

# Die Sequenzkomplexität transkribierter unique DNA Sequenzen im Genom von Maus P815 Mastocytoma Zellen

Sequence Complexity of Transcribed Unique DNA Sequences in Genome of Mouse P815 Mastocytoma Cells

Thomas L. J. Boehm und Dusan Drahovsky

Zentrum der Biologischen Chemie der Universität Frankfurt am Main, Theodor-Stern-Kai 7, 6000 Frankfurt am Main 70

Z. Naturforsch. **34 c**, 436–441 (1979); eingegangen am 28. Dezember 1978/13. Februar 1979

RNA-DNA-Hybridization, nRNA Complexity

The sequence complexity of nuclear RNA from mouse liver, mouse spleen and highly malignant P815 mastocytoma was measured by nRNA driven hybridization to unique DNA sequences of P815 cells. The unique DNA sequences represent 63% of the total nuclear DNA of P815 cells and their availability in hybridization experiments was found to be 76%. Of these sequences 7.8% formed hybrids with nuclear RNA of this cell, about 11.5% with mouse spleen and about 14.5% with mouse liver nuclear RNA. Assuming an asymmetrical transcription, the complexities of these transcripts are  $2.8 \times 10^8$  nucleotides for mouse P815 mastocytoma,  $4.3 \times 10^8$  for mouse spleen and about  $5.3 \times 10^8$  nucleotides for mouse liver.

Cellular specificity of the transcribed information was analyzed in additivity experiments, in which unique DNA sequences, not complementary to the nuclear RNA of one cell were annealed to the nuclear RNAs of the two other tissues/cells. In these experiments most of the nuclear RNA sequences of P815 cells were found to be also present in the nucleus of mouse liver and spleen. Only a small portion of the unique DNA sequences of P815 mastocytoma (about 1.2% corresponding to  $4.4 \times 10^7$  nucleotides) was found to be complementary only to P815 mastocytoma nuclear RNA.

## Einleitung

Um den transkribierten Anteil der DNA in einer Zelle zu bestimmen, wird die Hybridisierung von unique DNA Sequenzen mit einem großen Überschuß an nuklearer RNA verwendet [1–4]. Diese Untersuchungen sind von besonderem Interesse, da die Vielfalt eines multizellulären Organismus bei gleichem genetischen Material nur durch selektive Genexpression erklärt werden kann. Für die Hybridisierungsreaktionen werden im allgemeinen entweder polyA-haltige mRNA oder seine durch reverse Transkription hergestellte Kopie (cDNA) verwendet. Da mit dieser Methode aber die Komplexität im allgemeinen unterschätzt wird [5], haben wir uns für die Hybridisierung mit nuklearer RNA entschieden.

In der vorliegenden Arbeit haben wir den Anteil transkribierter unique DNA Sequenzen in einem experimentellen Maustumor (P815 Mastocytoma) bestimmt, und untersucht, welcher Anteil der in dieser Tumorzelle transkribierten DNA Sequenzen zu nuklearer RNA anderer Gewebe (Leber und Milz

erwachsener Mäuse) komplementär ist. Die Ergebnisse zeigen, daß im Vergleich zu Mäuseleber und -milz etwa 13% der in P815 Zellen transkribierten Information für diese Tumorzelllinie spezifisch ist. Dies entspricht einer Sequenzkomplexität von  $4,4 \times 10^7$  Nukleotiden.

## Material und Methoden

P815 Mastocytoma ist eine maligne Zelllinie, die nach intraperitonealer Inokulation von etwa  $10^6$  Zellen rasch in die Brustdrüse und andere Organe disseminiert und die tumortragenden Mäuse (BD2F<sub>1</sub>) innerhalb von 8–9 Tagen tötet. In einer Suspensionskultur (McCoy 5a Medium, 20% fötales Kälberserum) haben diese Zellen eine Generationszeit von 13–14 Stunden.

Leber und Milz wurden aus gesunden erwachsenen Mäusen gewonnen und sofort verarbeitet.

