

Redundante Nucleotid-Sequenzen in DNA aus Weizen

Redundant Nucleotide-Sequences in DNA
from Wheat

Hartmut Kern und Joachim Grübler *

Institut für Botanik und Mikrobiologie, Kernforschungs-
anlage Jülich

(Z. Naturforsch. 31 c, 104–107 [1976]; eingegangen
am 29. September 1975)

Wheat, Germination, DNA, Redundancy

DNA from dormant and germinated embryos exhibit differences in the kinetics of reassociation of thermal denatured nucleic acid. Within 24 h of germination a reduction of the renaturation, expressed as $Cot_{1/2}$ of the redundant fraction, is detectable.

Im Rahmen entwicklungsbiologischer Untersuchungen an Karyopsen von Weizen interessieren uns die ersten Phasen der Keimung, die auf makromolekularer Ebene faßbar sind. Neuere Arbeiten^{1–3} zeigen, daß die Aktivierung des Genoms kaskadenartig erfolgt³ und *de-novo*-Synthesen der wichtigsten Makromoleküle innerhalb der ersten 24 h nach der Imbibition ruhender Embryonen mit Wasser bei optimalen Keimungsbedingungen in der folgenden Sequenz in Gang gesetzt werden: mRNA – Proteine – DNA – rRNA – tRNA. Am Ende dieses Zeitraumes wird das erste Maximum der Zellteilungen erreicht. Diese Feststellungen stehen teilweise im Gegensatz zu den Befunden anderer Autoren und werden in den zitierten Veröffentlichungen^{1–3} diskutiert. Interessant ist, daß DNA im ruhenden und im keimenden Embryo Unterschiede aufweist, die sich u. a. im Schmelzpunkt (T_m) und der Basenzusammensetzung ausdrücken⁴. Ähnliche Befunde ergaben sich auch in eigenen Arbeiten (unveröffentlicht). Nach den Untersuchungen von Chen *et al.*⁴ läßt sich nach 48 h Keimung eine Reduzierung des Amplifikationsgrades der Gene nachweisen, die ribosomale RNA codieren (rDNA). Mit Hilfe der molekularen DNA-RNA-Hybridisierungstechnik stellten diese Autoren eine Verringerung von rDNA um ca. 30% fest. Dieses Phänomen war Veranlassung zu prüfen, ob auch Veränderungen in der Reassoziationskinetik thermisch denaturierter DNA aus ungekeimten bzw. gekeimten Embryonen nachweisbar sind. Da möglicherweise Änderungen in der Amplifikation von rDNA in Beziehung zur Mitose stehen⁴, wurde die

Reassoziations von DNA aus ruhenden und gekeimten Embryonen untersucht und dabei mit Rücksicht auf das Mitosemaximum³ eine Keimdauer von 24 h gewählt. Bei den Experimenten fand nur der den redundanten Nucleotid-Sequenzen entsprechende Bereich der jeweiligen Reassoziationskurven mit schneller Renaturierung Beachtung.

Wie im experimentellen Anhang näher beschrieben, erfolgten die Reassoziationsexperimente nach der von Britten und Kohne⁵ entwickelten Methodik. Dabei wurde die betreffende DNA durch Ultraschall fragmentiert, thermisch denaturiert und die Renaturierung bei 60 °C in 0,14 M Phosphatpuffer bei pH 6,8 vorgenommen. Die nach verschiedenen Inkubationszeiten entnommenen Proben wurden an Hydroxyapatit in einsträngige und zweisträngige DNA fraktioniert. Die Eluierung zweisträngiger DNA erfolgte dabei mit 0,4 M Phosphatpuffer bei 60 °C. In einigen Fällen wurde ³H-markierte DNA aus den gekeimten Embryonen in entsprechender Weise renaturiert, der Reassoziationsgrad jedoch unter Anwendung der einstrangspezifischen Nuclease S₁ bestimmt, die nach den Angaben von Vogt⁷ aus *Aspergillus oryzae* gewonnen wurde. Außerdem prüften wir, ob sich auch eine aus *Staphylococcus aureus* isolierte Nuclease⁸ für diesen Zweck verwenden läßt. Durch logarithmische Auftragung des Produktes aus Reaktionszeit und DNA-Konzentration (Cot) gegen den Anteil einsträngiger DNA wurden die Reassoziationskurven im Bereich schneller Renaturierung konstruiert. Als Maß für die Reassoziierung wurde der jeweilige $Cot_{1/2}$ -Wert ermittelt. Dieser ist gleichbedeutend mit einer 50-prozentigen Renaturierung der redundanten Nukleotid-Sequenzen.

