

CHROM. 11,660

PRÄPARATIVE ISOLIERUNG VON TRI-, TETRA-, PENTA- UND HEXA-PYRIMIDINNUCLEOTIDEN AUS HYDROLYSATEN DEPURINIERTER HERINGSSPERMEN-DNA

HERBERT SCHOTT

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

(Eingegangen am 11. Dezember 1978)

SUMMARY

Preparative isolation of tri-, tetra-, penta- and hexapyrimidine nucleotides from hydrolysates of depurinated herring sperm DNA

The pyrimidine nucleotides $p(dC)_3p$, $p(dT)_3p$ and $p(dT)_4p$ and mixtures of the sequence isomers $p(dC_3, dT)$, $(dC_3, dT)p$; $p(dC_3, dT)p$; $p(dC_2, dT_2)p$; $p(dC, dT_3)p$; $p(dC_3, dT_2)p$; $p(dC_2, dT_3)$; $p(dC_2, dT_3)p$; $p(dC, dT_4)p$; $p(dC_4, dT_2)$; $p(dC_3, dT_3)$; $p(dC_3, dT_3)p$ and $p(dC_2, dT_4)p$ have been isolated on a preparative scale from hydrolysates of depurinated herring sperm DNA. The DNA hydrolysate is first separated into a high- and a low-molecular-weight pyrimidine nucleotide mixture by column chromatography at pH 7.5 on DEAE-cellulose. The high-molecular-weight pyrimidine nucleotide mixture is further separated into four peaks on QAE-Sephadex at pH 7.5. The second peak is re-chromatographed on QAE-Sephadex at pH 3.5. Pyrimidine nucleotides containing predominantly cytidylic acid units may thus be separated from these with predominantly thymidylic acid units. Subsequent separation according to number of phosphate groups at pH 7.5 on QAE-Sephadex yields products of 70–93% purity. In a final separation step, the pyrimidine nucleotides and mixtures of sequence isomers are once again chromatographed on QAE-Sephadex with 7 M urea at pH 7.5. The products thus obtained are generally chromatographically pure. Impurities which are not fully removed by column chromatography are separated by paper chromatography. The structure of the isolated DNA fragments and the composition of the mixtures of sequence isomers are determined from the chromatographic data, absorption characteristics and by enzymatic degradation

EINLEITUNG

Zahlreiche Fragen der Molekularbiologie, wie bspw. Wechselwirkungen zwischen kurzen DNA-Fragmenten und Peptiden oder pharmakologische Eigenschaften von Oligonucleotiden definierter Sequenz sind heute noch weitgehend ungeklärt. Untersuchungen dieser wichtigen Fragen scheitern bisher meistens daran, dass die benötigten Oligonucleotide nur in sehr schwierigen chemischen Synthesen zu-

gänglich sind. Obwohl man bei einigen Oligonucleotiden und Nucleotidderivaten eine Adjuvantien-Wirkung gefunden hat¹, wäre eine medizinische Therapie mit definierten Oligonucleotiden beim derzeitigen Stand der chemischen Oligonucleotidsynthese unrealistisch, da die Darstellung der hierzu benötigten Mengen zu aufwendig ist.

Eine einfache Alternative zur chemischen Synthese von Oligonucleotiden sehen wir in der präparativen Isolierung definierter DNA-Fragmente aus Partialhydrolysaten natürlich vorkommender, leicht zugänglicher DNA. Dieses Konzept erscheint uns auch daher besonders attraktiv, da bei zahlreichen biotechnischen Prozessen DNA in ausreichenden Mengen anfällt, für die zur Zeit noch keine Verwendung besteht.

Im Zusammenhang mit der aufgezeigten Thematik gehen wir seit einiger Zeit folgenden Fragen nach:

(a) Auf welchem Weg kann DNA im präparativen Massstab zu definierten Oligonucleotiden abgebaut werden.