## Isolierung der P815 DNA

(a) Die DNA wurde aus Zellen isoliert, die am 7. Tag nach der Inokulation aus der Ascitesflüssigkeit der tumortragenden Mäuse gewonnen wurden; sie erfolgte nach einer Modifikation [6] der von

Sonderdruckanforderungen an PD Dr. D. Drahovsky.  
0341-0382 / 79 / 0500-0436 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Marmur angegebenen Methode [7], die in Wiederholung der RNAase- und Pronasebehandlung der DNA-haltigen Lösung besteht.

Radioaktiv markierte DNA wurde aus Zellen gewonnen, die in Gegenwart von 100  $\mu\text{Ci}$  [Methyl- $^3\text{H}$ ]-Thymin (26Ci/mmol, New England Nuclear, Dreieich, Deutschland) auf 100 ml einer Kultur von  $0,3 \times 10^6$  Zellen per ml Medium (McCoy 5a ergänzt mit 20% fötalem Kälberserum) gewachsen waren. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen aus dem Medium isoliert, gewaschen und die DNA isoliert (spezifische Aktivität  $1 - 5 \times 10^6$  cpm/ $\mu\text{g}$  DNA).

Die isolierte DNA wurde in einem Branson Sonifier (Branson Sonic Power, Danbury, USA) bis zu einer durchschnittlichen Länge von 450 Nukleotiden beschallt [6].

(b) Unique DNA Sequenzen wurden durch Denaturierung ultraschall-behandelter nuklearer DNA und anschließender Renaturation bei 60 °C bis zu einem Cot von 1000 mol sec Liter $^{-1}$  als einzelsträngige Strukturen mit Hilfe der Hydroxylapatit-chromatographie (siehe unten) isoliert. Um alle doppelsträngigen Anteile zu entfernen, wurden die unique Sequenzen noch zweimal über Hydroxylapatit gereinigt. Die Verfügbarkeit („availability“) der unique DNA Sequenzen in Hybridisierungsreaktionen wurde durch Hybridisierung der unique DNA Sequenzen mit einem großen Überschuß an unmarkierter gesamter nuklearer DNA gemessen [8]. Bei einem Cot von größer als 10 000 mol sec Liter $^{-1}$  binden sich etwa 76% der unique DNA Sequenzen an Hydroxylapatit in 0,15 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,8). Das bedeutet, daß für Hybridisierungen nur etwa drei Viertel der gesamten unique DNA Sequenzen für Hybridisierungen zur Verfügung stehen. Um dies auszugleichen, werden die Ergebnisse der Hybridisierungsreaktionen mit dem Faktor  $1/0,76 = 1,3$  multipliziert [8, 9].

#### Isolierung der nuklearen RNA

Die nukleare RNA aus P815 Zellen, von Mäuseleber und -milz wurde nach folgendem Verfahren isoliert:

(a) Die Zellen werden in Puffer I resuspendiert (30 mM KCl – 0,5 mM  $\text{CaCl}_2$  – 10 mM  $\text{MgCl}_2$  – 2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – 2 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 1 M Saccharose, pH 7,6), Nonidet P-40 (Shell AG) wird hinzugefügt bis zu einer Endkonzentration von 0,25% und die Lösung für 10 min in Eis inkubiert. In einer Zen-

trifugation (10 min,  $500 \times g$ ) sedimentieren die Kerne und werden zweimal mit Puffer I gewaschen.

(b) Die Nuklei werden in Puffer II resuspendiert (150 mM NaCl – 50 mM  $\text{NaCH}_3\text{COO}$  – 3% SDS, pH 5,1), homogenisiert und nach kurzer Inkubation in Eis mit einem gleichen Volumen einer Phenolmischung (Phenol : mKresol :  $\text{H}_2\text{O}$  – 70 : 10 : 20 – 0,1% 8-Hydroxychinolin) bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zentrifugation wird die wässrige Phase mit der Phenolmischung nochmals extrahiert und mit zwei Volumen kalten Alkohols (70% – 2%  $\text{KCH}_3\text{COO}$ ) bei –18 °C präzipitiert. Nach vier Stunden wird die DNA mit einem Spatel vorsichtig entfernt und die RNA durch Zentrifugation sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen in Alkohol (70%) werden die RNA und die DNA in Puffer III gelöst (50 mM Tris-HCl – 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 8,0).

