

CHROM. 11,117

PRÄPARATIVE ISOLIERUNG VON DESOXIRIBOADENYLSÄUREN AUS HYDROLYSATEN OXIDIERTER HERINGSSPERMEN-DNA

HERBERT SCHOTT und MARGARETE SCHWARZ

Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, Tübingen (B.R.D.)

(Eingegangen am 9. Februar 1978)

SUMMARY

Preparative isolation of deoxyriboadenylic acids from hydrolysates of oxidized herring sperm DNA

The preparative-scale chemical degradation of DNA from herring sperm to mixtures of purine oligonucleotides or deoxyriboadenylic acids is described. The deoxyriboadenylic acid mixture was separated into six fractions according to increasing ionic charge by column chromatography on QAE-Sephadex A-25. Of the first fraction, 75% was deoxyriboadenosine monophosphate; of the second, 99% consisted of a mixture of $p(dA)_2$ and $(dA)_2p$, while of the third 93% was $pdAp$. The remaining fractions contained more or less complex mixtures of longer-chain oligonucleotides which could be further separated by subsequent re-chromatography on QAE-Sephadex at pH 9.6. By application of paper chromatography to the fractions obtained from column chromatography, the pure nucleotide phosphates $pdAp$, $p(dA)_2p$, $p(dA)_3p$, $p(dA)_4p$ and the mixtures of sequence isomers $p(dA)_2$, $(dA)_2p$; $p(dA)_3$, $(dA)_3p$; and $p(dA)_6$, $(dA)_6p$ could be isolated preparatively. The nucleotide phosphates were converted to $(dA)_2$, $(dA)_3$ or $(dA)_4$ and the mixtures of sequence isomers to $(dA)_2$, $(dA)_3$ or $(dA)_6$ by treatment with alkaline phosphatase. By this means dephosphorylated, paper chromatographically pure oligodeoxyriboadenylic acid may be obtained in a preparative scale from the hydrolysates. The structures of the nucleotides thus isolated were deduced from the absorption characteristics, the R_f values and the results of enzymatic degradation.

EINLEITUNG

Oligomere der Desoxiriboadenylsäure sind im präparativen Massstab bisher nur durch die sehr aufwendige chemische Polykondensation von Desoxiriboadenosinmonophosphat erhältlich¹. Die chemische Polykondensation ist so kompliziert, dass sie nur von Spezialisten erfolgreich praktiziert werden kann. Ausserdem treten während der Kondensation Nebenreaktionen auf, durch die auf Kosten der gewünschten linearen Oligonucleotide zyklische Verbindungen, Pyrophosphatderivate und verschiedene andere Reaktionsprodukte gebildet werden. Hinzu kommt, dass bei der chemischen Polykondensation bevorzugt die kurzen Oligomeren mit bis zu vier

Monomereinheiten gebildet werden, während längere Fragmente in nur sehr geringen Ausbeuten entstehen. Definierte lineare Oligodesoxiriboadenylsäuren sind aus dem Kondensationsansatz erst nach mehreren aufwendigen Trennschritten in papierchromatographisch reiner Form erhältlich.

Bei der Suche nach einfachen Wegen zur Darstellung von Desoxiriboadenylsäuren fanden wir, dass Jones *et al.*²⁻⁴ zur Ermittlung von Adenylsäurefragmenten Desoxiribonucleinsäuren (DNA) chemisch im analytischen Massstab zu Oligodesoxiriboadenylsäuren auf folgendem Weg abgebaut haben. Zunächst wurden die Nucleobasen der DNA (3 g Ansatz) bis auf Adenin mit alkalischer KMnO_4 -Lösung oxidativ zu Ureidogruppen abgebaut, wobei die Polymerhauptkette erhalten blieb. Die Ureidogruppen in dieser sogenannten "oxidierten DNA" wurden anschliessend durch Hydrazinolyse in Hydrazone überführt, aus denen dann mit Benzaldehyd die Aldehydfunktionen freigesetzt wurden. Die so vorbehandelte DNA wurde im Alkalischen hydrolysiert und das neutralisierte Hydrolysat (40 mg Ansatz) an einer DEAE-Cellulose-Säule in mehrere Fraktionen aufgetrennt. Papierchromatographisch und aus dem Phosphat-Adeninverhältnis konnten die Autoren in den verschiedenen Fraktionen Oligomere der Adenylsäure mit bis zu drei Monomereinheiten nachweisen, während sie die Anwesenheit höherer Fragmente vermuteten.

Wir haben das Verfahren, das Jones *et al.* als analytische Methode konzipiert hatten, so modifiziert, dass sich in einem Ansatz der oxidative Abbau mit 30 g DNA und die Fraktionierung des Hydrolysats im 5 g Ansatz praktikabel durchführen lässt. Damit haben wir einen neuen Weg erschlossen, auf dem Desoxiriboadenylsäuren in präparativen Mengen in chromatographisch reiner Form sehr einfach zugänglich sind, wie wir in der vorliegenden Arbeit zeigen werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

Reagenzien

Hydraziniumhydroxid zur Synthese (Merck-Schuchardt, München, B.R.D.); Kaliumpermanganat p.A.; die übrigen Chemikalien wurden in "chemisch reiner" Form verwendet; DNA, pdA, dA (PWA Waldhof, Mannheim, B.R.D.); die übrigen Referenznucleotide wurden in unserem Labor synthetisiert^{5,6}; QAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden); Chromatographiepapier 2316 (Schleicher & Schüll, Dassel, B.R.D.); DEAE-Cellulose (Whatman DE-23; W. & R. Balston, Maidstone, Grossbritannien); Enzyme (Boehringer, Mannheim, B.R.D.); Membranen (Amicon, Lexington, Mass., V.S.).

Pufferlösungen

1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.5): 121 g (1 M) Tris-(hydroxymethyl)aminomethan werden in 900 ml Wasser gelöst, mit 50 ml konz. HCl versetzt, dann mit HCl auf pH 7.5 eingestellt und schliesslich mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

1 M NaHCO_3 - Na_2CO_3 -Puffer (pH 9.6): 65.3 g (0.78 M) NaHCO_3 und 23.5 g (0.22 M) wasserfreies Na_2CO_3 werden mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Laufmittelsysteme

A: Äthanol-1 M NH_4Ac (7:3) pH 7.5; B: *n*-Propanol-Konz. Ammoniak-Wasser (55:10:35); C: Isobuttersäure-konz. Ammoniak-Wasser (66:1:33).

Depyrimidinierung und hydrolytische Spaltung der DNA aus Heringsspermen

Käufliche Heringsspermen-DNA (40 g) werden in 160 ml Hydraziniumhydroxid gelöst und 4 h bei 60° im Trockenschrank belassen. Anschliessend wird die hierbei entstandene, braune Reaktionslösung am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedunstet, der Rückstand in Wasser gelöst und wieder zur Trockene gebracht. Den Rückstand versetzt man mit 1.5 l einer 1.2 M KOH Lösung und erhitzt den Ansatz 1 h auf dem siedenden Wasserbad. Anschliessend wird die Lösung im Eisbad auf ca. 5° abgekühlt und mit ca. 25%iger Perchlorsäure neutralisiert. Nach ca. 12 stündigem Stehenlassen im Kühlschrank wird der ausgefallene Niederschlag auf der Nutsche abgesaugt und mehrmals mit kaltem Wasser nachgewaschen. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt, mit Wasser auf 5 l aufgefüllt und säulenchromatographisch fraktioniert.

Säulenchromatographische Trennung des depyrimidinierten DNA-Hydrolysates an einer DEAE-Cellulose-Säule bei pH 7.5

Das in 5 l Wasser gelöste DNA-Hydrolysat wird auf eine DEAE-Cellulose-Säule mit ca. 1 l/h gepumpt. Die Säulenfüllung beträgt 50 × 7 cm. Nach dem Auftragen der Lösung wird die Säule bei gleichem Durchfluss zunächst mit 5 l Wasser bei Raumtemperatur eluiert. Hierbei sinkt die bei 260 nm gemessene Absorption des Eluats unter 1 A_{260} -Einheit. Das Eluat wird verworfen. Anschliessend eluiert man die Säule mit ca. 12–15 l einer 0.1 M NaCl-Lösung, die mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist, bis die Absorption des Eluats unter 4 A_{260} -Einheiten sinkt. Im dritten und letzten Schritt werden die noch adsorbierten Purinnucleotide mit 1 M NaCl-Lösung von der Säule eluiert. Die mit 0.1 M NaCl-0.05 M Tris-HCl eluierten Purinnucleotide werden vereinigt und am Rotationsverdampfer soweit konzentriert, bis Salz ausfällt. Das Konzentrat wird vom Salz befreit und anschliessend an einer UM 2 Membran so lange ultrafiltriert, bis das Eluat mit $AgNO_3$ keine Reaktion zeigt. Das salzfreie Retentat wird lyophilisiert und man erhält ca. 7 g niedermolekulare Purinnucleotide als gelbliches Pulver. Die mit 1 M NaCl eluierten höhermolekularen Purinnucleotide werden analog aufgearbeitet und ergeben ca. 5 g eines hellbraunen Pulvers, das in der folgenden Oxidationsreaktion eingesetzt wird.

