimentele benaderingswyse waarvolgens die invloed van *in vivo* toediening van 17β -estradiol die translasiëgebeure as sulks beïnvloed, ondersoek kan word, is om van hersaangestelde sisteme gebruik te maak. Dit beteken dat die verskillende komponente van die translasiemasjienerie van die sel geïsoleer word. Dan kan oorkruiseksperimente met behulp van die komponente uit kontrole- en hormoonbehandelde diere uitgevoer word. Op hierdie wyse kan bepaal word op watter vlak van die translasiëproses veranderinge na hormoon-toediening ingetree het. Alhoewel hulle hierdie eksperimentele metode met uterusribosome van die marmot uitgevoer het, toon Shapiro, et al (1975) aan dat ten minste 'n gedeelte van die toename in die sintesekapasiteit van die uterusribosome na *in vivo* hormoon-toediening in die 80S mono-

some geleë is en spesifiek in die 60S subeenheid. Alhoewel hulle dit nie heeltemal oortuigend in hul resultate aantoon nie, vind hulle met behulp van poli-akrielamiedgelelektroforese die teenwoordigheid van 'n addisionele proteïen in die 60S subeenheid. Hierdie resultaat beteken egter nie dat die verhoogde sintesevermoë van die ribosome geheel in hierdie verandering van die proteïensamestelling van die 60S subeenheid geleë is nie.

Die bydrae wat veranderinge in die sitoplasmiese faktore na hormoon-toediening tot die verhoogde translasevermoë van die uterusribosome kan hê, is nog geensins opgeklar nie. Aan die eenkant is aangetoon dat *in vivo* hormoon-toediening geen effek op die aktiwiteit van die postribosomale ensiemfraksie het nie (Teng & Hamilton, 1967 b), maar aan die ander kant is met behulp van oorkruiseksperimente aangetoon dat hierdie ensiemfraksie wel beïnvloed word (Shapiro et al, 1975). In ekstrakte wat uit *in vivo* hormoonbehandelde rotuteri berei is, het die aktiwiteit van die meeste amino-asiel-tRNA-sintetases tot 'n groter mate toegeneem as die algemene toename in proteïensintese (Berg, 1977). Die verhoogde aktiwiteit is reeds 4 minute na hormoon-toediening waargeneem.

2.2.3.3 Die akkumulering van die uterusribosome van 17 β -estradioltoediening

In die voorafgaande bespreking van die invloed van 17 β -estradiol op die inkorporering van aminosure in uterusproteïene, is kortliks melding gemaak dat 'n toename in die inkorporeringsaktiwiteit na hormoon-toediening deels in 'n toename in die hoeveelheid ribosome geleë kan wees (Teng & Hamilton, 1967 b; Whelley & Barker, 1974). Hierdie verband word verder in tabel 2.4 getilustreer waar die akkumulering van isoleerbare ribosome in die

Tabel 2.4 Invloed van hormoontoediening op die akkumulering van
uterusribosome

		Akkumulering van Ribosome		Toename in Aktiwiteit ¹		
Tipe Proefdier	Wise van toediening ¹	Tyd na toediening	% Toename	Tyd na toediening	% Toename	Verwysing
Volwasse 4 das na ovx ²	s.k.	4 uur	45	3+5 uur	41	Greenman & Kenney 1964
Volwasse 3 weke na ovx	i.p.	0-24/36 uur	400 - 500	0-12 uur	100	Teng & Hamilton 1967, b
		36-72 uur	Neem af tot 200-300% bo kontrole	36-72 uur	Neem af tot waardes laer as kontrole	
	2 ^o toediening na 36 uur	36-72 uur	600 - 700	36-72 uur	Neem nog verder af	
Onvolwasse	?	4 uur	22	1 uur	-20	Eilon & Gorski 1971
		12 uur	100	12 uur	263	
Volwasse 3-4 weke na ovx	i.v.	1 4 12	156 180 210	1 4 12	268 180 210	Whelly et al, 1973

¹ s.k. = onderhuids.

i.p. = intraperitoneaal.

i.v. = intraveneus.

² ovx = ovariectomie

³ Gegevens saamgevat uit 2.2.3.2.

sitoplasma van die uterusweefsel na hormoon-toediening saamgevat word:

Uit die tabel kom die volgende na vore:

1. Die eerste toename in die akkumulering van ribosome is so vroeg as 1 uur na hormoon-toediening waargeneem.
2. 'n Aansienlike variasie in die ribosomale opbrengs na hormoon-toediening kan waargeneem word.
3. Uit die resultate van Teng & Hamilton (1967 b) blyk dit dat daar in die uterus nie 'n refraktêre periode ontstaan ten opsigte van ribosoomakkumulering na meerdere hormoon-toediening nie.
4. Geen definitiewe vergelyking kan gemaak word ten opsigte van die reaksie van die uterus en die wyse van hormoon-toediening nie, maar dit blyk asof intraveneuse toediening van die hormoon 'n groter reaksie ten opsigte van ribosoomakkumulering tot gevolg het.
5. Teenstrydighede kom na vore wanneer die toename in ribosoomakkumulering en die aktiwiteit daarvan na hormoon-toediening, vergelyk word. In sommige gevalle is die toename in beide parameters ekwivalent (Greenman & Kenney, 1964; Whelly et al, 1973), maar dit is nie deurgaans die geval nie (Teng & Hamilton, 1967 b).

Die verband tussen akkumulering van ribosome en die toename in hul aktiwiteit na hormoon-toediening is verder deur Teng & Hamilton (1970) uitgewerk deur gebruik te maak van aktinomisien D,

'n inhibeerder van RNA-sintese. Hulle vind dat die stimulerende effek van 17β -estradiol op die akkumulering van ribosome en hul *in vitro* aktiwiteit verskil in hul gevoeligheid vir aktinomisien D. Die toename in die aktiwiteit van die ribosome is meer gevoelig vir aktinomisien D as die akkumulering daarvan na hormoon-toediening. Dit is bekend dat in die uterus lae dosisse van aktinomisien D ($37,5\mu\text{g}/150\text{g}$ liggaamsmassa) rRNA-sintese inhibeer maar dat hoër dosisse totale RNA-sintese inhibeer (Cattelli & Baulieu, 1976). Die dosis van $125\mu\text{g}/180\text{--}200\text{g}$ liggaamsmassa wat Teng & Hamilton (1970) gebruik het, is waarskynlik hoog genoeg om beide rRNA- en mRNA-sintese te inhibeer. Beide mRNA- en rRNA-sintese word dan gehinibeer. Dit kan die ontbinding van bestaande en die voorkoming van die vorming van nuwe polisome tot gevolg hê. Dit kan die gevoeligheid van die toename in die aktiwiteit van die ribosome na hormoon-toediening, verklaar, omdat die hoeveelheid polisome afneem. Die rede vir die toename in die hoeveelheid ribosome na hormoon-toediening in die teenwoordigheid van aktinomisien D, bly onbekend. Dit mag wees dat meer vrye ribosome voorkom as gevolg van die ontbinding van die polisome, maar die feit dat 'n konsentrasie van $750\mu\text{g}$ aktinomisien D/ $180\text{--}200\text{g}$ liggaamsmassa 'n toename in beide hierdie paramaters na hormoon-toediening inhibeer (Teng & Hamilton, 1967 b), ondersteun nie so 'n verklaring nie. Hierdie outeurs het nie die effek van aktinomisien D op die invloed van 17β -estradiol op die sedimentasie-eienskappe van die ribosome gemonitor nie. 'n Ander rede waarom aktinomisien D die *in vitro* aktiwiteit van die ribosome by die laer konsentrasie wat hulle gebruik het, inhibeer, is dat hierdie antibiotikum die inisiasie van translase inhibeer (Singer & Penman, 1972).

Uit hierdie bespreking kan die opsommende gevolgtrekking gemaak word dat beide die hoeveelheid en die aktiwiteit van die

uterusribosome na 'n enkele hormoontoediening toeneem. 'n Analise van die aktiwiteit en konsentrasie van die ribosome is egter onvoldoende om finale konklusies te maak oor die gevolg van 17β -estradiolbehandeling. Daarvoor moet die sedimentasie-eienskappe van die ribosome (polisome) eweneens ondersoek word.

2.2.3.4 Die invloed van 17β -estradiol op die monosoom:polisoom-verhouding

2.2.3.4.1 Inleiding

In 'n oorsigsartikel oor proteïensintese in spierweefsel, maak Beecher (1974) die volgende opmerking: "... *sucrose gradient analysis of cytoplasmic extracts from muscle gives substantial information about muscle protein synthesis....*" Hierdie opmerking is ewe goed van toepassing op die rotuterus, veral omdat hierdie orgaan eksperimenteel onder verskillende fisiologiese toestande gebring kan word. Tog is daar min gegewens in die literatuur beskikbaar oor die invloed van 17β -estradiol op veranderinge in die monosoom:polisoom-verhouding van die uterusribosome van die geovariotomeerde volwasse rot.

In hierdie bespreking sal agtereenvolgens gelet word op ultrastrukturele en biochemiese gegewens ten opsigte van polisoomvorming in hierdie orgaan na hormoontoediening.

2.2.3.4.2 Ultrastrukturele morfologie ten opsigte van ribosome

'n Ondersoek na die morfologiese veranderinge van die ribosome in die epiteelselle van die geovariotomeerde volwasse rot is deur Brökelman (1977) uitgevoer. Hierin is verskillende

eksperimentele kondisies toegepas:

1. Die gevolge van ovariectomie op die ultrastrukturele morfologie.
2. Die invloed van die dosisgrootte van 17β -estradiol.
3. Die wyse van hormoontoediening.
4. Die reaksie op 17β -estradiol by proefdiere op verskillende tydperke (1 tot 6 uur) na ovariectomie. Die resultate van hierdie ondersoek word in tabel 2.5 gegee. Die tabel is saamgestel uit die data van tabel 1 van Brökelman (1977).

Die belangrikste bevindings wat uit hierdie resultate na vore kom, is:

1. In die sitoplasma van die uterus-epiteelselle van die geovariotomeerde volwasse rot word hoofsaaklik monosome waargeneem. Dit geld vir al die tye na ovariectomie maar na langer tye (3-6 weke) word bykans geen polisome waargeneem nie. Namate die tyd na ovariectomie verloop, word die endoplasmiese retikulum ook minder prominent.
2. 'n Baie duidelike resultaat van hierdie ondersoek is dat polisoomvorming in die sitoplasma van die epiteelselle van die geovariotomeerde volwasse rot na 'n enkele toediening van 17β -estradiol plaasvind. Alhoewel die tydstip van aanvang en omvang van polisoomvorming variëer, word dit onder al die eksperimentele kondisies wat toegepas is, waargeneem.
3. Die mate van polisoomvorming na hormoontoediening variëer met die wyse van hormoontoediening: die aanvang van polisoomvorming en die maksimum voorkoms van polisome kom vroeër

Tabel 2.5 Beraamde hoeveelheid monosome en polosome in die sitoplasma van uterusepitelselle op verskillende tye na hormoontoediening (+++ = baie; ++ = matig; + = min; - = baie min).

A. Tyd na hormoon-toediening	1 week na ovx 10 μ gE ₂ i.p.		B. Tyd na hormoon-toediening	3-4 weke na ovx 10 μ gE ₂ s.k.	
	Monosome	Polosome		Monosome	Polosome
0 min.	+++	+	0 uur	++	+
15 min.	++	++	1 uur	+++	
30 min.		+++	6 uur	-	++
45 min.		+++	12 uur		+++
60 min.	+	++	24 uur		+++
360 min.	+	+++	48 uur	+	++
			72 uur	++	+
C. Tyd na hormoon-toediening	3-4 weke na ovx 10 μ gE ₂ i.v.		B. Tyd na hormoon-toediening	3-4 weke na ovx 100 μ gE ₂ i.v.	
	Monosome	Polosome		Monosome	Polosome
0 min.	+++		0 min.	+++	
15 min.	+++	+	15 min.	+++	+-
30 min.	++	++	30 min.	++	+-
45 min.	+	+++	45 min.	+	+++
60 min.	+	++	60 min.	++	++
E. Tyd na hormoon-toediening	6 weke na ovx 10 μ gE ₂ i.v.		F. Tyd na hormoon-toediening	6 weke na ovx 100 μ gE ₂ i.v.	
	Monosome	Polosome		Monosome	Polosome
0 min.	+++		0 min.	++	+
15 min.	+++		20 min.	++	++
30 min.	+++		40 min.	+	++
45 min.	+++	+-	60 min.		+++
60 min.	++	++	120 min.	+	++

Afkortings: 1. ovx = ovariectomie
 2. i.v. = intraveneuse toediening
 3. s.k. = onderhuidse toediening
 4. i.p. = intraperitoneale toediening.

voor indien die hormoon intraveneus toegedien word as wanneer dit onderhuids toegedien word (vergelyk tabelle B & C). Dit geld vir rotte, 3-4 weke na ovariotomie, wat 'n dosis van $10\mu\text{g}$ 17β -estradiol ontvang het. In die geval van intraveneuse toediening (tabel C) word polisoovorming reeds 15 minute na hormoon-toediening waargeneem en bereik 'n maksimum na 45 minute. Hierteenoor neem polisoovorming eers 6 uur na onderhuidse hormoon-toediening (tabel B) toe en word 'n maksimum eers na 12-24 uur bereik. Die verloop van die gebeure wat in tabel B beskryf word, is moontlik te wyte daaraan dat 'n langer tyd verloop voordat die hormoon die uterus bereik en die uterus ook langer aan die hormoon blootgestel word (kyk 2.3).

4. Dieselfde variasie in die aanvang en die mate van polisoovorming geld ook vir die tydperk wat verloop na ovariotomie totdat die hormoon toegedien is: polisoovorming neem heelwat vroeër (na 15 minute) 'n aanvang in die geval van 1 week na ovariotomie (tabel A) as na enige ander tyd na ovariotomie. Maksimum polisoovorming in die geval van 1 week na ovariotomie (tabel A) word reeds 30 minute na hormoon-toediening bereik, terwyl 45 minute verloop in die geval van 3-4 weke (tabel C) na ovariotomie. In die geval van 6 weke na ovariotomie (tabel E) word maksimum polisoovorming nie tydens die tydperk van ondersoek bereik nie. Die resultate van tabel A & C is egter nie heeltemal vergelykbaar nie want die wyse van hormoon-toediening vir hierdie twee eksperimente was nie dieselfde nie. Tog wil dit voorkom asof 'n lang tydperk na ovariotomie, al is daar heelwat monosome teenwoordig (tabel E), die omvang van polisoovorming na hormoon-toediening, aansienlik laat afneem.
5. Die grootte van die dosis beïnvloed ook die aanvang en mate

van polisoovorming (vergelyk tabelle C & D en E & F, onderskeidelik): in die geval van 3-4 weke na ovariectomie word maksimum polisoovorming vir die twee dosisse van $10\mu\text{g}$ (tabel C) en $100\mu\text{g}$ (tabel D) in albei gevalle, 45 minute na hormoontoediening bereik, maar die verloop van polisoovorming vind in die geval van die laer dosis vinniger plaas as vir die groter dosis. In die geval van 6 weke na ovariectomie is die dosis van $100\mu\text{g}$ 17β -estradiol blykbaar genoegsaam om die "weerstandbiedendheid" van die uterus te oorbryg en neem polisoovorming in hierdie geval (tabel F) reeds 20 minute na hormoontoediening 'n aanvang en bereik 'n maksimum na 60 minute. In die geval van die laer dosis (tabel E) begin polisoovorming eers na 45-60 minute. Soortgelyke waarnemings is deur Teng & Hamilton (1970) gemaak ten opsigte van die akkumulering en *in vitro* aktiwiteit van uterusribosome na verskillende dosisse 17β -estradiol: 'n maksimum in albei parameters is met 'n dosis van $10\mu\text{g}$ 17β -estradiol verkry terwyl 'n dosis van $100\mu\text{g}$ 17β -estradiol eerder inhibierend was.

5. Die duur van die reaksie van die uterus ten opsigte van polisoovorming na hormoontoediening varieër ook met die eksperimentele kondisies. Wanneer die hormoon intraperitoneaal 1 week na ovariectomie toegedien word (tabel A), word polisoovorming tot 360 minute volgehou. In die geval van rotte 3-4 weke na ovariectomie, neem polisoovorming vinniger af in die geval van die groter dosis (tabel D), as met die kleiner dosis (tabel C). In hierdie verband is tabelle E & F moeilik vergelykbaar maar wanneer tabelle D & F vergelyk word, lyk dit asof die reaksie in die geval van 6 weke na ovariectomie (tabel F) langer volgehou word as in die geval van 3-4 weke na ovariectomie.

6. In die geval van rotte 1-4 weke na ovariotomie vind polisoovorming sonder 'n wesentlike sloerfase plaas (tabel A & C en tot 'n mate tabel B).

Benewens die invloed van 17β - estradiol op polisoovorming, bespreek Brökelman (1977) ook die resolusie wat die verskillende preparate vertoon, en maak daaruit belangrike gevolgtrekkings. Die kontras van die ribosome in die elektronmikroskoopfoto's verbeter in al die gevalle waar polisoovorming na hormoon-toediening plaasvind. Verder is ook waargeneem dat die gemiddelde deursnit van die ribosome van $200\text{\AA}$, 4 weke na ovariotomie, na hormoon-toediening tot 'n gemiddelde waarde van ongeveer $280\text{\AA}$ toeneem. Volgens Brökelman (1977) dui die hoër kontras en die toename in die deursnit van die ribosome op veranderinge in die tersiêre struktuur van die ribosome. Dit mag saamval met die veranderinge in die aktiwiteit van die ribosome. Die implikasie is dat die bestaande ribosome in die onbehandelde uterus tydens die vroeë stadiums na hormoon-toediening gereaktiveer word en in polisome geïnkorporeer word. Dit sou dan die sintese van nuwe ribosome vir polisoovorming voorafgaan. Hierdie opmerkings van Brökelman (1977) word ondersteun deur die resultate wat in tabel 2.4 saamgevat is. Dit toon aan dat beide die hoeveelheid en die aktiwiteit van die ribosome in die geatrofeerde uterus vroeg na hormoon-toediening toeneem.

Veranderinge in die ultrastrukturele morfologie ten opsigte van ribosome in die uterus van die onvolwasse rot na 'n enkele hormoon-toediening (Friedericki & DeCloux, 1968) stem in hooftrekke ooreen met dié van die geovariotomeerde volwasse rotuterus soos deur Brökelman (1977) beskryf is. In

die onbehandelde uterus van onvolwasse rotte is min ribosome in die sitoplasma sigbaar. Die miofilamente is eweneens min, maar goed ontwikkel. Binne 1 uur na 'n enkele hormoon-toediening is heelwat vrye ribosome alreeds in die sitoplasma sigbaar. Na 2 tot 3 uur begin die ribosome aggregeer* en na 6 uur is heelwat ribosomale aggregate sigbaar. Die miofilamente het ook vermeerder en die gladde en ruwe endoplasmiese retikulum is groter en meer prominent. Na 18-24 uur is die spierselle groter en meer kompak en hul voorkoms is baie dieselfde as dié van die volwasse selle. Beide die endoplasmiese retikulum en die miofilamente is meer prominent. Meer ribosomale aggregate is op die retikulum sigbaar en minder vrye ribosome in die sitoplasma. Die belangrikste gevolgtrekkings wat hieruit gemaak kan word, is:

1. 'n Groot aantal ribosome verskyn tydens die eerste paar uur na hormoon-toediening.
2. Aanvanklik kom die ribosome vry voor maar, met verloop van tyd na hormoon-toediening, aggregeer die ribosome. Die aggregate kom verder al meer op die retikulum voor.
3. 'n Toename in die aantal miofilamente volg op die toename in die aggregering van die ribosome met verloop van tyd na hormoon-toediening. Hierdie outeurs maak die afleiding dat aktien en miosien deur die ribosomale aggregate gesintetiseer word.

* Die term "aggregering" wat deur Friedericki & DeCloux gebruik word, word as polisoomvorming geïnterpreteer.

2.2.3.4.3 Die sedimentasiekarakteristieke van uterusribosome

Wanneer die literatuur oor die sedimentasie-eienskappe van uterusribosome met die elektron-mikroskopiese gegewens vergelyk word, blyk onmiddellik dat sekere teenstrydighede bestaan. Dit het veral betrekking op die omvang van polisoomvorming. Die belangrikste gegewens in die literatuur oor die invloed van *in vivo* toediening van 17 β -estradiol op die sedimentasie-eienskappe van die ribosome van die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot, is te vind in die werk van Teng & Hamilton (1967 a & b). Die sedimentasieprofiele van die uterusribosome berei uit die uteri van volwasse rotte 3 weke na ovariectomie, word gekenmerk deur prominente 78S en 110S pieke met geen oligosome sigbaar nie (Moore & Hamilton, 1964; Teng & Hamilton, 1967 a). Hierdie verspreiding van die ribosome is verkry ten spyte daarvan dat die ribosome tydens hul bereiding deur 'n 2M-sukrosekussing gesentrifugeer is. Hierdie prosedure word algemeen gebruik om die oligo- en polisoomfraksie van 'n ribosomale bereiding te verryk (Noll, 1969). Hierby kan gemeld word dat die gradiënte na sentrifugering nie kontinu gemonitor is nie, maar dat die gradiënte in gelyke fraksies verdeel is. Die absorpsie by 260nm van elke fraksie is bepaal ten einde die sedimentasieprofiele te verkry. Hierdie metode gee nie 'n goeie resolusie van die gradiënte nie en om hierdie rede is dit moontlik dat Teng & Hamilton (1967 a) nie die teenwoordigheid van oligosome in hul ribosomale bereidings kon waarneem nie.

Moore & Hamilton (1964) interpreteer die gegewens egter dat die afwesigheid van oligosome en polisome 'n gevolg van die homogeniseringsprosedure is. Wanneer die elektronmikroskopiese

ondersoek daarinteen in gedagte gehou word, is dit te verwagte dat werklik min oligosome en polisome in sodanige preperate aanwesig sal wees. Die gegewens van Teng & Hamilton (1967 a & b) en Moore & Hamilton (1964) weerspieël dus waarskynlik inderdaad die werklike distribusie *in vivo* en is nie slegs 'n artefak van die eksperimentele prosedure nie. Nadat radio-aktiewe aminosure intraperitoneaal toegedien is (dit wil sê sonder enige toediening van 17β -estradiol) en uterusribosome 10 minute later berei en op sukresegradiënte geanaliseer is, kom die radio-aktiwiteit in 'n aantal pieke in die sedimentasieprofiele voor (Teng & Hamilton, 1967 a). Die radio-aktiwiteit val hoofsaaklik saam met 78S en 110S pieke en ook in die gebied waar swaarder ribosomale materiaal sou voorkom. Behandeling met RNase by 37°C voor gradiëntanalise laat die radio-aktiwiteit vanaf die swaarder gebied na die 78S piek verskuif en die 110S piek verdwyn ook (Teng & Hamilton, 1967 a). Soos in tabel 2.4 aangetoon, is hierdie ribosomale bereidings aktief ten opsigte van die *in vitro* inkorporering van aminosure in polipeptiede en die aktiwiteit van hierdie selvrye sisteme neem toe na *in vivo* hormoon-toediening (Teng & Hamilton, 1967 b).

Na 'n enkele intraperitoneale dosis van $10\mu\text{g}$ 17β -estradiol het Teng & Hamilton (1967 b) ribosome op verskillende tyd na hormoon-toediening uit die uteri van hierdie proefdiere berei, en dit op liniêre sukresegradiënte geanaliseer. In die sedimentasieprofiele van al die verskillende eksperimentele groepe (kontrole, 4, 12 en 24 uur na hormoon-toediening) is die 78S en 110S pieke prominent, maar geen akkumulering van ribosomale materiaal kom in die gebiede waar oligo- en polisome teenwoordig sou wees, voor nie. Teng & Hamilton (1967 b) stel dan baie eksplisiet "... *that an overall change in the size of polymeric*

ribosomes or in the relative abundances of polymeric and monomeric ribosomes did not occur during the period of hormone action examined". Dit is duidelik dat die waargenome toename in proteïensintese ná behandeling van die geovariotomeerde volwasse rot met 17 β -estradiol volgens Teng & Hamilton (1967 b) nie gepaard gaan met polisoomvorming nie. Hulle stel dan die volgende hipotese voor om hierdie gegewens te akkomodeer *"... that estrogenic hormone in its action does not influence the size of polymeric ribosomes by altering the number of ribosomes per molecule of messenger RNA, but influences the number and activity of polymeric ribosomes in the cytoplasm".* Dit is opvallend dat hierdie hipotese selfs as basis gebruik is vir 'n globale indeling van hormone op grond van hul werkingstrye. Dit volg duidelik uit die volgende aanhaling: *"Although many hormones have been demonstrated to increase polyribosomal protein biosynthesis, few have been reported to concomitantly influence the conversion of monosomes into polyribosomes".* (Means et al, 1971). Die invloed van 17 β -estradiol op die rotuterus word hier uitgesluit terwyl die effek van byvoorbeeld insulien op skeletspier en diëtielstilbestrol op die kuikenoviduk, ingesluit word.

Uit die bespreking van die veranderinge in die ultrastrukturele morfologie (2.2.3.4.2), volg dat die elektronmikroskopiese analise nie die hipotese van Teng & Hamilton (1967 b) ondersteun nie. Twee verdere analyses getuig daarvan, naamlik die ondersoeke van die sedimentasie-eienskappe van

1. ribosome tydens die estrussiklus in volwasse rotte en
 2. die invloed van 17 β -estradiol op onvolwasse rotte.
- Kwalitatiewe veranderinge in die sedimentasie-eienskappe van die uterusribosome van die intakte rot tydens die estrussiklus is

waargeneem met 'n maksimum hoeveelheid polisome tydens pro-estrus en estrus (Hernandez et al, 1973). Die veranderinge in die sedimentasie-eienskappe verloop parallel met die hoeveelheid ribosome tydens die estrussiklus en die maksimum polisome tydens pro-estrus word toegeskryf daaraan dat proteïensintese baie aktief tydens hierdie fase plaasvind (Hernandez et al, 1973).

Uit hierdie bespreking is dit duidelik dat die gevolge van 17 β -estradiol op die monosoom:polisoom-verhouding in die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot nog nie ondubbel-sinnig opgelos is nie. Dit beteken dat die hipotese van Teng & Hamilton (1967 b) met betrekking tot die invloed van 17 β -estradiol dus eweneens nie volledig betroubaar is nie.

Polisoomvorming in die uterus van die onvolwasse rot na hormoon-toediening is ook nog nie bo alle twyfel bewys nie. Hormoon-toediening het deurgaans 'n toename in die *in vitro* aktiwiteit van die uteruspolisome tot gevolg (tabel 2.4). Gelyktydig hiermee vind Gasde et al (1971) 'n toename van 23% in die polisoomfraksie van die sedimentasieprofiel 12 uur na hormoon-toediening. Die toename in die aktiwiteit van die ribosome (met 'n faktor van 2.3) oorskry die toename in die monosoom:polisoom-verhouding (dit is met 'n faktor van 1.6). Hierdie kwantitatiewe verskil ten opsigte van die mate van polisoomvorming en die toename in die aktiwiteit van die ribosome, word deur hierdie outeurs nie net aan 'n toename in RNA-sintese of "mRNA activation" toegeskryf nie, maar ook aan die betrokkenheid van addisionele faktore, byvoorbeeld die aktivering van ribosoomgebonde ensieme. Hierteenoor het Eilon & Gorski (1971) geen veranderinge in die sedimentasieprofiel van die ribosome waargeneem nie.

2.2.3.5 Die indusering van die sintese van spesifieke proteïene deur 17 β -estradiol

2.2.3.5.1 "Induced Protein" (IP)

Die sintese van 'n spesifieke proteïen ("induced protein", IP) word vroeg na hormoontoediening in die uterusselle geïnduseer (Notides & Gorski, 1966). IP-sintese is reeds 30 minute na hormoontoediening waarneembaar en bereik 'n maksimum na ongeveer 2 uur. Die sintese daarvan kan beide *in vivo* en *in situ* aangetoon word (Barnea & Gorski, 1970; Katzenellenbogen & Gorski, 1972; Sömjen et al, 1974). Die indusering van IP-sintese is afhanklik van die *de novo* sintese van RNA en proteïene (Katzenellenbogen & Gorski, 1972) en verder kom die maksimum sintese daarvan op 'n vroeër tydstip voor as die aanvang van algemene proteïensintese (Hamilton, 1968). Op grond van hierdie gegewens is die hipotese gestel dat IP 'n sleutel intermediêre proteïen is in die stimulering van algemene RNA- en proteïensintese na hormoontoediening (Baulieu, 1975; Pennequin et al, 1975). Die feit dat IP nog nie in die kern van die uterusselle aangetoon is nie (Pennequin et al, 1975) en ook omdat nog geen defenitiewe funksie daaraan gekoppel kon word nie (Galand et al, 1978), maak so 'n rol vir IP moeilik aanvaarbaar.

Ander redes waarom IP tans nie meer so geredelik as 'n sleutel intermediêre proteïen beskou kan word nie, is:

1. Die sintese daarvan is ook in ander organe byvoorbeeld die brein (wat nie 'n teikenorgaan vir 17 β -estradiol is nie) aangetoon (Walker et al, 1977).

2. Alhoewel met behulp van aktinomisien D aangetoon is dat vroeë RNA-sintese noodsaaklik is vir IP-sintese (Katzenellenbogen & Gorski, 1972), moet die interpretering van hierdie gegewens versigtig gehanteer word. Dit is so aangesien aktinomisien D ook die inisiasie van translase beïnvloed (Singer & Penman, 1972) en so die sintese van 'n proteïen kan beïnvloed. Spesifieke mRNA-sintese is dus nie noodwendig betrokke by die indusering van IP-sintese nie.
3. Verder is die teenwoordigheid van IP in beide kontrole- en hormoonbehandelde rotuteri aangetoon (Walker et al, 1976).
4. Laastens is die induksie van IP-sintese op sigself nie 'n waarborg dat die uterotrofe effek van 'n estrogeniese hormoon tot volle uiting sal kom nie. Dit is so omdat IP-sintese ook deur byvoorbeeld estriol, wat 'n swak estrogeniese hormoon is, geïnduseer word (Katzenellenbogen & Gorski, 1972). 'n Vroeë sleutelrol vir IP in die latere uterotrofe reaksies in die uterus is dus heel onwaarskynlik en kan 'n ander funksie hê wat nie beperk is tot die hormoonbehandelde toestand nie.

In reaksie op die onwaarskynlikheid dat IP 'n sleutel intermediêre proteïen in die werking van 17β -estradiol is, is meerdere ander funksies vir IP voorgestel:

1. 'n IP-geassosiëerde fosfoproteïenfosfatase-aktiwiteit (Vokaer et al, 1974). Geen fisiologiese substraat en gevolglike funksies is deur hierdie outeurs vir IP aangetoon nie. Hierdie waarneming kon nie deur ander navorsers bevestig word nie, tewens Kay et al (1975) het aangetoon dat hierdie fosfatase-aktiwiteit volledig van IP geskei kan

word.

2. Die indusering van IP-sintese speel 'n belangrike rol tydens die aanvulling van die hormoonreseptor in die reseptorsiklus tydens hormoonwerking (Galand et al, 1978).
3. 'n Estradiol-geïnduseerde proteïen (IP?) wat tesame met proteïenmateriaal uit rotuteri geïsoleer word en wat in staat is om die indusering van die inkorporering van DNA-voorgangers in die DNA van 3T6 fibroblast kulture te stimuleer, is deur King et al (1977) aangetoon. 'n Rol vir hierdie proteïen (IP?) tydens indusering van DNA-sintese in die uterus na hormoontoediening, is moeilik om te verklaar. Dit is so omdat IP-sintese so vroeg as 2 uur na hormoontoediening 'n maksimum bereik en 'n toename in DNA-sintese eers na 12-24 uur voorkom (2.2.1).
4. Die moontlike betrokkenheid van IP by die akkumulering van cGMP na hormoonbehandeling (Nicoll & Goldberg, 1976).

