

Über die Verwertung von Thymin und Thymidin als DNS-Vorstufe in *Chlorella pyrenoidosa*

Von

F. Fetter und H. Altmann

Aus dem Institut für Biologie und Landwirtschaft des Reaktorzentrums
Seibersdorf

(Leiter: Prof. Dr. K. Kaindl)

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 7. Februar 1968)

Es wurden Untersuchungen über den Einbau von Thymin und Thymidin in synchronisierte *Chlorella*-Zellen während der S-Phase durchgeführt. *Chlorella* verfügt über Enzymsysteme, die sie zur Verwertung beider Vorstufen für die DNS-Synthese befähigen. Der Einbau des Thymidins erfolgt etwa 10mal stärker als der des Thymins.

Investigations have been carried out on the incorporation of thymine and thymidine in synchronized *chlorella* cells during the S phase. *Chlorella* contains enzyme systems capable of using both precursors for DNA synthesis, but thymidine is incorporated 10 times more rapidly than thymine.

Einleitung

Verschiedene Mikroorganismen, wie z. B. die Hefe, sind nicht imstande, Thymin oder Thymidin in ihren DNS-Stoffwechsel einzubeziehen.¹ Deshalb werden häufig Desoxycytidin und Desoxyuridin zur biosynthetischen Markierung der DNS eingesetzt. Eine große Anzahl verschiedener Organismen schöpfen die Vorstufen für die Biosynthese sowohl der DNS wie auch der RNS aus dem gleichen Nukleotid-Pool. Die Ribonukleosid-Diphosphate nehmen dabei eine zentrale Stelle ein. Sowohl aus Uridin-

¹ E. R. Lochmann, Naturwiss. 52, 498 (1965).

Diphosphat als auch aus Cytidin-Diphosphat kann Desoxythymidin-Diphosphat gebildet werden².

*Dalmon*³ konnte bereits einen Einbau von Thymidin in *Chlorella* feststellen, ohne jedoch bei seinen Untersuchungen synchrones Zellmaterial zu verwenden und ohne chromatographische Auftrennungen der Nukleinsäuren durchzuführen.

Durchführung der Untersuchungen

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir die einzellige Grünalge *Chlorella pyrenoidosa*, Stamm Nr. 211—8b, der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen. Zur Gewinnung synchronen Zellmaterials diente eine automatische Anlage⁴.

Nach Feststellung des Zeitraumes der *DNS*-Synthese innerhalb des Zyklus⁵ wurde die 16. Stunde des 28-Stundenzyklus (16 Stdn. Lichtphase, 12 Stdn. Dunkelphase) als Zeitpunkt der maximalen *DNS*-Synthese ausgewählt. Die zu diesem Zeitpunkt der Züchtungs- und Synchronisationsanlage entnommenen Algen (1×10^7 Zellen/ml) wurden durch Zentrifugation von der rein anorganischen Nährlösung⁶ abgetrennt und in 250 ml Nährlösung, der 25 μCi ¹⁴C-markiertes Thymin oder Thymidin zugegeben worden war, 30 Min. bei 30° C inkubiert.

Die Nukleinsäuren aus der *Chlorella* (3 g *Chlorella*-Feuchtwicht) wurden nach einer Methode von *Richter* und *Senger*⁷ isoliert und auf einer modifizierten Methylalbumin—Kieselgur-Säule⁸ aufgetrennt.

Die herkömmliche, von vielen Autoren benützte Methode der Auftrennung auf Methylalbumin-Kieselgur hat den Nachteil, daß sich die Säulen leicht verstopfen und für die Elution Druck angelegt werden muß, wodurch oft Unregelmäßigkeiten bei der Auftrennung auftreten.

Um dies auszuschalten, verwendeten wir als Absorptionsmaterial für das Methylalbumin eine gekörnte, säuregewaschene und geglühte Kieselgur, die als Füllmaterial für gaschromatographische Säulen hergestellt wird. Dieses sogenannte „Gaschrom P“ (60—80 mesh) bezogen wir von der Firma Serva (Heidelberg).

Die Beladung des Gaschrom P mit Methylalbumin wurde in der Kälte (4° C) durchgeführt.

Gaschrom. P wurde mehrmals in destill. Wasser suspendiert und abdekantiert, anschließend mit gleicher Volumsmenge 0,1*m*-NaCl-Lösung in 0,05*m*-*Tris*-Puffer (pH 6,7) versetzt und pro 50 g Gaschrom P 10 ml 1proz. wäbr. Methylalbuminlösung zugegeben. Nach 60 Min. Rühren wurde die NaCl-Konzentration auf 0,2*m* gebracht, nochmals 30 Min. gerührt, dann der Überstand abdekantiert und die Methylalbumin-Kieselgur einige Male mit 0,2*m*-NaCl (pH 6,7) nachgewaschen, um überschüssiges Methylalbumin zu entfernen.

² *I. L. Cameron* und *G. M. Padilla*, *Cell Synchrony*. New York: Academic Press 1966, S. 213.

³ *I. Dalmon*, *Trav. laborat. zool. exper. faculté sci. de Lyon*: Nr. 4 (1966).

⁴ *F. Fetter* und *T. Gumpelmayer*, *Die Bodenkultur* **18**, 4 (1967).