(c) RNase-freie DNase wird hinzugefügt (100  $\mu\text{g}$ /ml) und eine Stunde bei 37 °C inkubiert; danach Zugabe von Pronase (1 mg/ml) und SDS (Endkonzentration 1%) und Inkubation für weitere 3 Stunden.

(d) Gleiches Volumen einer Phenol-Chloroform- (1:1)-Mischung wird hinzugefügt und für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die wässrige Phase wird nochmals extrahiert und wie unter (b) mit Alkohol präzipitiert. Die RNA wird dann in 0,4 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) gelöst und die Konzentration durch die Extinktion bei 260 nm bestimmt ( $1 \text{ mg/ml} = 27 A_{260} \text{ U}$ ).

#### nRNA-DNA Hybridisierung

Die Hybridisierung nuklearer RNA mit unique DNA Sequenzen wird in 0,4 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) ausgeführt. Das molare Massenverhältnis zwischen DNA und RNA war immer kleiner als 1/500.

Zur Kontrolle der DNA-Reassoziationswährend der Hybridisierung wurde diese im Parallelansatz mit 0,3 N NaOH-hydrolysierten nRNA durchgeführt. Der damit bestimmte Wert der DNA-Reassoziationswährend der Hybridisierung wurde von allen angegebenen Werten der Hybridisierungsreaktionen mit unbehandelter nRNA abgezogen. Das Ausmaß der Hybridisierung wurde mit Hilfe der Hydroxylapatitchromatographie gemessen.

#### Hydroxylapatit-Chromatographie

Hydroxylapatit (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland), äquilibriert in 0,04 M Na-

triumphosphatpuffer (pH 6,8) wurde zur Trennung der einzel- und doppelsträngigen Nukleinsäuren benutzt. Einzelsträngige Strukturen wurden mit 0,15 M, doppelsträngige mit 0,4 M Natriumphosphatpuffer eluiert (Säulentemperatur 60 °C).

### Reisolation der hybridisierten DNA

Die in nRNA-DNA-Hybriden enthaltenen unique DNA Sequenzen wurden nach Hydrolyse der RNA in 0,3 N NaOH und anschließender Neutralisation und Adsorption an Hydroxylapatit durch Elution mit 0,15 M Natriumphosphatpuffer zurückgewonnen.

## Ergebnisse

### (a) Charakterisierung der unique DNA Sequenzen aus P815 Zellen

Unique DNA Sequenzen wurden durch Denaturierung ultraschall-behandelter DNA und Reassoziations bis  $Cot$  1000 durch Hydroxylapatitchromatographie isoliert. Unter diesen Reassoziationsbedingungen (Abb. 1) finden sich etwa 63% der gesamten DNA als einzelsträngige Strukturen in 0,15 M Phosphatpuffer. Die Reaktionskonstante der unique DNA Sequenzen in einer Reaktion zweiter Ordnung ist  $4,7 \times 10^{-4} \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1} \text{ Liter}$ , entsprechend einem  $Cot_{1/2}$  von 2100 [10]. Dieser Wert gilt jedoch nur für die Reassoziations in der gesamten DNA. Um die Verfügbarkeit der unique DNA Sequenzen für die Hybridisierungsreaktionen zu messen, läßt man unique DNA Sequenzen in Gegenwart eines Überschusses an gesamter DNA reassoziieren [8, 9]. Dabei ergibt sich als Reaktionskonstante  $2,9 \times 10^{-4} \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1} \text{ Liter}$ . Daß bei einer solchen Reaktion nur etwa 76% der unique DNA Sequenzen an Hydroxylapatit binden, zeigt, daß die Verfügbarkeit nur 76% beträgt. Daher werden alle Werte aus Hybridisierungsreaktionen mit unique DNA Sequenzen mit dem Faktor  $1/0,76 = 1,3$  korrigiert [8, 9]. Die Reassoziationskurven für die Reassoziations der gesamten DNA und in Gegenwart eines Überschusses an nuklearer DNA sind in Abb. 1 dargestellt.