Dit ten spyte, word die indusering van die sintese van IP tog benut as 'n merker van 'n biologiese reaksie van die rotuterus op hormoonbehandeling (Katzenellenbogen & Greger, 1974; Bhakoo & Katzenellenbogen, 1977).

2.2.3.5.2 Ander proteïene

Estrogeniese hormone het 'n toename in die sintese van beide strukturele en funksionele proteïene in die rotuterus tot gevolg. 'n Toename in die sintese van die spierproteïene is beide biochemies (Csapo, 1950) en met behulp van ultrastrukturele waarnemings aangetoon (Friedericki & DeCloux, 1968).

Die sintese van 'n spesifieke suurproteïen in die kerne van die uterusselle is maksimaal 12 uur na hormoontoediening (Teng &

Hamilton, 1970). Op hierdie tydstip neem die hoeveelheid chromosomale suurproteïene merkbaar toe (Teng & Hamilton, 1968) en dit val saam met die verskyning van nuutgevormde ribosome in die sitoplasma (Hamilton, 1968).

'n Toename in die inkorporering van aminosure in 'n nie-histoon chromosomale proteïen, is binne 15 minute na 17β -estradiol toediening deur Barker (1971) waargeneem. Die opeenvolgende stimulerings van die sintese van nie-chromosomale proteïene deur 17β -estradiol is deur Cohen & Hamilton (1975 a & b) aangetoon. Die molekulêre massa van hierdie proteïene is 96 000, 29 000, 20 700 en 16 400 D en 'n toename in hul sintese is 3, 5, 12 en 24 uur onderskeidelik, na hormoon-toediening, waargeneem. Die sintese van 'n nie-histoon proteïen met 'n molekulêre massa van 70 500 D is binne 1 uur na hormoon-toediening waargeneem en bereik 'n maksimum na 2-3 uur. Cohen & Hamilton bespiegel dat hierdie proteïen identies mag wees aan die 4,5S estrogeenreseptor.

Tesame met die sintese van IP word die sintese van 'n basiese proteïen (16 000D) en twee suurproteïene (25 000 en 42 000 D) in die chromatinmateriaal van die uterus deur 17β -estradiol geïnduseer. Hierdie proteïene is nie histone nie (Kay et al, 1974).

'n Toename in die tempo van histoonsintese in die uterus vind bykans gelyktydig plaas met 'n toename in DNA-sintese na hormoon-toediening (Anderson & Gorski, 1971). Die toename in die sintese van arginien- en lisienryke histoonfraksies neem geleidelik na hormoon-toediening toe en bereik 'n maksimum na 24 uur (Anderson & Gorski, 1971). Barker (1971) vind 'n toename in die sintese van slegs arginienryke histone 12 uur na hormoon-toediening en na 24 uur die sintese van alle histone.

Asetilering van histone is eers 18-24 uur na hormoon-toediening waargeneem (Anderson & Gorski, 1971) maar Libby (1972) vind asetilering van histoonfraksies reeds 5 minute na hormoon-toediening.

Alhoewel die rol van nie een van bogenoemde "geïnduseerde" kernproteïene in die werking van 17β -estradiol in die uterus bekend is nie, is dit te wagte dat hormoon-toediening hul op een of ander wyse sal beïnvloed. Dit is so omdat, enersyds die primêre invloed van 17β -estradiol op die transkripsie vlak geleë is (2.2.2) en andersyds omdat hierdie proteïene 'n integrale deel uitmaak van die chromatienmateriaal en daardeur die transkripsiegebeure kan beïnvloed deur 'n bepaalde rol te speel in die beskikbaarstelling van die DNA-templaot vir transkripsie (O'Malley et al, 1977).

'n Vergelyking van die sinteseprodukte van die *in vitro* sel-vrye sisteem wat deur Whelly & Barker (1974) uit kontrole en hormoonbehandelde (1 uur) uteri berei is, dui op 'n toename in die sintese van proteïene met 'n molekulêre massa van 30 000-80 000 maar geen sintese van 'n spesifieke proteïen nie.

Die indusering van die sintese van ('n) hormoonspesifieke proteïen(e) is in ander estrogeen-responsiewe teikenorgane waargeneem en dit het baie bygedra tot die opheldering van die meganisme van werking van hierdie hormone (O'Malley & Means, 1976; Palmiter, 1975). Behalwe vir die indusering van IP na 17β -estradioltoediening, word die sintese van geen ander proteïen by voorkeur in die rotuterus geïnduseer nie. Hormoon-toediening het dus eerder 'n toename in algemene proteïensintese in die rotuterus tot gevolg. Dit bemoedilik tot 'n groot

mate die bestudering van die sintese en verwerking van mRNA in hierdie orgaan van hormoontoediening.

2.3 Terreinafbakening en benaderingswyse

2.3.1 Doelstellings

Uit die voorafgaande literatuuroorsig is dit duidelik dat die invloed wat 'n enkele toediening van 17 β -estradiol op die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot (en ook die onvolwasse rot) het, in breë trekke opgehelder is. Die toename in die sintese van proteïene vloei voort uit 'n toename in die hoeveelheid en aktiwiteit van die subsellulêre komponente wat daarby betrokke is - dit is die transkripsie en verwerking van die verskillende tipes sellulêre RNA's, die biogenese van ribosome en 'n verhoogde aktiwiteit van die translasiemapparaat. Soos aangetoon bestaan sekere teenstrydighede en leemtes nog op feitlik elke terrein waar die invloed van 17 β -estradiol op die uterus ondersoek is. 'n Ondersoek soos wat met hierdie studie onderneem is, het dan veral ten doel om aanvullende gegewens te verkry om hierdie tekortkominge te help opklaar. Die konkrete doelstellings wat vir hierdie ondersoek geformuleer is, is:

1. Die ontwikkeling van 'n geskikte metode om polosome wat 'n hoë mate van funksionele integriteit besit en 'n ware beeld van hul organisasie *in vivo* vertoon, uit die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot te isoleer.
2. Die bestudering van die indusering van polisoovorming deur 17 β -estradiol in die uterus. Dit is een van die hoofogmerke van hierdie studie omdat daar leemtes en teen-

strydighede in die literatuur oor hierdie verskynsel bestaan. Aan die een kant is ultrastrukturele ondersoeke (Brökelman, 1977) wat die induksie van polisoomvorming in die uterus oteenseglik bewys en aan die anderkant is daar teenstrydige biochemiese eksperimentele waarnemings (Teng & Hamilton, 1967 b; Gasde et al, 1971; Eilon & Gorski, 1971).

3. Die isolering van polisomale poliA(+)RNA en die bestudering van die invloed van 17β -estradiol op die karakteristieke daarvan. Die doel hiervan is om die moontlike rol van mRNA in die modulering van proteïensintese in die uterus deur 17β -estradiol te ondersoek.

2.3.2 Eksperimentele benaderingswyse

Om hierdie doelstellings te bereik is die invloed van 'n enkele dosis 17β -estradiol op die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot bestudeer.

Die rotuterus is om die volgende redes vir hierdie ondersoek gebruik. Eerstens is die groei van die uterus een van die duidelikste waarneembare invloede van die estrogeniese hormone. Hierdie groeiproses vind tewens plaas via die modulering van die molekulêre biologie van die uterus (Hamilton, 1968). Tweedens is hierdie invloed van die estrogeniese hormone op die uterus maklik eksperimenteel bestudeerbaar deur 'n enkele toediening van 17β -estradiol aan die onvolwasse of geovariotomeerde volwasse rot. Derdens is rotte goedkoper en meer geredelik beskikbaar as ander proefdiere wat steroïed-responsiewe organe besit.

In beide die onvolwasse en geovariotomeerde rot word die uterus deur 'n enkele toediening van 17β -estradiol tot 'n aktief-groeiende orgaan gestimuleer (Mueller et al, 1972). In hierdie ondersoek is volwasse diere bo onvolwasse diere gekies omdat volwasse rotte meer geredelik beskikbaar was. Die uterus van die volwasse diere is ook groter en dus makliker hanteerbaar as die van die onvolwasse diere. Dit hou daarom die voordeel in dat meer subsellulêre komponente daaruit geïsoleer kan word. 'n Nadeel van die gebruik van die uterus van die volwasse diere is dat dit 'n stewige orgaan is wat moeilik hormone-niseerbaar is (Moore & Hamilton, 1964).

Alhoewel die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot vorige *in vivo* invloede van estrogeniese hormone ondervind het, is die reaksie daarvan ten opsigte van massa toename, die vroeë aanvang van proteïensintese en die aktiwiteit van RNA polimerase II na hormoontoediening in dieselfde orde as die van die uterus van die onvolwasse rot (Hamilton, 1968; Munns & Katzman, 1971 a; Courvalin et al, 1976).

Omdat die estrogeniese potensiaal van 17β -estradiol, soos dit na vore kom in byvoorbeeld die induksie van IP (kyk 2.2.3.5.1), groter is as die ander estrogeniese hormone, byvoorbeeld diëtielstilbesterol, estriol en estroon (Katzenellenbogen & Gorski, 1972), is 17β -estradiol meer geskik vir die doel van hierdie ondersoek. Tewens, 17β -estradiol is die mees potente, natuurlike, estrogeniese hormoon in die meeste estrogeen-responsiewe sisteme (King, R.J.B. & Thompson, J. 1974, soos bespreek deur Liao (1975)). Hierbenewens is 17β -estradiol die fisiologiese hormoon wat verantwoordelik is vir die groei van die uterus tydens die estrussiklus.

Daar is besluit om die enkele dosis 17β -estradiol intraperitoneaal toe te dien. Dit word dan vinniger geabsorbeer as wanneer dit onderhuids toegedien word en daarom sal die blootstelling van die uterus aan die hormoon in die eersgenoemde geval korter wees. Daarmee word voldoen aan die vereiste om die invloed van 'n enkele puls te ondersoek. Hierdie wyse van hormoon-toediening (intraperitoneaal) word tewens baie algemeen gebruik, byvoorbeeld vir RNA-sintese (Knowler & Smellie, 1971 & 1973), DNA-sintese (Harris & Gorski, 1978 a), proteïensintese (Teng & Hamilton, 1967 a & b) en ultrastrukturele ondersoeke (Brökelman, 1977).

HOOFSTUK 3

DIE TROFIESE EFFEK VAN 17β -ESTRADIOL
OP DIE UTERUS VAN DIE GEOVARIOTOMEER=
DE VOLWASSE ROT

3.1 Inleiding

Die estrogeniese hormone is hoofsaaklik betrokke by die inisiëring en handhawing van uterusgroei by die soogdier tydens die estrussiklus. Dit is om die uterus voor te berei vir die uiteindelijke inplanting van 'n bevrugte eiersel waartydens progesteroon 'n belangrike rol speel. Om die onderliggende molekulêre gebeure wat die basis van hierdie groeiproses vorm te bestudeer, kan hierdie effek eksperimenteel nageboots word deur die toediening van 17β -estradiol aan die onvolwasse of geovariotomeerde volwasse rotwyfie.

In hierdie hoofstuk sal die invloed van 'n enkele toediening van 17β -estradiol op die uterusmassa van die geovariotomeerde volwasse wyfierot aangetoon word. Die doel hiervan is eerstens om 'n beskrywing te gee van die prosedures wat met die proefdier gevolg is. Tweedens is dit nodig om 'n geskikte tydsinterval vanaf die moment van hormoon-toediening tot dat die effek van die hormoon nie meer waarneembaar is nie, vas te stel. Dit is nodig vir gebruik in die verdere ondersoek na die molekulêre gebeure tydens die trofiese respons van die uterus op 17β -estradiolbehandeling.

3.2 Metodes

3.2.1 Voorbereiding van die proefdiere

In hierdie ondersoek is Sprague-Dawley wyfierotte gebruik. Twaalf weke na geboorte, wanneer hul gemiddelde massa 150g was, is hulle geovariotomeer soos beskryf deur Ingle & Griffith (1949), en hierna is hulle vir ten minste twee weke gelaat voor-

dat die invloed van 17 β -estradiol ondersoek is (Csapo, 1950; Teng & Hamilton, 1967, a & b). Die rotte het voortdurend genoeg voedsel (gewone rotpille) en water ontvang en is aan dag-en-nag-lengtes van 12 uur elk, blootgestel.

3.2.2 Hormoontoediening

Die hormoon, 17 β -estradiol (Merck) is in 'n klein volume 96% etanol opgelos en daarna met 'n 0,85% NaCl-oplossing aangevul tot 'n eindkonsentrasie van 150 μ g/ml. Dit beteken dat 'n enkele toediening van 100 μ l 'n hormoontoediening van 10 μ g 17 β -estradiol/100g liggaamsmassa gee. Hierdie dosis is vergelykbaar met die meeste gepubliseerde ondersoeke oor die invloed van 17 β -estradiol, byvoorbeeld deur Teng & Hamilton (1970). Die hormoon is deurgaans intraperitoneaal toegedien.

- Opmerkings:
1. Waar van die term kontrole rotte of kontroles gebruik gemaak word, word verwys na geovario=tomeerde volwasse rotte wat geen hormoonbehandeling ontvang het nie.
 2. Die terme hormoonbehandeling en hormoontoediening word as sinonieme vir dieselfde eksperimentele ingrepe gebruik.

3.2.3 Massabepaling van die uteri

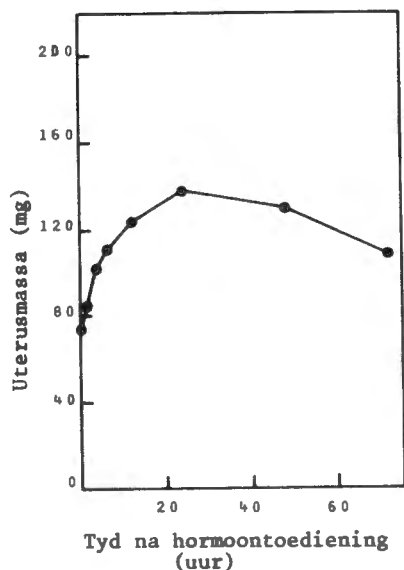
Die rotte is deur middel van 'n harde hou agter die nek en kop gedood en die uteri is so gou as moontlik daarna verwyder en op ys geplaas. Die vetweefsel en die bloedvate wat nog aan die uteri vas was, is in koue by ongeveer 4°C verwyder en die uteri is daarna in 'n voorafgeweegde bekertjie geplaas en geweeg.

3.2.4 Isolering van rotuterusspieroote

Rotuterusspieroote is geïsoleer volgens 'n metode wat gebaseer is op dié van Wachsberger et al, (1974) en Sobieszek et al, (1976). Die uteri (ongeveer 500mg weefsel) is in klein stukkes gesny en met koue gedistilleerde water gewas en met behulp van 'n Ultra-Turrax weefselhomogeniseerder in 5ml homogeniseermidum (40mM imidazool, pH 7,0; 600mM KCl; 2mM MgCl₂; 1mM sisteïen; 1mM EDTA) gehomogeniseer. Die homogenaat is vir 30 minute by 4°C gelaat en daarna vir 10 minute teen 10 000 xg gesentrifugeer. By die supernatant is 10 maal die volume koue gedistilleerde water wat 1mM β -merkaptopetanol bevat, gevoeg en die mengsel is vir 60 minute by 4°C gelaat sodat die spieroote volledig kon presipiteer. Die suspensie is vir 10 minute by 10 000 xg gesentrifugeer en die sediment, dit is die miofibrille, is in .5ml suspenderbuffer gesuspendeer (20mM imidazool, pH 7,0; 60mM KCl; 1mM sisteïen; 1mM MgCl₂). Die sediment is drie keer met hierdie buffer gewas en die eerste was het 1% Triton X-100 bevat. Na die laaste was is die sediment in 1 ml buffer gesuspendeer en die proteïenkonsentrasie is volgens die metode van Lowry et al, (1951) bepaal.

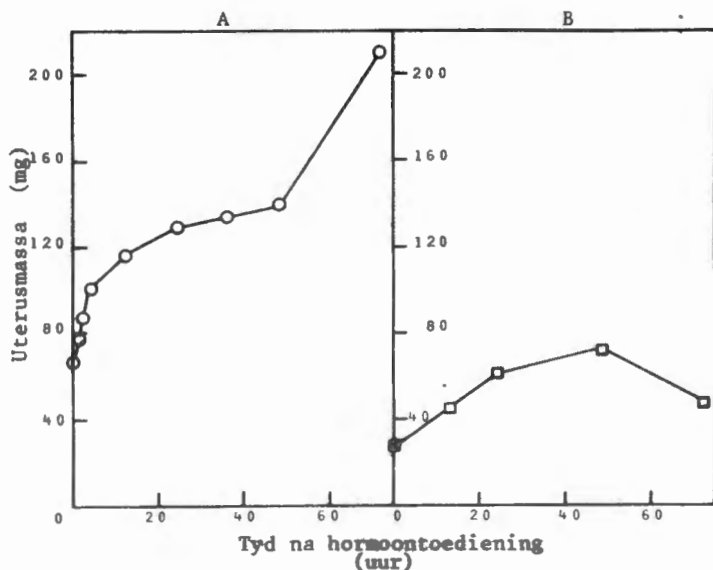
3.3 Resultate

Die effek van 'n enkele toediening van 17 β -estradiol (10 μ g/100g liggaamsgewig) op die natgewig van die uterus van die geovario-tomeerde rot as 'n funksie van die tyd na hormoon-toediening word in figuur 3.1 geïllustreer. Hiervolgens is daar 'n vroeë toename in die natgewig van die uterus wat binne twee uur na hormoon-toediening waargeneem kan word. Die geleidelike toename bereik 'n maksimum na 24 uur waarna 'n meer geleidelike afname volg tot by 72 uur.



Figuur 3.1 Die effek van 'n enkele toediening van 17β -estra=diol op die massa van die uterus van die geovario=tomeerde rot met verloop van tyd na hormoon-toedie=ning. Die rotte het elk $10\mu\text{g}$ 17β estradiol/100g liggaamsmassa intraperitoneaal ontvang. Hierdie resultate verteenwoordig die rekenkundige gemiddeld van die waardes van ten minste 10 afsonderlike eksperimente.

Vergelykenderwys word in figuur 3.2 'n grafiese voorstelling ge=gee wat gebaseer is op getabuleerde resultate wat deur Hamil=ton et al, (1971) vir geovariotomeerde volwasse rotte en deur Munns & Katzman (1971, a) vir onvolwasse rotte gepubliseer is. Die behandeling van die geovariotomeerde volwasse rotte deur Hamilton et al, (1971) was dieselfde as vir die resultate wat in figuur 3.1 beskryf is. Die aanvanklike reaksie, naamlik tot 24 uur na hormoon-toediening (figuur 3.2 A) was dieselfde as wat in figuur 3.1 aangetoon is. Tydens die verdere tydsverloop ver=skil hul resultate egter aansienlik van die van figuur 3.1, in die



Figuur 3.2 'n Grafiese voorstelling van die resultate van Hamilton et al, (1971) en Munns & Katzman (1971, a) ten opsigte van die effek van 'n enkele dosis 17β -estradiol op die uterusmassa van volwasse geovariotomeerde en onvolwasse rotte onderskeidelik.

- A. 'n Toename in die massa van uteri van volwasse geovariotomeerde rotte na 'n enkele dosis $10\mu\text{g } 17\beta\text{-estradiol}/100\text{g liggaamsmassa}$. (Hamilton et al, 1971).
- B. 'n Toename in die massa van uteri van onvolwasse rotte na 'n enkele dosis van $5\mu\text{g } 17\beta\text{-estradiol}/40\text{-}50\text{g liggaamsmassa}$ (Munns & Katzman, 1971, a).

sin dat die massa van die uterus steeds bly toeneem. Volgens Hamilton et al, (1971) is die gevolg van 'n enkele toediening van 17β -estradiol 'n toename in die uterusmassa tot 'n eindwaarde na aan die van die uterus van die volwasse rot in die estrus (gemiddeld 210mg). Hulle gee egter geen verklaring vir die skielike massatoename wat hulle 36 uur na hormoon-toediening waargeneem het nie. Hierteenoor stem die toename in die massa van die

uterus van die onvolwasse rot met verloop van tyd na 'n enkele hormoontoediening (figuur 3.2 B) meer ooreen met die resultate wat in figuur 3.1 gegee is. Daar moet egter op gewys word dat 'n verloop in massatoename by onvolwasse rotte waargeneem is (Billing et al, (1969)) wat sekere ooreenkomste vertoon met dié van Hamilton et al, (1971). Die persentasie toenames val in hierdie geval egter ook binne dieselfde grense as wat in figuur 3.2 B aangetoon word.

Die afname in die massa van die uterus na ovariectomie en die toename daarvan na hormoonbehandeling, kan aan meerdere faktore toegeskryf word (Hoofstuk 2), waarvan verandering in die aktomiosieninhoud van die uterus waarskynlik die belangrikste is (Csapo, 1950). Waar in hierdie ondersoek veral aandag aan veranderinge in proteïensintese gegee word, is daar op 'n verband tussen die toename in die uterusmassa na hormoonbehandeling en die aktomiosieninhoud van die uterus, gelet.

Aktomiosien is op verskillende tye na hormoontoediening getoel (3.2.4) en die resultate word in tabel 3.1 weergegee. In vergelyking met die maksimum toename van 142% in die aktomiosieninhoud na 24 uur is die toename tydens die eerste 12 uur na hormoontoediening relatief min. In die daaropvolgende tydsverloop tot 60 uur neem die aktomiosieninhoud af na 'n waarde van 79% bokant die kontrolewaarde. Die mate van toename in die uterusmassa tydens die eerste 12 uur na hormoontoediening is groter as die toename in die aktomiosieninhoud. Dit kan toegeskryf word aan die inhibisie van water wat binne die eerste paar uur na hormoontoediening volg (Mueller et al, 1972). Nietemin, die akkumulering van aktomiosien volg dieselfde patroon as die toename in die massa van die uterus na hormoontoediening. 'n Soortgelyke verband is deur Munns & Katzman (1971, a) vir die

akkumulering van totale uterusproteïene in die onvolwasse rot=
wyfie na 'n enkele stimulerings, gevind.

Tabel 3.1 Invloed van 17 β -estradiol op die akkumulering van
aktomiosien in die uterus van die geovariotomeerde
volwasse rot

Tyd na hormoon= toediening (uur)	Akkumulering van aktomiosien ⁽¹⁾		Toename in uterusmassa ⁽²⁾	
	mg/g weefsel	% toename	mg/uterus	% toename
0	1,24	-	74	-
12	1,85	49	124	67
24	3,01	142	137	85
60	2,23	79	118	59

(1) Aktomiosien is uit die rotuterus soos in 3.2.4 beskryf is,
geïsoleer.

(2) Gegewens uit figuur 3.1. geneem

3.4 Samevatting

Die trofiese respons van die uterus van die geovariotomeerde
volwasse rot na 'n enkele hormoon-toediening word gekenmerk deur
'n verband tussen die toename in die massa van die uterus en
die akkumulering van die spierproteïene. Uit die verloop van
die trofiese respons van die uterus na hormoon-toediening blyk
dit dat die geskikte tydsverloop om die onderliggende molekulêre
gebeure te bestudeer, in die tydsinterval vanaf hormoon-toedie=
ning tot 72 uur daarna is. Dit blyk daaruit dat die uterusmassa,
wat 'n weerspieëling van die trofiese respons van die uterus is,
in hierdie tydsinterval verby 'n maksimum verloop en daarna na 'n
laagtepunt neig.

HOOFSTUK 4

DIE ISOLERING EN KARAKTERISERING VAN
RIBOSOME UIT DIE UTERUS VAN DIE GEO=
VARIOTOMEERDE VOLWASSE ROT

4.1 Inleiding

Ten einde die gevolge van *in vivo* toediening van 17 β -estradiol op proteïensintese in die uterus van die geovariotomeerde rot te kan bestudeer, is dit noodsaaklik dat die komponente wat daarby betrokke is, op sodanige wyse uit die weefsel geïsoleer moet word dat hierdie effek aangetoon kan word. Dit beteken dat die ribosome wat geïsoleer word, funksioneel aktief moet wees (dit is, hulle moet in 'n selvrye sisteem in staat wees om aminosure in polipeptiede te kan inbou) en dat enige veranderinge in hul sedimentasie-eienskappe duidelik aangetoon moet kan word. Alhoewel daar selvrye sisteme in die literatuur beskryf is waarvolgens die effek van *in vivo* hormoon-toediening *in vitro* gemonitor kan word, gaan hierdie sisteme mank aan gebrekkige teenstrydige inligting ten opsigte van die sedimentasie-eienskappe van hierdie ribosome (Teng & Hamilton, 1967 a & b); Greenman & Kenney, 1964; Whelley & Barker, 1974; Eilon & Gorski, 1971; Gasde et al, 1971). Daar bestaan ook nie 'n algemeen toepasbare metode waarvolgens aktiewe polsosome uit enige spierweefsel geïsoleer kan word nie en daarom is 'n isoleringsmetode toegepas wat saamgestel is uit metodes wat vir soortgelyke doeleindes in ander weefseltipes suksesvol toegepas is.

Om 'n beeld te kry van die organisasie en aktiwiteit van die ribosome in die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot, is eerstens die sedimentasie-eienskappe en tweedens die *in vitro* aktiwiteit daarvan ondersoek.

4.2 Metodes

4.2.1 Isolering van uterusribosome van geovariotomeerde rotte

Volwasse rotte is voorberei soos in 3.2 beskryf. Tensy anders vermeld, is al die werk by 4°C uitgevoer. Na eksperimentering met ander homogeniseringsbuffers (Palmiter et al, 1970; Whelly & Barker, 1974) is die volgende buffer uit die van Suvatte. & Hagerman (1970) en Manchester (1974) saamgestel: 50mM Tris-HCl, pH 7,6; 250mM KCl; 15mM MgCl₂; 5mM EGTA; 0,1mM EDTA; 10mM β-merkaptotoetanol en 250mM sukrose. Die uteri, gewoonlik 10 uteri in 10ml buffer, is in klein stukgies gesny en met 'n Ultra-Turrax homogeniseerder, wat teen halfspoed gedraai het, vir twee periodes van 30 sekondes elk, gehomogeniseer. Die homogenaat is vir 10 minute by 8 000 x g gesentrifugeer, daarna is die supernatant afgegooi en die sediment weer met dieselfde volume homogeniseerbuffer geëkstraheer. Die supernatantfraksies is bymekaar gevoeg en 10% natriumdeoksicholaat is bygevoeg tot 'n eindkonsentrasie van 1%. Die mengsel is vir ten minste 30 minute op ys gelaat voordat dit teen 15 000 x g vir 10 minute gesentrifugeer is. Hierdie supernatant is bo-op 'n 15ml 1,5M sukrosekussing (in homogeniseerbuffer) in rotor 42.1 (Beckman) geplaas en vir ten minste 90 minute teen 185 000 x g gesentrifugeer. Na sentrifugering is die supernatant afgegooi, die buis is met koue (4°C) gedistilleerde water uitgepoel en die wand van die buis is met handdoekpapier drooggegee. Die ribosome is in suspenderbuffer (20mM Tris-HCl, pH 7,6; 80mM KCl; 5mM MgCl₂; 5mM β-merkaptotoetanol) gesuspendeer. Indien dit nie dadelik gebruik is nie, is dit in vloe-

bare stikstof bewaar. Die konsentrasie van die ribosome is spektrofotometries bepaal: $12 A_{260}$ eenhede = 1mg ribosome (van der Walt, 1972).

4.2.2 Selvrye sisteem

4.2.2.1 Bereiding van ensiemfraksie

Die pH5-ensiemfraksie is uit rotlewers berei soos beskryf deur Laga et al, (1970). Rotte is oornag uitgehonger voor= dat die lewers verwyder is. (In die literatuur word rotle= wers hoofsaaklik vir hierdie doel gebruik). Die lewers is dadelik op ys geplaas, die bloedvate en bindweefsel is ver= wyder en die massa is bepaal. Al hierdie prosedures is by 4°C uitgevoer. Die lewerweefsel is in 'n volume suspendeer= buffer (4.2.1) wat vier keer die massa van die lewerweefsel is, gehomogeniseer. Die homogenaat is vir 10 minute teen $14\,000 \times g$ gesentrifugeer en die supernatant vir drie uur teen $105\,000 \times g$ gesentrifugeer. Die middelste twee derdes van die supernatant is met behulp van 'n 10ml spuit uitge= suig en die pH daarvan met behulp van 1M. asynsuur tot tus= sen 5 en 5,2 verlaag. Nadat dit vir 30 minute op ys gelaat is, is dit vir 5 minute teen $5\,000 \times g$ gesentrifugeer. Die sediment is met suspendeerbuffer afgespoel en daarna in 'n volume suspendeerbuffer (een sesde van die oorspronklike mas= sa weefsel) gesuspendeer. Fraksies van 1ml elk is in vloeibare stikstof bewaar.

4.2.2.2 In vitro proteïensintese

Die *in vitro* proteïensintesevermoë van die geïsoleerde uterus= ribosome is vasgestel deur die tempo van inkorporering van

radio-aktief gemerkte aminosure in TCA-onoplosbare materiaal te bepaal. Die reaksiemengsel (100 μ l) is uit die volgende komponente saamgestel: 20mM Tris-HCl, pH 7,6; MgCl₂ en KCl soos in die byskrifte van die figure aangedui; 5mM β -merkaptop-
etanol; 1,8mM ATP; 0,4mM GTP; 5mM kreatiefosfaat; 10 μ g krea-
tiekinese; 10 μ l ¹⁴C-proteïenhidrolisaat (55mCi/m.at.;
Amersham); 80-100 μ g ribosome; 0,12mg pH 5-ensiemfraksie. Na
inkubering vir 'n bepaalde tyd is die reaksie beëindig deur
die byvoeging van 5ml 10% TCA en die radio-aktiwiteit in die
TCA-onoplosbare materiaal is bepaal soos deur van der Walt
(1972) beskryf.

4.2.3 Gradiëntanalise van die uterusribosome

Liniêre (10-30%) sukrosegadiënte, in suspenderbuffer, is
berei volgens die metode van Britten & Roberts (1960). Na
sentrifugering is die gradiënte met behulp van of 'n Uvicord=
sisteem of 'n Acta III spektrofotometer gemonitor. Die sen-
trifugeringskondisies word telkens in die byskrifte van die
figure gegee.

4.3 Resultate

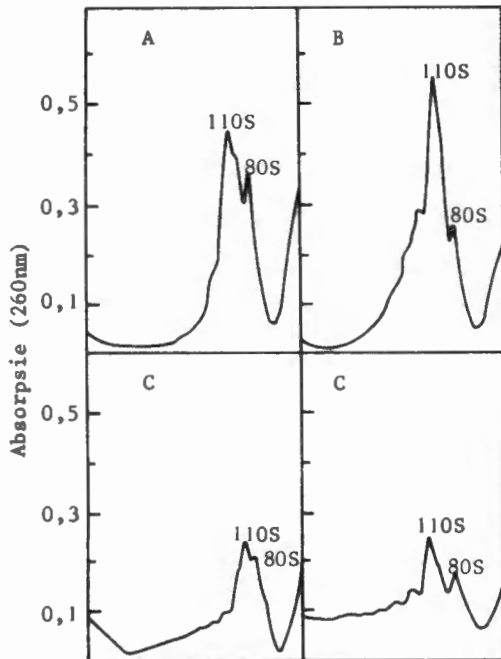
4.3.1 Sedimentasie-eienskappe van ribosome geïsoleer uit die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot

Die invloed van 17 β -estradiol op die uterus is, sover moontlik,
slegs nagegaan op rotte twee weke ná ovariotomie. Die sedi-
mentasie-eienskappe van verskillende bereidings uterusribosome
word in figuur 4.1 geïllustreer. Uit hierdie resultaat kom
die volgende na vore:

- 1) die voorkoms van die ribosomale profiele verskil van bereiding tot bereiding ten opsigte van die hoeveelheid oligosome wat teenwoordig is. In sommige bereidings (figuur 4.1 A) is bykans geen oligosome teenwoordig nie terwyl daar in ander (byvoorbeeld figuur 4.1 C & D) weer heelwat teenwoordig is. 'n Moontlike verklaring vir hierdie verskille is dat in sommige groepe proefdiere enkele rotte kon wees wat langer as twee weke na ovariotomie in die eksperiment betrek is.
- 2) Die eerste duidelike piek vanaf die meniskus is as die monosomale materiaal (80S) geïdentifiseer. Dit is verder duidelik dat die gebied direk nêr die monosome 'n relatief swak resolusie vertoon en deur 'n prominente piek oorheers word. Die grootte van hierdie piek wissel ook van bereiding tot bereiding en val in die sedimentasieprofiele saam op die plek van die disome.