(b) Wie und inwieweit können definierte DNA Fragmente im präparativen Massstab aus dem Partialhydrolysat einer DNA isoliert werden.

Als Ausgangsmaterial für unsere Untersuchungen verwenden wir DNA aus Heringsspermen, die im Handel preisgünstig erhältlich ist. Für den Partialabbau der DNA zu Oligonucleotidgemischen bieten sich verschiedene chemische Hydrolyseverfahren an, die aber nur im analytischen Massstab konzipiert sind, da sie zur DNA-Sequenzierung entwickelt wurden²⁻¹⁵. Einige dieser Verfahren lassen sich nach entsprechenden Modifikationen im präparativen Massstab durchführen, so dass man in einem Ansatz *ca.* 100–200 g DNA entweder zu Purinoligonucleotid¹⁶, oder Pyrimidinoligonucleotid^{17,18}, oder zu Oligoadenylsäuregemischen abbauen kann¹⁶.

Aus verschiedenen Gründen haben wir zunächst mit der präparativen Auftrennung der Oligoadenylsäure- und Oligopyrimidinnucleotidgemische begonnen. Die Isolierung definierter Oligomere der Desoxyadenylsäure aus dem Partialhydrolysat der oxydierten Heringsspermen-DNA ist weitgehend abgeschlossen¹⁶, während die Pyrimidinnucleotidmischung zu etwa 60% aufgetrennt ist^{17,18}.

Natürliche DNA weist in ihrem Molekülverband überwiegend kurze Pyrimidinsegmente auf, so dass bei der Hydrolyse einer depurinierten DNA vor allem kurze Pyrimidinnucleotide neben nur wenig langkettigen Fragmenten freigesetzt werden. Zur Isolierung der längeren Pyrimidinnucleotide ist es daher zweckmässig, zunächst die niedermolekularen Fragmente weitgehend von den hochmolekularen Pyrimidinnucleotiden abzutrennen. Hierzu wird das Partialhydrolysat an DEAE-Cellulose säulenchromatographisch in zwei Fraktionen vorgetrennt. Die erste Fraktion, die mit 0.1 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) eluiert wird, enthält Pyrimidinnucleotide mit 1–4 Monomereinheiten. Aus dieser Fraktion, in der *ca.* 60% des aufgetragenen Partialhydrolysats die Säule verlassen, sind folgende Pyrimidinnucleotide definierter Sequenz und Mischungen von Sequenzisomeren in chromatographisch reiner Form zugänglich^{17,18}: pdCp; pdTp; p(dC)₂; p(dT)₂; p(dC)₂p; p(dT)₂p; p(dC)₃; p(dT)₃; p(dC, dT); p(dC, dT)p; p(dC, dT)₂; p(dC, dT)₂p; p(dC₂, dT); p(dC₂, dT)p; p(dT₂, dU); (dT₂, dU)p; p(dC₂, dT₂); p(dC, dT₃).

Ausserdem gelingt es mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie an Ionenaustauschern^{19,20} bisher folgende Mischungen der Sequenzisomeren, deren terminale Phosphatgruppen enzymatisch entfernt wurden, in ihre Komponenten zu trennen: (dC, dT); (dC₂, dT); (dT₂, dC); (dC₃, dT); (dC₂, dT₂); (dC, dT₃). Auf diesem

Weg ist es erstmals möglich, definierte Pyrimidinnucleotide unterschiedlicher Sequenz selektiv aus dem Partialhydrolysat einer DNA im präparativen Massstab zu isolieren.

Die restlichen 40% des Partialhydrolysats verlassen die DEAE-Cellulose-Säule in der zweiten Fraktion, die mit 1 M NaCl eluiert wird. Im folgenden wird ein Trennungsgang beschrieben, nach dem aus dieser Fraktion sowohl definierte Mischungen von Sequenzisomeren als auch Pyrimidinnucleotide definierter Sequenz mit bis zu 6 Monomereinheiten im präparativen Massstab chromatographisch rein zugänglich sind.