Oxidation der Heringsspermen-DNA und der höhermolekularen Purinoligonucleotide

Käufliche Heringsspermen-DNA (Reaktionsansatz 1–4, Tabelle I) oder die mit 1 M NaCl eluierten höhermolekularen Purinoligonucleotide (Reaktionsansatz 5, Tabelle I) werden gemeinsam mit $NaHCO_3$ in 1 l Wasser gelöst und auf 37° erwärmt. Die Lösung wird mit 1 l einer ebenfalls auf 37° erwärmten $KMnO_4$ -Lösung versetzt. Hierbei stellt sich der pH-Wert der Lösung auf ca. 8 ein (Reaktionsansatz 1 und 5). Die Reaktionslösungen der Ansätze 2, 3 und 4 werden dagegen mit 2 N NaOH exakt auf pH 9 eingestellt. Man belässt die Ansätze 1, 2, 3 und 5 für 19 h bei 37°, während Ansatz 4 nur 3 h bei dieser Temperatur verbleibt. Anschliessend werden die violett gefärbten Lösungen der Ansätze 1, 2 und 5 durch Zugabe von festem $NaHSO_3$ entfärbt. Der ausgefallene Niederschlag wird abfiltriert und mit Wasser nachgewaschen. Das hellgelbe Filtrat wird mit dem Waschwasser vereinigt und an einer UM-10 Membran durch Ultrafiltration entsalzt. Nach der Gefriertrocknung der entsalzten Retentate werden die "oxidierte DNA" und die "oxidierten Purinnucleotide" in der folgenden Reaktion weiterbehandelt.

TABELLE I

BEDINGUNGEN ZUR OXIDATION DER HERINGSSPERMEN-DNA UND DEREN ANSCHLIESSENDE ALKALISCHE HYDROLYSE ZU DESOXIRIBOADENYLSÄUREN

Oxidation (bei 37°)							Alkalische Hydrolyse (1 h bei 100°)					
Reaktions- ansatz Nr.	DNA* (g)	KMnO ₄ * (g)	NaHCO ₃ * (g)	NaHSO ₃ (g)	pH-Wert	Zeit (h)	"Oxidierter DNA" (g)	KOH (l) (M)		Ausbeute (g) (%)		
1	10	20	46.6	8.1	ca. 8	19	7	0.5	0.3	3.0	30	
2	30	60	46.6	6.8	9.0	19	24	1.0	1.0	9.5	32	
3	30	30	46.6	—	9.0	19	26	1.0	1.0	9.0	30	
4	30	30	46.6	—	9.0	3	25	1.0	1.0	8.5	28	
5	9***	9	42.0	8.0	ca. 8	19	7**	0.5	0.3	5.5	61	

* Gemeinsam in 2 l Wasser gelöst.

** "Oxidierter Purinoligonucleotide".

*** Purinoligonucleotide.

Hydrazinolyse und alkalische Hydrolyse der "oxidierten DNA" und "oxidierten Purinoligonucleotide"

"Oxidierter DNA" bzw. "oxidierte Purinoligonucleotide" (7–26 g) werden in 40–150 ml Hydraziniumhydroxid gelöst und 4 h bei 60° belassen. Anschliessend engt man die Lösung am Rotationsverdampfer auf die Hälfte ein und lässt sie langsam zum 5-fachen Volumenüberschuss an frisch destilliertem Benzaldehyd unter Rühren zutropfen. Da die Reaktion exotherm verläuft, werden die grösseren Ansätze unter Kühlung durchgeführt. Während des Zutropfens der Lösung wird der Benzaldehyd zunächst milchig trübe, später gelb und gegen Ende der ca. 20-min Reaktion fallen gelbe Nadeln aus, die einen Kristallbrei bilden. Durch Zugabe von drei Teilen Äther und einem Teil Wasser wird der Kristallbrei gelöst. Die wässrige Phase wird abgetrennt, anschliessend noch 4–5 mal mit Äther ausgeschüttelt und zum Schluss am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht. Die Rückstände der Reaktionsansätze 1 und 5 werden mit je 500 ml 0.3 M KOH gelöst, während die Reaktionsprodukte aus den Ansätzen 2, 3 und 4 in jeweils 1 l 1 M KOH aufgenommen werden (vgl. Tabelle I). Die alkalische Hydrolyse wird 1 h bei 100° durchgeführt. Dann wird die Lösung im Eisbad auf ca. 5° gekühlt und mit ca. 25%iger Perchlorsäure neutralisiert. Nach der Neutralisation lässt man den Ansatz ca. 12 h im Kühlschrank stehen, saugt den Niederschlag ab und wäscht ihn mit kaltem Wasser nach. Das klare Filtrat wird mit dem Waschwasser vereinigt, an einer UM-2 Membran entsalzt und anschliessend lyophilisiert.

Isolierung von Desoxiriboadenylnsäuren

(1) Säulenchromatographische Trennung der DNA- und Purinoligonucleotidhydrolysate an QAE-Sephadex A-25 bei pH 7.5 (vgl. Fig. 1). Ca. 5 g (60,000–70,000 A₂₆₀-Einheiten) des DNA-Hydrolysates oder der hydrolysierten Purinoligonucleotide werden in 40 ml einer 0.025 M NaCl-Lösung, die mit 0.025 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist, auf eine QAE-Sephadex A-25 Säule gepumpt. Die Säulenfüllung beträgt 70 × 3 cm und ist mit 0.05 M NaCl–0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) äquilibriert. Der Durchfluss wird mit einer Schlauchpumpe auf ca. 700 ml/h eingestellt. Nach dem

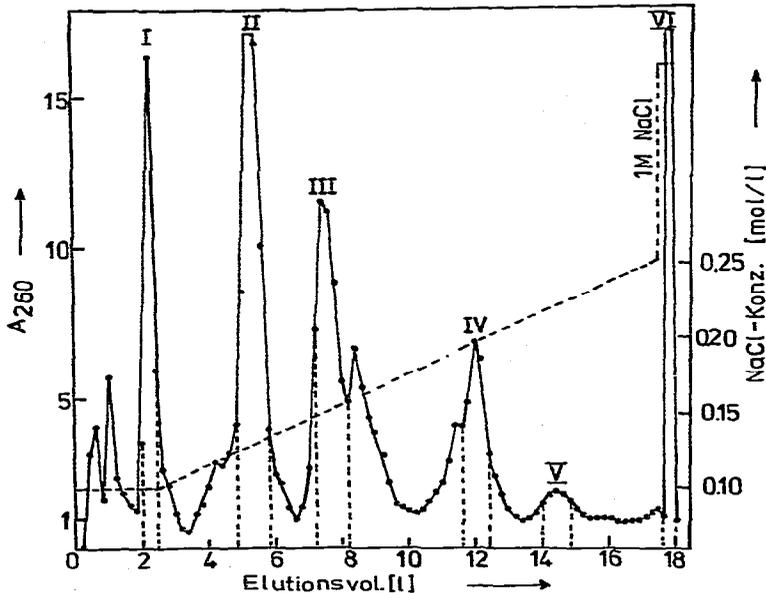


Fig. 1. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Trennung von 5 g des "oxidierten DNA"-Hydrolysates aus Reaktionsansatz 4 (vgl. Tabelle I und II) an QAE-Sephadex A-25. Säulenfüllung: 70×3 cm; Durchfluss: 700 ml/h. Die Elution erfolgt bei 20° im steigenden NaCl-Gradienten, der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist. Abschliessend wird die Säule mit 1 M NaCl eluiert. Die Produkte innerhalb der senkrechten Strichelung werden aufgearbeitet und rechromatographiert (vgl. Fig. 2 und 3).

Auftragen der Probe wird die Säule zunächst bei 20° mit $2.5\text{ l } 0.1\text{ M}$ NaCl eluiert. Fraktionen zu ca. 20 ml werden gesammelt. Die Absorption jeder 10. Fraktion wird spektralphotometrisch bei 250, 260 und 280 nm gemessen. Die graphische Auftragung der bei 260 nm gemessenen Absorptionswerte gegen das Elutionsvolumen führt zu dem in Fig. 1 abgebildeten Elutionsprofil. Bei den Elutionsprofilen der Fig. 2 und 3 wird entsprechend verfahren.

Die Fraktionen von Peak I werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt und an einer UM-05 Membran entsalzt. Anschliessend wird die Säule im linear steigenden NaCl-Gradienten eluiert, der ebenfalls mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist. Der Gradient beginnt mit $5\text{ l } 0.1\text{ M}$ NaCl im Mischgefäss und $5\text{ l } 0.2\text{ M}$ NaCl im Vorratsgefäss und wird dann mit $2.5\text{ l } 0.2\text{ M}$ NaCl im Mischgefäss und $2.5\text{ l } 0.25\text{ M}$ NaCl im Vorratsgefäss fortgesetzt. Nach dem NaCl-Gradienten eluiert man die Säule mit $0.5\text{ l } 1\text{ M}$ NaCl. Die Fraktionen von Peak II-VI werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt. Zur Entsalzung werden die Fraktionen aus Peak II und III an einer UM-2 Membran, die Oligonucleotide aus Peak IV-VI an einer UM-10 Membran ultrafiltriert und anschliessend lyophilisiert. Die A_{260} -Einheiten der vereinigten Peakfraktionen sind gemeinsam mit den Ausbeuten an Lyophilisat in Tabelle II zusammengestellt. Produkte gleicher Peaknummer aus den Reaktionsansätzen werden vereinigt und wie unter (3) beschrieben bei pH 9.6 rechromatographiert.