Aus der Reaktionskonstante der Reassoziations der unique DNA Sequenzen kann man mittels einer Vergleichs-DNA (im allgemeinen die von *E. coli*) bekannter Komplexität und Reaktionskonstante die Sequenzkomplexität der unique DNA Sequenzen berechnen [10]. Dies geschieht nach der Gleichung  $G_{P815} = G_{E. coli} \times k_{E. coli} / k_{P815}$ , wobei  $G$  jeweils die Komplexität und  $k$  die Reaktionskonstante der Re-

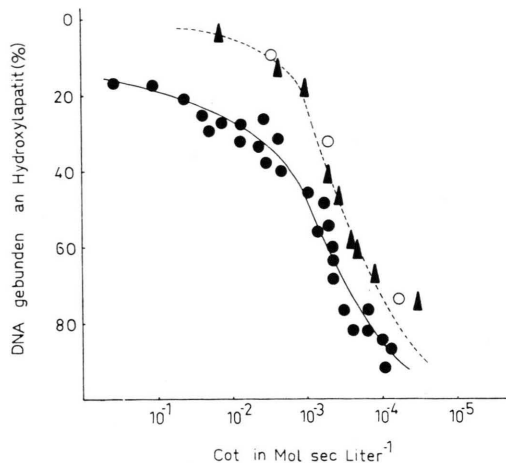


Abb. 1. Renaturation ultraschallbehandelter nuklearer DNA aus P815 Zellen mit einer Fragmentlänge von 450 Nukleotiden (●), Reassoziations isolierter unique DNA Sequenzen in Anwesenheit eines großen Überschusses an gesamter nuklearer DNA (▲), und Renaturation von Sequenzen, die aus Hybriden reisoliert wurden in Gegenwart eines großen Überschusses an gesamter nuklearer DNA (○).

assoziations bezeichnet. Mit dieser Beziehung läßt sich für die Sequenzkomplexität der unique DNA Sequenzen von P815 Zellen ein Wert von  $3,5 \times 10^9$  Nukleotiden ermitteln [11].

### (b) Hybridisierung von unique DNA Sequenzen mit nuklearer RNA aus P815 Zellen

In einer typischen Hybridisierungsreaktion wurden 6 mg nuklearer RNA und 10 µg DNA (100 000 cpm) in 300 µl 0,4 M Phosphatpuffer bei 60 °C inkubiert. Nach Erreichen eines bestimmten Rot-Wertes wird die Mischung in 0,04 M Phosphatpuffer verdünnt und an Hydroxylapatit absorbiert. Die Hybride werden mit 0,4 M Phosphatpuffer eluiert. Zur Bestimmung der während der Hybridisierung ebenfalls ablaufenden DNA-Reassoziations wird die Reaktion im Parallelansatz mit 0,3 N NaOH hydrolysierten nRNA durchgeführt. Dabei ergaben sich Werte von 0,5 – 1,7% für die DNA-Reassoziations, was unter diesen Bedingungen einem  $Cot$  von etwa 150 entspricht.

Die Kinetik der Hybridisierungsreaktion ( $D/D_0 = e^{-kR_0t}$ , wobei  $D$  der Konzentration an unhybridisierter DNA,  $D_0$  der DNA-Anfangskonzentration,  $k$  der Reaktionskonstante und  $R_0$  der Anfangskonzentration an RNA und  $t$  der Zeit entsprechen) ist in Abb. 2 dargestellt. Die Reaktionskonstante wurde zu  $0,35 \times 10^{-5} (\text{mol sec})^{-1} \text{ Liter}$  bestimmt. Der

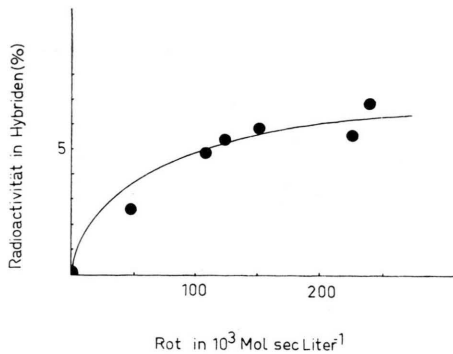


Abb. 2. Reaktionsverlauf der Hybridisierung von P815 unique DNA Sequenzen mit homologer nuklearer RNA. Rechnerische Analyse der Reaktion (siehe Text) ergibt einen Wert von  $0,35 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1} \text{ Liter}$  für die Reaktionskonstante.