Wie aus Tab. I zu ersehen ist, weisen die jeweiligen DNA-Präparate ähnliche spektroskopische Eigenschaften auf, die für die Beurteilung des Reinheitsgrades üblich sind. Die Hyperchromizität lag in allen Fällen bei 25% und ließ nicht die von Chen *et al.*⁴ gefundenen Unterschiede erkennen. Die angeführten Cot -Werte differieren und lassen eine Abnahme redundanter Nucleotid-Sequenzen in der Größenordnung von ca. 40% erkennen. Ein Vergleich dieser Werte von DNA aus gekeimten Embryonen, deren Reassoziierung durch Anwendung von Hydroxyapatit oder – im Falle einer *in vivo*-Markierung mit [³H]Thymidin – mit Nuclease S₁ analysiert wurde, ergibt Unterschiede, die methodisch bedingt sind. Diese resultieren aus der Tatsache, daß ungepaarte Überhänge oder Schleifen reassoziierter DNA-Fragmente bei der Fraktionierung mit Hydroxyapatit mit in die Fraktion doppelsträngiger DNA eingehen, während bei der Anwendung von Nuclease S₁ diese einsträngigen Teile abgebaut werden. Daraus erklärt sich die Abnahme des Cot -Wertes bei der enzymati-

* Fachhochschule Aachen, Abt. Jülich. Die hier mitgeteilten Ergebnisse sind Teil einer Ingenieurarbeit. Sonderdruckanforderungen an H. Kern, Institut für Botanik und Mikrobiologie, KFA-IBO, Postfach 365, D-5170 Jülich.



Tab. I. Eigenschaften von DNA aus ruhenden und keimenden Weizenembryonen.

DNA-Präparat	E_{260}/E_{230}	E_{260}/E_{280}	% Hyperchromizität	$Cot_{1/2}$ für redundante Sequenzen [M × sec/l]
Ruhende Embryonen (3)	2,15	1,79	max. 25	2,0
Keimende Embryonen, 24 h (2)	2,12	1,84	max. 25	1,2
Keimende Embryonen, [3H]Thymin, 24 h (2)	2,0	1,92	max. 25	1,02

Von jeder DNA wurde die in Klammern angeführte Anzahl Präparate untersucht. Für die Berechnung der Cot -Werte wurde die Näherungsformel $(E_{260} \times t)/2$ benutzt⁵. Die Schwankung der Werte lag bei 2%.

schen Methode. Parallelversuche, bei denen die erwähnte Nuclease aus *Staphylococcus aureus*⁸ eingesetzt wurde, ließen erkennen, daß die selektive Hydrolyse einsträngiger DNA unter den von Kacian *et al.*⁸ für DNA aus *E. coli* beschriebenen Bedingungen im vorliegenden Fall nicht gewährleistet war.

Die hier mitgeteilten Ergebnisse zeigen, daß in der Reassoziierung denaturierter DNA aus ruhenden und keimenden Embryonen qualitative und quantitative Unterschiede bestehen (Abb. 1). Jedoch können

erst weitere Untersuchungen klären, ob hiermit auch eine Abnahme der Redundanz für rRNA verbunden ist. Da auch die Gene für tRNA redundant sind und im Gegensatz zu Chen *et al.*⁴ die Keimzeit von 48 h auf 24 h aus dargelegten Gründen herabgesetzt wurde, sind entsprechende Hybridisierungsexperimente notwendig. Zum anderen muß darauf hingewiesen werden, daß Chen *et al.*⁴ mit isolierten Embryonen gearbeitet haben, während in unserem Fall die Keimung ganzer Karyopsen erfolgte und die Embryo-