(2) *Rechromatographie des Lyophilisats von Peak VI der Fig. 1 an QAE-*

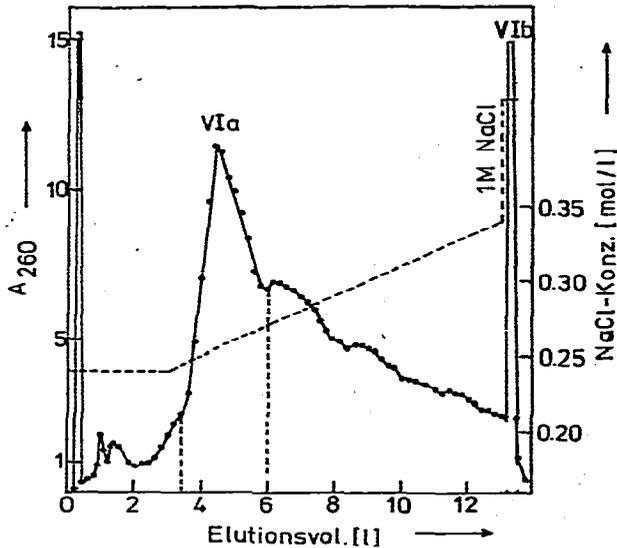


Fig. 2. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung von 5 g der in Peak VI (vgl. Fig. 1) eluierten DNA-Fragmente an QAE-Sephadex A-25. Säulenfüllung: 70×3 cm; Durchfluss: 700 ml/h. Die Elution erfolgt bei 20° im steigenden NaCl-Gradienten, der mit $0.05 M$ Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist (vgl. Tabelle II). Abschliessend wird die Säule mit $1 M$ NaCl eluiert. Die Produkte innerhalb der senkrechten Strichelung von Peak VIa werden aufgearbeitet und rechromatographiert (vgl. Fig. 3).

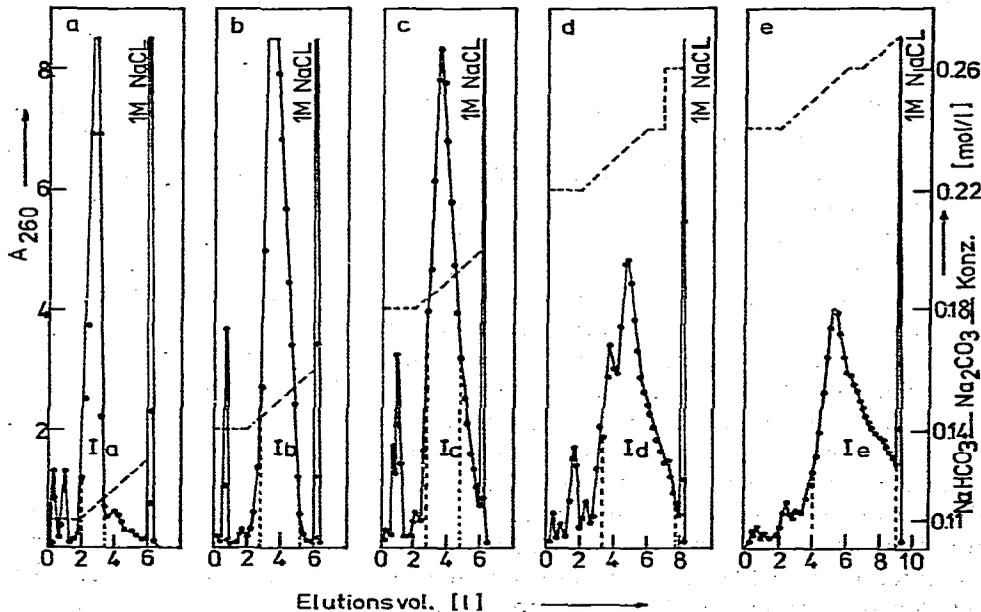


Fig. 3. a-e: Elutionsprofile der säulenchromatographischen Nachtrennung von ca. 1 g der in den Peaks II-V und VIa (vgl. Fig. 1 und 2) eluierten Desoxiriboadenylsäuren an QAE-Sephadex A-25. Säulenfüllung: 45×2 cm; Durchfluss: 600 ml/h. Die Elution erfolgt bei 20° im steigenden NaHCO_3 - Na_2CO_3 -Gradienten bei pH 9.6 (vgl. Tabelle III). Abschliessend wird die Säule mit $1 M$ NaCl eluiert. Die Produkte innerhalb der senkrechten Strichelung werden aufgearbeitet. Die Charakterisierung der in den Peaks Ia-e eluierten Oligoadenylsäuren ist in Tabelle IV-VII zusammengefasst.

TABELLE II

BEDINGUNGEN UND ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNG VON OXIDIERTEN DNA-HYDROLYSATEN AN QAE-SEPHADEX A-25 (VGL. FIG. 1 UND 2)

Ca. 5 g der DNA-Hydrolysate aus den Reaktionsansätzen 1–5 (vgl. Tabelle I) oder 5 g der in Peak VI eluierten Oligoadenylnsäuren werden bei 20° chromatographiert bzw. rechromatographiert. Die Elution erfolgt im NaCl-Gradienten, der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist. Säulenfüllung: 70 × 3 cm, Durchfluss ca. 700 ml/h.

	Peak Nr. (Fig. 1) und Elution bei NaCl (M)						Zwischen- peak- fraktionen	Isolierte Gesamt- menge	
	I	II	III	IV	V	VI		g	%
	0.10	0.12–0.13	0.14–0.16	0.19–0.20	0.21–0.23	1.00			
<i>DNA-Hydrolysat aus Reaktionsansatz 1</i>									
<i>A</i> ₂₆₀ -Einheiten	2800	8200	10,400	8700	5800	8900	15,300		
(%)	4.6	13.6	17.3	14.5	9.6	14.8	25.6		
Isolierte Menge (g)	—	0.58	0.60	0.58	0.35	0.50	—	2.61	52.2
(%)	—	11.6	12.0	11.6	7.0	10.0	—		
<i>DNA-Hydrolysat aus Reaktionsansatz 2</i>									
<i>A</i> ₂₆₀ -Einheiten	2700	6500	14,600	8800	3500	9400	21,000		
(%)	4.0	9.8	21.9	13.2	5.3	14.1	31.6		
Isolierte Menge (g)	—	0.37	0.85	0.47	0.20	0.55	—	2.44	48.8
(%)	—	7.4	17.0	9.4	4.0	11.0	—		
<i>DNA-Hydrolysat aus Reaktionsansatz 3</i>									
<i>A</i> ₂₆₀ -Einheiten	3700	11,100	7600	6800	2800	8300	20,200		
(%)	6.1	18.4	12.6	11.2	4.6	13.7	33.4		
Isolierte Menge (g)	—	0.62	0.41	0.37	0.18	0.48	—	2.06	41.2
(%)	—	12.4	8.2	7.4	3.6	9.6	—		
<i>DNA-Hydrolysat aus Reaktionsansatz 4</i>									
<i>A</i> ₂₆₀ -Einheiten	4800	12,400	9600	4100	1500	15,200	21,100		
(%)	7.0	18.0	14.0	6.0	2.2	22.1	30.7		
Isolierte Menge (g)	—	0.58	0.54	0.26	0.10	0.87	—	2.35	47.0
(%)	—	11.6	10.8	5.2	2.0	17.4	—		
<i>DNA-Hydrolysat aus Reaktionsansatz 5</i>									
<i>A</i> ₂₆₀ -Einheiten	6000	3900	7800	7000	4800	11,300	21,500		
(%)	9.6	6.3	12.5	11.2	7.7	18.1	34.5		
Isolierte Menge (g)	—	0.23	0.43	0.40	0.27	0.65	—	1.98	39.6
(%)	—	4.6	8.6	8.0	5.4	13.0	—		
<i>Rechromatographie der Oligoadenylnsäuren aus Peak VI</i>									
Peak Nr. (Fig. 2)			VIa			VIb			
Elution bei NaCl (M)			0.24–0.27			1.00			
<i>A</i> ₂₆₀ -Einheiten			22,000			22,300	25,900		
(%)			31.3			31.8	36.9		
Isolierte Menge (g)			1.4			—	—	1.40	28.0
(%)			28.0			—	—		

Sephadex A-25 bei pH 7.5 (vgl. Fig. 2). 5 g (ca. 71,000 *A*₂₆₀-Einheiten) des Lyophilisats von Peak VI (Fig. 1) werden in 40 ml 0.12 M NaCl–0.05 M Tris–HCl (pH 7.5) auf eine QAE-Sephadex A-25 Säule aufgepumpt. Die Säulenfüllung beträgt 70 × 3 cm. Nach dem Auftragen der Probe wird die Säule unter den in (1) beschriebenen Bedingungen zunächst mit 3 l 0.24 M NaCl–0.05 M Tris–HCl (pH 7.5) gewaschen. Anschliessend lässt man 10 l eines linearen NaCl-Gradienten folgen, der mit 0.05 M Tris–HCl auf

pH 7.5 gepuffert ist. 5 l 0.24 M NaCl befinden sich im Mischgefäß, während 5 l 0.34 M NaCl im Vorratsgefäß enthalten sind. Nach dem Gradienten eluiert man die Säule abschliessend mit 0.5 l 1 M NaCl. Der Elutionsverlauf ist in Fig. 2 dargestellt. Die Fraktionen von Peak VI a werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, an einer UM-10 Membran entsalzt und ergeben 1.4 g eines bräunlichen Lyophilisats, das unter (3) beschrieben, bei pH 9.6 nachgetrennt wird.