Sättigungswert für die Reaktion lag bei einem Wert von 7,8%, was einer RNA-Komplexität von  $2,8 \times 10^8$  Nukleotiden entspricht. Zur Kontrolle wurden die in den Hybriden gefundenen DNA Sequenzen mit einem Überschuß an gesamter DNA hybridisiert; in Abb. 1 ist zu ersehen, daß diese wie unique DNA Sequenzen renaturieren.

(c) Hybridisierung der nuklearen RNA von Mäuseleber und -milz mit unique DNA Sequenzen von P815 Zellen

Hybridisierungen nuklearer RNA aus Mäuseleber und Mäusemilz mit unique DNA Sequenzen aus P815 Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Hybridisierungen mit homologer nRNA ausgeführt. Die Sättigungswerte der Reaktionen sind in Tab. I wiedergegeben.  $11,0 \pm 1,1\%$  der unique DNA Sequenzen aus P815 Zellen waren der nuklearen RNA aus Mäuseleber komplementär, entsprechend einem korrigierten Wert von  $14,5 \pm 1,5\%$ . Nach Hybridisierung mit nuklearer RNA aus Mäuse-

Tab. I. Hybridisierung von nuklearer RNA mit unique DNA Sequenzen aus P815 Zellen.

Nukleare RNA	Anzahl der Experimente	Prozent Radioaktivität in RNA-DNA-Hybriden (Mittelwerte <sup>a</sup> )	
		gemessen	korrigiert <sup>b</sup>
P815 Mastocytoma	4	$6,0 \pm 0,7$	$7,8 \pm 1,0$
Mäuseleber	5	$11,0 \pm 1,1$	$14,5 \pm 1,5$
Mäusemilz	4	$8,7 \pm 0,4$	$11,5 \pm 0,6$

<sup>a</sup> Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

<sup>b</sup> Korrigiert für Verfügbarkeit der unique Sequenzen in Hybridisierungen (siehe Text).

milz fanden sich  $8,7 \pm 0,4\%$  der unique DNA Sequenzen in RNA-DNA-Hybriden (entspricht einem korrigierten Wert von  $11,5 \pm 0,6$ ). Die Kinetik der Hybridisierungen ist in Abb. 3 dargestellt. Rechnerische Auswertung der erhaltenen Daten ergab folgende Werte für die Reaktionskonstanten:  $0,96 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1} \text{ Liter}$  und  $1,08 \times 10^{-5}$  für Leber.

(d) Mehrfachhybridisierungen

Um den Anteil an nuklearer DNA aus P815 Zellen zu bestimmen, der für diese Zelle im Vergleich zu Mäuseleber und -milz spezifisch ist, wurden die nichthybridisierten unique DNA Sequenzen aus der homologen Hybridisierungsreaktion mit der nuklearen RNA aus Mäuseleber bzw. Mäusemilz rehybridisiert. Die kreuzweise Hybridisierung der in einer Reaktion nicht komplementären unique DNA mit der nRNA aus den beiden anderen Geweben/Zellen ermöglicht es, Aussagen über die spezifische Information in den einzelnen Zellen zu machen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. II zusammengestellt. Nach der Hybridisierung mit P815 nRNA hybridisieren etwa 10,9% der verbliebenen unique DNA Sequenzen mit nuklearer RNA aus Leber und 1,6% mit der aus Milz. Diese Werte beschreiben den Anteil an DNA Sequenzen, die zwar mit nuklearer RNA aus Leber und Milz, nicht aber mit der aus P815 Zellen komplementär sind. Nach Sättigung mit nuklearer RNA aus Mäuseleber finden sich 3,5% der nichtkomplementären unique DNA Sequenzen in Hybriden mit homologer RNA und 4%