EXPERIMENTELLES

Reagenzien

Chemikalien werden in "chemisch reiner" Form verwendet. QAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden); Membranen (Amicon, Lexington, Mass., U.S.A.); Chromatographiepapier 2316 (Schleicher & Schüll, Dassel, B.R.D.); Enzyme: Alkalische Phosphatase, Orthophosphorsäure-Monoester-Phosphohydrolase (alkalisches Optimum) (EC 3.1.3.1); Phosphodiesterase I, Oligonucleat-5-Nucleotidohydrolase (EC 3.1.4.1), (Boehringer, Mannheim, B.R.D.); Nucleoside dT, dC, Nucleotide pdT, pdC, DNA (Waldhof, Mannheim, B.R.D.); die übrigen Referenznucleotide: pdC-dT, p(dT)₂, p(dC)₂, p(dC)₃, (dC)₃, (dT)₃, (dT)₄, (dC)₂, (dC)₂-dT wurden in unserem Labor synthetisiert.

Pufferlösungen

(a) 1 M Natriumacetat-Puffer, pH 3.5: 57 ml (1 mol) Eisessig werden zu 800 ml Wasser gegeben. Der pH-Wert wird mit 40 ml 2 M NaOH auf pH 3.5 eingestellt und die Lösung mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

(b) 1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.5: 121 g (1 mol) α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (Tris) werden in 900 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird mit ca. 50 ml konz. HCl auf pH 7.5 eingestellt und dann mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Laufmittelsysteme

(A) Ethanol-1 M NH₄Ac (pH 7.5) (7:3, v/v); (B) 1-Propanol-konz. NH₄OH-H₂O (55:10:35, v/v/v); (C) iso-Buttersäure-konz. NH₄OH-Wasser (66:1:33, v/v/v).

Säulenchromatographische Fraktionierung hochmolekularer Pyrimidinnucleotide an QAE-Sephadex A-25 bei pH 7.5

Im folgenden wird die weitere Auftrennung der Mischung der langkettigen Pyrimidinnucleotide beschrieben, die bei der ersten Vortrennung des Partialhydrolysats die DEAE-Cellulose-Säule in der zweiten Fraktion mit 1 M NaCl verlässt¹⁷.

30 g des Lyophilisats der zweiten Fraktion werden in 200 ml Wasser gelöst und auf eine mit 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) äquilibrierte QAE-Sephadex A-25-Säule aufgetragen. Die Säulenfüllung beträgt 60 cm \times 5 cm. Nach dem Auftragen der Lösung wird die Säule im steigenden NaCl-Gradienten, der mit 50 mM Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist, in vier Stufen bei Raumtemperatur eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit wird mit Hilfe einer Schlauchpumpe auf ca. 800 ml/h eingestellt. In der ersten Stufe wird die Säule mit 18 l 190 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, in der zweiten Stufe mit 20 l 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl eluiert. In der dritten

Stufe setzt man die Elution mit 10 l 400 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl fort, die in der vierten Stufe mit 3 l 2 M NaCl beendet wird. Die Lösungen der Pyrimidinnucleotide, die mit 0.19, 0.3, 0.4 und 2 M NaCl die Säule verlassen, werden am Rotationsverdampfer soweit konzentriert, bis Salz ausfällt. Die Konzentrate werden durch Ultrafiltration an einer UM 10 Membran bei ca. 500–600 Pa (4–5 atü) entsalzt und anschliessend lyophilisiert. Von 180 g des hochmolekularen Pyrimidinnucleotidgemisches, die auf diesem Weg in 6 Läufen fraktioniert werden, verbleiben nach der Ultrafiltration und Gefriertrocknung ca. 148.6 g (82.6%), die sich wie folgt auf die vier Peaks verteilen:

Peak Nr.	Pyrimidinnucleotide eluiert bei NaCl-Konz. (M)	Isolierte Mengen	
		(g)	(%)
1	0.19	39.7	22.1
2	0.30	75.0	41.7
3	0.40	20.0	11.1
4	2.00	13.9	7.7

In den folgenden Trennungen werden ausschliesslich die Pyrimidinnucleotide aus Peak 2; die mit 0.30 M NaCl eluiert werden, weiter aufgearbeitet.