(3) *Rechromatographie der Oligodesoxiriboadenylsäuren aus Peak II-V und VIa der Fig. 1 und 2 an QAE-Sephadex A-25 bei pH 9.6 (vgl. Fig. 3a-e)*. Jeweils ca. 1 g (ca. 11,000–16,000 A_{260} -Einheiten) der Lyophilisate von Peak II-V und VIa (Fig. 1 und 2) werden in 10 ml NaHCO_3 - Na_2CO_3 -Puffer auf eine QAE-Sephadex A-25 Säule aufgetragen. Die Säulenfüllung beträgt 45×2 cm. Die säulenchromatographischen Trennungen werden unter den in Tabelle III aufgeführten Bedingungen wie folgt durchgeführt. Nach dem Auftragen der Probe wäscht man die Säule bei einem Durchfluss von ca. 600 ml/h zunächst mit 2 l Pufferlösung und lässt dann 4 l eines linearen NaHCO_3 - Na_2CO_3 -Gradienten (pH 9.6) folgen. Nach dem Gradienten wird die Säule in den Trennungen a-c abschliessend mit ca. 0.5 l 1 M NaCl eluiert. Die Rechromatographie der Lyophilisate von Peak V (Fig. 1) bzw. von Peak VIa (Fig. 2) wird nach dem Gradienten mit 1 l 0.24 M bzw. 1 l 0.26 M NaHCO_3 - Na_2CO_3 fortgesetzt. Die Rechromatographie wird mit 0.5 l 1 M NaCl beendet, während in der Trennung e ein zweiter Gradient angefügt wird: 1 l 0.26 M NaHCO_3 - Na_2CO_3 im Mischgefäß; 1 l 0.27 M NaHCO_3 - Na_2CO_3 im Vorratsgefäß. Nach dem zweiten Gradienten wird die Säule abschliessend mit 0.5 l 1 M NaCl eluiert. Die Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung (Fig. 3a-e) werden vereinigt und wie unter (1) beschrieben aufgearbeitet. Die Ergebnisse der Rechromatographie sind in Tabelle IV zusammengefasst.

TABELLE III

BEDINGUNGEN ZUR RECHROMATOGRAPHIE VON DESOXIRIBOADENYLSÄUREN AN QAE-SEPHADEX A-25 (VGL. FIG. 3)

Ca. 1 g der Lyophilisate aus Peak II-V und VIa (vgl. Tabelle II) werden bei 20° chromatographiert. Die Elution erfolgt im NaHCO_3 - Na_2CO_3 -Gradienten bei pH 9.6. Säulenfüllung: 45×2 cm; Durchfluss: ca. 600 ml/h.

Aufgetragene Lyophilisate				Konzentration des NaHCO_3 - Na_2CO_3 -Puffers (mM)		Peak I (Fig. 3)
Peak Nr.	Fig.	A_{260} -Einheiten	Gelöst in 10 ml NaHCO_3 - Na_2CO_3 (mM)	Waschlösung 2 l	Gradient 2 l → 2 l	Elution erfolgt von-bis
II	1	10,700	55	110	110 → 130	110-117 a
III	1	15,300	70	140	140 → 160	142-155 b
IV	1	14,900	90	180	180 → 210	183-194 c
V	1	16,300	110	220	(1) 220 → 240 (2) 11 240	227-240 d
VIa	2	13,100	120	240	(1) 240 → 260 (2) 11 260 (3) 11 260 → 11 270	250-270 e

TABELLE IV

ERGEBNISSE DER RECHROMATOGRAPHIE VON DESOXIRIBOADENYLSÄUREN AUS PEAK II-V UND VI_a (VGL. TABELLE II, FIG. 3) AN QAE-SEPHADEX A-25 BEI pH 9.6

Peak (Fig. 3)	<i>A</i> ₂₆₀ -Einheiten		Bezeichnung	Peakanteil (%) [*]
	Isoliert	Anteil der Mischung (%)		
Ia	6700	62.6	p(dA) ₂	77
			(dA) ₂ p	22
			Unbekannt	1
Ib	13,000	85.0	pdAp	93
			p(dA) ₃ , (dA) ₃ p ^{***}	3
			Unbekannt	4
Ic	9700	65.1	p(dA) ₂ p	42
			p(dA) ₂ pR ^{**}	40
			Unbekannt	18
Id	11,400	69.7	p(dA) ₃ p	29
			p(dA) ₂ pRp ^{**}	32
			p(dA) ₃ pR ^{**}	26
			p(dA) ₂ pR ^{**}	3
			Unbekannt	10
Ie	7700	58.7	p(dA) ₄ p	16
			p(dA) ₆ , (dA) ₆ p ^{***}	6
			Unbekannt	78

* Papierchromatographisch aus *A*₂₆₀-Einheiten ermittelt.

** Hypothetische Struktur mit unbekanntem Rest R.

*** Mischung aus Sequenzisomeren.

ERGEBNISSE

Als Ausgangsmaterial verwenden wir DNA aus Heringsspermen, die als technisches Produkt preisgünstig im Handel angeboten wird und ohne zusätzliche Reinigung für unsere Zwecke verwendet werden kann.

Da nach der von Jones *et al.*² angegebenen Vorschrift 30 g DNA in einem Ansatz nicht praktikabel zu oxidieren sind, wird zur Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen, die DNA unter verschiedenen Bedingungen oxidiert. Die Oxidation wird in wässriger NaHCO₃-Lösung bei 37° mit unterschiedlichen Mengen an KMnO₄, bei verschiedenen Konzentrationen und während unterschiedlich langer Reaktionszeiten entweder bei pH 8–9 oder exakt bei pH 9 durchgeführt. Die Bedingungen und Ausbeuten sind für die einzelnen Reaktionsansätze in Tabelle I zusammengefasst.

In den Ansätzen 1 und 2 behält die, durch KMnO₄ violett gefärbte Reaktionslösung, ihre Farbe während der gesamten Reaktionszeit. Der KMnO₄-Überschuss wird nach der Oxidation mit NaHSO₃ reduziert. Dagegen entfärben sich die Reaktionslösungen der Ansätze 3 und 4 im Verlauf der Reaktion, so dass unter diesen Bedingungen das eingesetzte KMnO₄ vollständig zur Oxidation verbraucht wird. Nach der Oxidation wird der ausgefallene Braunstein abfiltriert, das Filtrat neutralisiert und zur Entfernung von Salz und niedermolekularen Fragmenten an einer UM-10 Membran ultrafiltriert. Das salzfreie Retentat wird lyophilisiert und man erhält die "oxidierte DNA" als gelbliches Pulver. Die Ausbeute an "oxidierte DNA" liegt, bezogen

auf die Menge der eingesetzten DNA, bei durchschnittlich 82%. Aus den Ausbeuten der Reaktionsansätze 1–4 (vgl. Tabelle I) folgt, dass die Oxidation weitgehend konzentrationsunabhängig ist, bei pH 8–9 abläuft und bereits nach 3 h beendet ist.

Nach der Oxidation werden die Ureidogruppen der "oxidierten DNA", wie von Jones und Walker⁴ beschrieben, durch Hydrazinolyse und Benzaldehydbehandlung in Aldehydgruppen überführt. Dann wird die DNA unter den in Tabelle I angegebenen Bedingungen mit überschüssiger KOH in Oligodesoxiriboadenylsäurefragmente gespalten. Die von uns verwendeten, unterschiedlichen KOH-Konzentrationen wirken sich nicht signifikant auf die Ausbeute an Hydrolyseprodukten aus, so dass die alkalische Hydrolyse der "oxidierten DNA" nicht an exakte Konzentrationsbedingungen gebunden ist. Die Hydrolysate werden an einer UM-2 Membran durch Ultrafiltration von Salz und zum Teil auch von niedermolekularen Verbindungen befreit und dann lyophilisiert. Die durchschnittliche Ausbeute an DNA-Hydrolysat liegt bei 30% bezogen auf die Menge der eingesetzten Heringsspermen-DNA.