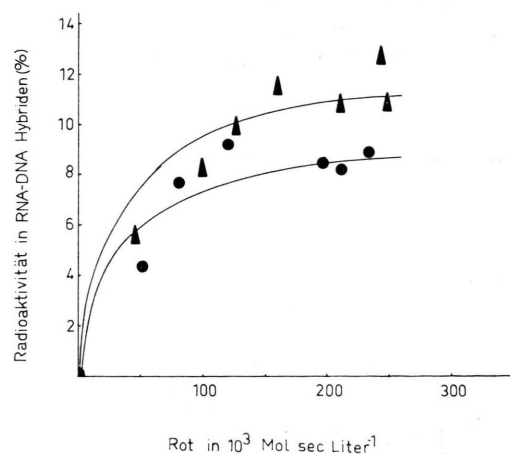


Abb. 3. Hybridisierung von unique DNA Sequenzen aus P815 Zellen mit nuklearer RNA aus Mäuseleber (▲) und Mäusemilz (●). Die Reaktionskonstanten sind  $0,96 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1} \text{ Liter}$  für Milz und  $1,08 \times 10^{-5}$  für Leber.



Tab. II. nRNA-Komplexität von Leber, Milz und P815 Mastocytoma.

DNA	Sättigungswerte <sup>a</sup> in RNA-bestimmten Hybridisierungsreaktionen					
	P815 nRNA		Leber nRNA		Milz nRNA	
	%	Komplexität <sup>b</sup>	%	Komplexität	%	Komplexität
<i>Erste Hybridisierung</i>						
Unique DNA Sequenzen aus P815 Zellen	7,8 ± 1,0	2,8 ± 0,4	14,5 ± 1,4	5,3 ± 0,5	11,5 ± 0,6	4,3 ± 0,2
<i>Zweite Hybridisierung</i>						
mit nicht-komplementärer DNA in						
Hybridisierung mit						
P815 nRNA	—	—	10,9 ± 2,3	3,9 ± 0,8	1,6 ± 0,3	0,6 ± 0,1
Leber nRNA	3,5 ± 0,8	1,3 ± 0,3	—	—	4,0 ± 0,5	1,5 ± 0,2
Milz nRNA	3,5 ± 0,6	1,3 ± 0,2	7,0 ± 0,5	2,5 ± 0,2	—	—

<sup>a</sup> Durchschnitt aus jeweils drei unabhängigen Experimenten (korrigierte Werte).

<sup>b</sup> In 10<sup>8</sup> Nukleotiden bei angenommener asymmetrischer Transkription.

in solchen mit nuklearer RNA aus Milz. Unique Sequenzen, die mit nuklearer RNA aus Milz keine Hybride gebildet hatten, bildeten zu 3,5% mit homologer nRNA und zu 7% mit nRNA aus Leber Hybride.

Durch die Kombination all dieser Werte aus Tab. II ist es möglich, ein Schema der zu nRNA komplementären Regionen in P815 unique DNA Sequenzen zu konstruieren. Aus Abb. 4 ist zu entnehmen, wieviel Prozent der unique DNA Sequenzen für die jeweilige Zellart im Vergleich zu den anderen spezifische nRNA-DNA-Hybride bilden. Zudem zeigt sich, daß 87% der unique DNA Sequenzen, die in P815 Zellen transkribiert werden, auch komplementär zu nRNA aus Mäuseleber und -milz sind. Nur die restlichen 13% (entsprechend 1,2% der unique DNA) der transkribierten Sequenzen sind im Vergleich zu diesen beiden Geweben spezifisch. Dieser Anteil entspricht einer Sequenzkomplexität von  $4,4 \times 10^7$  Nukleotiden.

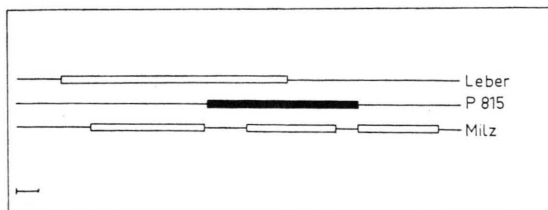


Abb. 4. Überlappung komplementärer unique DNA Sequenzen aus P815 Zellen mit nuklearer RNA aus P815 Zellen (■), Mäuseleber und Mäusmilz (□). Der Balken entspricht einer Sequenzkomplexität von 10<sup>8</sup> Nukleotiden. Aus dieser Abbildung ist der für die jeweilige Zellart spezifische Anteil der unique DNA Sequenzen abzulesen. Er entspricht für P815 Zellen 1,2%, für Leber 4,4% und für Milz 1,6% der unique DNA Sequenzen aus P815 Zellen.