Säulenchromatographische Fraktionierung des aus der Fraktionierung hochmolekularer Pyrimidinnucleotide erhaltenen Lyophilisats von Peak 2 an QAE-Sephadex A-25 bei pH 3.5 (vgl. Fig. 1)

15 g (ca. 274000 A_{260} -Einheiten) des Lyophilisats von Peak 2 werden in 100 ml Wasser gelöst und auf eine mit 130 mM NaCl, 50 mM NaAc (pH 3.5) äquilibrierte QAE-Sephadex A-25-Säule aufgetragen. Die Säulenfüllung beträgt 60 cm \times 5 cm. Nach dem Auftragen der Lösung wird die Säule im steigenden NaCl-Gradienten, der mit 50 mM NaAc auf pH 3.5 gepuffert ist, in sechs Stufen bei Raumtemperatur eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit wird mit Hilfe einer Schlauchpumpe auf ca. 650 ml/h eingestellt. Bei dieser und den folgenden Trennungen werden Fraktionen zu ca. 20 ml gesammelt. Die Absorption jeder zehnten Fraktion wird spektralphotometrisch bei 260 nm gemessen und graphisch gegen das Elutionsvolumen aufgetragen, wobei die in Fig. 1–6 abgebildeten Elutionsprofile erhalten werden. In der ersten Stufe wird die Säule mit 8 l 130 mM NaCl, 50 mM NaAc eluiert. In der zweiten Stufe folgt ein linear steigender NaCl-Gradient: 5 l 130 mM NaCl, 50 mM NaAc im Mischgefäss; 5 l 200 mM NaCl, 50 mM NaAc im Vorratsgefäss. In der dritten Stufe wird die Säule mit 3 l 200 mM NaCl, 50 mM NaAc eluiert. In der vierten Stufe folgt der zweite linear steigende NaCl-Gradient: 4 l 200 mM NaCl, 50 mM NaAc im Mischgefäss; 4 l 300 mM NaCl, 50 mM NaAc im Vorratsgefäss. In der fünften Stufe wird die Säule mit 4 l 300 mM NaCl, 50 mM NaAc eluiert. In der sechsten und letzten Stufe wird die Säule mit ca. 1 l 1 M NaCl eluiert. Die Fraktionen von Peak I–VI werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, mit NaOH neutralisiert und am Rotationsverdampfer soweit konzentriert, bis Salz ausfällt. Die durch Ultrafiltration entsalzten Lösungen werden wie unter *Säulenchromatographische Fraktionierung hochmolekularer Pyrimidinnucleotide an QAE-Sephadex A-25 bei pH 7.5* beschrieben aufgearbeitet. Nach der Ultrafiltration und Gefriertrocknung werden die Lyophilisate