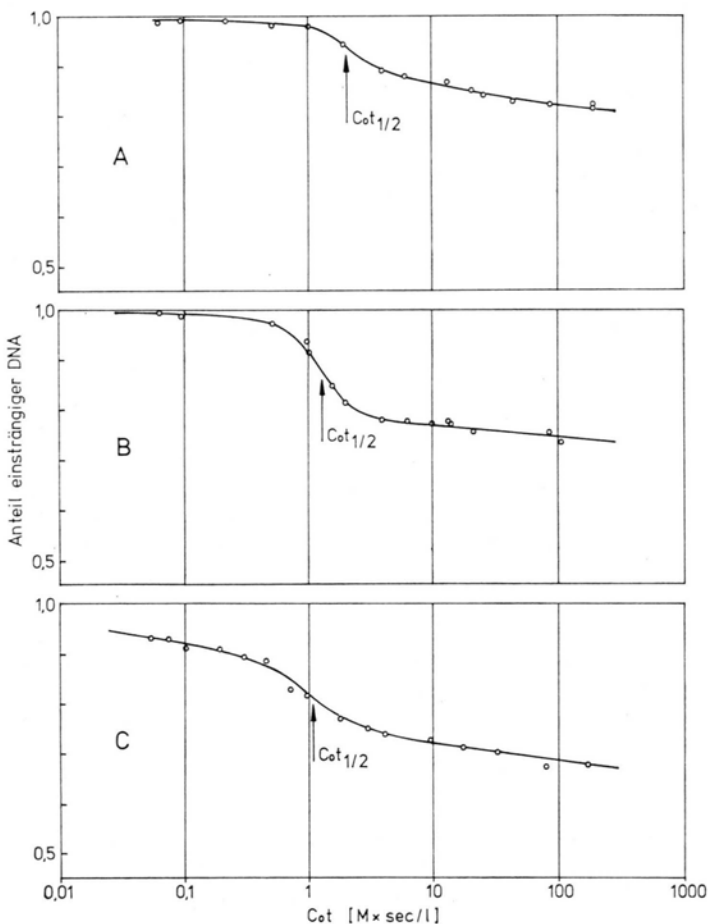


Abb. 1. Kinetik der Reassoziierung thermisch denaturierter DNA aus Weizen. — A: DNA aus ruhenden Embryonen, die Messung der Reassoziierung wurde mit Hydroxyapatit durchgeführt^{5,6}; B: DNA aus keimenden Embryonen (24 h), Anwendung der Hydroxyapatit-Methode; C: 3H -markierte DNA aus keimenden Embryonen (24 h), die Diskriminierung zwischen ein- und zweisträngiger DNA erfolgte enzymatisch⁷ mit Nuclease S_1 .

nen erst dann isoliert wurden. Dadurch sind physiologische Unterschiede von vornherein gegeben^{1,9}, die einen Vergleich mit den Ergebnissen der zitierten Autoren⁴ nur bedingt zulassen.

Experimentelles

Für die Versuche wurde Winterweizen, *Triticum aestivum*, Sorte LP 3950 (F. v. Lochow-Petkus GmbH, Stöckheim) verwendet. Die Gewinnung von Embryonen aus ruhenden Karyopsen geschah durch Flotieren geschroteter und gesiebter Körner in Cyclohexan-Tetrachlorkohlenstoff¹⁰. Die Keimung ganzer Karyopsen erfolgte in GM-Medium⁴ bei 25 °C im Dunkeln¹¹. Bei den Einbauexperimenten enthielt das Keimmedium pro 5 g Körner je 100 μ Ci ([Methyl-³H]thymidin, 15,3 Ci/mm) in 5 ml Flüssigkeit. Die Keimung erfolgte 24 h in Gegenwart des Tracers. In jedem Falle wurden die einzelnen Ansätze auf Sterilität geprüft, wobei von dem Keimmedium Ausstriche auf Nährböden angefertigt wurden. Für die Gewinnung von DNA wurden nur die Proben verwendet, deren Sterilität gesichert war. Bis zur Auswertung der Ausstriche wurden die gekeimten Karyopsen bei -70 °C aufbewahrt.

Die Extraktion von DNA erfolgte im Prinzip nach der Methode von Kirby¹², schloß aber noch weitere Reinigungsschritte ein, wie eine Behandlung der DNA mit RNase A und anschließend mit Pronase B und Schütteln mit Phenol-Chloroform bis zur völligen Abwesenheit einer Interphase. Erst dann wurde mit Äthanol ausgefällt. Der Reinheitsgrad der einzelnen DNA-Präparate ist in Tab. I wiedergegeben.

Bei der Durchführung der Denaturierung und Reassoziierung der einzelnen DNA-Präparate folgten wir der Methodik von Britten und Kohne⁵⁻⁶. Die DNA-Konzentration lag aus technischen Gründen bei 350 μ g/ml 0,14 M Phosphatpuffer, pH 6,8. Die Fragmentierung erfolgte durch Ultraschall. Dabei wurden Proben von jeweils 5 ml 90 sec unter Kühlung in einer Stickstoffatmosphäre (Braun Sonic 300 S) dem Ultraschall (100 W) ausgesetzt. Für die thermische Denaturierung erwies sich eine Erhitzung der DNA-Lösungen auf 100 °C für 10 min als notwendig. Die Inkubation der betreffenden unmarkierten DNA-Proben erfolgte in 0,14 M Phosphatpuffer, pH 6,8, bei 60 °C. Jede Meßreihe umfaßte jeweils 15 Proben, wobei die Inkubationsdauer so gewählt wurde, daß im Bereich der Wendepunkte der Cot-Kurven eine dichtere Folge der einzelnen Meßpunkte