Die beperkte hoeveelheid oligomose wat in die sedimentasieprofiele voorkom (figuur 4.1) mag die gevolg wees van die aktiviteit van sellulêre RNase wat tydens die isoleringsproses die verskuiwing van polisome na oligosome en monosome tot gevolg het. Om dit vas te stel, is die volgende eksperiment uitgevoer: konyn retikulosietribosome (verkry van Mnr. W.J. de Wet van ons laboratorium) is met 'n 185 000 x g supernatant (in homogeniseerbuffer) wat uit uteri van geovariotomeerde rotte berei is, behandel. Geen betekenisvolle verskil in die sedimentasieprofiele van hierdie ribosome en ribosome waarby geen supernatant uit die uterus gevoeg is, is waargeneem nie. Endogene RNases speel dus onder die isoleringskondisies wat toegepas is, geen rol in die bepaling van die voorkoms van die sedimentasieprofiel van die ribosome wat uit geovariotomeerde

rotte geïsoleer is nie. Die voorkoms van die sedimentasie= profiele (figuur 4.1) weerspieël dus die organisasie van die ribosome in die uteruselle in daardie bepaalde fisiologiese toestand waarin die uterus verkeer.

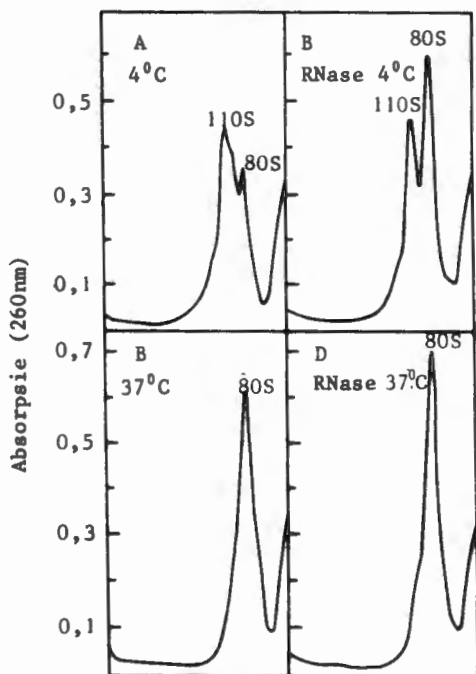


Figuur 4.1 Sedimentasie-eienskappe van verskillende bereidings van uterusribosome. Ribosome is volgens die metode soos beskryf in 4.2.1 uit geovario= tomeerde volwasse rotte geïsoleer en met behulp van 10-30% liniêre sukrosegadiënte geanaliseer. Die ribosome is voortdurend by 4°C gehou. Die sentrifugeringskondisies was 38 000 o.p.m. by 4°C vir 60 minute in Beckman rotor SW 41. Sedimentasie was van regs na links.

Opmerking: Omdat die doel van hierdie ondersoek grotendeels die bestudering van polisoomvorming in die uterus was, is die ribosome tydens bereiding deur 'n sukrosekussing gesentrifugeer om die polisoomfraksie te verryk. Die 60S- en 40S-subeenhede word onder die sentrifugeringskondisies wat toegepas is, nie deur hierdie sukrosekussing gesentrifugeer nie en is daarom nie sigbaar in die sedimentasieprofiele nie.

4.3.2 Die verskynsel van dimerisering van monomere

In 4.3.1 is aangetoon dat die prominente piek in die sedimentasiegebied groter as 80S 'n negatiewe invloed op die resolusie van die polisoomprofiel het. Dit was daarom noodsaaklik om meer gegewens omtrent die materiaal wat vir hierdie piek verantwoordelik is, te bekom. In figuur 4.2 A word aangetoon dat hierdie struktuur soms baie prominent is en enige oligosome wat teenwoordig mag wees, heeltemal oorskadu. Wanneer hierdie ribosome voor gradiëntanalise by 4°C met 5µg RNase behandel word, neem die 80S piek toe (figuur 4.2 B) maar 'n aansienlike hoeveelheid materiaal bly RNase weerstandbiedend. Hieruit volg dus dat laasgenoemde materiaal nie disome (twee 80S ribosome wat deur middel van 'n enkele mRNA geassosieër is) kan wees nie. 'n Alternatief is dat hierdie struktuur 'n dimeer (twee 80S ribosome wat onderling en in die afwesigheid van mRNA assosieër) mag wees. 'n Ondersoek na die sedimentasie-eienskappe van hierdie struktuur het aangetoon dat dit 'n sedimentasiewaarde van ongeveer 110S het wat heeltemal binne die grense van 'n moontlike dimeer val.



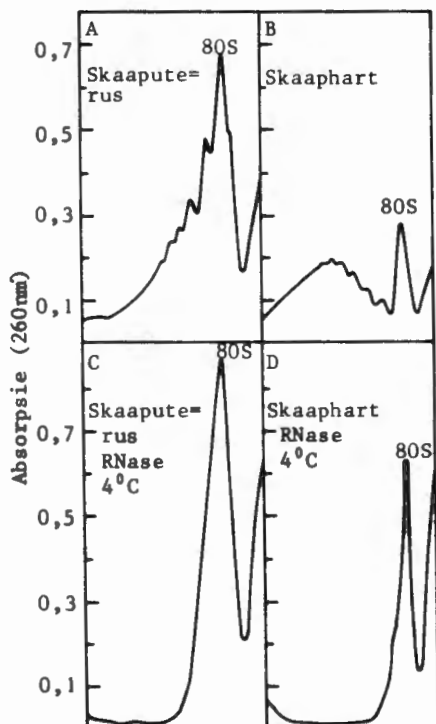
Figuur 4.2 Sedimentasie-eienskappe van ribosome wat uit uteri van geovariotomeerde volwasse rotte geïsoleer is. Die sentrifugeringskondisies was dieselfde as vir figuur 4.1

- A: Ribosome wat voortdurend by 4°C gehou is.
- B: Ribosome wat voor gradiëntanalise by 4°C met 5µg RNase behandel is.
- C: Ribosome wat voor gradiëntanalise by 37°C vir 5 minute geïnkubeer is.
- D: Ribosome wat voor gradiëntanalise by 37°C met 5µg RNase behandel is.

'n Verdere waarneming wat die afleiding dat dimerisering plaasvind, ondersteun, is dat hierdie struktuur meestal net teenwoordig was in die sedimentasieprofiel indien die ribosome

voor gradiëntanalise voortdurend by 4°C gehou is. Inkubering van die ribosome by 37°C voor gradiëntanalise laat hierdie piek verdwyn en dit vind plaas ten gunste van die 80S piek (figuur 4.2 C). RNase-behandeling van die ribosome by 37°C het dieselfde resultaat tot gevolg (figuur 4.2 D). Beide hierdie waarnemings ondersteun dus die afleiding dat die 110S struktuur 'n dimeer en nie 'n disoom is nie.

Die vraag ontstaan nou of die teenwoordigheid van die dimeer, soos aangetoon in die sedimentasieprofiel van figuur 4.1 en 4.2, die gevolg is van die bereidingsmetode en of dit spesifiek vir ribosome uit die uterus van geovariotomeerde rotte is. Om hierdie moontlikhede te ondersoek, is ribosome volgens dieselfde metode (4.2.1) uit die uterus en hartspier van ander proefdiere (skape) berei. Die resultate hiervan word in figuur 4.3 getoon. In die sedimentasieprofiel van ribosome wat uit 'n skaaputerus berei is (figuur 4.3 A), kom minder polisome voor as in die geval van die hartspier (figuur 4.3 B). Hierdie verskil mag eensyds die gevolg wees van die weefselaard (die skaaputerus het drastieser homogenisering vereis as die hartspier) en andersyds die fase van die estrus siklus waarin die skaap verkeer het. Laasgenoemde kondisie was onbekend. Ten spyte van genoemde verskille, is hierdie isoleringsmetode geskik om polisome uit ander weefseltipes te berei. Die voorkoms van die polisoomprofiel van die hartspierribosome is karakteristiek van 'n goeie polisoombereiding uit hartspier (Noll, 1969). Wanneer beide hierdie ribosomale bereidings by 4°C met RNase behandel word, verskuif al die polisome na 80S ribosome en geen RNase weerstandbiedende piek is daarna meer sigbaar nie (figuur 4.3 C & D).

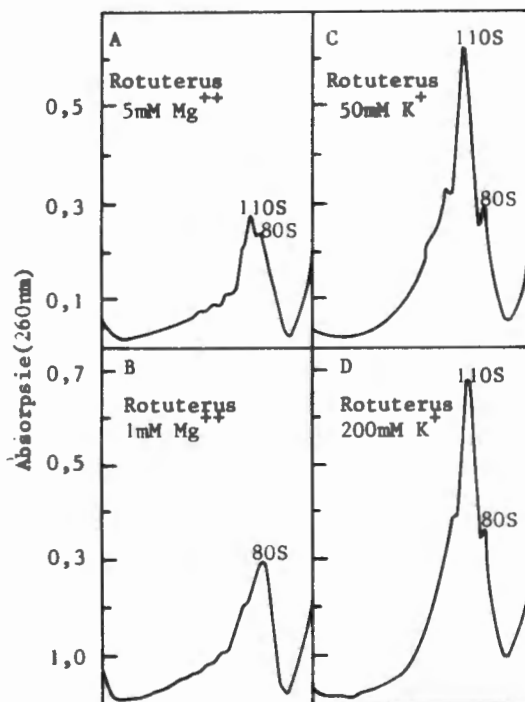


Figuur 4.3 Sedimentasie-eienskappe van ribosome wat uit skaaputerus (A & C) en skaaphart (B & D) geïsoleer is. Die isoleringsmetode was dieselfde as wat in 4.2.1 beskryf is en die sentrifugeringskondisies net soos in figuur 4.2. Die ribosoombereidings is voordurend by 4°C gehou en 5µg RNase is bygevoeg voor sedimentasie-analise in die geval van C en D.

Uit die voorafgaande volg dat die ribosomale dimeer wat in die ribosomale preparate uit die uteri van geovariotomeerde rotte verkry is, waarskynlik spesifiek vir hierdie proefdiere is.

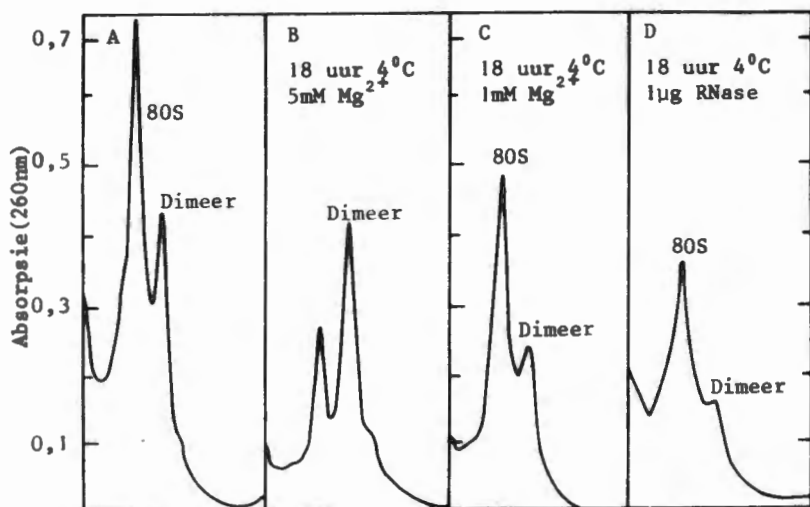
Ten einde meer te wete te kom oor die kondisies vir dimerisering, is rotuterusribosome onder verskillende ioniese kondisies geïsoleer. Uit 'n vergelyking van die sedimentasieprofiel van figuur 4.4, is dit duidelik dat die vorming van die dimeer meer geredelik plaasvind wanneer ribosome in 'n homogeniseringsbuffer wat 5mM Mg^{2+} (figuur 4.4 A) bevat as wanneer dit 1mM Mg^{2+} (figuur 4.4 B) bevat. 'n Toename in die K^+ -inhoud van die homogeniseringsbuffer van 50mM (figuur 4.4 C) tot 200mM (figuur 4.4 D) beïnvloed dimerisering weinig. Hieruit volg dat Mg^{2+} 'n belangrike rol speel in die vorming van die dimeer maar dat K^+ nie 'n merkbare rol speel nie. Verdere ondersteuning vir die rol van Mg^{2+} in die vorming van die dimeer, word deur die resultate van 'n ondersoek na die mate van omkeerbaarheid van dimerisering in verskillende ioniese konsentrasies (figuur 4.5) gegee. In hierdie eksperiment is ribosome van die uterus van die geovariotomeerde rot by 37°C geïnkubeer en daarna in die teenwoordigheid van verskillende magnesiumkonsentrasies vir 18 uur by 4°C gelaat. Hierna is die mate waartoe dimere gevorm het, met behulp van suikrogradiëntanalise bepaal. Die materiaal in figuur 4.5 A verteenwoordig die geïsoleerde ribosome in die teenwoordigheid van 5mM Mg^{2+} by 4°C. Wanneer hierdie materiaal by 37°C geïnkubeer is, waartydens die dimeer ontbind (figuur 4.2 C), en dan in die teenwoordigheid van 5mM Mg^{2+} vir 18 uur by 4°C gelaat is (figuur 4.5 B), was die mate waartoe die dimeer gevorm is aansienlik meer as wanneer dit vir dieselfde tyd in die teenwoordigheid van 1mM Mg^{2+} gelaat was (figuur 4.5 C). Geen of weinig omkeerbaarheid van die dimeer het plaasgevind wanneer die materiaal van figuur 4.5 A, nadat dit by 37°C geïnkubeer is, in die teenwoordigheid van 5mM Mg^{2+} en 1µg RNase vir 18 uur by 4°C gelaat is nie. Aangesien reeds aangetoon is

dat intakte mRNA nie betrokke is by die vorming van die dimeer nie (figuur 4.2), volg dit nou dat intakte rRNA wel noodsaaklik vir die vorming van die dimeer mag wees.



Figuur 4.4 Sedimentasie-eienskappe van rotuturusribosome wat in verskillende ioniese kondisies geïsoleer is. Die ribosoombereidings is voordurend by 4°C gehou en die sentrifugeringskondisies was dieselfde soos in figuur 4.2. Die isoleringskondisies was in die teenwoordigheid van

- A: 5mM Mg^{2+} ;
- B: 1mM Mg^{2+} ;
- C: 50mM K^+ en
- D: 200mM K^+ .



Figuur 4.5 Dimeervorming in die teenwoordigheid van RNase en variërende Mg^{2+} -konsentrasies. Die sentrifugeringskondisies is dieselfde as vir figuur 4.2.A: Ribosomale materiaal geïsoleer uit kontrolediere. Die geïsoleerde materiaal is vir 5 minute by $37^{\circ}C$ geïnkubeer en daarna vir 18 uur by $4^{\circ}C$ in die teenwoordigheid van $5mM Mg^{2+}$ (B), $1mM Mg^{2+}$ (C) en $1\mu g$ RNase (D) gelaat voor sentrifugering.

Uit 'n vergelyking van die resultate van figuur 4.2 en figuur 4.5, is dit duidelik dat die dimeer gevorm word deur die aggregering van 80S monomere: In figuur 4.2 neem die 80S piek toe wanneer die dimeer tydens inkubering by $37^{\circ}C$ ontbind en in figuur 4.5 neem die 80S piek af ten gunste van die dimeer onder die kondisies waarby dimerisering plaasvind. Hieruit kan 'n algemene gevolgtrekking gemaak word dat dimerisering 'n *in vitro* gebeure is, en nie noodwendig 'n karakteristiek van die uterusribosome onder *in vivo* kondisies weerspieël nie. 'n Verdere

motivering vir hierdie gevolgtrekking word in Hoofstuk 7 gegee.

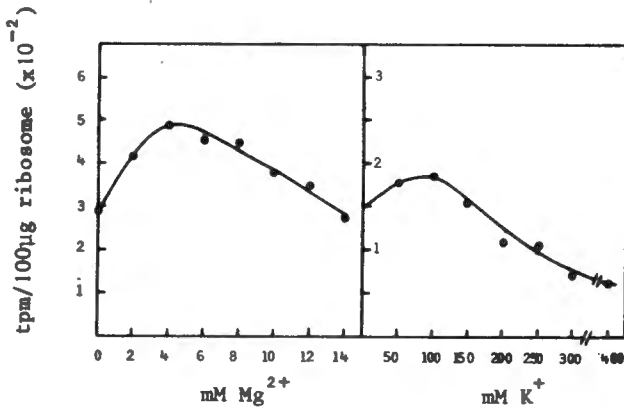
4.3.3 In vitro proteïensintese

Die *in vitro* proteïensintesevermoë van die ribosomale bereidings uit die uterus van die geovariotomeerde rot is uitgevoer soos in 4.2.2 beskryf is. As so 'n sisteem eers gekarakteriseer is, kan die reaksie van die uterus teenoor hor-moonbehandeling ook beskryf word in terme van die *in vitro* aktiwiteit van die proteïensintese apparaat van die uterus. In tabel 4.1 word die belangrikste kenmerke van die selvrye sisteem wat vir die uterusribosome saamgestel is, gegee. Ten spyte van die voorkoms van die dimeer in die ribosomale bereidings uit uteri van geovariotomeerde rotte en die variasie in die hoeveelheid oligosome daarin teenwoordig, was die aminosuurinkorporasie met verskillende ribosoombereidings heel goed reproduceerbaar. Weglating van enige een van die essensiële komponente vir proteïensintese het die aktiwiteit laat afneem. In figuur 4.6 word die optimale kondisies ten opsigte van die Mg^{2+} - en K^{+} -konsentrasies vir die selvrye sisteem wat vir die uterusribosome saamgestel is, gegee. Die optimale aktiwiteit vir die inkorporasie van aminosure vind by Mg^{2+} - en K^{+} - konsentrasies van 3,5-4mM en 80-100mM onderskeidelik plaas. Hierdie waardes stem goed ooreen met die resultate wat Teng & Hamilton (1967, a) en Whelly & Barker (1974) vir analoë, maar nie identiese selvrye sisteme vir geovariotomeerde volwasse rotte gevind het. Hieruit is dit duidelik dat die ribosome wat volgens die beskryfde tegniek geïsoleer is, aktief is in 'n *in vitro* selvrye sisteem en ook goed ooreenstem met dié wat in die literatuur beskryf is.

Tabel 4.1 Die belangrikste kenmerke van die selvrye sisteem wat vir uterusribosome saamgestel is.

	Aktiwiteit (tpm/80µg ribosome)
Volledige sisteem	731
Volledige sisteem - ribosome	106
Volledige sisteem - ATP	187
Volledige sisteem - GTP	560
Volledige sisteem - pH5-fraksie	222
Volledige sisteem + 5µg RNase	168

Die selvrye sisteem is saamgestel soos in 4.2.2 beskryf.



Figuur 4.6 Die effek van wisselende Mg²⁺ - (A) en K⁺-konsentrasies (B) op die *in vitro* translasiermoë van ribosome wat uit die uteri van geovariotomeerde rotte geïsoleer is. Die ribosome is geïsoleer soos in 4.2.1 beskryf en die reaksiemengsel is saamgestel en sintese is uitgevoer soos wat in 4.2.2 beskryf is.

4.4 Samevatting

Die isoleringsmetode wat in hierdie hoofstuk beskryf is vir die isolering van rotuterusribosome, is geskik gevind nie net om ribosome te isoleer wat *in vitro* aktief is nie, maar wat ook na alle aanduidings 'n getroue beeld gee van hul organisasie in die selle van die geatrofeerde uterus. Die metode is ook geskik om polisome uit ander weefseltipes te isoleer. Die aard van die prominente 110S-struktuur in die sedimentasieprofiele van die ribosomale bereidings vanuit die uterus van die geovariotomeerde rot is ondersoek en dit is afgelei dat dit 'n ribosomale dimeer is, saamgestel uit twee 80S monomere. Waarskynlik is Mg^{2+} en rRNA by die vorming van die dimeer betrokke.

HOOFSTUK 5

DIE INVLOED VAN 17 β -ESTRADIOL OP DIE SEDIMENTASIE-EIENSKAPPE EN AKTIWITEIT VAN UTERUSRIBOSOME VAN DIE GEOVARIOTOMEERDE VOLWASSE ROT

5.1 Inleiding

Veranderinge in proteïensintese op biologiese stimuli gaan gepaard met aanpassings van die proteïensintese-apparaat waaronder die organisasie van monosome in polisome, asook 'n verhoogde translasië-aktiwiteit van hierdie ribosome (Tata, 1967; Palmiter, 1975). Alhoewel die uterus van die rot 'n teikenorgaan is vir die estrogeniese hormone, is die moduleering van die proteïensintese-apparaat deur hierdie hormone, nog nie bo alle twyfel vir die rotuterus aangetoon nie (Hamilton et al, 1971; Katzenellenbogen & Gorski, 1975). In die vorige hoofstuk is aangetoon dat aktiewe ribosome uit die uterus van geovariotomeerde rotte geïsoleer kan word en dat dit 'n getroue beeld gee van hul organisasie in die geatrofomeerde uterus. In hierdie hoofstuk sal beskryf word hoedat 17 β -estradiol die proteïensintese-apparaat van die geovariotomeerde rotuterus moduleer in ooreenstemming met die trofiese effek wat hierdie hormoon op dié orgaan het.

Om te bepaal hoedanig hormoonbehandeling die organisasie en aktiwiteit van die translasië-apparaat van die rotuterus beïnvloed, is die invloed van 'n enkele hormoontoediening eerstens op die sedimentasie-eienskappe en tweedens op die aktiwiteit van die rotuterusribosome bestudeer.

5.2 Metodes

5.2.1 Kwantifisering van die effek van *in vivo* hormoontoediening op die sedimentasie-eienskappe van uterusribosome

Die mate van polisoomvorming na 'n enkele hormoontoedie-

ning is vasgestel deur ribosome op verskillende tye na hormoontoediening te isoleer en op suikrose-gradiënte te analiseer soos in 4.2.3 beskryf is. Die verhouding polisome tot monosome soos wat dit in die sedimentasieprofiel voorkom, is soos volg bepaal: 'n fotokopie is van die oorspronklike sedimentasieprofiel wat deur die skrywer van die apparaat waarmee die gradiënte gemonitor is, gemaak. Die polisoom- en monosoomfraksies is uitgeknipt, die onderskeie fraksies is geweeg en die bydrae van elke fraksie in die sedimentasieprofiel is bepaal en as persentasie van die totaal uitgedruk (Bast et al, 1977). In baie gradiënte het ongeveer 5% van die totale hoeveelheid materiaal op die meniskus van die gradiënt gebly en is nie vir die bepaling van die verhoudings in berekening gebring nie.

5.2.2 Bepaling van die aantal aktiewe ribosome in die ribosomale bereidings

Dit is bekend dat ribosome wat aktief in die translasiëproses betrokke is, nie deur hoë soutkonsentrasies gedissosieër word soos wat dit die geval is met nie-funksionele ribosome nie (Zylber & Penman, 1970). Ribosomale bereidings wat op verskillende tye na hormoontoediening geïsoleer is, is in beide lae- en hoë soutkonsentrasies gesuspendeer (Lae sout : 10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 10 mM NaCl; 5 mM MgCl₂. Hoë sout : 10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 500 mM NaCl; 50 mM MgCl₂) (Meedel & Levine, 1978). Hierdie ribosomale bereidings is in suikrosegadiënte (ook in hierdie buffers) geanaliseer en gekwantifiseer soos in 5.2.1 beskryf.

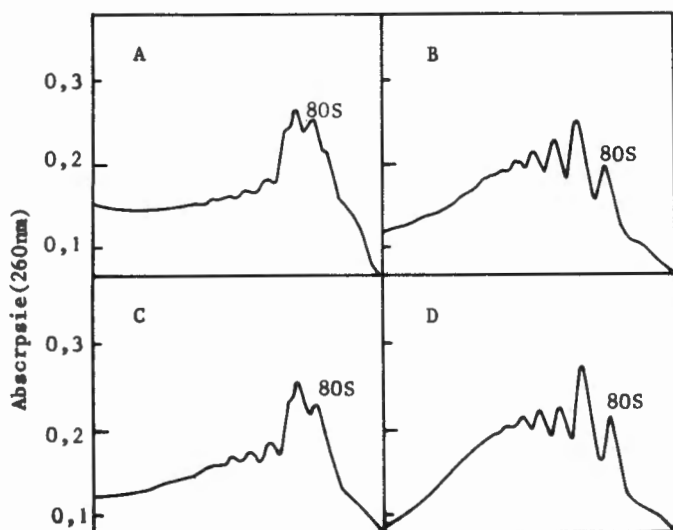
5.2.3 Translering van rotuterusribosome in oösiere van *Xenopus laevis*

Mikro-inspuiting van rotuterusribosome is uitgevoer volgens die tegniek van Gurdon et al, (1971) en in ons laboratorium aangepas (van der Walt, 1977). Ribosoombereidings van 100-300 mg ribosome wat op verskillende tye na hormoon-toediening geïsoleer is, is in 50 μ l inspuitbuffer (15mM Tris-HCl, pH 7,6; 10mM KCl; 88mM NaCl) gesuspender. Daar is 50nl van hierdie ribosoombereidings per oösiet in groepe van 10 oösiete ingespuir. Inspuitbuffer is in 'n addisionele groep oösiete ingespuir om die endogene aktiwiteit van die oösiete te bepaal. Die onderskeie groepe oösiete is dan in 100 μ l gewysigde Barthmedium, wat 10 μ l 14 C-L-leusien (331mCi/m mol, Amersham) bevat het, by 19°C vir 18 uur geïnkubeer. Die inkorporering van aminosure in polipeptiede is uitgevoer soos deur Chan et al. (1976) en Laskey et al (1977) beskryf. Die oösiete is in 1 ml 10mM Tris-HCl (pH 7,6) wat 100mM KCl bevat het, gehomogeniseer en hierby is 50% TCA gevoeg tot 'n endkonsentrasie van 10%. Hierdie mengsel is vir 10 minute gekook. Nadat dit afgekoel het is die presipitaat op Milliporefilters opgevang en met 10% TCA gewas. Radio-aktiwiteit is bepaal soos in 4.2.2 beskryf is.

5.3 Resultate

5.3.1 Invloed van 17 β -estradiol op die sedimentasie-eienskappe van rotuterusribosome

Die invloed van 'n enkele toediening van 'n dosis van 10 μ g 17 β -estradiol/100 g liggaamsmassa op die sedimentasie-eienskappe van die ribosome van geovariotomeerde volwasse rotte word in figuur 5.1 geïllustreer. Die sedimentasieprofiel van die ri-



Figuur 5.1 Die effek van 'n enkele toediening van 17 β -estradiol, coumestrol, en genistein op die sedimentasie-eienskappe van uterusribosome. Die sedimentasiekondisies was dieselfde as vir figuur 4.2.

- A: Kontrole;
 B: 10 μ g 17 β -estradiol/100g liggaamsmassa;
 C: 120 μ g coumestrol/100g liggaamsmassa;
 D: 1,25 mg genistein/100g liggaamsmassa.

Die tydsverloop na die toediening van die estrogene was 15 uur en die geïsoleerde ribosomale materiaal is voortdurend by 4°C gehou.

bosome van die onbehandelde rotte (figuur 5.1 A) word gekenmerk deur die teenwoordigheid van die karakteristieke dimeer, asook in klein hoeveelheid oligosome. Opvallende verandering is merkbaar in die sedimentasieprofiel van die ribosome wat 15 uur na hormoon-toediening geïsoleer is (figuur 5.1 B): die dimeer is afwesig en oligosome sowel as groter polisome is waarneembaar. Hierdie dosis van 10 μ g/100g liggaamsmassa is volgens Teng &

Hamilton (1970) optimaal vir toename in die massa van die uterus van die geovariotomeerde volwasse rotte na 'n enkele toediening, alhoewel hierdie outeurs bevind dat hormoonbehandeling geen invloed op die ribosomale proefiele het nie (Teng & Hamilton, 1967b). Volgens die resultate van figuur 5.1 B, lei hierdie dosis egter wel tot polisoomvorming.

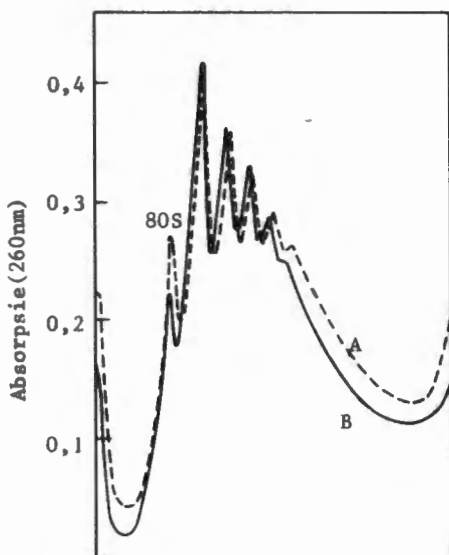
Om vas te stel of die vorming van polisome eksklusief 'n reaksie van die uterus op 17β -estradiol is, is die moontlike invloed van nie-steroïed plantestrogene vervolgens nagegaan. Hierdie verbindings wat in sekere klawergewasse voorkom, is bekend as plantestrogene omdat hulle die fisiologiese effek van die steroïdestrogene in baie opsigte naboots (Little & Lambourne, 1976). Die resultate word in figuur 5.1 C & D geïllustreer waar die sedimentasieproefiele van ribosome vertoon word wat uit uteri van rotte wat $120\mu\text{g}$ coumestrol/100g liggaamsmassa (figuur 5.1 C) en 1,25 mg genistein/100g liggaamsmassa (figuur 5.1 D) ontvang het.* (Hierdie konsentrasies van die plantestrogene is gekies omdat dit volgens Perel & Lindner (1970) ongeveer 'n 50% toename in die massa van geovariotomeerde volwasse rotte 6 uur na toediening tot gevolg gehad het). Uit 'n vergelyking van figuur 5.1 C & D is dit duidelik dat genistein 'n groter mate van polisoomvorming tot gevolg gehad het as coumestrol. Dit blyk ook uit die toename in die massa van die rotuteri wat hierdie plant-estrogene tot gevolg gehad het want genistein het in hierdie tydperk 'n 30% groter toename in die uterusmassa tot gevolg gehad. Estradiol het tydens

* Coumestrol en Genistein is verkry van:
Dr. R.I. Cox
Ian Clunies Ross Animal Research Laboratory
CSIRO, Blacktown. N.S.W. AUSTRALIË.

hierdie tydperk 'n groter trofiese effek as beide die plant-estrogene tot gevolg gehad. Soortgelyke resultate ten opsigte van die massatoename na coumestrol- en genisteïntoediening aan onvolwasse rotte is deur Noteboom en Gorski (1963) waargeneem.