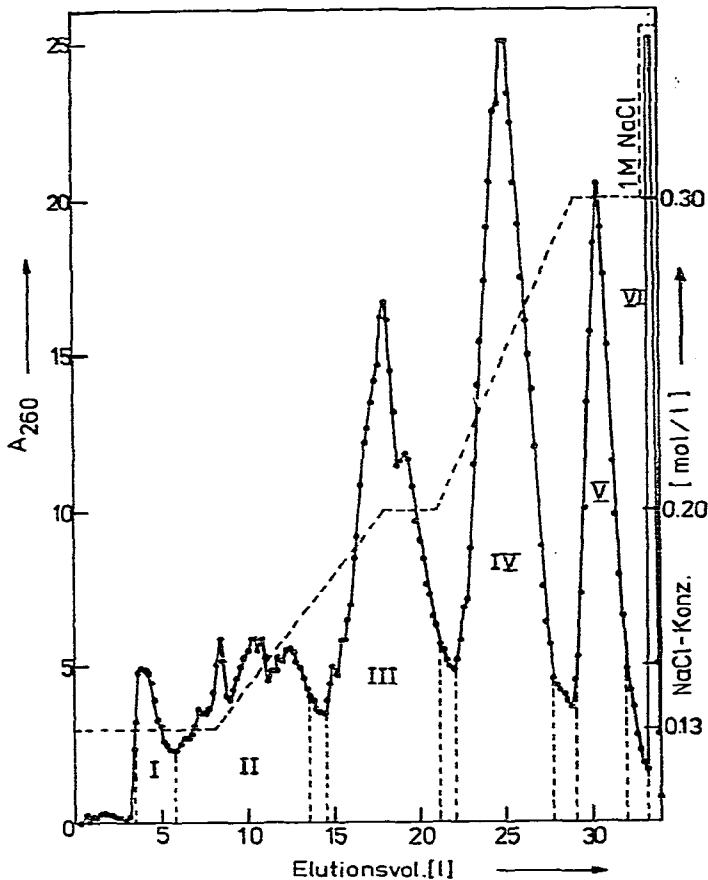


Fig. 1. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Fraktionierung von 15 g (ca. 274,000 A_{260} -Einheiten) eines Pyrimidinnucleotidgemisches aus Hydrolysaten depurinierter Heringsspermen-DNA an QAE-Sephadex A-25 bei pH 3.5. Experimentelle Einzelheiten s. Beschreibung der Versuche und Tabelle I. Die Fraktionen von Peak I-VI werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, entsalzt und lyophilisiert. Die Lyophilisate von Peak I-V werden einzeln rechromatographiert (vgl. Fig. 2-6).

von Peak I-VI in den in Tabelle I aufgeführten Mengen erhalten. In fünf Läufen werden insgesamt 75 g des zweiten Peaks auf diesem Weg fraktioniert.

Rechromatographie der Pyrimidinnucleotidgemische aus Peak I-V der Fig. 1 an QAE-Sephadex A-25 bei pH 7.5 (vgl. Fig. 2-6)

In den folgenden Trennungen werden die Lyophilisate von Peak I-V der Fig. 1 bei pH 7.5 an einer QAE-Sephadex A-25-Säule im steigenden NaCl-Gradienten bei Raumtemperatur rechromatographiert. Die Säulenfüllung beträgt 70×3 cm. Die Elutionsgeschwindigkeit wird mit einer Schlauchpumpe auf ca. 400-500 ml/h eingestellt. Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung (vgl. Fig. 2-6) werden vereinigt und wie unter Säulenchromatographische Fraktionierung hochmolekularer Pyrimidinnucleotide an QAE-Sephadex A-25 bei pH 7.5 beschrieben aufgearbeitet. Die Trennergebnisse sind in Tabelle II zusammengefasst. Die Rechromatographie der einzelnen Lyophilisate wird wie folgt durchgeführt.