#### (e) Menge an heterogener nuklearer RNA (HnRNA)

Um zu berechnen, welcher Anteil der nuklearen RNA die RNA-DNA-Hybridisierungsreaktion eingeht, bestimmt man die Reaktionskonstante ( $K_{pre}$ ) der Hybridisierungsreaktion unter der Voraussetzung, daß alle Moleküle der nuklearen RNA für die Reaktion verantwortlich sind. Dies geschieht nach einer Beziehung, die von Hough *et al.* [12] angegeben wurde. Unter den Voraussetzungen unserer Experimente ergibt sich folgende Gleichung:

$$k_{pre} = \frac{2,1 \times 10^6}{\text{Sequenzkomplexität der nuklearen RNA}} \times \left[ \frac{\text{Fragmentlänge der unique DNA Sequenzen}}{\text{mittlere Länge eines nRNA-Moleküls}} \right]^{1/2}$$

Damit errechnen sich unter der Annahme einer mittleren Länge eines nRNA-Moleküls von 4500 Nukleotiden [8] für P815 nRNA eine Reaktionskonstante von  $0,12 \times 10^{-2}$ , für Leber  $0,06 \times 10^{-2}$  und für Milz  $0,08 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1} \text{ Liter}$ . Dividiert man nun die tatsächlich beobachtete Reaktionskonstante durch die vorausberechnete ( $k_{pre}$ ), so erhält man den Anteil der an der Reaktion beteiligten nRNA-Moleküle [5]. Wie in Tab. III dargestellt ist, entsprechen dieser Fraktion 0,3% der nuklearen RNA von P815 Zellen, 1,8% der von Leber und 1,2% der von Milz. Diese Anteile der nuklearen RNA besitzen zwar eine geringe Häufigkeit, dafür aber eine sehr große Komplexität. Umgekehrt gilt für den größten Teil der nRNA, daß sie in großer Frequenz mit geringer Komplexität vorliegt [3]. Man kann annehmen, daß die Fraktion der nuklearen RNA, die die Hybridisierung bestimmt, mit der heterogenen nuklearen RNA identisch ist.

Tab. III. Angenäherte Werte für Heterogene Nukleare RNA (HnRNA)-Moleküle.

Parameter	Nukleare RNA		
	P815 Mastocytoma	Mäuseleber	Mäusemilz
beobachtete Reaktionskonstante ( $k_{\text{obs}}$ ) <sup>a</sup>	$0,35 \times 10^{-5}$	$1,08 \times 10^{-5}$	$0,96 \times 10^{-5}$
vorausgerechnete Reaktionskonstante ( $k_{\text{pre}}$ ) <sup>b</sup>	$0,12 \times 10^{-2}$	$0,06 \times 10^{-2}$	$0,08 \times 10^{-2}$
$k_{\text{obs}}/k_{\text{pre}} \times 100$ <sup>c</sup>	0,29	1,8	1,2
nRNA-Komplexität <sup>d</sup>	$2,8 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$
Anzahl der HnRNA-Moleküle <sup>e</sup>	$0,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$0,9 \times 10^5$
Anzahl der HnRNA-Moleküle spezifisch für f	$0,7 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$

<sup>a</sup> In mol sec Liter<sup>-1</sup> (berechnet aus Abbn. 2 und 3).

<sup>b</sup> In mol sec Liter<sup>-1</sup> (zur Berechnung siehe Text).

<sup>c</sup> Prozent der nRNA, die die Hybridisierung bestimmen.

<sup>d</sup> In Nukleotiden bei angenommener asymmetrischer Transkription.

<sup>e</sup> Berechnung siehe Text.

<sup>f</sup> Berechnet aus Daten der Tab. II und der Abb. 4.