Zur Überprüfung der Oxidationsreaktion werden im Reaktionsansatz 5 (vgl. Tabelle I) Purinoligonucleotide anstelle der DNA eingesetzt. Purinoligonucleotide erhält man durch Depyrimidinierung nach der von Türler und Chargaff⁷ beschriebenen Methode, die wir mit entsprechender Änderung im 40 g Ansatz durchführen. Die depyrimidierte DNA wird alkalisch hydrolysiert und das neutralisierte Hydrolysat säulenchromatographisch in nieder- und höhermolekulare Purinoligonucleotide getrennt. Die isolierten höhermolekularen Fragmente werden mit einem Überschuss an KMnO_4 19 h oxidiert und anschliessend wie "oxidierte DNA" unter den in Tabelle I angegebenen Bedingungen weiterbehandelt. Die Ausbeute an Lyophilisat beträgt, bezogen auf die eingesetzte Purinoligonucleotidmenge, 61% und entspricht der Ausbeute, die beim Abbau der Heringsspermen-DNA erhalten wird. Die gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des DNA- und Purinoligonucleotidabbaus beweist, dass nur die Pyrimidinbasen und Guanin, nicht aber Adenin oxidativ zerstört werden.

Zur Gewinnung der Oligodesoxiriboadenylsäuren aus den Hydrolysaten verwenden wir die zur Isolierung synthetischer Oligonucleotide bewährten Trennmethoden. Das Hydrolysat wird daher zunächst an dem Anionenaustauscher QAE-Sephadex A-25 im steigenden Salzgradienten säulenchromatographisch in Komponenten steigender Phosphatladung fraktioniert. Jeweils 5 g eines Lyophilisats (vgl. Tabelle II) werden an einer Säulenfüllung von 70×3 cm unter identischen Bedingungen zunächst bei pH 7.5 im NaCl-Gradienten chromatographiert. Der Elutionsverlauf wird spektralphotometrisch bei 250, 260 und 280 nm verfolgt. Die gemessenen Absorptionenwerte bei 260 nm werden gegen das Elutionsvolumen aufgetragen und führen zu dem in Fig. 1 abgebildeten Elutionsprofil. In Fig. 1 ist stellvertretend für die übrigen Trennungen das Elutionsprofil der aus dem Reaktionsansatz 4 erhaltenen Hydrolysate abgebildet, da die Elutionsprofile aller 5 Hydrolysate grundsätzlich untereinander übereinstimmen.

Nach dem Auftragen der Probelösung eluiert man die Säule zuerst mit 0.1 M NaCl. Bei dieser Salzstärke werden 2 kleine Peaks und später 1 Hauptpeak eluiert. Im darauf folgenden, linear von 0.1 M bis 0.25 M NaCl steigenden Gradienten verlassen nacheinander weitere 4 Hauptpeaks die Säule. Bei der abschliessenden Elution mit 1 M NaCl wird der 6. Hauptpeak erhalten. Die deutlich von einander abgetrennten Peaks treten in allen 5 Trennungen an identischen Positionen aber mit unterschied-

lichen Höhen auf. Die in Tabelle II aufgeführten Daten lassen keinen direkten Zusammenhang zwischen den Reaktionsbedingungen und der Veränderung eines bestimmten Peaks erkennen.

Die gemessenen Absorptionsverhältnisse der Peakfraktionen, die für 280/260 zwischen 0.19 und 0.45 liegen, deuten bereits darauf hin, dass in den verschiedenen Peaks als Hauptprodukte Oligoadenylsäuren enthalten sind, da die berechneten Absorptionsverhältnisse von 280/260 für Adenylsäuren mit 0.19–0.25 angegeben werden⁶. Bei Anwesenheit von Oligomeren der Thymidyl-, Cytidyl- und Guanylsäure sollten die Absorptionsverhältnisse der Peakfraktionen für 280/260 bei 0.73, 0.98 bzw. 0.67 liegen. Fraktionen im An- und Abstieg der Peaks, die 280/260 Verhältnisse von 0.30 und höher aufweisen, werden verworfen, so dass nur die Fraktion innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt werden. Die vereinigten Fraktionen werden konzentriert, durch Ultrafiltration entsalzt und lyophilisiert. Nach der säulenchromatographischen Trennung und Aufarbeitung verbleiben vom ursprünglichen Hydrolysat noch ca. 40–50%.

Die papierchromatographische Untersuchung der isolierten Peakfraktionen aller 5 Hydrolysate zeigt, dass in sich entsprechenden Peaks grundsätzlich die gleichen Hauptprodukte eluiert werden, so dass wir die Lyophilisate gleicher Peaknummer vereinigen. Die papierchromatographische Untersuchung im Laufmittelsystem A und B zeigt, dass Peak I als Hauptprodukt eine im R_F -Wert mit gekauftem pdA identische Substanz enthält. Die Lyophilisate von Peak II–V erweisen sich im Papierchromatogramm als komplex zusammengesetzte Mischungen, deren Komponenten langsamer als pdA wandern und sich somit wie Oligomere der Desoxiriboadenylsäure verhalten. Das Lyophilisat von Peak VI ist so komplex zusammengesetzt, dass es papierchromatographisch nicht aufgetrennt und daher bei pH 7.5 an QAE-Sephadex rechromatographiert wird. Die Nachtrennung führt zu einem geringfügig aufgelösten Elutionsprofil, das in Fig. 2 abgebildet ist. Die Fraktionen aus Peak VIa, die ca. 30% der ursprünglichen Mischung enthalten, werden entsalzt und lyophilisiert, während die übrigen Fraktionen nicht aufgearbeitet werden.

Im folgenden zweiten Trennschritt werden die Lyophilisate von Peak II–V und VIa (Fig. 1 und 2) säulenchromatographisch an QAE-Sephadex bei pH 9.6 nachgetrennt. Jeweils ca. 1 g der 5 verschiedenen Lyophilisate wird an einer Säulenfüllung von 45×2 cm unter den in Tabelle III angegebenen Bedingungen im steigenden NaHCO_3 – Na_2CO_3 Gradienten fraktioniert. In Fig. 3a–e sind die Elutionsprofile abgebildet, die bei der Rechromatographie der Lyophilisate erhalten werden. Allen 5 Elutionsprofilen ist gemeinsam, dass nach mehreren kleinen Peaks immer zwei Hauptpeaks folgen, von denen der erste im steigenden NaHCO_3 – Na_2CO_3 Gradienten, der zweite im 1 M NaCl die Säule verlässt. Die beiden Hauptpeaks, die in Fig. 3a und b noch deutlich voneinander getrennt sind, überlappen sich in Fig. 3c–e in zunehmendem Masse. Aus den Absorptionsverhältnissen von 280/260 sieht man, dass bei allen 5 Trennungen immer der erste Hauptpeak ($280/260 < 0.30$) als Hauptprodukt Oligoadenylsäuren enthält, während im zweiten Hauptpeak ($280/260 < 0.50$) die Anwesenheit von Oligoadenylsäuren weitgehend ausgeschlossen werden kann. Die Fraktionen des zweiten Hauptpeaks werden verworfen. Die Fraktionen von Peak Ia–e die zwischen 59–85% der jeweils aufgetragenen Lyophilisate enthalten (vgl. Tabelle IV), werden vereinigt, entsalzt, lyophilisiert und anschliessend wiederum papierchromatographisch im Laufmittelsystem A und B untersucht. Hierbei zeigt sich, dass in

den verschiedenen Lyophilisaten immer noch eine unterschiedliche Anzahl von Komponenten enthalten ist, die im Papierchromatogramm in mehr oder weniger gut aufgetrennten Flecken wandern.

Alle im Papierchromatogramm auftretenden Flecken eines Lyophilisats werden ausgeschnitten und eluiert. Im Eluat der einzelnen Flecken bestimmt man spektralphotometrisch die A_{260} -Einheiten und errechnet daraus die prozentuale Zusammensetzung des betreffenden Lyophilisats. Die eluierten Hauptprodukte werden konzentriert und im Laufmittelsystem C rechromatographiert. Wandert ein DNA-Fragment in 2 bzw. 3 unterschiedlichen Laufmittelsystemen auf dem Papier als ein einheitlicher Fleck, so wird die Substanz üblicherweise mit "chromatographisch rein" bezeichnet. Da auf einem normalen Papierbogen (60×58 cm) bis zu 800 A_{260} -Einheiten chromatographiert werden können, sind auf diesem Weg praktisch alle Komponenten eines Lyophilisats in präparativen Mengen chromatographisch rein zu isolieren.

Die Struktur der isolierten chromatographisch reinen Nucleotide wird mit den Methoden ermittelt, mit denen bekanntlich seit Jahren die Strukturen synthetischer Oligonucleotide eindeutig bewiesen werden. Zur Strukturbestimmung werden Absorptionsverhältnisse, R_F -Werte und Ergebnisse des enzymatischen Abbaus herangezogen.

Aus den gemessenen Absorptionsverhältnissen von 250/260 und 280/260 (vgl. Tabelle V), die mit den in der Literatur⁸ für Riboadenylsäuren angegebenen Werte sehr gut übereinstimmen, folgt, dass die isolierten DNA-Fragmente Oligomere der Adenylsäuren sind und dass die Anwesenheit von Thymidyl-, Guanyl- und Cytidylsäuren auszuschliessen ist.

Aus dem säulenchromatographischen Verhalten, den R_F -Werten und, soweit vorhanden, mit Hilfe gekaufter und/oder synthetischer Vergleichssubstanzen^{5,6}, die wir in einem anderen Zusammenhang hergestellt haben, wird die Kettenlänge der isolierten Oligoadenylsäuren bestimmt.