Uit die resultate van figuur 5.1 kan dus 'n samevattende gevolgtrekking gemaak word dat 'n duidelike verandering in die intrasellulêre organisasie van die ribosome volg na behandeling van die geovariotomeerde rotte met 17 β -estradiol sowel as met die plantestrogene. Dit is egter van belang om vas te stel of die RNase-aktiwiteit in die preparate wat uit die atrofiese uterus berei is en dié uit die uterus van die hormoonbehandelde proefdiere, van dieselfde orde is. Hierdie gegewens is van belang voordat 'n uitspraak gegee kan word oor hoeverre die sedimentasieprofiel 'n getroue weergawe is van die werklike *in vivo* distribusie en organisasie van die ribosome na hormoon-toediening, met ander woorde of die veranderinge in die sedimentasieprofiel 'n ware hormoongeïnduseerde reaksie is. Hiervoor is uteri van 6-uur hormoonbehandelde rotte elkeen in twee gelyke dele verdeel en in twee groepe geplaas. Ribosome is uit die een groep in homogeniseerbuffer geïsoleer en uit die ander groep in 'n hoë-spoed supernatant wat uit die uteri van geovariotomeerde rotte berei is. (Uteri van geovariotomeerde rotte is in homogeniseerbuffer gehomogeniseer. Die homogenaat is vir 3-uur by 185 000xg gesentrifugeer). Hierdie ribosoombereidings is op sukrosegadiënte geanaliseer. Sou daar veranderinge in die RNase aktiwiteit na hormoon-toediening voorgekom het, sal dit in die voorkoms van die sedimentasieprofiel waargeneem kan word. Die resultate van hierdie eksperiment word in figuur 5.2 gegee en daarin is dit duidelik dat daar geen verskil van enige betekenis tussen die voorkoms van die sedimentasieprofiel van die ribosome wat in die homo-

genisseerbuffer (figuur 5.2 B) en in die hoë-spoed superna-
tant geïsoleer is nie. Hiervolgens is 'n hoë RNase aktiwi-
teit nie met die geatroteerde uterus geassosiëer nie. Dit
blyk dus dat veranderinge in die sedimentasie-eienskappe van
die uterusribosome na hormoonbehandeling 'n ware hormoon=
geïnduseerde reaksie is.



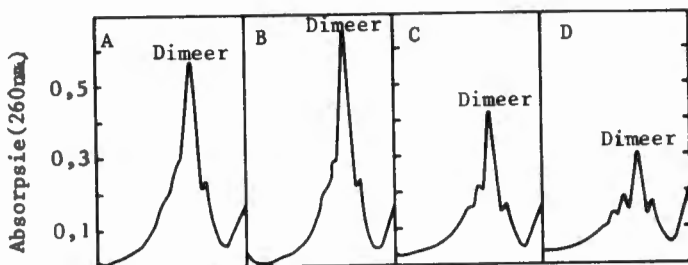
Figuur 5.2 Sedimentasieprofile van uterusribosome wat in
die teenwoordigheid (kurwe A----) en die afwe-
sigheid (kurwe B—) van 'n hoë-spoed superna-
tant (berei uit geovariotomeerde rotuteri) geï-
soleer is. Die ribosome is uit uteri van 6-uur
hormoonbehandelde rotte geïsoleer. Die senti-
fugeringskondisies was dieselfde as vir figuur
4.5 behalwe dat die ribosome vooraf by 37°C
geïnkubeer is.

5.3.2 Tydsafhanklike verandering in die sedimentasieprofiële van rotuterusribosome na 'n enkele hormoon-toediening

5.3.2.1 Vroeë veranderinge in die sedimentasieprofiële

Die veranderinge in die sedimentasieprofiële soos aangetoon in figuur 5.1 is 15 uur na hormoon-toediening waargeneem. In 'n ondersoek na die tydsafhanklike veranderinge in reaksie op hormoon-behandeling, is eerstens gelet op die veranderinge wat waargeneem word binne enkele ure na toediening van 17β -estradiol. Die resultaat hiervan word in figuur 5.3 geïllustreer. Hierdie sedimentasieprofiële is verkry met ribosomale preparate wat nie voor sedimentasie-analise by 37°C getinkubeer is nie. In die geval van die ribosome wat uit kontrolediere (figuur 5.3 A) geïsoleer is, is die dimeer baie prominent en oorskadu enige oligosome wat teenwoordig mag wees. Veranderinge in die sedimentasieprofiel, alhoewel nog gering, is alreeds waarneembaar so vroeg as 2 uur na hormoon-toediening (figuur 5.3 B). Namate die tyd na hormoon-toediening verloop, word die dimeerpiek minder prominent (figuur 5.3 B-D) en daarteenoor word meer oligomere sigbaar.

Hierdie verskynsel van die vermindering van dimerisering na hormoon-toediening, word verder in figuur 5.4 geïllustreer. In figuur 5.4 A is die dimeer weer eens prominent in die sedimentasieprofiel van ribosome wat uit kontrolediere geïsoleer is en is dit minder prominent 6-uur na hormoon-toediening (figuur 5.4 B). Heelwat oligosome is ook sigbaar in figuur 5.4 B. Wanneer die ribosome, wat in figuur 5.4 A & B geïllustreer is, met $5\mu\text{g}$ RNase by 4°C behandel word, verskuif die oligosome ten gunste van monosome maar in beide gevalle (figuur 5.4 C & D) is daar nog RNase-weerstandbiedende materiaal (dimeer) in die



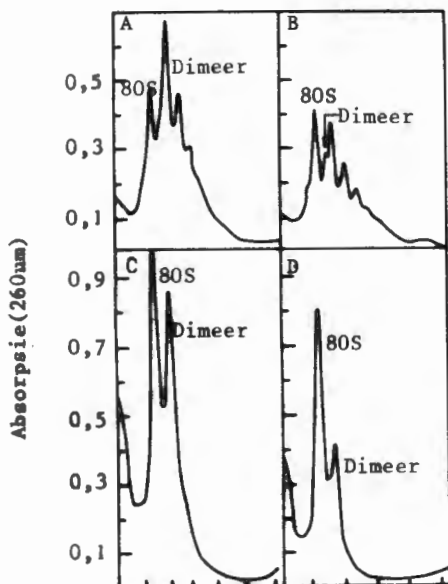
Figuur 5.3 Veranderinge in die sedimentasie-eienskappe van uterusribosome tydens die eerste ses uur na hormoon-toediening. Die kondisies van hormoon-toediening en sentrifugering was dieselfde as vir figuur 5.1.

- A: Kontrolle;
- B: 2 uur;
- C: 4 uur;
- D: 6 uur na hormoon-toediening.

sedimentasieprofile sigbaar. Wat baie opvallend is, is dat daar 'n kleiner hoeveelheid dimere in die sedimentasieprofiel van die ribosome van die hormoonbehandelde diere voorkom (figuur 5.4 D) as in die geval van die kontrolediere (figuur 5.4 A).

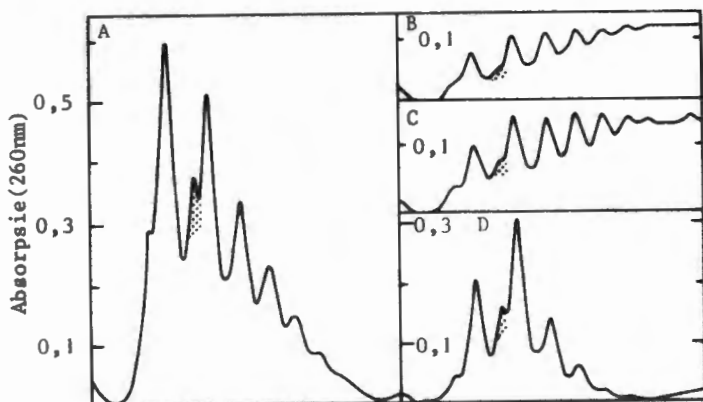
5.3.2.2 Veranderinge in die sedimentasieprofile oor langer tye na hormoon-toediening

In figuur 3.1 is aangetoon dat die trofiese effek van 17β -estradiol op die rotuterus gou na 'n enkele toediening begin en progressief voortduur tot 24 uur na hormoon-toediening waarna dit weer geleidelik afneem tot 72 uur na hormoon-toediening. Hierdie verandering is eweneens waarneembaar op die ribosomale vlak soos wat dit in figuur 5.5 geïllustreer word.



Figuur 5.4 Vermindering van dimerisering na hormoon-toediening. Hormoon-toediening en sedimentasie-analise was dieselfde as vir figuur 4.3.

- A: Kontrole;
- B: 6 uur na hormoon-toediening;
- C: Kontrole ribosome plus 5µg RNase by 4°C;
- D: Ribosome van 6-uur hormoon-behandelde uteri plus 5µg RNase by 4°C.

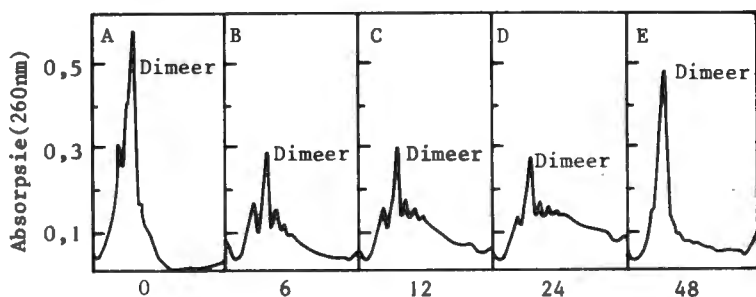


Figuur 5.5 Veranderinge in die sedimentasie-eienskappe van uterusribosome oor 'n tydperk van 72 uur na 'n enkele hormoontoediening. Hormoon=toediening en sedimentasie-analise was dieselfde as vir figuur 5.4, behalwe dat die ribosome voor sedimentasie-analise by 37°C geïnkubeer is. Die gespikkelde gedeelte dui die dimere aan.
A: Kontrole;
B: 24 uur;
C: 48 uur;
D: 72 uur na hormoontoediening.

In figuur 5.5 word 'n tipiese verloop van die verandering in die sedimentasie-eienskappe van uterusribosome oor 'n lang tydperk na 'n enkele hormoontoediening aangetoon. Die materiaal wat uit die uteri van kontrolerotte geïsoleer is (figuur 5.5 A), toon 'n dominante monosoompiek met afnemende hoeveelhede oligosome. Op tye 24 uur en 48 uur (figuur 5.5 B & C) na hormoontoediening het die hoeveelheid 80S monosome grootliks afgeneem en word die sedimentasieprofiel gekenmerk deur polisome met hoër sedimentasiewaardes. Hierdie sedimentasieprofiel is karakteristiek vir weefsel waarin aktiewe pro-

teïensintese plaasvind (Bast et al, 1977). Dit is besonder opvallend dat in die sedimentasieprofiel van die ribosome wat 72 uur na hormoon-toediening geïsoleer is (figuur 5.5 D) die polisome teruggekeer het na oorwegend monosome en oligosome. Ten spyte daarvan dat die ribosome wat in figuur 5.5 geïllustreer is, voor sedimentasie-analise by 37°C geïnkubeer is, is van die dimere (soos aangedui) nog sigbaar in die sedimentasieprofiel van die ribosome wat uit geovariotomeerde rotte geïsoleer is (figuur 5.5 A). In hierdie sedimentasieprofiel is die dimeer sigbaar as 'n klein piek tussen die 80S monosoompiek en die disoompiek. Namate die tyd na hormoon-toediening verloop, verdwyn die dimeer grootliks (figuur 5.5 B & C) maar is weer sigbaar in die sedimentasieprofiel van die ribosome wat na 72 uur geïsoleer is.

In figuur 5.6 word 'n verdere voorbeeld gegee van die sedimentasieveranderinge van die uterusribosome na hormoon-toediening. In hierdie voorbeeld is die dimeer baie prominent in die geval van die kontrolediere (figuur 5.6 A). Met verloop van tyd na hormoon-toediening vind polisoovorming plaas, maar die dimeer bly steeds prominent (figuur 5.6 B-D). Polisoovorming bereik 'n maksimum 24 uur na hormoon-toediening (figuur 5.6 D), maar anders as in figuur 5.5 het die polisome in hierdie geval alreeds 48 uur na hormoon-toediening tot hoofsaaklik monosome teruggekeer en word die sedimentasieprofiel deur die dimeer oorheers (figuur 5.6 E).



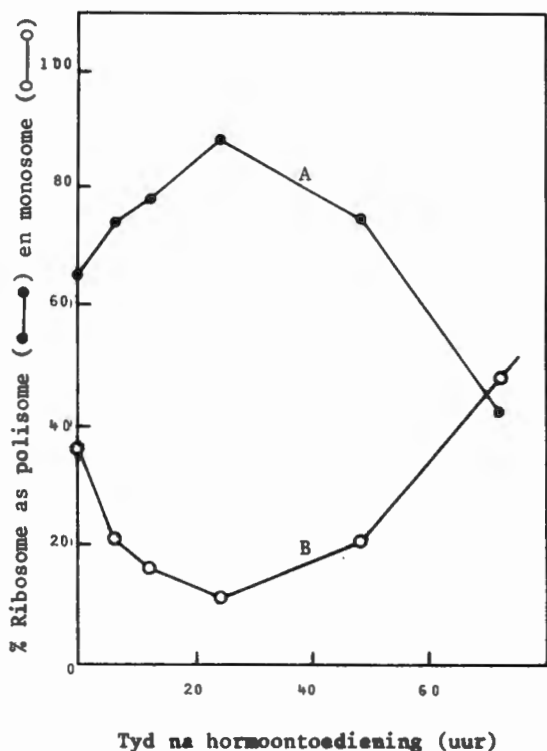
Figuur 5.6 'n Verdere voorbeeld van die veranderinge in die sedimentasie-eienskappe van uterusribosome na 'n enkele *in vivo* hormoontoediening. Die eksperimentele kondisies was dieselfde as vir figuur 5.5.

- A: Kontrole;
- B: 6 uur;
- C: 12 uur;
- D: 24 uur;
- E: 48 uur na hormoontoediening.

Soos reeds gemeld, kom daar 'n variasie voor tussen die verskillende ribosoombereidings ten opsigte van die hoeveelheid oligosome wat teenwoordig is in die sedimentasieprofiel van ribosome wat berei is uit die uteri van kontrolerotte (figuur 4.1). Dit geld ook vir die effek van die hormoon soos dit na vore kom uit 'n vergelyking van die resultate van figuur 5.1, figuur 5.5 en figuur 5.6. Uit 'n vergelyking van hierdie resultate kom die volgende na vore: Ten spyte van die variasie in die reaksie van die rotuterus na 'n enkele hormoontoediening is polisoomvorming deurgaans waargeneem, alhoewel nie altyd tot dieselfde mate nie. Dit is ook opvallend dat hoe minder oligosome in die sedimentasieprofiel van kontrolediere voorkom, hoe kleiner die mate van polisoomvorming is en hoe gouer die ribosomale bereidings na

oorwegend disome en oligosome terugkeer. Hierdie verskynsel kom duidelik na vore by 'n vergelyking van die resultate van figuur 5.5 en figuur 5.6.

Ten einde 'n geheelbeeld te kry van die veranderinge in die polisoominhoud van die uterus na *in vivo* behandeling met 17 β -estradiol, is die gegewens van ten minste tien individuele eksperimente in figuur 5.7 saamgevat. Hierdie resultate is verkry volgens die prosedure soos in 5.2.1 beskryf: Die hoeveelheid ribosome wat as polisome (figuur 5.7, kurwe A) teenwoordig is in die sedimentasieprofiele van ribosomale bereidings uit die uteri van geovariotomeerde rotte, is 65%. Binne 6 uur na hormoon-toediening neem die hoeveelheid polisome toe tot 74%, dit is 'n toename van 16%, en bereik 'n maksimum van 88% na 24 uur. Dit is 'n toename van 38% bo die kontrolewaarde. 'n Vergelyking van hierdie resultate en dié van figuur 5.3 dui daarop dat die toename in polisoomvorming na hormoon-toediening sonder 'n merkbare sloerfase geskied. Gedurende die tydverloop nadat maksimum polisoomvorming bereik is (24 uur na hormoon-toediening) neem die hoeveelheid polisome redelik skerp af tot 'n waarde van 43% op 72 uur. Hierdie waarde is ongeveer 33% laer as in die geval van die kontrolediere. In die uterus van die geovariotomeerde rot is 36% van die ribosome as monosome teenwoordig (figuur 5.7, kurwe B). Hierdie waarde verminder na hormoon-toediening en is reeds na 6 uur slegs 21%, wat 41% minder is as in die kontroles. 'n Minimum van 11% monosome is na 24 uur teenwoordig, wat soveel as 70% minder is as in die kontroles. Hierna neem die hoeveelheid monosome toe tot 'n waarde van 49% na 72 uur wat 36% meer is as die kontrolewaarde.



Figuur 5.7 Veranderinge in die hoeveelheid ribosome wat in die sedimentasieprofiel as polysome (A, ●—●) en monosome (B, ○—○) teenwoordig is met verloop van tyd na hormoon-toediening. Hierdie resultaat is die gegewens van ten minste tien individuele eksperimente en is verkry soos wat in 5.2.1 beskryf is.

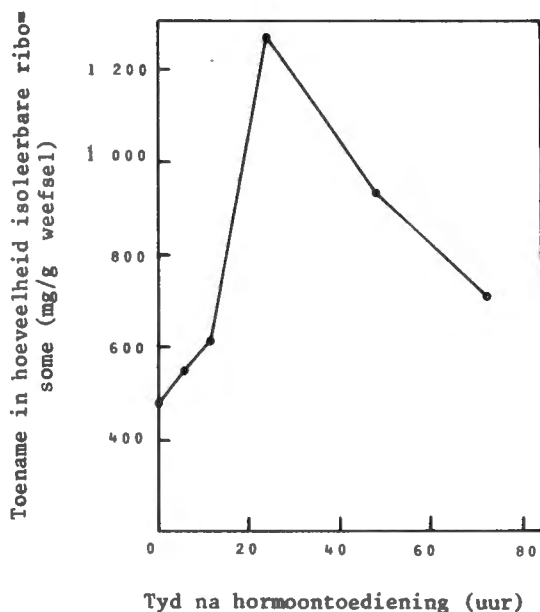
Op die oog af lyk hierdie twee kurwes (figuur 5.7 A & B) komplementêr, maar by 'n nadere beskouing blyk dit dat die afname in die hoeveelheid ribosome wat as monosome teenwoordig is, vinniger plaasvind as die toename in die hoeveelheid ribosome wat as polysome teenwoordig is. Moontlike verklarings hiervoor is:

- 1) Tegniese redes, byvoorbeeld die hoeveelheid materiaal op die meniskus van die gradiënt of die invloed wat die dimeer op die resolusie van die sedimentasie profiel gehad het.
- 2) 'n Belangrike verklaring vind ons in die bespreking van die resultate van figuur 5.3 en figuur 5.4, naamlik dat tydens die vroeë stadiums na hormoonbehandeling, die dimeer met verloop van tyd na hormoonbehandeling minder prominent word in die sedimentasieprofiel. Dit mag beteken dat die ribosome waaruit die dimeer saamgestel is, tydens die vroeë stadiums na hormoonbehandeling as't ware as 'n bron van ribosome vir polisoomvorming dien totdat nuut gesintetiseerde ribosome ook in polisome geïnkorporeer word. (Hierdie saak word in Hoofstuk 7 verder bespreek).

Laasgenoemde moontlikheid is verder ondersoek deur die hoeveelheid isoleerbare uterusribosome met verloop van tyd na hormoonbehandeling te bepaal. Die saamgevatte resultate van 'n aantal individuele eksperimente word in figuur 5.8 gegee. Die algemene patroon van die toename in die ribosomale opbrengs na hormoonbehandeling is soortgelyk as dié van die veranderinge in die hoeveelheid polisome (figuur 5.7, kurwe A). Daar is tog 'n opmerkbare verskil, naamlik tydens die eerste 24 uur na hormoontoediening verloop die toename in die ribosomale opbrengs nie liniêr soos in die geval van polisoomvorming nie. 'n Aanvanklike stadige toename (23%) vind tydens die eerste 12 uur plaas en dit word deur 'n vinniger styging tot op 24 uur (155%) na hormoontoediening gevolg. Hierna neem die ribosomale opbrengs geleidelik af en na 72 uur bereik dit 'n waarde wat steeds 62% hoër is as die kontrolewaarde. Dit is

in teenstelling met polisoomvorming, want laasgenoemde neem af tot 'n waarde wat 33% laer is as die kontrolewaarde.

Alhoewel al die moontlike verklarings vir die verloop van die kurwes van figuur 5.7 elkeen 'n belangrike rol speel, is die bydrae van die resultate wat in figuur 5.3 en figuur 5.8 gegee is, die belangrikste. Hierdie saak word in Hoofstuk 7 breedvoerig bespreek.



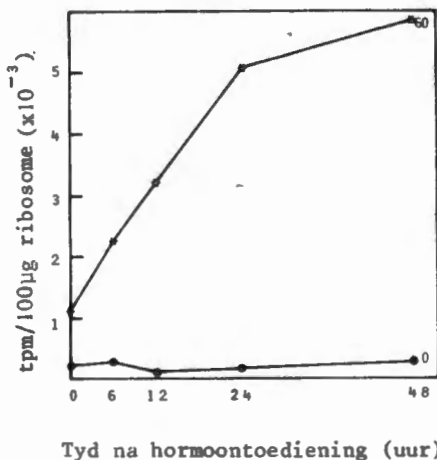
Figuur 5.8 Toename in die hoeveelheid isoleerbare ribosome met verloop van tyd na hormoonbehandeling. Ribosome is op verskillende tye na hormoonbehandeling (3.2.2) geïsoleer en die opbrengs is as mg ribosome/g uterusweefsel bepaal (4.2.1).

5.3.3 Proteïensintese met rotuterusribosome

Die resultate tot dusver in hierdie hoofstuk toon aan dat 'n enkele dosis 17 β -estradiol 'n reorganisasie van die ribosome in die uterusweefsel van die geovariotomeerde rot tot gevolg het. Hierdie invloed van 17 β -estradiol bestaan daaruit dat die organisasie van die ribosome in die geatrofeerde uterus van oorewegend monosome en oligosome na oorewegend polisome verskuif. (Laasgenoemde is kenmerkend van weefsel waarin proteïensintese aktief plaasvind). Om die verband tussen die mate van polisoombvorming en proteïensintese in die uterus na hormoonbehandeling vas te stel, is die volgende eksperimente uitgevoer: Eerstens is die *in vitro* aktiwiteit van die uterusribosome om aminosure in polipeptiede te inkorporeer, bestudeer. Dit is gedoen met behulp van die selvrye sisteem wat in 4.2.2 beskryf is en onder die optimale kondisies soos wat dit in 4.3.3 bespreek is. Die resultate van 'n eksperiment waar die *in vitro* aktiwiteit van die uterusribosome as 'n funksie van die tyd na hormoontoediening bestudeer is, word in figuur 5.9 gegee. Ribosome is op verskillende tye na hormoontoediening geïsoleer en 60 minute lank in 'n selvrye sisteem geïnkubeer. Die mate van die *in vitro* aktiwiteit van die ribosome word weergegee as die hoeveelheid radio-aktiewe aminosure wat deur 'n sekere hoeveelheid ribosome in polipeptiede geïnkorporeer is. Die *in vitro* aktiwiteit van die ribosome neem tydens die eerste 24 uur na hormoontoediening liniêr toe waarna die toename in die aktiwiteit afplat tot op 48 uur na hormoontoediening. Binne 6 uur na hormoontoediening is die *in vitro* aktiwiteit van die ribosome alreeds 109% bo die kontrolewaarde en na 12, 24 en 48 uur is die aktiwiteit 204, 376 en 462% onderskeidelik bokant die kontrolewaarde. Al hierdie waardes oortref beide die toename in die mate van polisoomb-

vorming (figuur 5.7) sowel as die toename in die hoeveelheid isoleerbare ribosome (figuur 5.8) na hormoontoediening.

Vervolgens is die hoeveelheid ribosome in die ribosomale bereidings wat aktief by die translasiëproses betrokke is as 'n funksie van die tyd na hormoontoediening bepaal. Dit is gedoen deur ribosome op verskillende tye na hormoontoediening te isoleer en die hoeveelheid aktiewe ribosome in die bereidings te bepaal, soos in 5.2.2 beskryf. Die resultate van

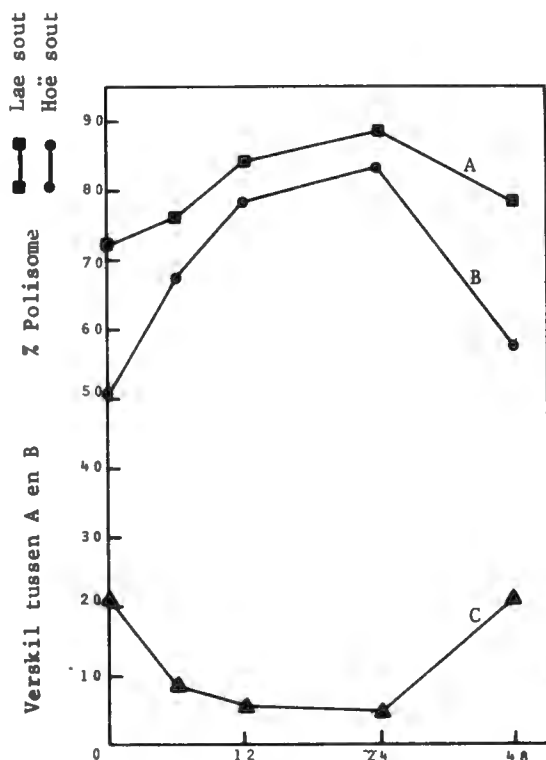


Figuur 5.9 Die invloed van *in vivo* hormoontoediening op die *in vitro* translasiëaktiwiteit van uterus-ribosome. Die rotte het 10µg 17β-estradiol/100g liggaamsmassa ontvang en ribosome is op verskillende tye daarna geïsoleer. *In vitro* proteïensintese is uitgevoer soos in 4.2.2 beskryf onder die optimale kondisies soos wat dit in 4.3.3 bespreek is.

Kontrole (•—•);
60 minute geïnkubeer (•—•).

so 'n eksperiment word in figuur 5.10 gegee: die totale hoeveelheid ribosome wat as polisome in die sedimentasieprofiële voorkom, word deur kurwe A in figuur 5.10 gegee. Hierdie kurwe het baie dieselfde verloop as dié van figuur 5.7 A. Die belangrikste kurwe in hierdie figuur is kurwe B wat die hoeveelheid ribosome wat as aktiewe polisome in die sedimentasieprofiële teenwoordig is, weergee. Hiervolgens is die hoeveelheid ribosome wat in die geatrofeerde uterus aktief by translasie betrokke is, ongeveer 52%. Hierdie hoeveelheid ribosome neem na 6 uur na hormoon-toediening toe tot 67% en bereik 'n maksimum van 84% na 24 uur. Hierna neem hierdie hoeveelheid aktiewe ribosome af tot 57%. Uit 'n vergelyking van kurwes A en B van figuur 5.10 is dit duidelik dat namate meer tyd na hormoon-toediening verloop, meer ribosome by die translasieproses betrokke raak, want minder ribosome word deur die hoër soutbehandeling gedissosieër omdat hulle deur hul betrokkenheid aan die translasiegebeure gestabiliseer word (Zylber & Renman, 1970). Dit word geïllustreer deur die verloop van kurwe C wat die verskil tussen kurwes A en B verteenwoordig. Hiervolgens neem die hoeveelheid labiele ribosome binne 6 uur na hormoon-toediening vinnig af maar tydens die tydsverloop vanaf 6 uur tot 24 uur is die afname meer geleidelik. Hierna neem die hoeveelheid labiele ribosome weer vinnig toe tot op 48 uur na hormoon-toediening. Die verband tussen hierdie resultate en dié van figuur 5.7 en figuur 5.8 sal in Hoofstuk 7 bespreek word.

Uit die voorafgaande kom die vraag na vore in hoeverre die mRNA, geassosieër met die polisome, funksioneel verander na hormoon-toediening. Hierdie probleem kan tans sinvol ondersoek word deur 'n ondersoek van proteïensintese, spesifiek uitgevoer in oösiëte van *Xenopus laevis*.



Tyd na hormoon-toediening (uur)

Figuur 5.10

Verandering in die hoeveelheid ribosome in die sedimentasieprofile wat aktief by die translasiëproses betrokke is met verloop van tyd na hormoon-toediening. Die eksperiment is uitgevoer soos in 5.2.2 beskryf. A (■----■) verteenwoordig die totale hoeveelheid polysome teenwoordig in die sedimentasieprofile en B (●----●) die wat aktief by die translasiëproses betrokke is. C (▲----▲) is die verskil tussen A en B.

Die oösierte van *Xenopus laevis* is bekend vir hul getroue translisering van spesifieke mRNA's (Gurdon et al, 1971) en dat translisering vir 'n baie langer tyd as in selvrye sisteme volgehou word, sodat die funksionele stabiliteit van mRNA's goed in oösierte bestudeer kan word (Nudel et al, 1976). Wanneer 'n spesifieke mRNA in oösierte getransleer word, kan die spesifieke translasiëprodukte waargeneem word (Gurdon et al, 1971), maar wanneer polisome, byvoorbeeld retikulosietpolisome, in oösierte getransleer word, word nie net die spesifieke translasiëprodukt (globien) gesintetiseer nie, maar die totale proteïensintese-aktiwiteit van die oösiet neem ook toe (Laskey et al, 1977).

In die geval van die rotuteruspolisome is die translasiëprodukt nie bekend nie en dit is hoogs waarskynlik 'n heterogene groep proteïene. Daarom is die inkorporering van aminosure in totale proteïene bepaal om die transleerbaarheid van uterus polisorale mRNA in oösierte te monitor. Die doel van hierdie eksperiment was om die effek van hormoon-toediening andersyds op die transleerbaarheid van uteruspolisome en andersyds op die stabiliteit van die polisorale mRNA te bestudeer.

Om te bepaal hoedanig die mikro-inspuiting van uteruspolisome die translasiëvermoë van *Xenopus laevis*-oösierte beïnvloed, is toenemende konsentrasies uteruspolisome in groepe van vyf oösierte ingespuut. Uit die resultate van figuur 5.11 kom die volgende na vore:

1. Inspuiting van uteruspolisome in oösierte van *Xenopus laevis* verhoog die hoeveelheid aminosure wat in proteïene

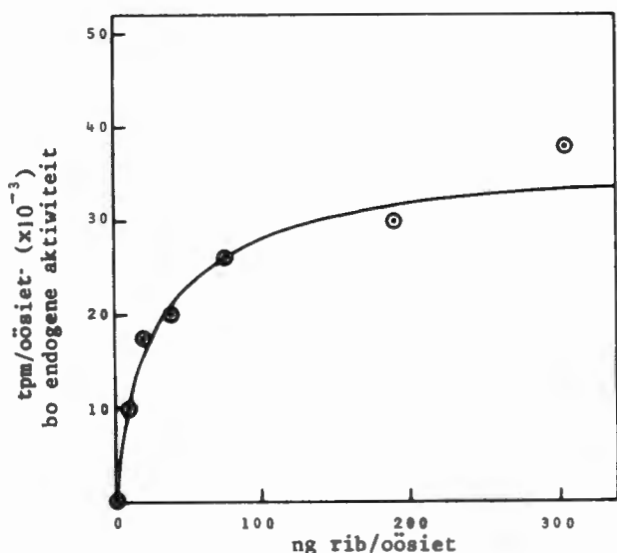
geïnkorporeer word.

2. 'n Toename in die inkorporering van aminosure is alreeds by 'n lae polisoomkonsentrasie (9,5ng) merkbaar.
3. Hoe meer polisome ingespuut word, hoe meer aminosure word in proteïene geïnkorporeer maar, na 'n aanvanklike liniêre verband, plat die mate van inkorporering egter af.

As in aanmerking geneem word dat polisome, wat uit die uteri van kontrolediere berei is, enersyds 'n relatiewe lae *in vitro* aktiwiteit het (figuur 5.9) en andersyds min aktiewe polisome (figuur 5.10) en poliA(+)RNA (figuur 6.2) bevat, is dit duidelik uit die resultate van figuur 5.11 dat die oösierte van *Xenopus laevis* 'n baie sensitiewe translasesisteem is. Hierdie sisteem is daarom uiters geskik om enige modifikasie van die transleerbaarheid en stabiliteit van uteruspolisome (mRNA) wat na hormoonbehandeling mag volg, te monitor.