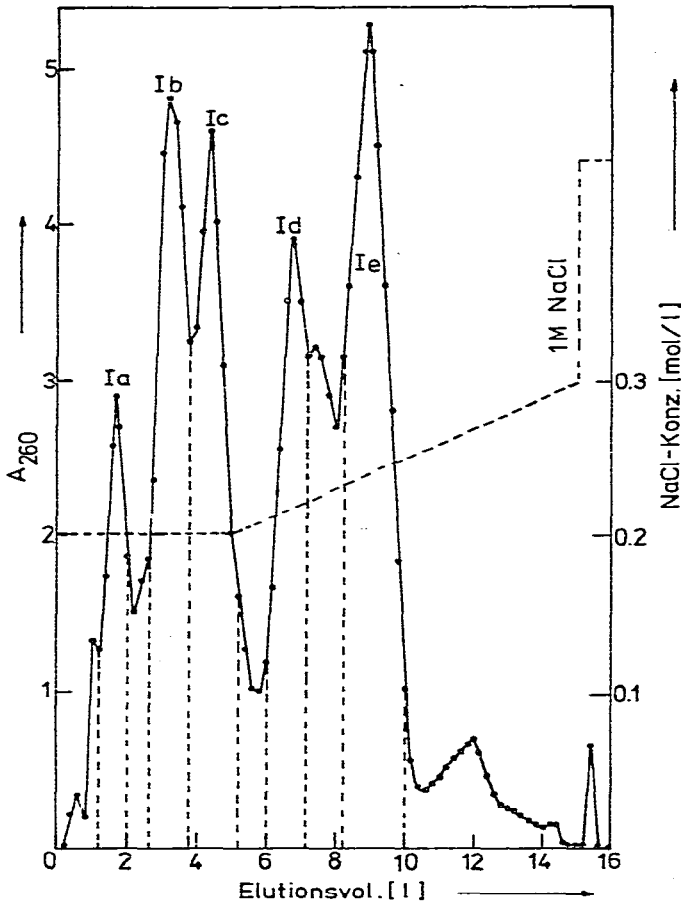


Fig. 2. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung der Pyrimidinnucleotide aus Peak I der Fig. 1 an QAE-Sephadex A-25 bei pH 7.5. Experimentelle Einzelheiten s. Beschreibung der Versuche und Tabelle II. Die Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung werden vereinigt, entsalzt und lyophilisiert. Die Charakterisierung der Pyrimidinnucleotide, die in Peak Ia-e eluiert werden, ist in Tabelle III-V aufgeführt.

Rechromatographie des Lyophilisats von Peak I der Fig. 1 (vgl. Fig. 2). 1.5 g des Lyophilisats von Peak I der Fig. 1 werden in 10 ml Wasser gelöst und auf die mit 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschliessend wird die Säule im steigenden NaCl-Gradienten in drei Stufen eluiert. In der ersten Stufe wird die Säule mit 5 l 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl eluiert. In der zweiten Stufe folgt ein linear steigender NaCl-Gradient: 5 l 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl im Mischgefäss; 5 l 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl im Vorratsgefäss. In der dritten Stufe wird die Säule mit ca. 1 l 1 M NaCl eluiert.

Rechromatographie des Lyophilisats von Peak II der Fig. 1 (vgl. Fig. 3a). 2.5 g des Lyophilisats von Peak II der Fig. 1 werden in 20 ml Wasser gelöst und auf die mit 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschliessend wird die Säule im steigenden NaCl-Gradienten in vier Stufen eluiert. In der ersten Stufe wird die Säule mit 5 l 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl eluiert. In der zweiten