Die so ermittelte Struktur der Oligoadenylsäuren wird abschliessend durch enzymatischen Abbau mit alkalischer Phosphatase und Phosphodiesterase aus Schlangengift überprüft und bestätigt⁹⁻¹¹. Die Phosphatase entfernt aus Oligonucleotiden endständige Phosphatgruppen ohne die Polymerketten anzugreifen. Die Entfernung terminaler Phosphatgruppen äussert sich im deutlichen Anstieg des R_F -Wertes. Oligonucleotide gleicher Sequenz, aber unterschiedlicher Anzahl terminaler Phosphatgruppen, sind papierchromatographisch aufgrund ihrer sehr unterschiedlichen R_F -Werte eindeutig zu unterscheiden. Nach dem Phosphataseabbau wird papierchromatographisch einerseits die Vollständigkeit des Abbaus und andererseits nochmals die Reinheit der Produkte überprüft. Aus dem Vergleich der R_F -Werte vor und nach dem Abbau lässt sich mit Sicherheit entscheiden, ob das ursprüngliche Nucleotid 1 und 2 oder keine terminalen Phosphatgruppen aufweist. Die dephosphorylierten Oligonucleotide werden vom Papier eluiert und zur Bestimmung der Kettenlänge mit Phosphodiesterase aus Schlangengift hydrolysiert. Phosphodiesterase aus Schlangengift baut bekanntlich als Exonuclease lineare Oligonucleotide vom 3'-Ende schrittweise ab und setzt dabei aus dephosphorylierten Oligonucleotiden 5'-Mononucleotide und den 5'-terminalen Baustein als Mononucleosid frei⁹. Bei der enzymatischen Hydrolyse der dephosphorylierten Oligodesoxiriboadenylsäuren mit Phosphodiesterase bilden sich somit dA und pdA. Oligodesoxiriboadenylsäuren mit nur einer ter-

TABELLE V

ABSORPTIONSVERHÄLTNISSE DER ISOLIERTEN, CHROMATOGRAPHISCH REINEN DESOXIRIBOADENYLSÄUREN

Adenylnsäuren Bezeichnung	Absorptionsverhältnisse	
	250/260	280/260
p(dA) ₂ , (dA) ₂ P*	0.83 (0.83)***	0.22 (0.19)***
p(dA) ₃ , (dA) ₃ P*	0.83 (0.85) [§]	0.23 (0.24) [§]
p(dA) ₆ , (dA) ₆ P*	0.86	0.30
pdAp	0.79	0.14
p(dA) ₂ p	0.84	0.23
p(dA) ₃ p	0.83	0.23
p(dA) ₄ p	0.85 (0.85) ^{§§}	0.25 (0.25) ^{§§}
(dA) ₂	0.83 (0.83)***	0.19 (0.19)***
(dA) ₃	0.84	0.23
(dA) ₄	0.84	0.24
(dA) ₆	0.86	0.30
p(dA) ₂ pR**	0.79	0.15
p(dA) ₂ pRp**	0.81	0.16
p(dA) ₃ pR**	0.84	0.25
(dA) ₂ pR**	0.78	0.14
(dA) ₃ pR**	0.84	0.20

* Mischung aus Sequenzisomeren.

** Hypothetische Struktur mit unbekanntem Rest R.

*** Berechnet für p(A)₂.§ Berechnet für p(A)₃.§§ Berechnet für p(A)₄.

minalen 5'-Phosphatgruppe werden dagegen ausschliesslich zu pdA abgebaut. Bei der Spaltung von Oligodesoxiriboadenylnsäuren mit nur einer terminalen 3'-Phosphatgruppe werden aus dem Dinucleotid dA und pdAp, aus den höheren Fragmenten dA, pdA und pdAp gebildet. Der Abbau von Oligodesoxiriboadenylnsäurephosphaten p(dA)_np führt auf diesem Weg zu pdA und pdAp. Eine 3'-Phosphatendgruppe erschwert den enzymatischen Abbau mit Phosphodiesterase, so dass kurze Oligonucleotide nur sehr langsam und längere nicht mehr abgebaut werden. Aus diesem Grund sind zur enzymatischen Hydrolyse der 3'-Nucleotide bzw. Nucleotidphosphate höhere Enzymkonzentrationen und längere Reaktionszeiten als bei 5'-Nucleotiden bzw. Oligomeren ohne terminale Phosphatgruppen erforderlich.

Nach dem enzymatischen Abbau wird das Hydrolysat papierchromatographisch getrennt und die hierbei auftretenden Spaltprodukte dA und pdA mit Hilfe gekaufter Referenzsubstanzen identifiziert. Auftretendes pdAp wird mit Phosphatase abgebaut und dann als dA nachgewiesen. Aus der Art der Spaltprodukte kann man feststellen, ob die Oligodesoxiriboadenylnsäuren am 5' oder 3' bzw. an beiden Enden Phosphatgruppen tragen. Zur Ermittlung der Kettenlänge werden die einzelnen Spaltprodukte quantitativ vom Papier eluiert. Aus dem Verhältnis der im Eluat gemessenen A₂₆₀-Einheiten von dA und pdA lässt sich bspw. die ursprüngliche Kettenlänge einer dephosphorylierten Oligoadenylnsäure ermitteln.

Die Charakterisierung und Identifizierung der Lyophilisate von Peak Ia-e, die in Tabelle V-VII zusammengefasst sind, führen im einzelnen zu folgenden Ergebnissen.

TABELLE VI

PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE R_F -WERTE DER ISOLIERTEN DESOXIRIBOADENYL-SÄUREN VOR UND NACH DEM ABBAU MIT ALKALISCHER PHOSPHATASE
A,B,C: siehe *Laufmittelsysteme*.

Adenylsäuren Bezeichnung	R_F -Werte absteigend im Laufmittelsystem			
	A		B	C
	Relativ zu pdA	Nach Phosphataseabbau Relativ zu pdA	Relativ zu pdA	Relativ zu pdA
$p(dA)_2, (dA)_2p^*$	0.38	2.00	0.84	0.98
$pdAp$	0.16	3.73	0.66	0.73
$p(dA)_3, (dA)_3p^*$	0.16	1.07	0.66	0.98
$p(dA)_2p$		2.00	0.50	0.78
$p(dA)_2pR^{**}$		1.39	0.77	
$p(dA)_2pRp^{**}$		1.39	0.54	
$p(dA)_3p$		1.07	0.38	0.82
$p(dA)_3pR^{**}$		0.84	0.67	
$p(dA)_4p$		0.90 ^{***}	0.25	0.74
$p(dA)_6, (dA)_6p^*$		0.49 ^{***}	0.25	0.53

* Mischung aus Sequenzisomeren.

** Hypothetische Struktur mit unbekanntem Rest R.

*** Im System B.

TABELLE VII

ENZYMATISCHE HYDROLYSE DER DESOXIRIBOADENYLSÄUREN MIT PHOSPHODI-ESTERASE AUS SCHLANGENGIFT

Adenylsäuren Bezeichnung	Spaltprodukte	Verhältnisse der Spaltprodukte	
		Erwartet	Gefunden
$p(dA)_2, (dA)_2p^*$	$pdA, pdAp, dA$		
$p(dA)_3, (dA)_3p^*$	$pdA, pdAp, dA$		
$p(dA)_6, (dA)_6p^{***}$	pdA		
$p(dA)_2p$	$pdA, pdAp$	1:1	1.00:1.28
$p(dA)_3p$	$pdA, pdAp$	2:1	2.30:1.00
$(dA)_2$	dA, pdA	1:1	1.14:1.00
$(dA)_3$	dA, pdA	1:2	1.00:1.82
$(dA)_4$	dA, pdA	1:3	1.00:3.20
$(dA)_6$	dA, pdA	1:5	1.00:4.87
$p(dA)_2pR^{***}$	keine		
$p(dA)_3pR^{***}$	keine		
$(dA)_2pR^{***}$	keine		
$(dA)_3pR^{***}$	keine		

* Mischung der Sequenzisomeren.

** Wird nicht gespalten.

*** Hypothetische Struktur mit unbekanntem Rest R.

Peak I (Fig. 1) enthält zu 75% Desoxiriboadenosinmonophosphat, das mit pdA in den Absorptionsverhältnissen und R_F -Werten übereinstimmt. Durch Phosphatasebehandlung lässt sich das Nucleotid vollständig abbauen. Das Abbauprodukt wird im Laufmittelsystem A eindeutig als dA identifiziert.