Om die effek van hormoontoediening op die transleerbaarheid van uteruspolisome (mRNA) van *Xenopus laevis* te bepaal, is die volgende eksperiment uitgevoer: Polisome is op verskillende tye na 'n enkele hormoontoediening uit die uteri van geovariotomeerde rotte geïsoleer. Gelyke hoeveelhede van elke groep polisome is in groepe van tien oösierte ingespuut en die inkorporering van aminosure in totale proteïene is bepaal soos in 5.2.3 beskryf. Die resultate van so 'n eksperiment word in figuur 5.12 geïllustreer. Die inkorporering van aminosure in proteïene neem toe namate die tyd na hormoontoediening verloop. Die verhoogde toename is 18% in die geval van die polisome wat 6 uur na hormoontoediening geïsoleer is en

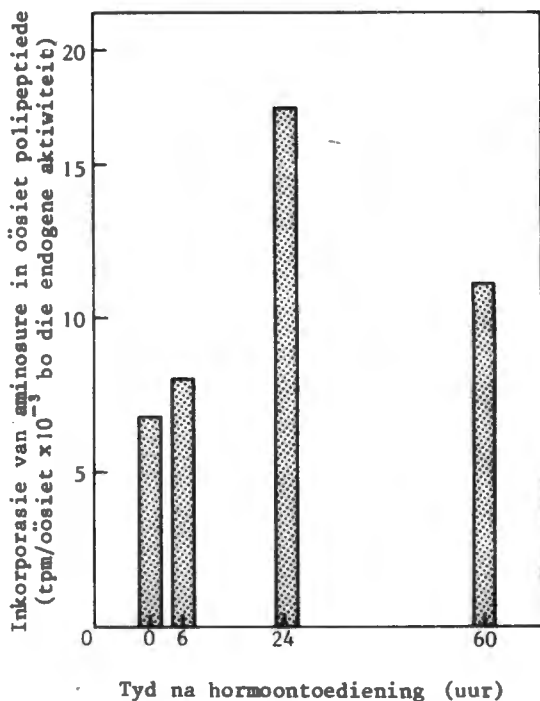
'n maksimum word bereik (146% bo die kontrolewaarde) met polisome wat 24 uur na hormoontoediening geïsoleer is.



Figuur 5.11 Dosis-reaksieverband tussen die hoeveelheid ribosome - per oösiet ingespuut en die mate van inkorporering van aminosure in oösietproteïene. Ribosome is uit uteri van kontrolediere geïsoleer en verskillende konsentrasies is in 'n volume van 50nl/oösiet ingespuut. Die inkorporering van aminosure in proteïene is uitgevoer soos in 5.2.3 beskryf. Die endogene aktiwiteit van die oösiete is telkens in berekening gebring.

In die geval van die polisome wat 60 uur na hormoontoediening geïsoleer is, het die inkorporering van aminosure afgeneem tot 'n waarde van 63% bo die kontrolewaarde. Hierdie resultate toon dat hormoonbehandeling van die geovariotomeerde rot inderdaad 'n effek het op die transleerbaarheid van die uterus=

polisome in oösiere van *Xenopus laevis*. Hierdie resultate moet egter in die lig gesien word daarvan dat beide die mRNA inhoud (figuur 6.2) en die hoeveelheid aktiewe polisome (figuur 5.10) van die polisoombereidings ook met verloop van tyd na hormoon-toediening verander. Hierdie verband sal later meer volledig bespreek word en word hier net volledigheidshalwe genoem.

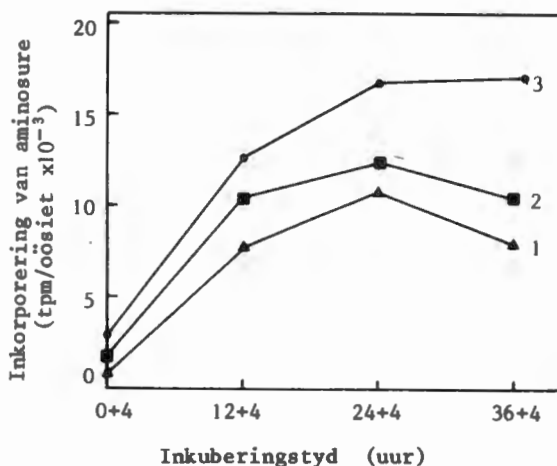


Figuur 5.12

Translasie van uterus-polisome in oösiere van *Xenopus laevis* as 'n funksie van die tyd na hormoon-toediening. Die polisome is uit rotuteri 0,6, 24 en 60 uur na hormoon-toediening geïsoleer en 176ng polisome is in elke oösiere in groepe van 10 oösiere/eksperimentele groepe ingespuut. Die bepaling van die hoeveelheid aminosure wat in oösiere-proteïene geïnkorporeer is, is uitgevoer soos in 5.2.3 beskryf.

Voorts is die funksionele stabiliteit van die uteruspolisome (mRNA) vanuit kontrole en 15-uur hormoonbehandelde rotte in oösiëte van *Xenopus laevis* vergelyk. Die protokol van hierdie eksperiment is basies dieselfde as die wat Nudel et al (1976) uitgevoer het om die funksionele stabiliteit van globien-mRNA's wat poli(A)-segmente wat verskillende lengtes bevat het, bestudeer het en met die van Lanclos & Hamilton (1975) wat die translisering van lewerpolisome ondersoek het. (Dit word kortliks in die byskrif van figuur 5.13 beskryf). In figuur 5.13 word die omvang van die inkorporering van aminosure in polipeptiede weergegee as 'n funksie van die inkuberingstyd. Daaruit kom die volgende na vore:

1. In die geval van beide groepe poliribosome (kurwes 2 & 3) is meer aminosure in polipeptiede geïnkorporeer as in die kontrolegroep oösiëte waarin net inspuitsbuffer gespuut is (kurwe 1).
2. Net soos in figuur 5.12 is meer aminosure in polipeptiede geïnkorporeer in die geval van die ribosome wat uit die uteri van hormoonbehandelde diere (kurwe 3) as in die geval van die kontrole-uteri (kurwe 2).
3. In teenstelling met die resultate van Nudel et al (1976) word die draaipunt in die translisie-aktiwiteit eers na 'n inkuberingstyd van 12 uur bereik waar dit in hulle geval na ongeveer 6 uur voorgekom het. Dit kan moontlik toegeskryf word aan 'n herstel- of reorganisasiefase wat die oösiëte deurloop na die inspuitsproses.
4. Die verloop van kurwes 2 en 3 verskil opmerklik van mekaar. Tydens die eerste 12 uur inkuberingstyd verloop



Figuur 5.13

Vergelyking van die funksionele stabiliteit van uteruspolisime (mRNA) geïsoleer uit kontrole en 15-uur behandelde rotte. Die ribosomale konsentrasies waarvan 50nl/oösiët ingespuut is, was 1,12mg/ml en vyf oösiëte is per groep gebruik. Na inkubering van die oösiëte in inkuberingsbuffer sonder gemerkte aminosure vir 0, 12, 24 en 36 uur na inspuiting, is hulle vir 4 uur in inkuberingsbuffer met gemerkte aminosure geïnkubeer. Inkorporering van aminosure is bepaal soos in 5.2.3.

Kurwe 1: endogene aktiwiteit van die oösiëte.

Kurwe 2: uteruspolisome geïsoleer uit kontrolediere.

Kurwe 3: uteruspolisome geïsoleer uit 15-uur behandelde diere.

hulle parallel met mekaar en tot 'n groot mate ook met kurwe 3. Hierna begin kurwe 2 afplat en bereik 'n maksimum na 24 uur. Hierna neig dit dan na 'n laagtepunt terwyl kurwe 3 steeds toeneem en na 24 uur inkuberingstyd eers afplat maar nog nie 'n laagtepunt bereik tydens die volgende 12 uur inkuberingstyd nie.

Afleiding: Die polisome (mRNA) wat uit hormoonbehandelde diere geïsoleer is, handhaaf die inkorporering van aminosure in polipeptiede in die oösiere vir 'n langer tydperk as polisome wat uit kontrolediere berei is. Dit beteken dat die uteruspolisome (mRNA) wat uit hormoonbehandelde diere geïsoleer is, funksioneel meer stabiel is as die polisome(mRNA) wat uit kontrole-uteri berei is.

5.4 Samevatting

Die hoofdoel van die eksperimente wat in hierdie hoofstuk beskryf is, was om aan te toon hoedanig 'n enkel *in vivo* toediening van 17 β -estradiol die translasië-apparaat van die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot beïnvloed. Die belangrikste gegewens wat na vore gekom het, is die volgende: Hormoon-toediening het nie net 'n toename in die hoeveelheid isoleerbare uterusribosome tot gevolg gehad nie, maar ook die vorming van polisome wat baie vroeg na hormoon-toediening waarneembaar was. Voorts is deur middel van twee verskillende translasië-sisteme aangetoon dat die translasiëvermoë van die uteruspolisome (mRNA) na hormoon-toediening aansienlik toegeneem het. Ten spyte van die variasies in die verloop van die gebeure na hormoon-toediening wat van eksperiment tot eksperiment waargeneem is, het die volgende algemene patroon na vore gekom:

'n Aanvanklike toename in die hoeveelheid, aktiwiteit en organisasie van die komponente wat betrokke is by die translasiemapparaat wat 'n maksimum bereik het 24 uur na hormoontoediening, waarna dit weer afgeneem het (in sommige gevalle tot waardes laer as die kontroles) in die tydperk wat gemonitor is.

HOOFSTUK 6

INVLOED VAN 17 β -ESTRADIOL OP DIE HOEVEELHEID
EN EIENSKAPPE VAN DIE POLISOMALE POLI $\hat{A}$ (+)RNA
IN DIE UTERUS VAN DIE GEOVARIOTOMEERDE VOL=
WASSE ROT

6.1 Inleiding

Ten einde 'n volledige beeld te kry van die wyse waarop *in vivo* toediening van 17β -estradiol die translasië-apparaat van die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot beïnvloed, word die invloed van 17β -estradiol op die hoeveelheid en sekere eienskappe van die polisomale poliA(+)RNA ondersoek. Eerstens word die toepasbaarheid van die standaard isoleringstegnieke vir polisomale poliA(+)RNA vir die isolering van hierdie RNA uit rotuterusribosome ondersoek en daarna die invloed van die hormoon op die akkumulering van die polisomale poliA(+)RNA. Laastens word die invloed van 17β -estradiol op poli(A)-inhoud en die grootte van die polisomale poliA(+)RNA ondersoek.

6.2 Metodes

6.2.1 Isolering van Polisomale PoliA(+)RNA

6.2.1.1 Metode van Aviv & Leder (1972)

PoliA(+)RNA is vanuit rotuteruspolisoombereidings verkry volgens die metode van Aviv & Leder (1972), soos wat dit op 'n roetine basis in ons laboratorium toegepas en volledig deur van der Walt (1977), beskryf is. Die volgende modifikasies is egter aangebring:

- (i) beide die water- en fenolfases is na die eerste fenol-ekstraksie weer eens met fenol en buffer onderskeidelik, gereëkstraheer,
- (ii) 'n kleiner kolom is gebruik, naamlik 0,5g oligo(dT)-sellulose (tipe 2, Collaborative Research, Waltman,

Mass.) in 'n 2,5ml wegdoenbare plastiese spuit en

- (iii) die poliA(+)RNA-fraksie wat tydens die eerste chromatografiesiklus verkry is, is vir 1 minuut by 70°C verhit, vinnig afgekoel en gerechromatografeer. Dit is gedoen om kontaminering van die poliA(+)RNA met rRNA te verhoed (Busch, 1976). Die poliA(+)RNA is dan in die teenwoordigheid van 100mM NaCl met twee volumes etanol by -20°C gepresipiteer. Die gepresipiteerde RNA is met behulp van sentrifugering by 4°C teen 20 000 x g vir 20 minute versamel en in 'n klein volume 10mM Tris-HCl (pH 7,6) opgelos.

6.2.1.2 Metode van Krystosek et al (1975)

Slegs die beginsel van die metode van Krystosek et al (1975), is toegepas, naamlik die direkte chromatografering van ribosome met behulp van oligo(dT)-sellulose, en daarom word die metode soos wat dit toegepas is, meer volledig beskryf: Die ribosome is in bindingsbuffer (10mM Tris-HCl, pH 9,0; 500mM NaCl) gesuspendeer en by kamertemperatuur is 10% SDS bygevoeg tot 'n eindkonsentrasie van 0,5%. Dieselfde kolom as in 6.1.1 is gebruik. Voordat die mengsel op die kolom geplaas is, is dit vir ongeveer 5 minute by 37°C geïnkubeer onderwyl dit goed geskud is. Die kolom is daarna agtereenvolgens met 5ml bindingsbuffer wat 0,5% SDS bevat, 5ml bindingsbuffer sonder SDS en 5ml 10mM Tris-HCl (pH 7,6) wat 100mM KCl bevat, gewas. Die gebonde RNA is geëluëer met 2,5ml gedistilleerde water en by hierdie fraksie is NaCl en Tris-HCl (pH 7,6) gevoeg tot 'n eindkonsentrasie van 500mM en 10mM onderskeidelik. Daarna is die mengsel vir 1 minuut by 70°C geïnkubeer, vinnig afgekoel en gerechromatografeer. Die finale poliA(+)RNA-fraksie is weer eens met gedistilleerde wa-

water geëlueer, 100mM ten opsigte van NaCl gemaak en met twee volumes etanol by -20°C gepresipiteer. Die gepresipiteerde RNA is met behulp van sentrifugering teen $20\,000 \times g$ vir 20 minute versamel en in 'n klein hoeveelheid water opgelos.

- Opmerkings:
1. Alle buffers en gedistilleerde water wat gebruik is, is vooraf met diëtielpirokarbonaat behandel (Ehrenberg et al, 1976): diëtielpirokarbonaat is 'n RNase-inhibeerder en is bygevoeg tot 'n eindkonsentrasie van 0,2%. Hierna is die buffers en water eers vir sowat 2 uur by 40°C en daarna oornag by 70°C gelaat om die diëtielpirokarbonaat te laat afdamp. Dit is nodig want diëtielpirokarbonaat denatureer nie net proteïene nie, maar reageer ook met RNA wat inaktivering van mRNA tot gevolg kan hê (Ehrenberg et al, 1976).
 2. Die metode van Aviv & Leder is aanvanklik gebruik maar is later vervang met die van Krystosek. Dit is gedoen omdat
 - (i) laasgenoemde metode baie matiger is (Die fenol-ekstraksiefase word uitgelaat). Hierdeur is daar minder verlies van RNA asook minder aggregering tussen die verskillende RNA-tipes (Perry et al, 1972; McNaughton et al, 1974) en
 - (ii) dit is 'n eenvoudige prosedure wat nie so tydrowend is nie

(iii) met behulp van laasgenoemde metode kan poliA(+)RNA uit baie klein hoeveelhede polisomale materiaal geïsoleer word.

3. Die doeltreffendheid van die kolom is gereeld met kommersiële poliA(+) getoets.

4. Die konsentrasie van die poliA(+)RNA is spektrofotometries bepaal: $24A_{260}$ eenhede = 1mg RNA (Favre et al, 1975).

6.2.2 $\{^3H\}$ Poli(U)-hibridisering

Poli(A)-poli(U)-hibridisering is uitgevoer volgens die metode van Bishop et al (1974). Die monsters (RNA of ribosome) is in 200 μ l bindingsbuffer (10mM Tris-HCl, pH 7,6; 200mM NaCl; 5mM Magnesiumasetaat) opgelos. Hierby is 5 μ l van 'n $\{^3H\}$ poli(U)-oplossing (1 μ Ci in 200 μ l; 21-74 Ci/mmol, Miles) gevoeg. Die mengsel is 15 minute by 30°C gekubeer waarna 5 μ l van 'n pankreas RNase-oplossing (1mg/ml) bygevoeg en die mengsel weer eens by 30°C vir 30 minute gekubeer is. Hierna is die reaksiemengsel op ys geplaas en *E.coli*-tRNA (1,0A₂₆₀ eenheid) is as draer-RNA bygevoeg, gevolg deur 2ml yskoue 10% TCA. Die radio-aktiewe RNase-weerstandbiedende hibriede is deur middel van filtrering op Millipore filters herwin en die radio-aktiwiteit is bepaal soos in 4.2.2

6.2.3 In situ merking van poliA(+)RNA

Die inkuberingskondisies was soortgelyk aan dié wat deur Frolik en Gorski (1977) en Aziz & Knowler (1978) gebruik is om

uterus poliA(+)RNA radio-aktief te merk. Uteri (ongeveer 500mg weefsel) is in klein stukkie gesny en vir 30 minute by 37°C in 2,5ml Eagle se minimale Essensiële Medium (Gibco) waar= in 50µCi {2-³H}-adenosien (23Ci/mmol) teenwoordig was, geïnkubeer. 'n Mengsel van 95% O₂ en 5% CO₂ is voortdurend deur die inkubasiemengsel geborel. Na inkubering is polisome uit die uterusweefsel geïsoleer waaruit die poliA(+)RNA berei is.

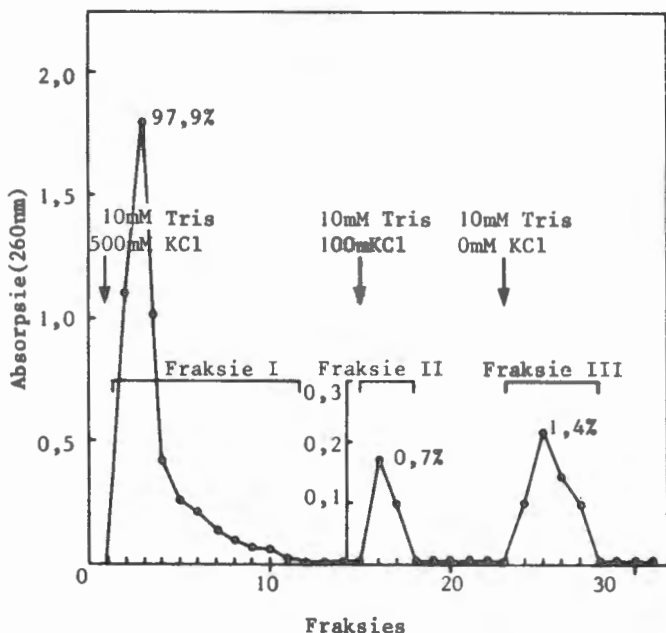
6.2.4 Gradiëntanalise van Poli A(+)RNA

Die sedimentasie-eienskappe van polisomale poliA(+)RNA is met behulp van 5-20% liniêre sukrosegadiënte wat in 10mM Tris-HCl (pH 7,6), 100mM NaCl en 1mM EDTA (Knowler & Smellie, 1973) berei is, bepaal. Voordat die RNA op die gradiënte geplaas is, is dit vir 1 minuut by 70°C geïnkubeer en vinnig afgekoel om aggregering van die RNA te voorkom. Nadat die gradiënte in rotor SW 41 vir 6 uur teen 38 000 o.p.m. by 4°C gesentrifugeer is, is hulle by 260nm gemonitor en in 15-druppelfraksies gefraksioneer. Die radio-aktiwiteit in elke fraksie is met behulp van 2ml Aquagel (Chemlab) bepaal. Totale ribosomale RNA is telkens gelyktydig gesentrifugeer om as merkers vir sedimentasiewaardes (28S, 18S en 5S) te dien. Laasgenoemde is verkry deur 100µg ribosomale materiaal in die teenwoordigheid van 1,0% SDS vir 5 minute by 37°C te inkubeer en dit direk voor sentrifugering op die gradiënte te plaas.

6.3.1 Isolering van polisomale poliA(+)RNA

Ribosome is uit die uteri van geovariotomeerde rotte geïsoleer soos beskryf in 4.2 en geassosiëerde poliA(+)RNA is met behulp van oligo(dT)-sellulose-chromatografie geïsoleer. Aanvanklik is die metode van Aviv & Leder (1972) gebruik maar,

om die redes wat in 6.2.1.2 genoem is, vervang met dié van Krystosek et al (1975). In figuur 6.1 word 'n tipiese elue-ringspatroon geïllustreer van 'n oligo(dT)-sellulose-chromatogram van totale polisomale RNA wat uit geovariotomeerde rotte berei is soos in 6.2.1.1 beskryf. Hierdie voorbeeld ver-teenwoordig die resultaat van die eerste chromatografiesiklus.



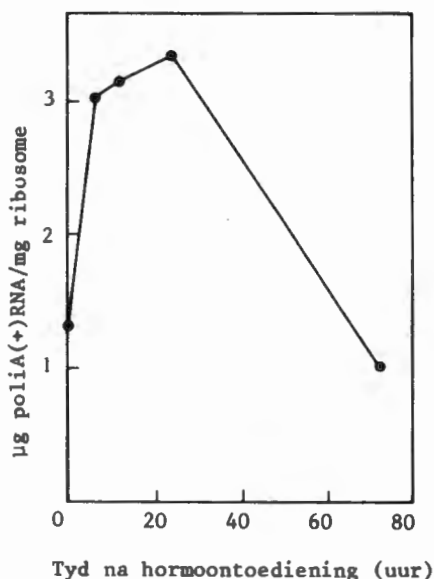
Figuur 6.1 Oligo(dT)-sellulose chromatogram van rotuterus ribosomale RNA. Ribosome is uit geovariotomeerde rotte geïsoleer en totale ribosomale RNA is daaruit berei. 21,1 A₂₆₀/ml totale ribosomale RNA is uit 34 A₂₆₀/ml ribosome berei. Die berei-ding van ribosomale RNA en oligo(dT)-chromato-grafie is uitgevoer volgens die metode van Aviv & Leder (6.2.1.1).

Die patroon van die chromatogram stem baie ooreen met dié van Aviv & Leder (1972) en van der Walt (1977). Die oorgrote meerderheid, nagenoeg 97%, van die RNA-materiaal wat op die kolom geplaas is, word met die bindingsbuffer geëluëer en staan bekend as die ongebonde fraksie of fraksie I. Dit is hoofsaaklik saamgestel uit ribosomale RNA tesame met kleiner hoeveelhede mRNA wat kort of geen poli(A)-segmente bevat nie (Gorski et al, 1974; Sheiness et al, 1975). Wanneer die K^+ -konsentrasie tot 100mM verlaag word, word fraksie II geëluëer wat hoofsaaklik uit ribosomale RNA wat kort oligo(A)-gedeeltes bevat, bestaan. Volgens 'n heel onlangse artikel kan hierdie fraksie ook mRNA-molekules met kort poli(A)-segmente bevat (Desphande et al, 1979). Alleen poliA(+)RNA-molekules met lang poli(A)-segmente behoort nou nog aan die kolom gebonde te wees. Hierdie RNA kan met behulp van water of 10mM Tris-HCl (pH 7,6) geëluëer word. Hierdie is fraksie III en verteenwoordig die meerderheid poliA(+)RNA wat in die totale polisomale RNA bereiding teenwoordig is (Busch, 1976). In die voorbeeld wat in figuur 6.1 geïllustreer word, is 21 A_{260} eenhede totale ribosomale RNA uit 34 A_{260} eenhede ribosomale materiaal (dit is 2,8mg) geïsoleer en van eersgenoemde maak fraksie III ongeveer 1,4% uit. Dit lewer 'n opbrengs van 4,4µg poliA(+)RNA/mg ribosomale materiaal. Omdat dit die resultaat van die eerste chromatografiesiklus is, met ander woorde kontaminering met rRNA is nog nie deur verhitting en herfraksionering uitgeskakel nie, mag hierdie hoë opbrengs misleidend wees (kyk 6.3.2). Nietemin, dit blyk dat die tegniek van oligo(dT)-sellulosechromatografie doeltreffend aangewend kan word vir die isolering van polisomale poliA(+)RNA van rotuterus.

6.3.2 Die invloed van 17 β -estradiol op die inhoud van polisomale RNA aan poli A(+)RNA

Om die invloed van *in vivo* hormoontoediening op die akkumulering van polisomale poli A(+)RNA in die uterus van die geovariotomeerde rot te bepaal, is soos volg te werk gegaan: Polisome is op verskillende tye na hormoonbehandeling uit die uteri van geovariotomeerde rotte geïsoleer soos in 4.2.1 beskryf. Vervolgens is poli A(+)RNA uit die polisoombereidings geïsoleer. Die hoeveelheid poli A(+)RNA wat geïsoleer is, is spektrofotometries bepaal en die opbrengs is uitgedruk as μg poli A(+)RNA/mg ribosomale materiaal. In figuur 6.2 word die resultate van vier sulke eksperimente saamgevat. Die opbrengs polisomale poli A(+)RNA uit onbehandelde rotte is $1,35\mu\text{g}/\text{mg}$ ribosome wat ongeveer 'n kwart is van die opbrengs van die voorbeeld van figuur 6.1. Die waardes wat in figuur 6.2 weergegee is, is verkry na die tweede chromatografieseklus.

Na hormoontoediening volg 'n vroeë aansienlike toename in die hoeveelheid isoleerbare polisomale poli A(+) RNA. Binne 6 uur is daar 'n toename van 125% waarna 'n meer geleidelike toename volg en na 24 uur word 'n maksimum toename van 198% bo die kontrole waargeneem. Gedurende die tydsverloop tot 72 uur na hormoontoediening neem die opbrengs polisomale poli A(+)RNA af tot 'n waarde wat ongeveer 15% laer is as in die geatrofeerde uterus. Hierdie resultate dui daarop dat *in vivo* hormoontoediening 'n invloed het op die akkumulering van polisomale poli A(+)RNA. Dit beteken dat die hoeveelheid polisoom-geassosiëerde mRNA-molekules wat oor 'n poli(A)-segment beskik, na hormoonbehandeling toeneem en na verloop van langer tye weer afneem.



Figuur 6.2 Die opbrengs van uterus polisomale polyA(+)-RNA met verloop van tyd na hormoon-toediening. Uit ribosome wat op verskillende tye na hormoon-toediening geïsoleer is, is polyA(+)-RNA met behulp van oligo(dT)-sellulosechromatografie geïsoleer (6.2.1). Die RNA-konsentrasie is bepaal soos in opmerking 4 (6.4.2) aangetoon en die opbrengs is uitgedruk as µg polyA(+)-RNA/mg ribosomale materiaal.

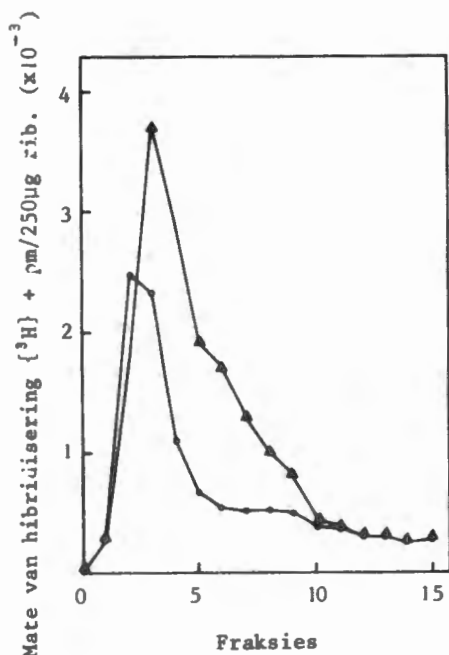
6.3.3 ^3H Poli(U)-hibridisering met polisomale polyA(+)-RNA

Die poli(A)-inhoud van die polisomale polyA(+)-RNA kan met behulp van hibridisering daarvan met ^3H poli(U)-bepaal word (6.2.2). Hoe meer poli(A) in die RNA teenwoordig is, hoe meer poli(U) sal daarmee hibridiseer en dit sal weerspieël word in die hoeveelheid radio-aktiwiteit wat uiteindelik gemonitor word. Hierdie tegniek word algemeen in die literatuur toegepas vir die bepaling van die hoeveelheid poli(A) in RNA-

bereidings (Schultz, 1975; Tata & Baker, 1975; Clark & Kidder, 1977). Die volgende eksperiment is uitgevoer om enige modifikasies van die poli(A)-inhoud van die polisomale poliA(+)RNA na hormoontoediening te monitor, naamlik 'n vergelyking van die elueringsprofile van fraksie III van die oligo(dT)-sellulosechromatogramme van kontrole- en hormoonbehandelde uteruspolisoombereidings. Voorts is die poli(A)-inhoud van hierdie RNA bepaal met behulp van hibridisering van die RNA met $\{^3\text{H}\}$ Poli(U).

Die elueringsprofile van die poliA(+)RNA-fraksie van kontrole- en hormoonbehandelde diere is soos volg verkry: ribosome is berei uit die uteri van onbehandelde en 15-uur hormoonbehandelde geovariotomeerde rotte. Hierdie ribosomale bereiding (gelyke hoeveelhede) is aan oligo(dT)-sellulosechromatografie onderwerp volgens die metode van Krystosek et al (1975), soos beskryf in 6.2.1.2. Fraksie III van die chromatogram is in 15 fraksies verdeel en $\{^3\text{H}\}$ poli(U)-hibridisering is op elke fraksie uitgevoer soos in 6.2.2 beskryf is. Die resultate van so'n eksperiment wat in figuur 6.3 geïllustreer word, dui op die volgende.

1. Die mate van hibridisering het na hormoonbehandeling toegeneem. In die geval van die behandelde diere was die mate van hibridisering, soos weerspieël word in 'n totaal van 16 873 tpm teenoor 'n totaal van 10 982 tpm in die geval van kontrolediere. Dit verteenwoordig 'n styging van ongeveer 53% in die mate van hibridisering.
2. Die elueringspatroon tussen die twee groepe verskil ook. In die geval van die behandelde diere word meer van die materiaal later uit die kolom geëluëer as in die geval van die kontrolediere.



Figuur 6.3 $\{^3\text{H}\}$ Poli(U)-hibridisering met fraksie III van 'n oligo(dT)-sellulosechromatogram van rotuterus-ribosome. Ribosome is geïsoleer uit uteri van kontrole en 15 uur-behandelde rotte en oligo(dT)-sellulosechromatografie is met hierdie ribosome uitgevoer volgens die metode van Krystosek et al (1975). Van beide bereidings is 259µg ribosome gechromatografeer en fraksie III van die chromatogram is in 5 druppels/fraksie gefraksioneer en $\{^3\text{H}\}$ Poli(U)-hibridisering is op elke fraksie uitgevoer soos in 6.1.3 beskryf.

Kontrole, •—•;

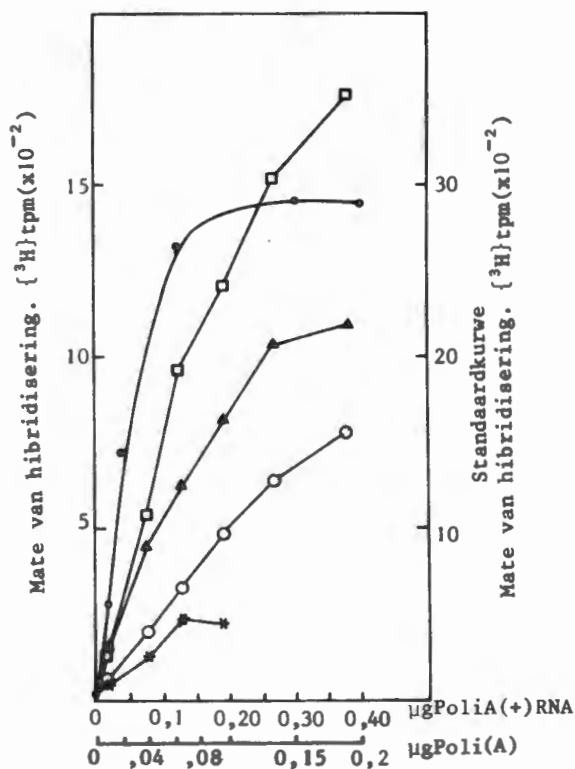
15 uur na hormoonbehandeling, ▲—▲.

Hierdie resultate is 'n verdere bevestiging dat hormoonbehandeling 'n invloed het op die uterus polisomale poliA(+)RNA

Die resultate van figuur 6.3, dit is die verskil in die mate van hibridisering en die elueringspatroon, kan die gevolg wees van óf die teenwoordigheid van meer polisoomgeassosieëerde poliA(+)RNA (dit wil sê 'n toename in die mRNA-inhoud) óf dat die poliA(+)RNA langer poli(A)-segmente bekom het (dit wil sê onveranderde mRNA-inhoud), of beide.