lag. Die bei -70 °C gelagerten Proben der jeweiligen Meßreihen wurden an Hydroxyapatitsäulen (je 1 g Säulenmaterial) in einsträngige und zweisträngige DNA fraktioniert. Diese Trennung erfolgte in Gegenwart von 0,4% Natriumdodecylsulfat⁵⁻⁶, um die Bindung einsträngiger DNA an die Säule zu unterdrücken. Die Fraktionierung wurde in Glassäulen (190 $\times$ 12 mm) vorgenommen, die, mit einer Glassinterfritte (Type 1D4) versehen, in einem temperierbaren Kupferblock angeordnet waren und am oberen Ende über einen Schraubverschluß an Druckluft angeschlossen wurden (0,5 kp/cm²). Die DNA-Konzentration im Durchlauf (einsträngige DNA) und im Eluat mit 0,4 M Phosphatpuffer bei ebenfalls 60 °C (zweisträngige DNA) wurde unter Berücksichtigung der Hyperchromizität der einsträngigen DNA spektroskopisch bestimmt.

Für den enzymatischen Abbau einsträngiger DNA wurde Nuclease S₁ nach den Angaben von Vogt⁷ aus α -Amylase-Präparaten von *Aspergillus oryzae* (Sigma) einschließlich der Fraktionierung an DEAE-Cellulose gewonnen. Da die weitere Reinigung des Enzyms an Sulfo-Sephadex wegen eines Abfalls des pH-Wertes eine starke Inaktivierung zur Folge hatte, wurde auf diesen Schritt verzichtet. Der enzymatische Abbau der einzelnen Proben wurde in je 3 ml Natriumacetat-Puffer⁷ 10 min bei 45 °C durchgeführt, nach Zusatz von Träger-DNA mit TCA ausgefällt und das Präzipitat auf Selectron-Filter übergeführt. Diese wurden nach Auswaschen mit kalter 5-prozentiger TCA getrocknet, in 0,5 ml Äthylenglycolmethyläther aufgelöst und mit je 10 ml Instagel (Packard) im Tri-Carb gemessen. Im Handel erhältliche Nuclease aus *Staphylococcus aureus* (Boehringer, Mannheim) erwies sich unter den von Kaschian *et al.*⁸ angegebenen Bedingungen als unbefriedigend. Eine Modifizierung der Inkubationsbedingungen wurde nicht vorgenommen.

Die erhaltenen Meßwerte, ausgedrückt als Anteil einsträngiger DNA, wurden halblogarithmisch gegen das Produkt aus Ausgangsmenge einsträngiger DNA (Co) und Dauer der Renaturierung (*t*) aufgetragen. Für die Berechnung der Cot-Werte wurde die Näherungsformel ($E_{260} \cdot t$)/2 benutzt⁵, wobei E_{260} die Absorption der einsträngigen Ausgangs-DNA bei der Wellenlänge 260 nm und Schichtdicke 1 cm und *t* die Inkubationsdauer in Stunden beinhalten. Die Bestimmung des Wendepunktes in den Cot-Kurven erfolgte auf graphischem Wege durch eine Tangentenkonstruktion.

¹ E. Rejman and J. Buchowicz, *Phytochemistry* **10**, 2951 [1971].

² E. Rejman and J. Buchowicz, *Phytochemistry* **12**, 271 [1973].

³ M. Dobrzanska, M. Tomaszewski, Z. Grzelszak, E. Rejman, and J. Buchowicz, *Nature* **244**, 507 [1973].

⁴ D. Chen and D. J. Osborne, *Nature* **225**, 336 [1970].

- ⁵ D. E. Kohne and R. J. Britten, *Procedures in Nucleic Acid Research*, (G. L. Cantoni and D. R. Davies, eds.), **Vol. 2**, p. 500, Harper & Row, New York 1971.
- ⁶ R. J. Britten and D. E. Kohne, *Science* **161**, 529 [1968].
- ⁷ V. M. Vogt, *Eur. J. Biochem.* **33**, 192 [1973].
- ⁸ D. L. Kacian and S. Spiegelman, *Anal. Biochem.* **58**, 534 [1974].
- ⁹ H. Kern, *Biol. Plant.* **17**, 309 [1975].
- ¹⁰ F. B. Johnston and H. Stern, *Nature* **179**, 160 [1957].
- ¹¹ H. Kern, *Physiol. Plant.* **34**, 47 [1975].
- ¹² K. S. Kirby, *Biochem. J.* **96**, 266 [1965].