Das Lyophilisat von Peak Ia enthält zu 99% eine Mischung der sequenzisomeren Dinucleotide $p(dA)_2$ und $(dA)_2p$, die in den Laufmittelsystemen A, B, C als ein Fleck wandern, der im R_F -Wert mit dem von synthetischem $p(dA)_2$ identisch ist. Die Absorptionsverhältnisse der vom Papier eluierten Dinucleotidmischungen stimmen sowohl mit den berechneten Werten als auch mit denen des synthetischen Dinucleotids überein. Nach Phosphatasebehandlung wandert das vollständig abgebaute Produkt im Laufmittelsystem A wiederum als einheitlicher Fleck, der im R_F -Wert mit dem von synthetischem $(dA)_2$ identisch ist. Beim Abbau des Dinucleosidphosphats mit Phosphodiesterase erhält man dA : pdA im Verhältnis 1.14:1. Den eindeutigen Beweis für die Anwesenheit beider Sequenzisomeren im einheitlich wandernden Fleck liefert der direkte Abbau mit Phosphodiesterase aus Schlangengift. Bei der enzymatischen Hydrolyse des aus dem Papier eluierten Substanzflecken mit Phosphodiesterase entstehen ausser pdA auch dA und $pdAp$. Die Bildung von dA kann nicht auf eine möglicherweise in der Phosphodiesterase enthaltene Phosphatase zurückgeführt werden, da im Kontrollversuch aus gekauftem pdA kein dA nachweisbar gebildet wird. Aus den Verhältnissen der A_{260} -Einheiten von pdA : dA + $pdAp$ ergibt sich, dass im Lyophilisat von Peak Ia etwa 77% $p(dA)_2$, das zu pdA abgebaut wird, neben etwa 12% $(dA)_2p$, aus dem dA und $pdAp$ gebildet werden, enthalten sind.

Das Lyophilisat von Peak Ib setzt sich zu 93% aus $pdAp$, zu 4% aus nicht näher untersuchten Verbindungen und zu 3% aus einer Mischung der sequenzisomeren Trinucleotide $p(dA)_3$ und $(dA)_3p$ zusammen. $pdAp$ wird papierchromatographisch im Laufmittelsystem C von den Trinucleotiden und Nebenprodukten befreit und ist auf diesem Weg in chromatographisch reiner Form erhältlich. Durch Behandlung mit Phosphatase lässt sich $pdAp$ vollständig abbauen. Das Abbauprodukt wandert im Laufmittelsystem A als ein Fleck, dessen R_F -Wert und Absorptionsverhältnisse mit dem Referenznucleosid dA identisch sind. Bei der Behandlung von $pdAp$ mit Phosphodiesterase können keine Spaltprodukte nachgewiesen werden. Dieser Befund ist ein zusätzlicher Beweis, dass die verwendete Phosphodiesterase keine Phosphatase enthält. Die Mischung der sequenzisomeren Trinucleotide wird zwar papierchromatographisch nicht aufgetrennt, kann aber im Laufmittelsystem C von den übrigen Verbindungen des Lyophilisats vollständig befreit werden. Bei der Behandlung mit Phosphatase werden die Trinucleotide vollständig abgebaut. Das Abbauprodukt stimmt sowohl in den Absorptionsverhältnissen als auch im R_F -Wert mit synthetischem $(dA)_3$ überein und wird von Phosphodiesterase zu dA und pdA im Verhältnis 1:1.82 gespalten. Die Anwesenheit beider Sequenzisomeren wird dadurch bewiesen, dass beim direkten Abbau, der vom Papier eluierten Trinucleotidmischung, mit Phosphodiesterase als Spaltprodukte pdA , dA und $pdAp$ auftreten. Aus den Verhältnissen der A_{260} -Einheiten von pdA : dA : $pdAp$ errechnet sich, dass die Mischung ca. 92% $p(dA)_3$ neben ca. 8% $(dA)_3p$ enthält.

Das Lyophilisat in Peak Ic trennt sich im Papierchromatogramm in mehrere Neben- und 2 Hauptflecken auf, die jeweils 42% bzw. 40% der aufgetragenen A_{260} -Einheiten enthalten. Der langsam wandernde Hauptfleck erweist sich in den Laufmittelsystemen A, B und C als einheitlich und wird auf folgendem Weg eindeutig als $p(dA)_2p$ identifiziert. Nach der Behandlung mit Phosphatase ist das Abbauprodukt papierchromatographisch einheitlich, im R_F -Wert und in den Absorptionsverhältnissen mit synthetischem $(dA)_2$ identisch und wird von Phosphodiesterase zu dA und pdA im Verhältnis 1.14:1.00 gespalten. Beim direkten Abbau mit Phosphodiesterase erhält

man pdA und pdAp. Der schneller wandernde Hauptfleck, der in den Laufmittelsystemen A und B einheitlich wandert, enthält vermutlich aus folgenden Gründen ein unvollständig hydrolysiertes Fragment der Oligodesoxiriboadenylsäure. Beim Abbau mit Phosphatase steigt der R_F -Wert so an, dass vermutlich nur eine terminale Phosphatgruppe abgespalten wird. Das dephosphorylierte Produkt kann aber anschliessend nicht mit Phosphodiesterase hydrolysiert werden. Wir nehmen daher an, dass mit Phosphatase die 5'-Phosphatgruppe entfernt wird, während ein unbekannter Rest R das 3'-Ende vor dem Angriff der Phosphodiesterase schützt. Aufgrund der Absorptionsverhältnisse und der säulen- und papierchromatographischen Daten weist das 2. Hauptprodukt aus Peak Ic vermutlich die Struktur $p(dA)_2pR$ oder $(dA)_2pRp$ auf.

Im Lyophilisat von Peak Id findet man papierchromatographisch 3 Haupt- und mehrere Nebenprodukte. Auf die Hauptprodukte entfallen im einzelnen jeweils 25–30% und zusammen etwa 87% der A_{260} -Einheiten des Lyophilisats, so dass sich die restlichen 13% auf mehrere, nicht näher identifizierte Nebenprodukte verteilen. Die Hauptprodukte werden vom Papier eluiert, in den Laufmittelsystemen B und C rechromatographiert und dann papierchromatographisch rein erhalten. Die Identifizierung der isolierten Hauptprodukte führt zu folgenden Ergebnissen. Die Absorptionsverhältnisse zeigen, dass die 3 Hauptprodukte aus Oligoadenylsäuren aufgebaut sind. Das Hauptprodukt mit dem niedrigsten R_F -Wert weist aus folgenden Gründen eindeutig die Struktur $p(dA)_3p$ auf. Beim Abbau mit Phosphodiesterase erhält man pdA:pdAp im Verhältnis 2.30:1.00. Beim Abbau mit Phosphatase verliert die Verbindung zwei Phosphatendgruppen. Das dephosphorylierte Produkt ist papierchromatographisch rein, im R_F -Wert und in den Absorptionsverhältnissen mit synthetischem $(dA)_3$ identisch und wird von Phosphodiesterase zu dA und pdA im Verhältnis 1.00:1.82 hydrolysiert. Die beiden schneller wandernden Hauptprodukte werden ebenfalls mit Phosphatase abgebaut. Aus dem unterschiedlichen Anstieg der R_F -Werte nach Phosphataseabbau folgt, dass die eine Oligodesoxiriboadenylsäure, deren R_F -Wert von 0.39 auf 0.84 steigt, nur eine terminale Phosphatgruppe verliert. Der R_F -Wert der anderen Oligodesoxiriboadenylsäure steigt von 0.22 auf 1.39, so dass hier zwei terminale Phosphatgruppen entfernt werden. Die abgebaute Verbindung ist in ihrem R_F -Wert mit dem Abbauprodukt des zweiten Hauptprodukts ($R_F = 1.39$) aus Peak Ic identisch. Beide Oligodesoxiriboadenylsäuren aus Peak Id sind nach der Phosphatasebehandlung mit Phosphodiesterase nicht spaltbar, so dass vermutlich das 3'-Ende wiederum mit einem unbekanntem Rest R blockiert ist. Wir nehmen daher an, dass die Oligodesoxiriboadenylsäure mit dem R_F -Wert von 0.39 die Struktur $p(dA)_3pR$ oder $(dA)_3pRp$, die andere die Struktur $p(dA)_2pRp$ aufweist. Mit dieser Annahme lassen sich sowohl die chromatographischen Eigenschaften als auch die Ergebnisse des enzymatischen Abbaus plausibel erklären.

Das Lyophilisat von Peak Ie wandert im System B zu 80% als Bande, während die restlichen 20% einen langsamer wandernden Flecken bilden, der zur weiteren Identifizierung eluiert und im Laufmittelsystem C nachgereinigt wird. Bei der Nachtrennung erhält man zwei Flecken. Der schneller wandernde Fleck wird aus folgenden Gründen als $p(dA)_4p$ identifiziert. Mit Phosphatase wird der eluierte Fleck vollständig abgebaut. Das Abbauprodukt wandert im Laufmittelsystem B als einheitlicher Fleck, der im R_F -Wert und in den Absorptionsverhältnissen mit synthetischem $(dA)_4$ identisch ist. Mit Phosphodiesterase wird das Abbauprodukt in dA und $p(dA)$ im Ver-

hältnis 1:3.2 gespalten. Im zweiten, langsamer wandernden Flecken werden die Sequenzisomeren $p(dA)_6$ und $(dA)_6p$ nachgewiesen. Aus dem eluierten Fleck erhält man nach Phosphataseabbau ein chromatographisch reines Produkt, das im R_F -Wert mit synthetischem $(dA)_6$ identisch ist und durch Phosphodiesterase vollständig zu dA und pA im Verhältnis 1:4.87 hydrolysiert wird. Die Anwesenheit beider Sequenzisomeren beweist der direkte Abbau mit Phosphodiesterase. Hierbei werden nur etwa 60% hydrolysiert, während die restlichen 40% nicht gespalten werden. Das nicht abgebaute Produkt lässt sich durch Phosphatase in $(dA)_6$ überführen. Aus den Verhältnissen der A_{260} -Einheiten folgt, dass sich die Mischung zu etwa 60% aus $p(dA)_6$ und zu 40% aus $(dA)_6p$ zusammensetzt.