Veranderinge in die poli(A)-inhoud van die polisomale poliA(+)RNA kan voorts bepaal word deur titrering van hierdie RNA teenoor $\{^3\text{H}\}$ Poli(U) (dit is met toenemende konsentrasies poliA(+)RNA wat op verskillende tye na hormoonbehandeling berei is). Die hoeveelheid poli(A) in die poliA(+)RNA kan dan bepaal word uit 'n standaardkurwe wat met behulp van kommersiële poli(A) verkry is. Om vas te stel of *in vivo* hormoontoediening die poli(A)-inhoud van die polisomale poliA(+)RNA enigszins beïnvloed, is so 'n eksperiment uitgevoer op polisomale poliA(+)RNA wat op verskillende tye na hormoontoediening berei is.

Polisomale poliA(+)RNA is berei uit uteri van kontrolediere en diere 6, 12 en 24 uur onderskeidelik na 'n enkele hormoontoediening. Vir elke eksperimentele groep is reaksiemengsels sodanig saamgestel (6.2.3) dat die poliA(+)RNA-konsentrasies daarvan van 0 tot $0,38\mu\text{g}$ RNA verloop het (behalwe vir die kontrole groep) en die standaard poli(A)-reeks se konsentrasies van $0-0,2\mu\text{g}$ poli(A). $\{^3\text{H}\}$ Poli(U)-hibridisering is op elkeen van hierdie fraksies uitgevoer soos beskryf in 6.2.3 en die mate van hibridisering is as $\{^3\text{H}\}$ tpm. uitgedruk. Die resultate word in figuur 6.4 gegee. Uit 'n vergelyking van die kurwes van figuur 6.4 kom die volgende na vore:



Tabel 6.4

$\{^3\text{H}\}\text{Poli(U)}$ -hibridisering met toenemende kon= sentrasies polisomale poliA(+)RNA. Polisoma= le poliA(+)RNA is volgens die metode van Aviv & Leder (1972) berei uit uterusribosome wat op verskillende tye na hormoon-toediening geïsoleer is. $\{^3\text{H}\}\text{Poli(U)}$ -hibridisering is uitgevoer soos in 6.1.3 beskryf.

Kontrole, *—*

6 uur, ○—○

12 uur, ▲—▲

24 uur, □—□

Poli(A) standaardkurve, ●—●

1. Vir al die eksperimentele groepe (kontrole 6, 12 en 24 uur na hormoon-toediening) geld dat namate die RNA-konsentrasie toeneem, die mate van hibridisering insgelyks toeneem. Behalwe in die geval van die kontrolegroep, is daar geen betekenisvolle afplatting van die kurwes nie en gevolglik is geen volledige versadigingskrommes verkry nie. In hierdie gevalle is daar dus nog poli(A)-gedeeltes in die poli A(+)RNA wat nie met poli(U) gehibridiseer het nie.
2. Die mate van hibridisering neem toe namate die tyd na hormoon-toediening verloop. Dit dui daarop dat die uiteinde=like versadigingsvlakke van die RNA's van die verskillende eksperimentele groepe, dit is daardie vlak van hibridi=sering waar al die poli(A) in die RNA met poli(U) gehibri=diseer het, met verloop van tyd na hormoon-toediening op hoër vlakke van hibridisering sal voorkom. Die betekenis hiervan is dat die hoeveelheid poli(A) wat in die poliso=male poli A(+)RNA voorkom, met verloop van tyd na hor=moon-toediening, toeneem.
3. Die poli(A)-standaardkromme bereik 'n versadigingsvlak en plat af. (Die mate van hibridisering van die eksperimen=tele groepe en dié van die poli(A)-versadigingskromme word op verskillende skale in dieselfde figuur weergegee).

Om die poli(A)-inhoud van die verskillende eksperimentele groe=pe te bepaal, is die formule wat Clark & Kidder (1977) vir dieselfde doel toegepas het, gebruik:

$$\% \text{Poli(A)} = \frac{\text{tpm}/\mu\text{g RNA}}{\text{tpm}/\mu\text{g Poli(A)}} \times \frac{\text{mol.massa AMP}}{\text{mol.massa UMP}} \times 100$$

Aangesien geen volledige versadigingskurwes met poli(U)-hibridisering (figuur 6.4) verkry is nie, is die hellings van die betrokke kurwes gebruik vir die bepaling van die % poli(A) van die poliA(+)RNA volgens bogenoemde formule:

1. Uit die poli(A)-standaardkromme word die mate van hibridisering van 0,04 μ g poli(A) deur 2 140 tpm verteenwoordig. Daarom sal die mate van hibridisering van 1 μ g poli(A) deur 53 500 tpm verteenwoordig word.
2. Uit die eksperimentele krommes:

Eksperimentele groep	tpm/0,1 μ g	tpm/ μ g
Kontrole	180	1 800
6 uur	260	2 600
12 uur	533	5 330
24 uur	765	7 650

Na toepassing van hierdie waardes in die formule is die waardes van 3,4% Kontrole,

4,9% 6 uur,

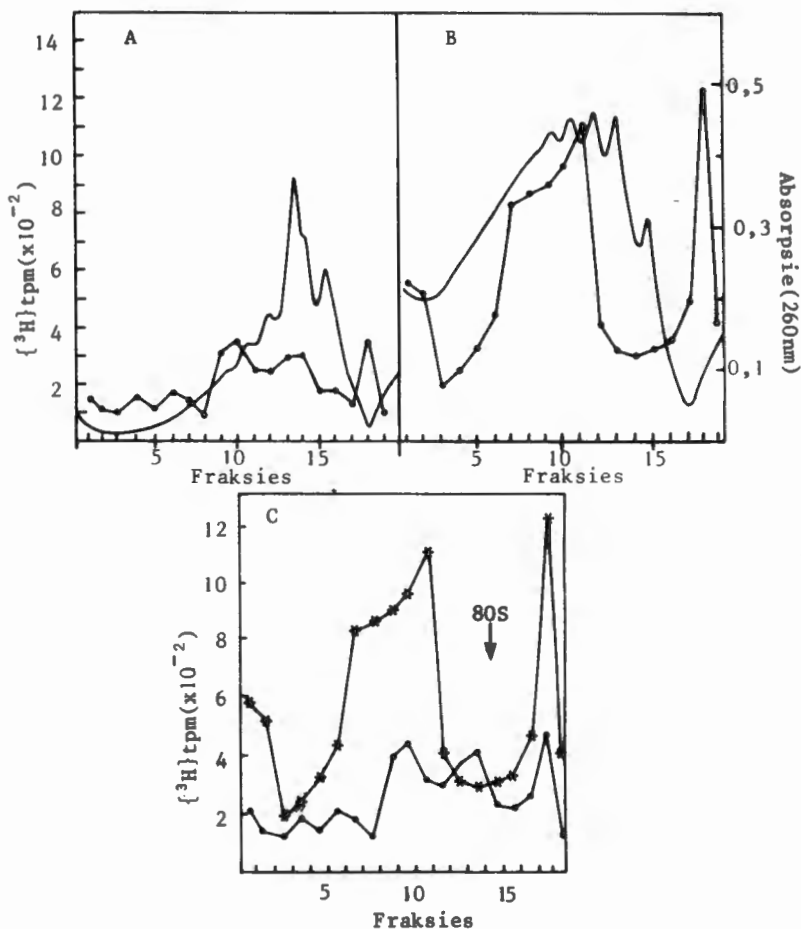
9,9% 12 uur,

14,3% 14 uur vir die poli(A)-inhoud van die poliA(+)RNA van die verskillende eksperimentele groepe verkry. Dit gee 'n toename van 44%, 191% en 320% na 6, 12 en 24 uur onderskeidelik

6.3.4 Polisomale distribusie van poliA(+)RNA

Om te bepaal hoedanig die verspreiding van poliA(+)RNA in polisomale sedimentasieprofiele deur hormoonbehandeling beïnvloed word, is die volgende eksperiment uitgevoer: Uterus=

ribosome is uit onbehandelde en 15-uur behandelde geovariotomeerde rotte geïsoleer en met behulp van sukrosegrediënte geanalyseer soos in Hoofstuk 4 beskryf is. Die gradiënte is egter in 10mM Tris-HCl (pH 7,6) wat 10mM NaCl en 5mM MgCl₂ bevat het, berei. Dit is so gedoen ten einde die ioniese kondisies van die verskillende fraksies makliker aan te pas vir ³H}poli(U)-hibridisering. Na sentrifugering is die gradiënte by 260nm gemonitor en in 15-druppelfraksies verdeel. Elke fraksie is 200mM en 1mM ten opsigte van NaCl en EDTA onderskeidelik, gemaak. ³H}poli(U)-hibridisering is op elke fraksie uitgevoer soos in 6.2.2 beskryf is. Die resultate van hierdie eksperiment (figuur 6.5) toon eerstens die tipiese effek van *in vivo* hormoon-toediening op die sedimentasie-eienskappe van die uterusribosome van die geovariotomeerde rot soos wat dit in Hoofstuk 5 beskryf is. Die verspreiding van die poliA(+)RNA wat weerspieël word deur die radio-aktiwiteitsverspreiding, in die sedimentasieprofiel van die onbehandelde rot (figuur 6.5 A), is heterogeen en nie geassosieer met enige spesifieke gedeelte van die profiel nie. Daarteenoor is die verspreiding van die poliA(+)RNA in die sedimentasieprofiel van die hormoonbehandelde rot (figuur 6.5 B) meer spesifiek en word dit met die groter polisome geassosieer. Die verspreidingspatroon van die poliA(+)RNA volg in hierdie geval dieselfde basiese patroon as die van die polisome in die sedimentasieprofiel. Die radio-aktiwiteit van elke fraksie van die onderskeie gradiënte, soos wat dit eksperimenteel bepaal is, word in figuur 6.5 A & B gegee. In figuur 6.5 C word die mate van hibridisering in elke fraksie so aangedui asof dieselfde hoeveelheid ribosome in beide gevalle geanalyseer is. Die radio-aktiwiteit op die meniskus van die gradiënte is heel waarskynlik as gevolg van hibridisering met RNA-afbraakprodukte en aspesifieke hibridisering en as gevolg



Figuur 6.5 Verspreiding van poliA(+)RNA in polisomale profiele van kontrole (A) en 15-uur hormoon= behandelde rotte. Die polisome is met behulp van sukresegradiënte geanaliseer soos in Hoof= stuk 4 beskryf is. Na sentrifugering is die gradiënte in 15-druppelfraksies verdeel en $\{^3\text{H}\}$ poli(U)-hibridisering is op elke fraksie uitgevoer soos in 6.2.2 beskryf. In figuur C word die mate van hibridisering in elke frak= sie so aangedui asof dieselfde hoeveelheid ri= bosome in beide gevalle geanaliseer is.

van die teenwoordigheid van sitoplasmiese RNP partikels. Dit is so omdat die ribosome tydens hul isolering deur 1,5M sukrese gesedimenteer word, wat die 40S en 60S subeenhede grootliks uitsluit. Die RNP-partikels het 'n sedimentasiewaarde van 30S en sal daarom ook uitgesluit word tydens die polisomale bereidings. Die vrystelling van polisomale RNP-partikels tydens sentrifugering mag waarskynlik 'n bydrae hiertoe lewer. Die totale mate van hibridisering, dit is die som van hibridisering van al die fraksies in die sedimentasieprofiel, in die geval van die hormoonbehandelde diere (figuur 6.5, C, kurwe A), verteenwoordig deur 10 365 tpm is 52% meer as die 4 975 tpm van die kontrolediere (figuur 6.5 C kurwe B). Hormoonbehandeling het dus 'n verandering in die mate van hibridisering van die fraksies van die polisoomprofiel tot gevolg. Die verspreidingspatroon van hibridisering in die polisoomprofiel verander ook na hormoonbehandeling in dié sin dat die heterogene verspreiding in die profiele van die kontrolediere na 'n meer spesifieke assosiasie met die groter polisome verskuif. Beide hierdie veranderings ondersteun vorige bevindings, naamlik dat daar meer poliA(+)RNA met die polisome na hormoontoediening geassosieër word (figuur 6.2) en dat die poli(A)-inhoud van die poliA(+)RNA beïnvloed word (figuur 6.4).

In tabel 6.1 word die resultate van figuur 6.5 verder uitgebrei waar die totale mate van hibridisering met ribosomale bereidings uit uteri van rotte op verskillende tye na hormoontoediening geïllustreer word. Die mate van hibridisering neem toe met verloop van tyd na hormoontoediening, naamlik 36% en 77% bo die kontrole na 6 en 12 uur onderskeidelik, en bereik 'n maksimum van 96% na 24 uur. In die tydsverloop na 48 uur neem die mate van hibridisering af tot 'n waarde van 74% bokant die kontrolewaarde.

Tabel 6.1 Mate van hibridisering van $\{^3\text{H}\}$ poli(U) met uterus=
ribosome met verloop van tyd na hormoon-toediening

Tyd na Stimulering (uur)	Mate van Hibridisering ($\{^3\text{H}\}$ tpm)	% Bo kontrole
0	1 578	-
6	2 145	36
12	2 788	77
24	3 099	96
38	2 739	74

Ribosome wat op verskillende tye na 'n enkele hormoon-toe= diening uit rotuteri geïsoleer is, is geanaliseer en gefrak= sioneer soos in figuur 6.5 beskryf. 212 μg ribosome is op elke gradiënt geplaas. Die mate van hibridisering is die totaal van al die fraksies van die gradiënt waarop $\{^3\text{H}\}$ poli(U)-hibridisering uitgevoer is.

6.3.5 Sedimentasie-eienskappe van polisomale poliA(+)RNA

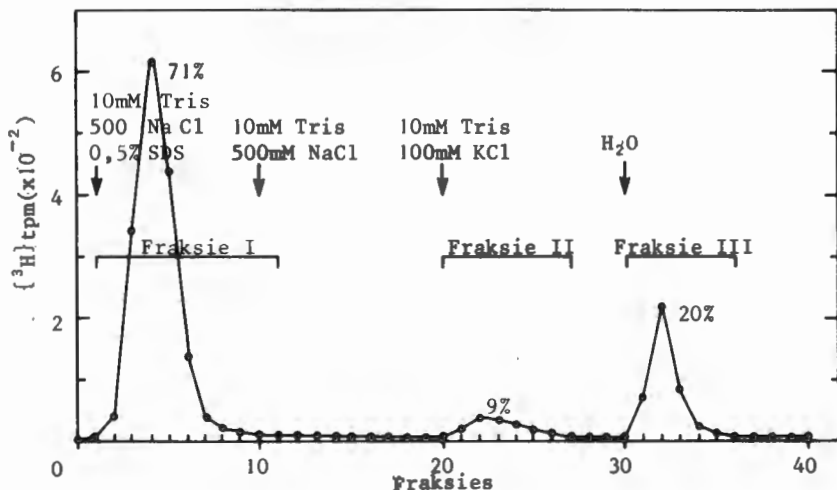
Die resultate oor die invloed van *in vivo* toediening van 17 β -estradiol op die eienskappe van die uterus polisomale poli= A(+)RNA. het tot dusver twee belangrike sake na vore gebring, naamlik 'n verandering in die hoeveelheid polisoomgeassosië= de poliA(+)RNA (6.3.2) en 'n modifikasie van die poli(A)-inhoud van dié RNA (6.3.3). Voortvloeiend hieruit ontstaan die vraag of hormoonbehandeling ook 'n invloed op die grootte van hierdie RNA het. So 'n invloed kan vasgestel word deur gradiëntanalise van die poliA(+)RNA.

Omdat te min materiaal uit die uteri van onbehandelde rotte verkry kon word om die verspreiding van die RNA in die suikrose gradiënte op die konvensionele manier te monitor, is die

poliA(+)-RNA *in situ* radio-aktief gemerk. Dit is gedoen onder soortgelyke kondisies as wat Frolik & Gorski (1977) en Aziz & Knowler (1978) toegepas het om poliA(+)-RNA van die rotuterus radio-aktief te werk. Frolik & Gorski (1977) het die totale uterus-RNA sowel as die poliA(+)-RNA-fraksie daarvan gemerk om vas te stel of enige nuwe tipe RNA na hormoonbehandeling gesintetiseer word, terwyl Aziz & Knowler (1978) die elektroforetiese eienskappe van die poli(A)-segment van rotuterus HnRNA gemonitor het. In beide gevalle is die *in situ* RNA radio-aktief gemerk omdat die beskikbare materiaal te min was om spektrofotometries te monitor. As die RNA op hierdie wyse gemerk word, is ook minder proefdiere nodig en 'n verdere voordeel is dat slegs die nuutgesintetiseerde en daardie RNA's met 'n hoë omset, wat hoofsaaklik mRNA is, gemerk word.

Om die polisomale poliA(+)-RNA in die uterus van die geovariotomeerde rotte *in situ* te merk, is die uteri geïnkubeer soos in 6.2.3 beskryf. Na inkubering is ribosome uit hierdie uteri berei en daarna poliA(+)-RNA volgens die metode van Krystosek (6.2.1.2). In figuur 6.6 word die oligo(dT)-sellulosechromatogram van ribosome wat uit geïnkubeerde uteri berei is, geïllustreer. Die algemene patroon stem ooreen met die van figuur 6.1 en adenosien is in al drie fraksies geïnkorporeer. Die verhouding van die fraksies tot mekaar in figuur 6.1, verskil, soos te wagte, egter aansienlik in figuur 6.6, naamlik fraksie I, II en III dra in laasgenoemde geval 71, 9 en 20% onderskeidelik tot die totale chromatogram by, terwyl dit in die eerste geval 97, 0,7 en 1,4% was. Dit kan die gevolg wees van die feit dat die adenosien in verskillende mates in die RNA's wat deur die verskillende fraksies verteenwoordig word, geïnkorporeer is. Fraksie I

is normaalweg in 'n totale volume van 5ml versamel en fraksie III is na die tweede chromatografiesiklus met 1ml H₂O geëluëer.

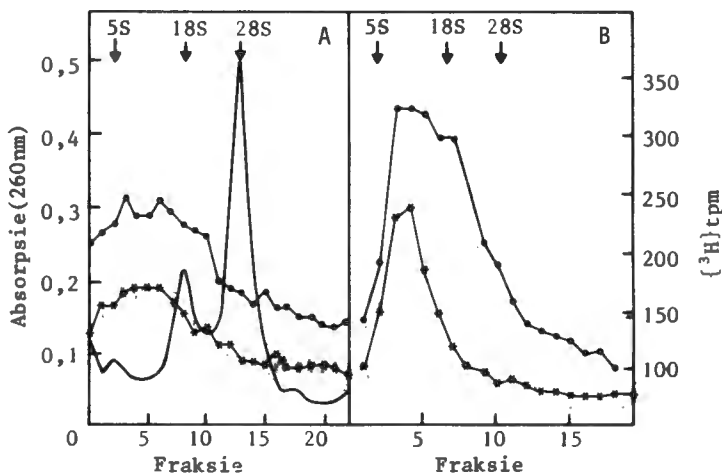


Figuur 6.6 Oligo(dT)-sellulosechromatogram van uterusribosome geïsoleer uit geovariotomeerde rotte. Die ribosome is uit uteri wat in die teenwoordigheid van $\{^3\text{H}\}$ -adenosien geïnkubeer is, soos beskryf in 6.2.3, geïsoleer. Oligo(dT)-sellulosechromatografie is uitgevoer volgens die metode van Krystosek et al (1975). Die radioaktiviteit in die fraksies van die chromatogram is bepaal soos in 6.2.4 beskryf.

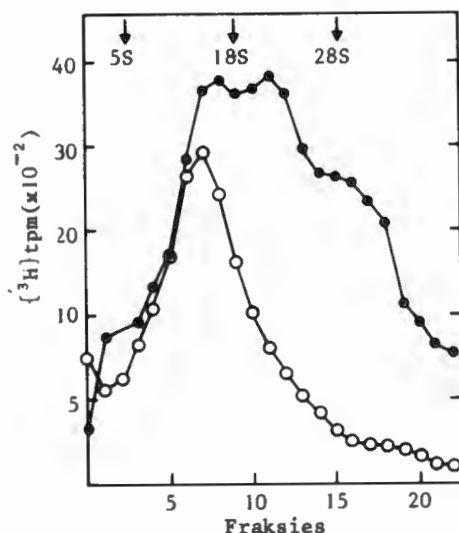
Om die invloed van *in vivo* hormoontoediening op die sedimentasie-eienskappe van die uterus polisomale poliA(+)RNA te bepaal, is uteri van onbehandelde en 15-uur hormoonbehandelde diere onderskeidelik, *in situ* gemerk en die poliA(+)RNA berei soos beskryf vir figuur 6.6. Sukrosegrediëntanalise is uitgevoer soos in 6.2.4 beskryf. In figuur 6.7 word die re-

sultate van so'n eksperiment gegee. In figuur 6.7 A word die sedimentasie-eienskappe van fraksie I en in figuur 6.7 B die sedimentasie-eienskappe van fraksie III van beide kontrole- en hormoonbehandelde diere, vergelyk. Die optiese digtheidsprofiel in figuur 6.7 A vertoon duidelik, goed gedefiniëerde pieke van die rRNA en baie min materiaal bly op die meniskus van die gradiënt agter. Dit dui daarop dat die RNA intakt is. Daarom kan aanvaar word dat die verspreiding van die radio-aktiwiteit in die sedimentasieprofiel ook intakte RNA-spesies sal verteenwoordig. Opmerklik in figuur 6.7 A is dat die verspreiding van die radio-aktiwiteit nie saamval met dié van die rRNA nie, maar meer homogeen versprei is. Dit verteenwoordig dus nie rRNA nie maar, soos wat dit by figuur 6.1 bespreek is, heelwaarskynlik poliA(-)mRNA's en ook poliA(+)RNA wat kort poli(A)-segmente het, waarin tydens die inkuberings tyd ook adenosienresidue geïnkorporeer is. Die verspreiding van die radio-aktiwiteit in figuur 6.7 B verskil duidelik van die van fraksie I: dit is beperk tot redelik goed gedefiniëerde pieke en val ook nie saam met die rRNA-merkers nie. Hormoonbehandeling het 'n toename in die inkorporering van adenosienresidue in die RNA van fraksie I (figuur 6.7 A) tot gevolg maar nie 'n betekenisvolle verandering in die patroon van verspreiding daarvan in die sedimentasieprofiel nie. Insgelyks het hormoontoediening nie slegs 'n toename in die inkorporering van adenosienresidue in die poliA(+)RNA-fraksie (fraksie III) tot gevolg nie, maar ook 'n verandering in die sedimentasie-eienskappe daarvan, naamlik dat 'n groter hoeveelheid swaarder materiaal in die sedimentasieprofiel teenwoordig is. Hierdie verandering word beter geïllustreer in figuur 6.8 waar die resultate van 'n ander soortgelyke eksperiment, weergegee word. (Net die sedimentasieprofiel van die poliA(+)RNA word gegee). In hierdie geval (figuur 6.8) is die invloed van

hormoonbehandeling op die sedimentasie-eienskappe van die polisomale poliA(+)RNA nog duideliker as in figuur 6.7 B en oorheers die swaarder materiaal die sedimentasieprofiel. Die verandering in die sedimentasiewaarde van die poliA(+)RNA na hormoonbehandeling, as dit volgens figuur 6.8 bereken word, verander van 'n RNA met 'n gemiddelde sedimentasiewaarde van ongeveer 13S (dit variëer van 5-25S) tot 'n heterogene populasie wat variëer van 13-35S.



Figuur 6.7 Gradiëntanalise van die ongebonde (A) en poliA(+)RNA (B) fraksies van 'n oligo(dT)-chromatogram van uterus polisome uitgevoer volgens die metode van Krystozek. Die polisome is geïsoleer uit onbehandelde (*—*) en 15-uur hormoonbehandelde (•—•) uteri wat *in situ* geïnkubeer is, soos beskryf in 6.1.5. Die sentrifugeringskondisies, fraksionering van die gradiënte en die bepaling van die radio-aktiwiteit in elke fraksie, is uitgevoer soos beskryf in 6.1.6. Slegs 1ml van fraksie I is op die gradiënte geplaas en 1ml van fraksie III.



Figuur 6.8 Gradiëntanalise van die poliA(+)RNA-fraksie van 'n oligo(dT)chromatogram van uteruspolisome. Die eksperimentele kondisies was dieselfde as vir figuur 6.7, behalwe dat die gradiënte vir 7,5 uur gesentrifugeer is..

6.4 Samevatting

Die invloed van *in vivo* hormoontoediening op die hoeveelheid en eienskappe van die polisomale poliA(+)RNA in die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot, kan soos volg saamgevat word: die toename in die hoeveelheid polisoomgeassosieerde poliA(+)RNA gaan gepaard met 'n toename in die gemiddelde poli(A)-inhoud daarvan. Verder word beide die hoeveelheid poliA(+) en poliA(-) polisomale RNA beïnvloed, en laastens is veranderinge in die sedimentasie-eienskappe van slegs die poliA(+)RNA waargeneem.

HOOFTUK 7

BESPREKING

7.1 Inleiding

In hierdie ondersoek is die invloed van 17β -estradiol op faktore wat betrokke is by proteïensintese in die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot bestudeer. Van hierdie faktore is veranderinge in beide die sintese-apparaat en die mRNA. Die samehang van hierdie waarnemings ten opsigte van die situasie in die geatrofeerde uterus en die aktief-groeiende uterus sal in hierdie hoofstuk bespreek word.

7.2 Monosome en Polisome in die uterus

7.2.1 Ribosome in die geatrofeerde uterus van die geovariotomeerde volwasse rot

'n Ultrastrukturele ondersoek van die epiteelselle van die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot (Brökelman, 1977) toon aan dat die ribosome hoofsaaklik as monosome teenwoordig is. Namate die tyd na ovariectomie verloop, neem die hoeveelheid polisome af en na 4 tot 6 weke is daar geen polisome teenwoordig nie. In aansluiting hierby is in 'n ondersoek na die sedimentasie-eienskappe van uterusribosome (Moore & Hamilton, 1964; Teng & Hamilton, 1967 a) die teenwoordigheid van prominente 110S en 78S pieke sonder enige oligosome waargeneem. Moore & Hamilton (1964) interpreteer laasgenoemde gegewens sodanig dat die afwesigheid van oligosome en polisome die gevolg is van die homogeniseringsprosedure. Hierdie interpretasie is egter nie korrek nie, aangesien die ultrastrukturele ondersoeke direk by die sedimentasiegegevens aansluit. Die *in vivo* organisasie van die ribosome in die geatrofeerde uterus is dus waarskynlik hoofsaaklik monosome met min oligosome en geen polisome nie.

In hierdie ondersoek is na eksperimentering met verskillende isoleringsmetodes 'n metode ontwikkel (4.2.1) waarvolgens ribosome uit die geatrofeerde uterus berei is wat na alle aanduidings 'n getroue beeld van hul *in vivo* organisasie gee. Hierdie gevolgtrekking word gemaak omdat die metode ook geskik is om goeie polisome uit die aktief-groeiende uterus (figuur 5.5) sowel as uit ander weefsel, byvoorbeeld hartspeer (figuur 4.3), te isoleer. Hierdie isoleringsmetode lewer ook ribosome wat aktief ten opsigte van *in vitro* proteïensintese by fisiologiese verantwoordbare kondisies (figuur 4.6; Whelly & Barker, 1974) is. Die resultate wat met behulp van hierdie metode van polisoom-isolering verkry is, toon aan dat:

1. Die meeste ribosome is in die geatrofeerde uterus as monosome teenwoordig met min oligo- en polisome (figuur 4.1).
2. Die *in vitro* aktiwiteit van die ribosomale bereidings is relatief laag (figuur 5.9). Dit beteken dat die proteïensintese-aktiwiteit in die geatrofeerde uterus waarskynlik laag is.

Hierdie waarnemings ten opsigte van die geatrofeerde uterus sluit aan by biochemiese ondersoeke van ander hormoonresponsiewe organe in die geatrofeerde toestand, byvoorbeeld die kuikenoviduk (Palmiter et al, 1970; Means et al, 1971), die ventrale prostaat van die mannetjie rot (Johnsonbaugh et al, 1976) en die lewer van onvolwasse kuikens (Bast et al, 1977). Hieruit blyk dat proteïensintese in geatrofeerde organe in die algemeen op 'n lae vlak is, soos deur die ultrastrukturele waarnemings van Brökelman (1977) gesuggereer is (2.2.3.4.2).

7.2.2 Dimerisering van uterusribosome

Teng & Hamilton (1967 a) maak die waarneming dat behandeling van hul ribosomale preparate met RNase by 37°C die prominente 110S-piek laat verdwyn. Die verdwyning van die 110S-piek is waarskynlik nie soseer as gevolg van die RNase-behandeling nie, maar eerder as gevolg van die inkubering by 37°C. Hierdie afleiding word gemaak na aanleiding van die resultate wat in figuur 4.2 aangetoon is. Daaruit blyk dat verdwyning van die 110S piek nie deur RNase by 4°C (waarby die ensiem wel aktief is (figuur 5.4)), bewerkstellig kon word nie (figuur 4.2). Na inkubering by 37°C in die afwesigheid van RNase verdwyn die 110S piek wel (figuur 4.2). Dit geskied ten gunste van die 80S-piek (figuur 4.2 A & C). Die 110S-piek wat deur Teng & Hamilton (1967 a) waargeneem is, sowel as dié van hierdie ondersoek, is heel waarskynlik dimere van 80S-monomere.

Die voorkoms van ribosomale dimere in ribosomale bereidings uit eukariotiese selle is nie 'n onbekende verskynsel nie. Ribosomale dimere is waargeneem in rot- en hamsterselle (Reader & Stanners, 1967; Silverman & Lubin, 1975). Ondersoeke deur hierdie outeurs na die kondisies van dimerisering van ribosome dui op die volgende:

1. Dimerisering van ribosome vind by lae temperatuur (0-4°C). plaas.
2. Dimere dissosiëer by hoër temperature, byvoorbeeld 37°C.
3. Dimere word gevorm tussen vrye 80S-monomere en word nie deur 'n mRNA molekule gestabiliseer nie. Hierdie gevolg= trekking volg uit eksperimente waarin gevind is dat temperatuurgedissosiëerde dimere weer by 0°C reassosiëer.

4. Mg^{2+} speel 'n belangrike rol in die vorming van die dimere.
5. rRNA speel eweneens 'n belangrike rol want reassosiasie van gedissosiëerde dimere vind nie plaas indien die monomere voor reassosiasie met RNase behandel word nie (Reader & Stanners, 1967). Hierdie waarneming is verder deur Silverman & Lubin (1975) ondersoek. Uit hulle ondersoek volg dat daar baseparing tussen blootgestelde gedeeltes van die 28S RNA van die 60S-subeenhede plaasvind om so die dimeer te vorm.

Die resultate van hierdie ondersoek sluit by hierdie waarnemings aan:

1. Dimerisering vind plaas by lae temperatuur ($4^{\circ}C$) tussen twee 80S-monomere (figuur 4.2) en die dimere word nie deur 'n mRNA-molekule gestabiliseer nie (figuur 4.5).
2. Voorts is gevind dat Mg^{2+} 'n belangrike rol speel by die vorming (figuur 4.4) en die reassosiasie van die dimeer na temperatuur dissosiasie (figuur 4.5).
3. Reassosiasie van temperatuurgedissosiëerde dimere vind nie plaas indien die monomere vooraf met RNase behandel word nie (figuur 4.5). Dit impliseer dat rRNA moontlik betrokke is by dimeervorming.
4. Dit is bekend dat dimerisering van ribosome 'n spesie-spesifieke verskynsel is (Reader & Stanners, 1967). Dit word ondersteun deur die afwesigheid van dimere in die polisoomprofiel wat in hierdie ondersoek uit uterus- en hartweefsel van skape geïsoleer is (figuur 4.3).

Ultrastrukturele ondersoeke van die rotuterus toon egter aan dat daar geen ribosomale dimere *in vivo* teenwoordig is nie. Dimerisering het dus waarskynlik geen fisiologiese betekenis nie. Die afleiding kan daarom gemaak word dat dimerisering *in vitro* plaasvind weens bepaaldestrukturele karakteristieke inherent aan die ribosome van sekere spesies. Hierdie dimerisering word dan deur bepaalde kondisies soos temperatuur en teenwoordigheid van sekere ione begunstig.