⁵ *H. Altmann*, *F. Fetter* und *E. Pfisterer*, in Vorbereitung.

⁶ *H. Senger*, *Arch. Mikrobiol.* **40**, 74 (1961).

⁷ *G. Richter* und *H. Senger*, *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 502 (1964).

⁸ *H. Altmann*, *I. Doljes* und *F. Fetter*, *Analyt. Biochem.* **22**, 477 (1967).

Die Suspension wurde dann auf eine Säule gebracht — in unserem Fall 300×15 mm — und so lange nachgewaschen, bis die Extinktion des Eluates bei 280 nm Null beträgt.

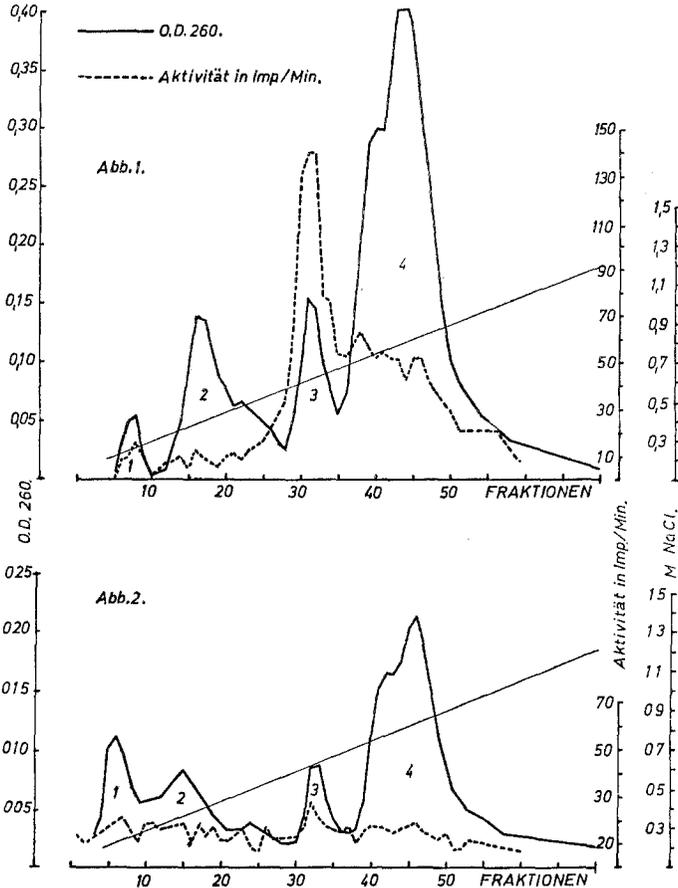


Abb. 1. Einbau von Thymidin-¹⁴C.

Abb. 2. Einbau von Thymin-¹⁴C.

Auftrennung der Nucleinsäuren aus *Chlorella pyrenoidosa* über modifizierte Methylalbumin—Kieselgur-Säulen. Eluiert wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten: 250 ml 0,2*m*-NaCl und 250 ml 1,5*m*-NaCl.

1. Niedermolekulare Verbindungen (Verunreinigungen).
2. s-RNS.
3. DNS.
4. r-RNS.

Das nach *Richter* und *Senger*⁷ mit Hilfe der Phenolspaltung und Alkohol-fällung gewonnene Nucleinsäuregemisch soll zur Auftrennung in verdünnter

Lösung auf die Säulen aufgebracht werden. Bei der beschriebenen Säulendimension soll die aufgetragene Nucleinsäuremenge etwa 2,5 mg nicht übersteigen.

Eluiert wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten: je 250 ml 0,2*m*- und 1,5*m*-Lösung in 0,05*m*-Tris-Puffer (pH 6,7). Die Elutionsgeschwindigkeit betrug etwa 5 ml/7,5 Min. Aufgefangen wurden die einzelnen Fraktionen mit Hilfe eines automatischen LKB-Fraktionskollektors. Die Extinktion der einzelnen Fraktionen wurde bei 260 nm mit einem Spektralphotometer (Zeiss PM Q II) gemessen. Zur Bestimmung der ¹⁴C-Aktivität als Maß für den Einbau von Thymin bzw. Thymidin in die *DNS* wurden je 3 ml der einzelnen Fraktionen auf Aluminiumschälchen aufgedampft und im Methandurchflußzähler (FH 49, Frieseke & Hoepfner) gemessen.

Ergebnisse und Diskussion

Abb. 1 und 2 zeigen den Einbau von Thymidin bzw. Thymin in die *DNS* synchroner Chlorella in der 16. Stunde des Entwicklungszyklus. Obwohl bei den dargestellten Auftrennungen ungleiche Mengen an Nucleinsäureextrakt aufgetragen worden waren, kann man aus der spezif. Aktivität deutlich sehen, daß Thymidin von der Chlorella etwa 10mal besser zum Einbau in die *DNS* verwertet werden kann als Thymin.

Die Restaktivität, die sich bei der Auftrennung nach dem Einbau von Thymidin in die *DNS* innerhalb der *r-RNS* zeigt, dürfte auf die von Holoubek⁹ beschriebene, neu synthetisierte *DNS*, die einen Proteinanteil enthalten soll, zurückzuführen sein.

⁹ V. Holoubek, *Analyt. Biochem.* **18**, 375 (1967).