Die Komplexität der nuklearen RNA erlaubt einige Aussagen über die Anzahl der HnRNA-Moleküle, die im Zellkern einer Zelle vorkommen. Nimmt man eine durchschnittliche Länge von 5000 Nukleotiden für ein typisches HnRNA-Molekül an [8], so finden sich  $0,5 \times 10^5$  HnRNA-Moleküle im Kern einer P815 Zelle,  $1,0 \times 10^5$  in Leber- und  $0,9 \times 10^5$  in Milzzellen. Die Anzahl der HnRNA-Moleküle, die unter den beschriebenen Bedingungen für die jeweilige Zellart spezifisch sind, kann mit  $0,7 \times 10^4$  für P815, mit etwa  $3,2 \times 10^4$  für Leber und mit  $1,2 \times 10^4$  für Milz berechnet werden (Tab. III).

## Diskussion

RNA-DNA-Hybridisierungsexperimente, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurden, sind, wie die Ergebnisse gezeigt haben, für die Bestimmung des in mehreren Geweben transkribierten Anteils der nuklearen DNA geeignet. Man kann aus diesen Daten den Anteil der für eine Zellart bzw. Gewebe spezifischen Information über kreuzweise Hybridisierungen ableiten; zum anderen gibt die Information über den gemeinsam transkribierten Anteil Aufschluß über die sogenannte „house-keeping“-Komplexität, welche der

genetischen Information für die in allen Zellen ablaufenden metabolischen Prozesse entsprechen würde.

Um solche Analysen durchzuführen, ist es vorteilhafter, zur Hybridisierung nukleare RNA zu benutzen, da, wie kürzlich bekannt wurde [13], die HnRNA im Karyoplasma vor dem Austritt in das Cytoplasma modifiziert wird, weshalb Hybridisierungen mit mRNA eine geringere Komplexität transkribierter DNA als die mit gesamter nRNA [5] ergeben. Das Ziel dieser Arbeit war es, den Anteil an transkribierten DNA eSequenzen einer malignen Zelllinie zu bestimmen, der auch in normalen Geweben zu finden ist. Fast 90% der von P815 Zellen DNA transkribierten DNA Sequenzen einer malignen Zellleber und -milz als HnRNA-Moleküle vorhanden. Im Vergleich zu Leber und Milz entspricht die Komplexität der für P815 Zellen spezifischen Information  $4,4 \times 10^7$  Nukleotiden; was einer Zahl von 14 000 HnRNA-Molekülen gleichkommt, wenn man eine mittlere Größe von 5 000 Nukleotiden annimmt.

Diese Untersuchungen sind von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Dr 104/5) finanziell unterstützt. Diese Arbeit ist Teil einer Doktorarbeit von T. L. J. Boehm am Fachbereich Humanmedizin der Universität Frankfurt am Main.

- [1] E. Sanchez de Jimenez u. J. L. Dominguez, J. Mol. Biol. **16**, 59 (1971).
- [2] W. E. Hahn u. C. D. Laird, Science **173**, 158 (1971).
- [3] L. Grouse, M.-D. Chilton u. B. J. McCarthy, Biochemistry **11**, 798 (1972).
- [4] K. Soga u. Y. Takahashi, Nature **256**, 233 (1975).
- [5] D. M. Chikaraishi, S. S. Deeb u. N. Sueoka, Cell **13**, 111 (1978).
- [6] D. Drahovsky, T. L. J. Boehm u. W. Kreis, Biochim. Biophys. Acta, 1979, im Druck.
- [7] J. Marmur, J. Mol. Biol. **3**, 208 (1961).

- [8] J. A. Bantle u. W. E. Hahn, Cell **8**, 139 (1976).
- [9] G. A. Galau, R. J. Britten u. E. H. Davidson, Cell **2**, 9 (1974).
- [10] E. H. Davidson, Gene Activity in Early Development, 2. Auflage, Academic Press, New York 1976.
- [11] T. L. J. Boehm u. D. Drahovsky, Eur. J. Biochemistry, eingereicht.
- [12] B. R. Hough, M. J. Smith, R. J. Britten u. E. H. Davidson, Cell **5**, 291 (1975).
- [13] T. H. Rabbitts, Nature **275**, 291 (1978).