7.2.3 Ribosome in die uterus na toediening van 17 β -estradiol

7.2.3.1 Verandering in die monosoom:polisoomverhouding

Die ondersoek na die invloed van 'n enkele dosis 17 β -estradiol ten opsigte van polisoomvorming in die uterus van die geovario-tomeerde rot dui daarop dat 17 β -estradiol die kinetiek van ribosoomvorming en mRNA-sintese sodanig moduleer dat dit resulteer in die vroeë vorming van polisome wat toeneem met verloop van tyd na hormoon-toediening. Die toename bereik 'n maksimum na 24 uur, gevolg deur 'n afname in polisome wat neig om na (ongeveer) 72 uur 'n laagtepunt te bereik (figuur 5.7). Tesame hiermee is 'n verhoogde mate van proteïensintese wat tot 'n groot mate dieselfde verloop toon tydens die ooreenstemmende tydperk (figuur 5.9). Uit die aard van die saak is die beskikbaarheid van genoegsame hoeveelhede ribosome en mRNA tydens hierdie molekulêre gebeure van kardinale belang. Daarom sal die tempo waarteen die ribosome en mRNA onderskeidelik gesintetiseer word, 'n snelheidsbepalende stap wees in die mate van polisoomvorming en gevolglik in die uiteindelijke handhawing van die tempo van proteïensintese (trofiese reaksie).

Die vorming van polisome in die uterus van die geovariotomeerde de volwasse rot in reaksie op 17β -estradiol, lei tot die slotsom dat die effek van die hormoon geleë moet wees in die beskikbaarheid van sellulêre mRNA's. Hierdie afleiding word goed ondersteun deur die vroeë molekulêre gebeure wat in die literatuuroorsig beskryf is naamlik dat die vroeë stimulerings van HnRNA-sintese en die verwerking daarvan tot mRNA's gevolg word deur die sintese en verwerking van rRNA- en tRNA-voorgangers.

Verdere indirekte gegewens ter ondersteuning van die hoër belading van die mRNA-templaats met ribosome as 'n gevolg van hormoonontdiening, word gegee deur die resultate van Greenman & Kenney (1964) en Khawaja (1976). Hierdie outeurs maak die waarneming dat die selvrye sisteme wat uit uteri van onbehandelde rotte berei is, in die teenwoordigheid van bygevoegde poli(U) meer fenilalanien in polipeptiede inkorporeer as selvrye sisteme wat uit uteri van hormoonbehandelde rotte berei is. Beide hierdie voorbeelde dui op 'n groter belading van die mRNA-templaats met ribosome na hormoonontdiening. Die bevinding van Khawaja (1976) dat nie net die hoeveelheid en aktiwiteit van membraangebonde ribosome na hormoonontdiening toeneem nie, maar dat hulle ook 'n kleiner poli(U)-effek* vertoon as die vrye ribosome, sluit aan by ultrastrukturele waarnemings van Friedericki & DeCloux (1968) dat die hoeveelheid membraangebonde ribosome (polisome) met verloop van tyd na hormoonontdiening, toeneem.

Die afleidings uit die ultrastrukturele waarnemings van Brökel-

* Hierdie "poli(U)-effek" kan as 'n aanduiding dien van die relatiewe endogene templaataktiwiteit of- potensiaal van 'n gegewe selvrye sisteem (Hunter & Korner, 1968).

man (1977) ten opsigte van polisoomvorming in die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot, word eweneens deur die resultate van figuur 5.5 en figuur 5.7 bevestig.

'n Saak wat baie nou hierby aansluit en wat reeds bespreek is, is dat die variasie in die voorkoms van die sedimentasieprofiele van die ribosomale bereidings vanuit die geatrofeerde uterus, hoofsaaklik bepaal word deur die tyd wat verloop tussen die ovariotomering van die diere en wanneer hulle gebruik word. Dieselfde variasie word aangetref in die mate van polisoomvorming na hormoontoediening (figuur 5.5 en 5.6). 'n Vergelyking van die mate van polisoomvorming in hierdie twee voorbeelde dui daarop dat hoe minder dimere en hoe meer oligosome in die sedimentasieprofiele van die onbehandelde diere voorkom (figuur 5.5 A), hoe groter is die mate van polisoomvorming en dat dit dan ook vir 'n langer tyd volgehou word. In figuur 5.5 is daar na 24 uur bykans geen dimere in die sedimentasieprofiele teenwoordig nie en na 72 uur is daar eers weer 'n prominente dimeer-piek. In teenstelling hiermee is die dimeer in figuur 5.6 deurgaans prominent en het polisoomvorming na 48 uur alreeds 'n laagtepunt bereik. Die deurgaanse prominente teenwoordigheid van die dimeer dui daarop dat daar voortdurend vrye ribosome in die sitoplasma teenwoordig was wat nie in polisome opgeneem is nie. Dit is heelwaarskynlik so omdat die reaksie van die uterus in hierdie geval ten opsigte van mRNA-sintese nie genoegsaam was om al die beskikbare ribosome in polisome te laat inkorporeer nie.

Uit hierdie resultate blyk dit dat die hipotese van Teng & Hamilton (1967 b) ten opsigte van die invloed van 17β -estra-diol op die rotuterus (p. 47) nie korrek is nie. Dit beteken

dat die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot na hormoontoediening tipies reageer soos ander hormoonresponsiewe geslagsorgane, byvoorbeeld die kuikenoviduk (Palmiter et al, 1970; Means et al, 1971) en die ventrale prostaat van die mannetjie rot (Johnsonbaugh et al, 1976).

7.2.3.2 Tipes ribosome wat vir polisoomvorming benut word

Wanneer die kinetiek van die akkumulering van ribosome (figuur 5.8) vergelyk word met die patroon van polisoomvorming (figuur 5.7), is dit opvallend dat, tydens die eerste 24 uur na hormoontoediening, die tempo van polisoomvorming nie parallel met die tempo van ribosoomakkumulering verloop nie. In laasgenoemde geval neem die akkumulering van ribosome tydens die eerste 12 uur stadig toe waarna 'n vinniger toename tot 24 uur volg. Dit beteken dat ribosome vir opname in polisome gedurende dié tydperk grootliks uit bestaande bronne verkry word. Indien die neiging tot dimeervorming van ribosomale preparate wat op verskillende tye na hormoontoediening berei is, vergelyk word, word 'n direkte aansluiting by hierdie konklusie gevind.

Uit die bespreking van die verskynsel van dimeervorming, het dit duidelik geword dat die dimere gevorm word deur die aggregering van potensiëel aktiewe 80S monomere wat vry in die sitoplasma voorkom. Die afname in die hoeveelheid dimere met verloop van tyd na hormoontoediening (figuur 5.3), mag die gevolg wees van die inkorporering van die 80S monomere, wat vry in die sitoplasma voorkom, in polisome. Alhoewel dit geen fisiologiese rol vir die dimerisering van die vrye ribosome impliseer nie, is hierdie ribosome tydens die eerste paar uur na hormoontoediening die bron van ribosome vir inkorporering

in polisome. Dit geskied totdat die tempo van ribosoomsintese genoegsaam is om in die aanvraag te voorsien vir die toenemende mate van polisoomvorming. Dit beteken dat die vrye ribosome in die sitoplasma van die geatrofeerde uterus as 'n ribosoomvoorraad dien vir onmiddellike inkorporering in polisome na die vinnige toename van mRNA-sintese na hormoonontoe-diening. Die hoeveelheid dimere wat in die sedimentasiepro-fiele voorkom, kan dus as 'n maatstaf dien van die hoeveelheid vrye ribosome* wat op 'n bepaalde tyd in die sitoplasma voor-kom. Namate die tyd na hormoonontoe-diening verloop, is die mate van ribosoomvorming genoegsaam om in polisome geïnkorporeer te word, terwyl mRNA-sintese steeds toeneem.

Die verandering in die polisoomprofile op langer tye na hor-moonontoe-diening sluit eweneens hierby aan. Minder ribosome kom dan in die polisome voor met die gevolg dat die hoeveelheid monosome in die ribosomale bereidings toeneem (figuur 5.7). Dit word gereflekteer in die hoeveelheid dimere wat in die sedimentasieprofile op langer tye na hormoonontoe-diening voor-kom (figuur 5.5 D en figuur 5.6 E).

Tydens die tydperk wat die polisome na 'n laagtepunt neig, neem die hoeveelheid isoleerbare ribosome ook af. 'n Waarskyn-like rede hiervoor is dat die 80S monomere na terminasie tot 60S en 40S subeenhede dissosieër as deel van die ribosomale siklus (Brañes & Pogo, 1975). Tydens die bereiding van die poli-some word hierdie subeenhede nie deur die 1,5M sukrosekus-sing gesentrifugeer nie en kan dus nie in berekening gebring

* Vrye ribosome: dit is 80S monomere waarmee geen mRNA geassosieër is nie, en wat dus nie aktief in proteïen-sintese is nie.

word in die hoeveelheid isoleerbare ribosome nie. Vandaar waarskynlik die vinnige afname in die hoeveelheid isoleerbare ribosome tussen 24-72 uur na hormoon-toediening.

7.2.3.3 Polisoomvorming by onvolwasse rotte

Daar is reeds daarop gewys (p.49) dat teenstrydighede oor polisoomvorming ook by onvolwasse rotte bestaan. Uit 'n onlangse persoonlike korrespondensie met Dr. J.T. Knowler* blyk dit dat 17 β -estradiol wel polisoomvorming by onvolwasse rotte induseer. Dit word duidelik aangetoon in resultate wat Knowler ingesluit het in 'n artikel wat voorberei is vir publikasie en wat in die loop van 1980 in die pers sal verskyn. Daarin word aangetoon dat polisoomvorming binne 1 uur na hormoon-toediening begin. Aanvanklik word ook ribosome in polisome geïnkorporeer wat in die sitoplasma beskikbaar is voordat nuwe ribosome daarvoor benut word. Alhoewel hulle dit nie beskryf nie, kan uit die voorkoms van die sedimentasieprofiële afgelei word dat die aanvanklike 80S-ribosome ook as dimere teenwoordig is. Hul waarnemings verskil egter van dié in die volwasse rot (figuur 5.7) in die sin dat polisoomvorming by die onvolwasse rot 'n maksimum alreeds na 8-12 uur na hormoon-toediening bereik. Na 16-24 uur neig dit tot 'n laagtepunt. Dit beteken dat polisoomvorming in die volwasse uterus vir 'n veel langer tyd as in die onvolwasse uterus gehandhaaf word.

* Dr. J.T. Knowler,
Dep. Biochemie, Universiteit van Glasco
Glasco G 12 8QQ
Skotland.

7.3 Veranderinge in die *in vitro* aktiwiteit van die uterus-ribosome

Die toename in die *in vitro* aktiwiteit van die uterusribosome as 'n funksie van die tyd na hormoon-toediening, kan, op pervlakkig gesien, afhanklik wees van net die hoeveelheid aktiewe ribosome en die hoeveelheid mRNA wat in die ribosomale bereidings op 'n bepaalde tyd teenwoordig is. Die resultate van hierdie ondersoek dui egter daarop dat daar na hormoon-toediening 'n kwantitatiewe verskil bestaan in die veranderinge in die *in vitro* sintese-aktiwiteit, die hoeveelheid aktiewe polisome (figuur 5.10) en die hoeveelheid polisomale polIA(+)RNA (figuur 6.2). Dit word deur die gegewens wat in tabel 7.1 saamgevat is, geïllustreer.

Tabel 7.1 Kwantitatiewe verskille tussen die *in vitro* aktiwiteit, die hoeveelheid aktiewe polisome en mRNA na hormoon-toediening

Tydsinterval na hormoon-toediening (uur)	Kwantitatiewe verandering ten opsigte van kontrole ¹		
	<i>In vitro</i> sintese aktiwiteit	Aktiewe polisome	Hoeveelheid polIA(+)RNA
0 - 6	2,1	1,3	1,8
0 - 12	3,0	1,5	1,9
0 - 24	4,8	1,6	2,0
0 - 48	5,4	1,2	1,6 ²

- 1 "Kwantitatiewe toename ten opsigte van kontrole" is die hoeveelheid wat die spesifieke parameter meer as die kontrolewaarde is.
- 2 Uit figuur 6.2 bereken.

Die gegewens in tabel 7.1 dui daarop dat die *in vitro* aktiwiteit na hormoon-toediening kwantitatief groter is as beide die hoeveelheid aktiewe polisome en die polisomale poliA(+)RNA. Alhoewel Teng & Hamilton (1967 b) geen verandering in die monosoom:polisoomverhouding van die uterusribosome na hormoonbehandeling waargeneem het nie, het hulle ook wel 'n verhoogde *in vitro* aktiwiteit van die ribosome gevind. Hulle maak die gevolgtrekking dat hormoon-toediening die sintese van nuwe ribosome met ander translasier vermoëns as die ou ribosome tot gevolg het. 'n Soortgelyke konklusie is ook deur Gasde et al (1971) gemaak.

Uit hierdie bespreking volg dus dat die hipotese van Teng & Hamilton (1967b) oor die invloed van 17 β -estradiol op die ribosome (p. 48) slegs gedeeltelik korrek is. Dit kan nou gestel word dat die verhoogde aktiwiteit van die uterusribosome na hormoon-toediening toe te skryf is aan verhoogde polisoomvorming en mRNA-sintese en ook aan die verhoogde translasiel aktiwiteit van die translasiemeganisme as sulks.

Die toename in die sintese-aktiwiteit van die uterusribosome kan weens veranderinge in die sitoplasmiese komponente wees en om die term van Clemens & Tata (1973), te gebruik, weens veranderinge in die intrinsieke aktiwiteit van die ribosome. Dit is egter moeilik om met die beskikbare eksperimentele gegewens uitsluitel te gee volgens watter meganisme die *in vitro* aktiwiteit van die uterusribosome deur *in vivo* hormoon-toediening gemodifiseer word. Heel algemeen kan gestel word dat die molekulêre gebeure wat deur hormoon-toediening geïnisieer word, sodanig gekoördineerd moet verloop dat dit in die verhoogde translasier vermoë van die proteïensintese-apparaat sal resulteer. Dit beteken dat die sintese, verwerking en akkumulering

van al die komponente van die translasiemeganisme gekoördineerd moet verloop. Hierdeur word die kardinale rol van mRNA-beskikbaarheid en -transleerbaarheid geensins gering geskat nie. Die sintese van mRNA is teweens 'n primêre reaksie van die uterus op hormoontoediening (2.2.2).

7.4 Die rol van poliA(+)RNA in die moduleringsproteïensintese

7.4.1 Akkumulering van veranderinge in die strukturele eienskappe van polisomale poliA(+)RNA

Die relatiewe hoeveelheid poliA(+)RNA wat op verskillende tye na hormoontoediening in die polisome teenwoordig is, is met behulp van oligo(dT)-sellulose-chromatografie van die totale polisomale RNA bepaal. Die hoeveelheid polisomale poliA(+)RNA neem aanvanklik (0 tot 6 uur) vinnig toe. In die tydsverloop van 6 tot 24 uur is die toename meer geleidelik. Hierna (24-72 uur) neem dit vinnig af tot 'n waarde laer as die kontrolewaarde (figuur 6.2). Voorts is waargeneem dat die polisomale poliA(+)RNA na hormoontoediening met groter polisome geassosieër is as in die geval van die kontroles. Die verspreiding in die gradiënte was ook meer homogeen na hormoontoediening (figuur 6.5).

Sedimentasie-analise van die polisomale poliA(+)RNA toon dat hormoonbehandeling die molekulêre dimensies van die RNA verander. Dit verander van RNA's met 'n sedimentasieverspreiding van 5S - 25S met 'n gemiddelde waarde van 13S tot RNA's met 'n sedimentasieverspreiding van 13S - 35S met oorwegend hoër molekulêre massa RNA's. Dit kan daarop dui dat die RNA-samestelling van die poliA(+)RNA na hormoontoediening meer

heterogeen word. Dit stem ooreen met die waarneming van Aziz et al (1979 a) vir die onvolwasse rot. Hulle het gevind dat die poliA(+)RNA samestelling 4 uur na hormoon-toediening meer kompleks is as dié van die kontroles. Tog het hulle geen hoogs betekenisvolle verskil tussen die sedimentasieprofiële van hierdie RNA's waargeneem nie. Die RNA wat hulle geïsoleer het, het 'n sedimentasieverspreiding van 5S - 28S met twee pieke van ongeveer 14S en 16S. Na hormoon-toediening is die 14S piek meer prominent maar die algemene sedimentasieverspreiding verander nie. Alhoewel die RNA-samestelling van die poliA(+)RNA 4 uur na hormoon-toediening meer kompleks is as in die kontroles, is die kompleksiteit daarvan nog nie soos wat dit in die volwasse rot is nie (Aziz et al, 1979 b).

'n Verdere hormoongeïnduseerde verandering in die strukturele kenmerke van die poliA(+)RNA is deur hierdie ondersoek aan die lig gebring: Uit die toename in die poli(A)-inhoud van hierdie RNA met verloop van tyd na hormoon-toediening is die gevolgtrekking gemaak dat die lengte van die poli(A)-segment na hormoon-toediening toeneem. Die teenwoordigheid van die heterogene mRNA-populasie bemoeilik die bepaling van die presiese lengte van die poli(A)-segment. Die berekening, soos op p.134 uitgevoer, dui daarop dat die toename in die gemiddelde lengte van die poli(A)-segment wat op tye 6, 12 en 24 uur na hormoon-toediening waargeneem is, 44, 191 en 320% respektiewelik is. Hierdie toename in die lengte van die poli(A)-segment beteken waarskynlik nie dat die lengte van die poli(A)-segment by die heterogene mRNA-populasie van eenvormige grootte is nie. In die geval van onvolwasse rotte het Aziz & Knowler (1978) inderdaad 'n heterogene verspreiding in die lengte van die poli(A)-segmente (80-150 adenienresidue) van HnRNA, wat uit die totale uterus-RNA, geïsoleer is, waargeneem. In

die geval van die onvolwasse uterus maak die poli(A)-segment 7,6% van die totale polisomale poliA(+)RNA uit en dit verteenwoordig 160 adenienresidue (Aziz et al, 1979 a). Hierdie waardes is heelwat hoër as wat vir die volwasse rot in hierdie ondersoek gevind is, naamlik 4,9% na 6 uur.

Dit lyk op hierdie stadium of 'n toename in die lengte van die poli(A)-segment van die poliA(+)RNA 'n karakteristieke invloed van hormoonwerking in die algemeen is. Dit volg uit resultate wat met ander hormone as 17β -estradiol verkry is:

1. Totale nukleêre RNA (De Groot et al, 1977) en polisomale poliA(+)RNA (Konstantinova et al, 1977) van rotlewer na hormoonoediening.
2. Trijodotironien (T_3)-behandeling van rotte waarby hipotiroïdisme opgewek is, het binne 10 uur 'n toename van 38% in die gemiddelde lengte van die poli(A)-segment van totale nukleêre-RNA van rotlewer tot gevolg gehad. Hierdie verlenging in die poli(A)-segment verloop saam met verhoogde RNA-sintese na T_3 -behandeling (De Groot et al, 1977).
3. Ook kortisoonbehandeling van rotte (Konstantinova et al, 1977), het 'n verandering in die lengte van die poli(A)-segment van polisomale poliA(+)RNA tot gevolg gehad.

'n Belangrike aspek ten opsigte van die lengte van die poli(A)-segment kom na vore uit sekere resultate van Konstantinova et al, (1977). Dit word in tabel 7.2 saamgevat. Uit hierdie gegewens is dit duidelik dat die poli(A)-segment van die membraangebonde mRNA na hormoonoediening by voorkeur toeneem.

- Dit pas in by 'n verhoogde mate van proteïensintese deur mem-

braangebonde polisome in die lewer na hormoon-toediening (Tata, 1967). Hierdie verhoogde proteïensintese volg, net soos in die geval van die rotuterus na hormoonbehandeling, op 'n verhoogde sintese van alle RNA-tipes (Konstantinova et al, 1977). Die afname in die lengte van die poli(A)-segment van die poliA(+)RNA van die vrye ribosome dui egter daarop dat die verskynsel van verandering in die lengte van die poli(A)-segment nie sô eenvoudig is nie. 'n Wyer verskeidenheid en meer eksakte analyses as wat tans beskikbaar is, word benodig om verdere uitsluitel hieroor te verkry.

Tabel 7.2 Veranderinge in die lengte van die poli(A)-segment van polisomale totale en poliA(+)RNA na kortisoon-behandeling¹

Oorsprong van RNA	Veranderinge in die lengte van die poli(A)-segment	
	Totale polisomale RNA	PoliA(+)RNA
Vrye polisome	+ 4%	- 7%
Gebonde polisome	+ 106%	+ 304%

¹ Gegewens saamgevat uit Konstantinova et al, (1977).

7.4.2 Translasie van uteruspolisome in oösiere van *Xenopus laevis*

Die translasievermoë van die proteïensintese apparaat van die rotuterus kan op twee moontlike wyses deur mRNA beïnvloed word, naamlik deur die *hoeveelheid* daarvan op 'n bepaalde tyd (Palmiter et al, 1970; Means et al, 1972) en die *funksionele*

stabiliteit daarvan (Nudel et al, 1976; Morrison et al, 1979). Die relatiewe eenvoudige uitvoerbaarheid en die betroubaarheid van die translisering van mRNA's en polisome (Lanclos & Hamilton, 1975; Nudel et al, 1976) in oösiete van *Xenopus laevis*, is benut om beide hierdie moontlikhede te ondersoek.

Deur die inspuiting van uteruspolisome wat op verskillende tye na hormoontoediening geïsoleer is, is aangetoon dat *in vivo* hormoonbehandeling van die geovariotomeerde volwasse rot inderdaad die transleerbaarheid van uteruspolisome in die oösiete beïnvloed (figuur 5.12). Die transleerbaarheid verander as 'n funksie van die tyd na hormoontoediening. Hierdie resultate moet egter in die lig daarvan beskou word dat beide die mRNA-inhoud (Tabel 6.1 en figuur 6.2) en die hoeveelheid aktiewe polisome (figuur 5.10) van die polisoombereidings na hormoontoediening verander. Om te bepaal of hierdie parameters 'n invloed op die transleerbaarheid van die polisome in die oösiete het, is die kwantitatiewe verskille in hierdie parameters as 'n funksie van die tyd na hormoontoediening vergelyk (tabel 7.3).

Uit hierdie gegewens kom die volgende na vore:

1. Tydens die vroeë stadium na hormoontoediening (0-6 uur) speel beide die hoeveelheid aktiewe polisome en die hoeveelheid poliA(+)RNA 'n rol in die bepaling van die mate van transleerbaarheid van die polisome. Hierdie afleiding word gemaak omdat beide die parameters na hierdie tydsverloop 'n groter kwantitatiewe verandering ondergaan het as die translisie van die polisome in die oösiete.

Tabel 7.3 Kwantitatiewe verskil tussen die translase van uteruspolisome in die oösiete van *Xenopus laevis* en die hoeveelheid aktiewe polisome en poliA(+)RNA

Tydsinterval na hormoon= toediening (uur)	Kwantitatiewe veranderinge ten opsigte van die kontrole as 'n funksie van die tyd na hormoon-toediening		
	Translasie in oösiete	Aktiewe polisome	PoliA(+)RNA
0 - 6	1,2	1,3	1,8
0 - 24	2,5	1,6	2,0
0 - 48	1,9 ¹	1,2	1,6

¹ Uit figuur 5.12 bereken

2. Met verloop van tyd na hormoon-toediening speel die hoeveelheid aktiewe polisome 'n al hoe kleiner rol as die hoeveelheid poliA(+)RNA. Dit word afgelei omdat die kwantitatiewe verandering in die hoeveelheid aktiewe polisome deurgaans laer is as die verandering in die translase van die polisome en ook vinniger na 'n laagtepunt neig. 'n Verdere faktor wat hierin 'n rol mag speel is dat die ribosome van die uteruspolisome hoogs waarskynlik met verloop van die inkuberingstyd deur oösietribosome op die uterus-mRNA vervang word. Die uterusribosome word tydens hierdie proses waarskynlik deur die sitoplasma van die oösiet versprei. Dit beteken dat enige modulering van hulle aktiwiteit as gevolg van hormoon-behandeling, nie 'n waarneembare rol speel in die hoeveelheid aminosure wat uiteindelik in polipeptiede geïnkorporeer word nie.

3. Die verloop van die inkorporering van aminosure in polipeptiede (figuur 5.12) is dus hoofsaaklik 'n weerspieëling van die translering van die hoeveelheid mRNA wat ingespuut is, of die transleerbaarheid van hierdie mRNA as 'n funksie van die tyd na hormoon-toediening.

Hieruit kan dus afgelei word dat die oösiëte van *Xenopus laevis* gebruik kan word om die transleerbaarheid en funksionele vermoë van uterus polisomale poliA(+)RNA(mRNA) te monitor sonder om die mRNA as sulks te isoleer en in oösiëte te transleer. Hierdie standpunt en benaderingswyse kom eweneens in ander ondersoeke voor. Deurenberg (1977) het dit gebruik vir die translering van polisome(mRNA) uit *Petunia*-ovaria en deur Lanclos & Hamilton (1975) met lewerpolisome(mRNA). Laasgenoemde outeurs het verder aangetoon dat die mate van inkorporering van aminosure in polipeptiede deur polisome self en die poliA(+)RNA-fraksie wat uit daardie polisome geïsoleer is, dieselfde is.

'n Vergelyking van die funksionele stabiliteit van uterus-mRNA voor en na hormoon-toediening (figuur 5.13) dui daarop dat *in vivo* hormoon-toediening die funksionele stabiliteit van die polisomale mRNA verhoog. Die faktore wat die stabiliteit van die mRNA-molekules bepaal, is grootliks onbekend. Eén moontlike faktor mag die verandering in die lengte van die poli(A)-segment wees (7.4.1).

7.5 Poli(A)-polimerase

Poli-adenilering van beide HnRNA en mRNA vind plaas deur die werking van nukleêre en sitoplasmiese poli(A)-polimerases onderskeidelik (2.2.2.4). Verandering in die adenilering van 'n mRNA tydens veranderde fisiologiese toestande sal dus nie

losstaan van die aktiwiteit van hierdie ensiem nie. In die beskikbare literatuur is niks bekend oor dié ensiem in die rotuterus nie.

Die toename in die lengte van die poli(A)-segment (figuur 6.4) en die verhoogde inkorporering van ^3H -adenosien in polisomale poliA(+)RNA (figuur 6.7 en figuur 6.8) na hormoon-toediening, dui daarop dat die aktiwiteit van die poli(A)-polimerases na alle waarskynlikheid ook toeneem. Die ensiem is egter ook aktief in die geatrofeerde uterus want ^3H -adenosien word wel deur hierdie orgaan *in situ* in polisomale poliA(+)RNA geïnkorporeer (figuur 6.7 en figuur 6.8).

Enkele oriënterende eksperimente oor die aktiwiteit van poli(A)-polimerase self is gedurende die loop van hierdie ondersoek uitgevoer*. Die poli(A)-polimerase-aktiwiteit in rotuteruskerne dui daarop dat hulle aktief is ten opsigte van die adenilering van endogene HnRNA-molekules. Dit is ook waargeneem dat hormoon-toediening 'n verhoogde poli(A)-polimerase-aktiwiteit in die uteruskerne tot gevolg het.

Veranderinge in die poli(A)-polimerase-aktiwiteit met veranderde fisiologiese kondisies is wel al vir ander sisteme beskryf. In rotlewerkerne neem die aktiwiteit van poli(A)-polimerase af na aminosuoronttrekking uit die diëet (Jacob et al, 1976), asook na adrenalectomie (Jacob & Rose, 1978). Verskaffing van aminosure aan die proefdiere asook glukokortikoïed behandeling, verhoog weer die aktiwiteit van hierdie ensiem

* Aangesien die ondersoek nog op inleidende vlak is, is die resultate nie in die proefskrif ingesluit nie.

in beide gevalle. Hierdie verband is egter nog nie bo alle twyfel aangetoon nie. In die kerne van die kwarteloviduk verander die aktiwiteit van hierdie ensiem nie onder verskillende hormonale kondisies nie (Müller et al, 1978). Die aktiwiteit van die de-adenileringsensiem van oviduk-kerne van die kwartel neem egter wel af na hormoonbehandeling.

'n Presiese analise van die veranderinge in die aktiwiteit van hierdie ensieme van beide die kerne en die sitoplasma (waaronder polisoom-geassosiëerd) na ovariectomie en hormoonbehandeling, is egter nodig om te bepaal in hoeverre die poli(A)-polimeraase 'n bydrae lewer tot die modulering van proteïensintese in die uterus.

HOOFTUK 8

OPSOMMING

SUMMARY

DIE MODULERING VAN PROTEÏENSINTESE IN DIE ROTUTERUS DEUR 17 β -ES- TRADIOL

Die modulering van proteïensintese deur steroïedhormone in hul teikenorgane gaan gepaard met veranderinge in die aktiwiteit en hoeveelheid van die subsellulêre komponente wat daarby betrokke is. Die verhoogde aktiwiteit van die proteïensintese-apparaat wat na hormoontoediening volg, word gekenmerk deur die sintese van 'n spesifieke mRNA('s) en die vorming van polisome. Hierdie gebeure is egter nog nie ten opsigte van die rotuterus na behandeling met 17 β -estradiol bevestig nie. Tewens, 'n ondersoek van die literatuur toon leemtes en teenstrydighede aan, veral ten opsigte van die vorming van polisome en die rol van mRNA in die modulering van proteïensintese.

Die invloed van 17 β -estradiol op die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot is bestudeer in 'n poging om 'n bydrae te maak in die opklaring van hierdie leemtes en teenstrydighede. Die geovariotomeerde volwasse rot is vir hierdie doel gebruik omdat 'n enkele toediening van 17 β -estradiol 'n trofiese reaksie van die uterus tot gevolg het wat 'n maksimum na 24 uur bereik en daarna na 'n laagtepunt neig. In hierdie sisteem kon die proteïensintese-apparaat van die uterus in 'n rustende en aktiewe toestand bestudeer word. So ook die verloop van al die molekulêre gebeure wat volg totdat die maksimale trofiese reaksie bereik is.

'n Metode is ontwikkel om ribosome uit die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot te isoleer. Hierdie ribosome besit 'n hoë mate van strukturele integriteit en die voorkoms van hul sedimentasieprofiele weerspieël na alle aanduidings 'n getroue

beeld van hul *in vivo* organisasie. Kenmerkend van hierdie ribosome is om dimere te vorm deur die assosiasie van twee 80S-monomere. Die dimere is nie 'n *in vivo* verskynsel nie maar word tydens die isoleringsproses tussen 80S-monomere, wat vry in die sitoplasma voorkom, gevorm.

'n Enkele dosis 17 β -estradiol verander die monosoom:polisoom-verhouding in die sedimentasieprofiele van oorwegend monosome en oligosome tot oorwegend polisome. Polisoomvorming bereik 'n maksimum na 24 uur wanneer 88% van die ribosome in die sedimentasieprofiele as polisome teenwoordig is. Hierna verloop dit na 'n hoogtepunt wat na 72 uur bereik word. Dan is die hoeveelheid ribosome wat as polisome teenwoordig is, laer as die kontrolewaarde van 64%. 'n Vergelyking van die kinetiek van polisoomvorming aan die een kant en die akkumulering van ribosome en poliA(+)RNA aan die ander kant dui op die volgende: Polisoomvorming neem 'n aanvang met die assosiasie van reeds bestaande ribosome in die sitoplasma met nuutgesintetiseerde mRNA-molekules. Die bestaande ribosome kom vry in die sitoplasma voor en word as die dimere in die sedimentasieprofiele waargeneem. Die sintese van mRNA kan dus beskou word as die primêre reaksie van die uterus ten opsigte van proteïensintese na hormoon-toediening. Daarom is mRNA-beskikbaarheid 'n beperkende faktor tydens die vroeë trofiese reaksie van die uterus. Met verloop van tyd na hormoon-toediening word die beskikbaarheid van ribosome onvoldoende en word die sintese van nuwe ribosome nodig. Vandaar die verhoogde akkumulering van ribosome na 'n aanvanklike sloerfase in hul akkumulering. Gedurende hierdie tyd is die hoeveelheid mRNA genoegsaam om die nuut-gesintetiseerde ribosome in polisome te akkomodeer. Die trofiese reaksie van die uterus gaan dus gepaard met 'n betekenisvolle organisasie van monosome in polisome.