DISKUSSION

Unsere Ergebnisse bestätigen grundsätzlich die Angaben von Jones *et al.*, zeigen aber darüber hinaus, dass nicht nur DNA, sondern auch Purinoligonucleotide durch Oxidation mit $KMnO_4$ und anschließender alkalischer Hydrolyse im präparativen Massstab gezielt zu Oligodesoxiriboadenylsäuren abgebaut werden können. Aus der durchschnittlichen Ausbeute an Adenylsäuren, die 30% bezogen auf die eingesetzte DNA Menge, bzw. 61% bezogen auf die Purinoligonucleotidmenge beträgt, lässt sich abschätzen, dass die Heringsspermen-DNA je zu 30% aus Adenyl- und Thymidyl- und je zu 20% aus Guanyl- und Cytidylsäuren aufgebaut ist und somit ein Molverhältnis von $dA + dT/dG + dC$ von *ca.* 1.50 erwarten lässt. Der Wert steht in gutem Einklang mit den in der Literatur für Heringsspermen-DNA angegebenen Molverhältnis von 1.27¹². Für die präparative säulenchromatographische Auftrennung der Hydrolysate, die wir im 5 g Ansatz durchführen, eignet sich unserer Erfahrung nach QAE-Sephadex besser als die von Jones *et al.* für die Auftrennung von 40 mg Hydrolysat verwendete DEAE-Cellulose. QAE-Sephadex ermöglicht als Perlpolymerisat eine homogene Säulenpackung mit hohem Durchfluss und weist ausserdem eine höhere Trennkapazität als DEAE-Cellulose auf. Bei der säulenchromatographischen Fraktionierung der Hydrolysate erhalten wir etwa das von Jones *et al.* beschriebene Elutionsprofil. In den verschiedenen Fraktionen finden wir aber nicht nur die von den Autoren qualitativ nachgewiesenen oder vermuteten Oligodesoxiriboadenylsäuren, die wir in chromatographisch reiner Form präparativ isolieren, sondern noch weitere DNA-Fragmente, die von den Autoren nicht erwähnt oder nicht gefunden werden. Hierzu zählen das Desoxiriboadenosinmonophosphat, die verschiedenen sequenzisomeren Oligodesoxiriboadenylsäuren und die vermutlich unvollständig abgebauten, am 3'-Ende mit einem unbekanntem Rest R blockierten Fragmente, der hypothetischen Strukturen $p(dA)_2pRp$, $p(dA)_2pR$, $(dA)_2pRp$, $(dA)_3pRp$, $p(dA)_3pR$. Der mit R bezeichnete Rest ist möglicherweise die ungesättigte Aldehydgruppe, die nach den Untersuchungen von Jones *et al.*¹³ im Verlauf des DNA-Abbaus zwar auftritt, aber unter alkalischen Bedingungen hydrolytisch sehr schnell abgespalten werden sollte.

Die Anwesenheit unterschiedlich hydrolysierter DNA-Fragmente kompliziert die präparative Isolierung chromatographisch reiner Oligodesoxiriboadenylsäuren aus dem DNA-Hydrolysat erheblich. Nach zwei säulenchromatographischen Trennungen und einem anschließenden papierchromatographischen Trennschritt sind bisher nur Fragmente mit bis zu sechs Monomereinheiten in chromatographisch reiner Form

aus den Hydrolysaten zu gewinnen. Zur Zeit versuchen wir mit anderen Trennmethoden auch die höhermolekularen Oligodesoxiriboadenylsäurefragmente zu isolieren, die mit Sicherheit in den Hydrolysaten enthalten sind. In Tabelle VIII sind die Desoxiriboadenylsäuren zusammengestellt, die wir bisher in chromatographisch reiner Form, in präparativen Mengen aus den DNA-Hydrolysaten erhalten. Die Mengenangaben sind aus den A_{260} -Einheiten der papierchromatographisch isolierten Nucleotide hochgerechnet und somit nur als Orientierungsdaten anzusehen, die nicht die tatsächliche Verteilung der Adenylsäuresegmente einer Heringsspermen-DNA wiedergeben. Die in der Tabelle aufgeführten Oligodesoxiriboadenylsäuren sind durch präparative Isolierung aus DNA Hydrolysaten wesentlich einfacher als durch chemische Synthese zugänglich.

TABELLE VIII

HOCHGERECHNETE MENGE DER DESOXIRIBOADENYLSÄUREN, DIE AUS 100 g HERINGSSPERMEN-DNA NACH OXIDATIVEM ABBAU, ALKALISCHER HYDROLYSE UND DREI CHROMATOGRAPHISCHEN TRENNSTRIITTEN IN CHROMATOGRAPHISCH REINER FORM DIREKT (I) ODER NACH PHOSPHATASEABBAU (II) ZUGÄNGLICH SIND

Bezeichnung der Adenylsäuren		Mengen (mg)
I	II	
p(dA) ₁		2600
p(dA) ₂ , (dA) ₂ P*		1700
p(dA) ₂ P		700
	(dA) ₂	2400
p(dA) ₂ PR**		650
	(dA) ₂ PR**	850
p(dA) ₃ , (dA) ₃ P*		<100
p(dA) ₃ P		250
	(dA) ₃	350
p(dA) ₃ PR**		200
	(dA) ₃ PR**	200
p(dA) ₄ P		<100
	(dA) ₄	<100
p(dA) ₆ , (dA) ₆ P*		< 50
	(dA) ₆	< 50

* Mischung aus Sequenzisomeren.

** Hypothetische Struktur mit unbekanntem Rest R.

DANK

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die grosszügige Unterstützung dieser Arbeit.

ZUSAMMENFASSUNG

Der chemische Abbau von DNA aus Heringsspermen zu Purinoligonucleotid- oder Desoxiriboadenylsäuregemischen wird im präparativen Massstab beschrieben. Die Desoxiriboadenylsäuregemische werden an QAE-Sephadex A-25 bei pH

7.5 säulenchromatographisch in sechs Hauptfraktionen getrennt. Die 1. Fraktion erhält zu 75% Desoxiriboadenosinmonophosphat, die 2. zu 99% eine Mischung aus $p(dA)_2$, $(dA)_2p$ und die 3. zu 93% $pdAp$. In den darauf folgenden Fraktionen werden mehr oder weniger komplex zusammengesetzte Mischungen längerkettiger Oligonucleotide eluiert, die durch Rechromatographie an QAE-Sephadex bei pH 9.6 weiter aufgetrennt werden. Aus den vorgetrennten Fraktionen werden papierchromatographisch die Nucleotidphosphate $pdAp$, $p(dA)_2p$, $p(dA)_3p$, $p(dA)_4p$ sowie die Mischungen der Sequenzisomeren $p(dA)_2$, $(dA)_2p$; $p(dA)_3$, $(dA)_3p$ und $p(dA)_6$, $(dA)_6p$ in präparativen Mengen chromatographisch rein isoliert.

Durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase werden die Nucleotidphosphate in $(dA)_2$, $(dA)_3$ oder $(dA)_4$ und die Mischungen der Sequenzisomeren in $(dA)_2$, $(dA)_3$ oder $(dA)_6$ überführt. Auf diesem Weg sind auch dephosphorylierte Oligodesoxiriboadenylsäuren in papierchromatographisch reiner Form in präparativen Mengen aus den Hydrolysaten erhältlich.

Die Struktur aller isolierten Desoxiriboadenylsäuren wird aus Absorptionsverhältnissen, R_F -Werten und durch enzymatischen Abbau bewiesen.

LITERATUR

- 1 R. K. Ralph und H. G. Khorana, *J. Amer. Chem. Soc.*, 83 (1961) 2926.
- 2 A. S. Jones, G. W. Ross, S. Takemura, T. W. Thompson und R. T. Walker, *J. Chem. Soc.*, (1964) 373.
- 3 A. S. Jones und R. T. Walker, *Nature (London)*, 202 (1964) 24.
- 4 A. S. Jones und R. T. Walker, *Nature (London)*, 202 (1964) 1108.
- 5 H. Schott, *J. Chromatogr.*, 96 (1974) 79.
- 6 H. Schott, *Makrom. Chem.*, 175 (1974) 1683.
- 7 H. Türler und E. Chargaff, *Biochim. Biophys. Acta*, 195 (1968) 446.
- 8 J. N. Toal, G. W. Rushizky, A. W. Pratt und H. A. Sorber, *Anal. Biochem.*, 23 (1968) 60.
- 9 W. E. Razzell und H. G. Khoranan, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 2105.
- 10 H. Schott, *J. Chromatogr.*, 115 (1975) 461.
- 11 H. Schott und M. Schwarz, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 358 (1977) 949.
- 12 S. Takemura, *Biochim. Biophys. Acta*, 29 (1958) 447.
- 13 A. S. Jones, A. M. Mian und R. T. Walker, *J. Chem. Soc.*, (1968) 2042.