Die kwantitatiewe toename in die *in vitro* aktiwiteit van die ribosomale bereidings is op enige tyd na hormoon-toediening groter as die kwantitatiewe toename in die hoeveelheid ribosome wat as polisome teenwoordig is. Die verhoogde proteïensintese aktiwiteit van die ribosomale bereidings is dus nie net afhanklik van die hoeveelheid mRNA en polisome wat op 'n gegewe tyd teenwoordig is nie. Die verhoogde aktiwiteit van die ribosomale bereidings kon in enige van óf die ribosome óf die mRNA self geleë wees. Die moontlike rol van die mRNA in hierdie verskynsel is ondersoek deur die translasing van die uteruspolisome in oösiëte van *Xenopus laevis*.

In hierdie ondersoek is gevind dat die polisome(mRNA) van die hormoonbehandelde diere hul translasier vermoë in die oösiëte veel langer volhou as dié van die kontrolediere. Dit beteken dat die polisomale mRNA na hormoon-toediening 'n verhoogde funksionele stabiliteit vertoon. 'n Ondersoek na die strukturele karakteristieke van die polisomale poliA(+)RNA het aan die lig gebring dat die lengte van die poli(A)-segmente toeneem het. Beide die hoeveelheid en die grootte van die polisomale poliA(+)RNA het ook na hormoon-toediening toeneem.

Die resultate van hierdie ondersoek het aan die lig gebring dat die uterus van die geovariotomeerde volwasse rot tipies soos ander hormoonresponsiewe geslagsorgane (byvoorbeeld die kuikenoviduk) teenoor hormoonbehandeling reageer.

Sommige van die resultate van hierdie studie is by wetenskaplike kongresse aangebied en ook aanvaar vir publikasie.

1. Pretorius, P.J. en Reinecke, C.J.

The Characterization of uterine Ribosomes.

X^e Kongres van die Internasionale Biochemiese Vereniging. Hamburg, 1976. Opsomming no. 08-2-271, p. 435.

2. Pretorius, P.J. en Reinecke, C.J.

Coordinate Regulation of Protein Synthesis in the Rat Uterus by Estrogen.

Jaarlikse byeenkoms van die Fisiologiese Vereniging van Suider Afrika. Pretoria, 1978. Opsomming: S.A.J. Sci., 75, 274 (1979).

3. Pretorius, P.J. en Reinecke, C.J.

Regulation of Protein Synthesis in the Rat Uterus by estradiol.

XI^e Kongres van die Internasionale Biochemiese Vereniging. Toronto, 1979. Opsomming no. 11-6-S3, p. 612.

4. Pretorius, P.J. en Reinecke, C.J.

Changes in the polyribosomes and polyribosomal poly(A)-containing RNA in the uterus of the ovariectomized rat in respect to estradiol-17 β treatment.

Biochem. J. (aanvaar vir publikasie). Vol. 188 (1980).

THE MODULATION OF PROTEIN SYNTHESIS IN THE RAT UTERUS BY
17 β -ESTRADIOL

(Original title: Die Modulering van Proteïnsintese in die Rotuterus deur 17 β -estradiol)

Pretorius, Petrus, Jacobus. D.Sc.: 1980.

1. Treatment of the ovariectomized rat with 17 β -estradiol results in a marked increase in uterine proliferation. With regard to the molecular biology of the uterus, this change is characterized by a sequential stimulation of the synthesis of macromolecules, the formation of new ribosomes and the mobilization of the tissue's protein synthesizing machinery. Although these events have been well studied, certain reports are still contradictory and other aspects not yet unequivocally established, as is indicated in the literature survey of this thesis.
2. A method have been developed for the isolation of uterine polysomes. These polysomes have a high degree of structural and functional integrity.
3. The ribosomal distribution in the atrophic uterus of ovariectomized rats is characterized by a marked amount (36%) of monosomes and monomers. The monomers tend to dimerize, resulting in structures with a sedimentation value of approximately 110S. These dimers are resistant to RNase-treatment and are accordingly not stabilized in this form due to mutual attachment to a single mRNA. Divalent ions (eg. Mg²⁺) and rRNA may be involved in the interaction between the two 80S monomers. Dimerization

is regarded to be a characteristic of monomeric ribosomes under *in vitro* conditions. This phenomenon apparently does not have a specific physiological function, but is noticed in ribosomes from a limited number of species probably due to structural characteristics inherent to these ribosomes.

4. In response to a single dose of 17β -estradiol to the ovariectomized rat, the amount of polysomes increases, reaching a peak value of approximately 88% polysomes 24 hours after stimulation. Thereafter the proportion of the polysomes decreases to a value of 48% at 72 hours. The proportion of monosomes decreases in the control animals to 11% at 24 hours after hormone treatment, after which the proportion again increases to 48% at 72 hours. The formation of polysomes is not only restricted to treatment with 17β -estradiol, but can also be induced by the plant estrogens, coumestrol and genistein.
5. In the early stages (0-12 hours) after hormone treatment, the 80S monomeric ribosomes are preferentially used for polysome formation. This conclusion is based on the rate of disappearance of the dimers from the polysomal preparations, as judged by sucrose density gradient analysis.
6. An increase in the protein synthesizing capacity of the uterine polysomes occurs concomitantly with the polysome formation. This increase is, however, more extensive than the extent of polysome formation. A maximum increase of 146% is reached 24 hours after hormone treatment, declining again to the 63% of the control value (0 hour) at 72 hours. These results have been obtained by an analysis

of the translation of the uterine polysomes in the oocytes of *Xenopus laevis*. Kinetic experiments in this system suggests that protein synthesis is sustained for longer periods by the polysomes from hormone treated animals than from the controls.

7. Polysomal polyA(+)RNA have been isolated from the polysomes with the aid of affinity chromatography on oligo(dT)-cellulose. After hormone treatment the polysomal polyA(+) RNA rapidly increases from 1,35 μ g/mg ribosomes in the controls to 3,05 μ g/mg ribosomes within 6 hours after treatment. This value slightly increases up to 24 hours after treatment, and then declines to values even less than that from the controls at 72 hours.
8. A comparison between the polyA(+)RNA from control and hormone-treated animals was made by preparing polyA(+)RNA labelled *in situ* by incubation of uterine tissue in the presence of {2 - 3 H} adenosine. The RNA isolated from polysomes prepared from these uteri was fractionated on an oligo(dT)-cellulose column and polyA(+)RNA fractions analyzed by sucrose density centrifugation. The polyA(+)RNA from the controls consists of a heterogeneous population of RNA with a sedimentation value between 5S and 25S. The hormone stimulation results in an increase in both the amount and size (13S to 35S) of the RNA. The higher-molecular-weight RNA predominates in these RNA populations.
9. The poly(A) content of the polyA(+)RNA was determined by hybridization of the polyA(+)RNA to { 3 H}poly(U). These results suggest that the *in vivo* hormone treatment increases the length of the poly(A) segment of the polyA(+)RNA.

10. Parts of results from this study have been presented at scientific meetings and have also been accepted for publications.

1. Pretorius P.J. and Reinecke, C.J.

The Characterization of uterine ribosomes.

Xth International Congress of Biochemistry;

Hamburg,(1976). Abstract no. 08-2-271, p. 435.

2. Pretorius,P.J. and Reinecke, C.J.

Coördinate regulation of protein synthesis in the rat uterus by estrogen.

Annual Meeting of the Physiological Society of Southern Africa, Pretoria,(1978).

(Abstract: S.A.J. Sci., 75, 274 (1979).

3. Pretorius, P.J. and Reinecke, C.J.

Regulation of protein synthesis in the rat uterus by estradiol.

XIth International Congress of Biochemistry,

Toronto,(1979). Abstract no. 11-6-S3 p. 612.

4. Pretorius, P.J. and Reinecke, C.J.

Changes in the polyribosomes and polyribosomal poly(A)-containing RNA in the uterus of the ovariectomized rat in response to estradiol-17 β treatment.

Biochem. J. (accepted for publication).

Vol. 188 (1980).

LITERATUURVERWYSINGS

- ABELSON, J. (1979). *Ann. Rev. Biochem.*, *48*, 1035-1069.
- ABRAHAM, A.K. & PIHL, A. (1978). *FEBS Letters*, *87*, 121-124.
- ADAMS, D.S. & JEFFERY, W.R. (1978). *Biochemistry*, *17*, 4519-4524.
- ANDERSON, N.O. & GORSKI, J. (1971). *Fed. Proc.*, *30*, 361.
- AVADHANI, N.G. (1979). *Biochemistry*, *18*, 2673-2678.
- AVIV, H. & LEDER, P. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *69*, 1408-1412.
- AZIZ, S. & KNOWLER, J.T. (1977). *Biochem. Soc. Trans.*, *5*, 664-667.
- AZIZ, S. & KNOWLER, J.T. (1978). *Biochem. J.*, *172*, 587-593.
- AZIZ, S., BALMAIN, A. & KNOWLER, J.T. (1979 a). *Eur. J. Biochem.*, *100*, 85-94.
- AZIZ, S., BALMAIN, A. & KNOWLER, J.T. (1979 b). *Eur. J. Biochem.*, *100*, 95-100.
- BALIGA, B.S. & BOREK, E. (1974). *Endocrinol.*, *94*, 815-821.
- BARD, E., EFRON, D., MARCUS, A. & PERRY, R.P. (1974). *Cell*, *1*, 101-106.
- BARKER, K.L. (1971). *Biochemistry*, *10*, 284-291.
- BARNEA, A. & GORSKI, J. (1970). *Endocrinol.*, *9*, 1899-1904.
- BAST, R.E., GARFIELD, S.A., GEHRKE, L. & ILAN, J. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *74*, 3133-3137.
- BAULIEU, E.-E (1975). *Moll. Cell. Biochem.*, *7*, 157-174.
- BEECHER, G.R. (1974). *J. Animal Sci.*, *38*, 1071-1078.

- BERG, B.H. (1977). *Biochim. Biophys. Acta*, **479**, 152-171.
- BERGMAN, I.E. & BRAWERMAN, G. (1977). *Biochemistry*, **16**, 259-264.
- BHAKOO, H.S. & KATZENELLENBOGEN, B.S. (1977). *Moll. Cell. Endocrinol.*, **8**, 105-120.
- BILLING, R.J., BARBIROLI, B & SMELLIE, R.M.S. (1969). *Biochim. Biophys. Acta*, **190**, 52-59.
- BISHOP, J.O., ROSBASH, M. & EVANS, D. (1974). *J. Mol. Biol.*, **85**, 75-86.
- BORTHWICK, N.M. & SMELLIE, R.M.S. (1975). *Biochem. J.*, **147**, 91-101.
- BRAÑES, C. & POGO, A.O. (1975). *Eur. J. Biochem.*, **54**, 317-328.
- BRANSGROVE, A.B. & COSQUER, C.C. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 504-511.
- BRAWERMAN, G. (1976). *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **19**, 117-148.
- BRENTANI, M., DOS SANTOS, C.L.S., D'ABRONZO, F.N. & BRENTONI, R.R. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 338-346.
- BRITTEN, R.J. & ROBERTS, R.B. (1960). *Science*, **131**, 32-33.
- BRÖKELMAN, J. (1977). *Cell Tissue Res.*, **179**, 517-530.
- BULLER, R.E. & O'MALLEY, B.W. (1976). *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 1-12.
- BURTON, K. (1956). *Biochem. J.*, **62**, 315-323.
- BUSCH, H. (1976). *Meth. Cancer Res.*, **13**, 101-197.
- CANN, A., GAMBINO, R., BANKS, J. & BANKS, A. (1974). *J. Biol. Chem.*, **249**, 7536-7540.

- CARLIN, A. (1978). *J. Theor. Biol.*, **71**, 323-338.
- CATELLI, M.G. & BAULIEU, E.-E. (1976). *Moll. Cell. Endocrinol.*, **6**, 129-151.
- CHAN, L., KOHLER, P.O. & O'MALLEY, B.W. (1976). *J. Clin. Invest.*, **57**, 576-585.
- CLARK, A.J. & KIDDER, G.M. (1977). *Differentiation*, **8**, 113-122.
- CLEMENS, M.J. & TATA, J.R. (1973). *Eur. J. Biochem.*, **33**, 71-80.
- COHEN, M.E. & HAMILTON, T.H. (1975 a). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 633-639.
- COHEN, M.E. & HAMILTON, T.H. (1975 b). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 4346-4350.
- CSAPO, A. (1950). *Am. J. Physiol.*, **162**, 406-410.
- COURVALIN, J.-C., BOUTON, M.-M., BAULIEU, E.-E., NURET, P. & CHAMBON, P. (1976). *J. Biol. Chem.*, **251**, 4843-4849.
- DARNELL, J.E., PHILIPSON, L., WALL, R. & ADESNIK, M. (1971). *Science*, **174**, 507-510.
- DE GROOT, L.J., RUE, P., ROBERTSON, M., BERNAL, J. & SCHERBERG, N. (1977). *Endocrinol.*, **101**, 1690-1700.
- DESPHANDE, A.K., CHATTERJEE, B. & ROY, A.K. (1979). *J. Biol. Chem.*, **254**, 8937-8942.
- DEURENBERG, J.J.M. (1977). *Planta*, **133**, 201-206.
- DOEL, M.T. & CAREY, N.H. (1976). *Cell*, **8**, 51-58.
- EDMONDS, H. & WINTERS, M.A. (1976). *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **19**, 149-179.
- EILON, G. & GORSKI, J. (1971). *Fed. Proc.* **31**, 245.

- EHRENBERG, L., FEDORESAK, T. & SOLYMOSY, F. (1976). *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **16**, 189-262.
- FAVRE, A., MOREL, C. & SCHERRER, K. (1975). *Eur. J. Biochem.*, **57**, 147-157.
- FRIEDERICKI, H.H.R. & DE CLOUX, R.J. (1968). *J.Ultrastruct. Res.*, **22**, 402-412.
- FROLIK, C.A. & GORSKI, J. (1977). *J. Steroid Biochem.*, **8**, 713-718.
- GALAND, P., FLANDROY, C. & MAIRESSE, N. (1978). *Life Sciences*, **22**, 217-238.
- GASDE, K., KRAMER, G. & SCHULTZ, K.-D. (1971). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 318-320.
- GLASSER, S.R., CHYTILL, F. & SPELLSBERG, T.C. (1972). *Biochem. J.*, **130**, 947-956.
- GORSKI, J., MORRISON, M.R., MERKEL, C.G. & LINGREL, J.B. (1974). *J. Mol. Biol.* **86**, 363-371.
- GORSKI, J. & GANNON, F. (1976). *Ann. Rev. Physiol.*, **38**, 425-450.
- GREENMAN, D.L. & KENNEY, F.T. (1964). *Arch. Biochem. Biophys.*, **107**, 1-6.
- GURDON, J.B., LANE, C.D., WOODLAND, H.R. & MARBAIX, G. (1971). *Nature*, **233**, 177-182.
- HADJIOLOV, A.A., NIKOLAEV, N. (1976). *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **31**, 95-144.
- HAMILTON, T.H. (1968). *Nature*, **161**, 649-661.
- HAMILTON, T.H., TENG, C.-S., MEANS, A.R. & LUCK, D.N. (1971). In: McKerns, K.W., red. *The Sex Steroids. Molecular Mechanisms*. Appleton-Century-Crofts. New York. p.197-240.

- HARDIN, J.W., CLARK, J.H., GLASSER, R. & PECK, E.J. (1976).
Biochemistry, 15, 1370-1374.
- HARRIS, J.N. & GORSKI, J. (1976). *Fed. Proc.*, 35, 1528.
- HARRIS, J.N. & GORSKI, J. (1978 a). *Endocrinol.*, 240,
 240-245.
- HARRIS, J.N. & GORSKI, J. (1978 b). *Moll. Cell. Endocrinol.*,
 10, 293-305.
- HERNANDEZ, O., BALLESTEROS, L.M., MENDEZ, D. & ROSADO, A.
 (1973). *Endocrinol.*, 92, 1107-1112.
- HEYWOOD, S.M. & KENNEDY, D.S. (1976). *Progr. Nucleic Acid
 Res. Mol. Biol.*, 19, 477-484.
- HIETER, P.A., LE GENDRE, S.M. & LEVY, C.C. (1976). *J. Biol.
 Chem.*, 251, 3287-3293.
- HRUBY, D.E. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81,
 1425-1434.
- HUNTER, A.R. & KORNER, A. (1968). *Biochim. Biophys. Acta*,
 179, 115-128.
- INGLE, D.J. & GRIFFITH, J.Q. (1949). In: Farris, E.J. &
 Griffith, J.Q., red. *The Rat in Laboratory Investiga=*
tion. Lippincot Company, London. p.448.
- JACOB, S.T., ROSE, K.M. & MUNRO, H.N. (1976). *Biochem. J.*,
 158, 161-167.
- JACOB, S.T. & ROSE, K.M. (1978). *Meth. Cancer Res.* 14,
 191-241.
- JOHNSONBAUGH, R. E., DALLDORF, F.G., FRENCH, F.S. & NAYFEH,
 S.N. (1976). *J. Steroid Biochem.*, 7, 73-79.

- KARPETSKY, T.P., HIETER, P.A., FRANK, J.J. & LEVY, C.C.
(1977). *Moll. Cell. Biochem.*, **17**, 89-99.
- KATZENELLENBOGEN, B.S. & GORSKI, J. (1972). *J. Biol. Chem.*,
247, 1299-1305.
- KATZENELLENBOGEN, B.S. & GREGER, N.G. (1974). *Moll. Cell.*
Endocrinol., **2**, 31-42.
- KATZENELLENBOGEN, B.S. & GORSKI, J. (1975). *Biochem. Actions*
Horm., **3**, 187-243.
- KAY, A.M., WALKER, M.A. & SÖMJEN, D. (1975). *Proc. Natl.*
Acad. Sci. U.S.A., **72**, 2631-2634.
- KAY, A.M., SHERATSKY, D. & LINDMER, H.R. (1972). *Biochim.*
Biophys. Acta, **261**, 475-486.
- KHAWAJA, J.A. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,
71, 249-256.
- KING, R.J.B., KAY, A.M. & SHODELL, M.J. (1977). *Exptl. Cell*
Res., **109**, 1-8.
- KNECHT, D.A. & LUCK, D.N. (1977). *Nature*, **266**, 563-564.
- KNOWLER, J.T. & SMELLIE, R.M.S. (1971). *Biochem. J.*, **125**,
605-614.
- KNOWLER, J.T. & SMELLIE, R.M.S. (1973). *Biochem. J.*,
131, 689-697.
- KNOWLER, J.T. (1976). *Eur. J. Biochem.*, **64**, 161-165.
- KONSTANTINOVA, I.M., KULICHKOVA, V.A., VOROBEV, V.J.,
RATOVITSKI, E.A. & SHAPOSHNIKOV, J.D. (1977). *Moll.*
Cell. Biochem., **18**, 29-32.
- KRAFT, N. & SHORTMAN, K. (1970). *Biochim. Biophys. Acta*,
217, 164-175.

- KRYSTOSEK, A., CAWTHON, M.L. & KABAT, D. (1975). *J. Biol. Chem.*, *250*, 6077-6084.
- LAGA, E.M., BALIGA, B.S. & MUNRO, H.N. (1970). *Biochim. Biophys. Acta*, *213*, 641-645.
- LANCLOS, K.D. & HAMILTON, T.H. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *72*, 3934-3938.
- LASKEY, R.A., MILLS, A.D., GURDON, J.B. & PARTINGTON, G.A. (1977). *Cell*, *11*, 345-351.
- LEWIN, B. (1975). *Cell*, *4*, 11-20.
- LIAO, S. (1975). *Int. Rev. Cytol.*, *14*, 87-172.
- LIBBY, P.R. (1972). *Biochem. J.*, *130*, 663-669.
- LITTLE, D.A. & LAMBOURNE, L.J. (1976). *Australian J. Agric. Res.*, *27*, 675-679.
- LOWREY, O.H., ROSEBOROUGH, N.L., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.*, *193*, 265-275.
- LUCK, D.N. & HAMILTON, T.H. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *69*, 157-161.
- LUCK, D.N. & HAMILTON, T.H. (1975). *Biochim. Biophys. Acta*, *383*, 22-29.
- LYNCH, A.G. & KLEIN, N.W. (1978). *Biochim. Biophys. Acta*, *519*, 194-203.
- MADEN, B.E.H. (1976). *Trends in Biochemical Science*, *1*, 196-199.
- MANCHESTER, K.L. (1974). *Biochemistry*, *13*, 3062-3068.
- MANCHESTER, K.L. (1975). In: Arnstein, H.R.V., ed. *M.T.P. International Review of Science, Reeks Een. Vol. 7.* Butterworth & Kie. p. 329-350.

- MARBAIX, G., HUEZ, G., BURNY, A., CLEUTER, Y., HUBERT, E.,
LECLERQ, H., CHANTRENNE, H., SOREQ, H., NUDEL, U. &
LITTAUER, U.Z. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*,
72, 3065-3067.
- MCAUGHTON, M., FREEMAN, K.B. & BISHOP, J.C. (1974).
Cell, 1, 117-125.
- MEANS, A.R. & HAMILTON, T.H. (1966). *Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S.A.*, 56, 686-693.
- MEANS, A.R., ABRASS, I.B. & O'MALLEY, B.W. (1971).
Biochemistry, 10, 1561-1570.
- MEANS, A.R., COMSTOCK, J.P., ROSENFELD, G.C. & O'MALLEY,
B.W. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69,
1146-1150.
- MEEDEL, T.H. & LEVINE, E.M. (1978). *J. Cell. Physiol.*,
94, 229-242.
- MENDECKI, S., LEE, Y. & BRAWERMAN, G. (1972). *Biochemistry*,
11, 792-798.
- MOLLOY, G. & PUCKETT, L. (1976). *Progr. Biophys. Mol. Biol.*,
31, 1-38.
- MOORE, R.J. & HAMILTON, T.H. (1964). *Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S.A.*, 52, 439-446.
- MORRISON, M.R., BRODEUR, R., PARDUE, S., BASKIN, F., HALL,
C.L. & ROSENBERG, R.N. (1979). *J. Biol. Chem.*, 254,
7675-7683.
- MUELLER, G.C., VONDERHAAR, B., KIM, U.H. & LE MALIEU, M.
(1972). *Rec. Progr. Horm. Res.*, 28, 1-49.
- MÜLLER, W.E.G., ARENDES, J., ZAHN, R.K. & SCHRÖDER, H.C.
(1978). *Eur. J. Biochem.*, 86, 283-290.
- MUNNS, T.W. & KATZMAN, P.A. (1971 a). *Biochemistry*, 10, 4941-4948.

- MUNNS, T.W. & KATZMAN, P.A. (1971 b). *Biochemistry*, 10, 4949-4954.
- MUNNS, T.W., SIMS, H.F. & KATZMAN, P.A. (1975). *Biochemistry*, 14, 4758-4764.
- NICOL, S.E. & GOLDBERG, N.D. (1976). *Biochemistry*, 15, 5490-5496.
- NOLL, H. (1969). *Techn. Prot. Biosynthesis*, 2, 101-179.
- NOTEBOOM, W.D. & GORSKI, J. (1963). *Endocrinol.*, 73, 736-739.
- NOTIDES, A. & GORSKI, J. (1966). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 56, 230, 235.
- NUDEL, U., SOREQ, H., LITTAUER, U.Z., MARBAIX, G., HUEZ, G., LECLERQ, M., HUBERT, E. & CHANTRENNE, H. (1976). *Eur. J. Biochem.*, 64, 115-121.
- O'MALLEY, B. W., MEANS, A.R. (1976). *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 19, 403-419.
- O'MALLEY, B.W., TOWLE, H.C., & SCHWARTZ, R.J. (1977). *Ann. Rev. Genet.*, 11, 239-275.
- PALMITER, R.D., CHRISTENSEN, A.K. & SCHIMKE, R.T. (1970). *J. Biol. Chem.*, 245, 833-845.
- PALMITER, R.D. (1975). *Cell*, 4, 189-197.
- PENNEQUIN, P., ROBEL, P. & BAULIEU, E. -E. (1975). *Eur. J. Biochem.*, 60, 137-145.
- PEREL, E. & LINDNER, H.R. (1970). *J. Reproduct. Fertil.*, 21, 171-175.
- PERRY, R.P., LA TORNE, J., KELLY, D.E. & GREENBERG, J.R. (1972). *Biochim. Biophys. Acta*, 262, 220-226.

- READER, R.W. & STANNERS, C.P. (1967). *J. Mol. Biol.*, **28**, 211-223.
- REVEL, M. & GRONER, Y. (1978). *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 1126-1079.
- ROEDER, R.G. (1976). In: Losick, R. & Chamberlin, M., red. *RNA Polymerase*. Cold Spring Harbour Laboratory. N.Y. p.285-329.
- RÖSE, K.M., JACOB, S.T. & KUMAR, A. (1979). *Nature*, **279**, 260-262.
- ROTTMAN, F.M., DESROIDES, R.C. & FRIDIRICI, K. (1976). *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **19**, 21-38.
- SCHAUER, R.C. & SMITH, D.E. (1977). *Horm. Metab. Res.*, **19**, 420-424.
- SCHULTZ, G.A. (1975). *Dev. Biol.*, **44**, 270-277.
- SEGHAL, P.B., SOREQ, H. & TAMM, T. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 5030-5033.
- SHAPIRO, S.S., PHIROMSAWAT, S. & HAGERMAN, D.D. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**, 376-381.
- SHEINESS, D. & DARNELL, J.E. (1973). *Nature* NB, **241**, 265-268.
- SHEINESS, D., PUCKETT & DARNELL, J.E. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 1077-1081.
- SHORE, G.C. & TATA, J.R. (1977). *Biochim. Biophys. Acta*, **472**, 197-226.
- SILVERMAN, D.J. & LUBIN, M. (1975). *J. Supramol. Struct.*, **3**, 67-79.
- SINGER, R.H. & PENMAN, S. (1972). *Nature*, **240**, 100-102.
- SMITH, D.E. & GORSKI, J. (1968). *J. Biol. Chem.*, **243**, 4169-4174.

- SOBIESZEK, A. & SMALL, J.V. (1976). *J. Mol. Biol.*, **101**, 75-92.
- SÖMJEN, D., KAY, A.M. & LINDNER, H.R. (1974). *Moll. Cell. Endocrinol.*, **1**, 77-88.
- STORMSHAK, F., LEAKE, R., WERTZ, N. & GORSKI, J. (1976). *Endocrinol.*, **99**, 1501-1511.
- SUVATTE, A.B. & HAGERMAN, D.D. (1970). *Endocrinol.*, **87**, 641-645.
- SZEGO, C.M. (1965). *Fed. Proc.*, **24**, 1343-1352.
- SZEGO, C.M. & DAVIS, J.S. (1967). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1711-1718.
- TATA, J.R. & BARKER, B. (1975). *Biochem. J.*, **150**, 345-355.
- TATA, J.R. (1967). *Biochem. J.*, **104**, 1-16.
- TENG, C.-S. & HAMILTON, T.H. (1967 a). *Biochem. J.*, **105**, 1091-1099.
- TENG, C. -S. & HAMILTON, T.H. (1967 b). *Biochem. J.*, **105**, 1101-1109.
- TENG, C. -S. & HAMILTON, T.H. (1968). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **60**, 1410-1414.
- TENG, C. -S. & HAMILTON, T.H. (1970). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1231-1238.
- VAN DER WALT, J.D. (1972). Ongepubliseerde Proefskrif, P.U. vir C.H.O., Potchefstroom.
- VAN DER WALT, M.P.K. (1977). Ongepubliseerde Verhandelings-P.U. vir C.H.O., Potchefstroom.
- VOKAER, A., IACOBELLI, S. & KRAM, S. (1964). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 4482-4486.

- WACHSBERGER, R.P. & PEPE, F.A. (1974). *J. Mol. Biol.*, *88*, 385-391.
- WALKER, M.D., GOZES, I., KAY, A.M., REISS, N. & LITTAUER, U.L. (1976). *J. Steroid. Biochem.*, *7*, 1083-1085.
- WALKER, M.D., GOZES, I. & KAY, A.M. (1977). *Proc. Am. Soc. Cell. Biol.*, San Diego. 15-18 Nov., p. 188a.
- WALKER, M.D., KAY, A.M. & FRIDLENDER, B.R. (1978). *FEBS Letters*, *92*, 25-28.
- WEILL, P.A., SIDIKARO, J., STANCEL, G.M. & BLATTI, S.P. (1977). *J. Biol. Chem.*, *252*, 1092-1098.
- WHELLY, S.M., BARKER, K.L. & GOLDSMITH, D.P.J. (1973). *Fed. Proc.*, *32*, 241.
- WHELLY, S.M. & BARKER, K.L. (1974). *Biochemistry*, *13*, 341-346.
- WIDNELL, C.C. & TATA, J.R. (1964). *Biochem. J.*, *92*, 313-317.
- WILSON, M.C., SAWICKI, S.G., WHITE, P.A. & DARNELL, J.E. (1978). *J. Mol. Biol.*, *126*, 23-36.
- YAMAMOTO, K.R. & ALBERTS, B.M. (1976). *Ann. Rev. Biochem.* *45*, 721-743.
- ZYLBER, E.A. & PENMAN, S. (1970). *Biochim. Biophys. Acta*, *204*, 221-229.

BEDANKINGS

My opregte dank aan -

- Prof. C.J. Reinecke, hoof van die Departement Biochemie, P.U. vir C.H.O., onder wie se leiding hierdie studie gedoen is. 'n Besondere woord van dank.
- Prof. P.J. Pretorius, hoof van die Departement Fisiologie, P.U. vir C.H.O., vir sy belangstelling en aanmoediging.
Mnre. W.J. de Wet en M.P.K. van der Walt van die Departement Biochemie, P.U. vir C.H.O., vir hul belangstelling, samewerking en vrugbare samesprekings.
- Mnre. V. Botes en T. Viljoen vir die teel en versorging van die proefdiere.
- Mev. I. de Beer vir haar hulp met die versorging van die figure.
- Mev. E. Schutte vir die tikwerk.
- Dr. N.T. Malan vir die taalkundige versorging.
- Mev. M.M.E. Kilian van die Ferdinand Postma Biblioteek vir haar hulp met die drukwerk.
- Die M.N.R. en R.A.K. vir finansiële steun.
- My ouers en skoonouers vir hul belangstelling en voortdurende aanmoediging.

Wat kan ek die Heer vir al sy guns vergeld?

Wat kan ek Hom bring uit dank vir Sy genade?

A F K O R T I N G S

DNA	-	Deoksiribonukleïensuur
RNA	-	Ribonukleïensuur
HnRNA	-	Heterogene nukleêre RNA
rRNA	-	Ribosomale RNA
tRNA	-	Oordrag RNA
mRNA	-	Boodskapper RNA
RNase	-	Ribonuklease
Poli(A)	-	Poli-adenilaat
PoliA(+)-RNA	-	Poli(A)-bevattende RNA
PoliA(-)-RNA	-	RNA wat nie poli(A) bevat nie
Poli(U)	-	Poli-uridilaat
Oligo(dT)	-	Oligo 2'-deoksitimidilaat
EDTA	-	Etileendiamientetra-asetaat
EGTA	-	Etileenglikool-bis-(β -amino-etieleter) N,N'-tetra-asetaat
SDS	-	Natriumdodesielsulfaat
TCA	-	Trichloorasynsuur
Tris	-	Tris(hidroksimetiel)aminometaan
cGMP	-	sikliese guanosien 5'-monofosfaat.