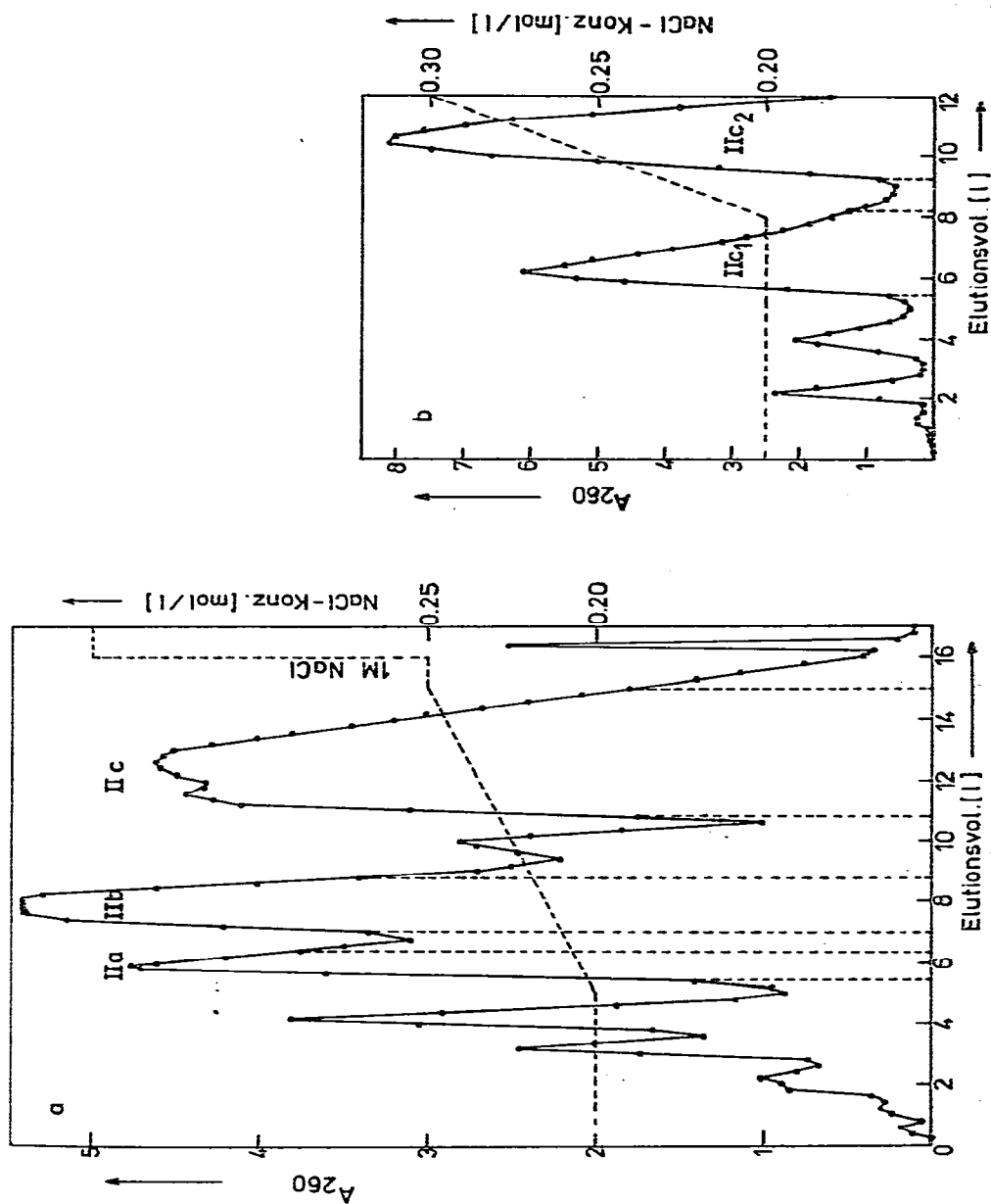


Fig. 3(a). Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung der Pyrimidinnucleotide aus Peak II der Fig. 1 an QAE-Sephadex A-25 bei pH 7.5. Experimentelle Einzelheiten s. Beschreibung der Versuche und Tabelle II. Die Fraktionen von Peak IIa-c werden innerhalb der senkrechten Strichleiten vereinigt, ensalzt und lyophilisiert. (b). Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung des Lyophilisats von Peak IIc der Fig. 3a an QAE-Sephadex A-25 bei pH 7.5 im NaCl-Gradienten unter Zusatz von 7 M Harnstoff. Die Charakterisierung der Pyrimidinnucleotide, die in Peak IIa, b, c₁ und c₂ eluiert werden, ist in Tabelle III-V aufgeführt.

Stufe folgt ein linear steigender NaCl-Gradient: 5 l 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl im Mischgefäß; 5 l 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl im Vorratsgefäß. Nach dem Gradienten eluiert man die Säule in der dritten Stufe mit 1 l 250 mM NaCl, 50 mM

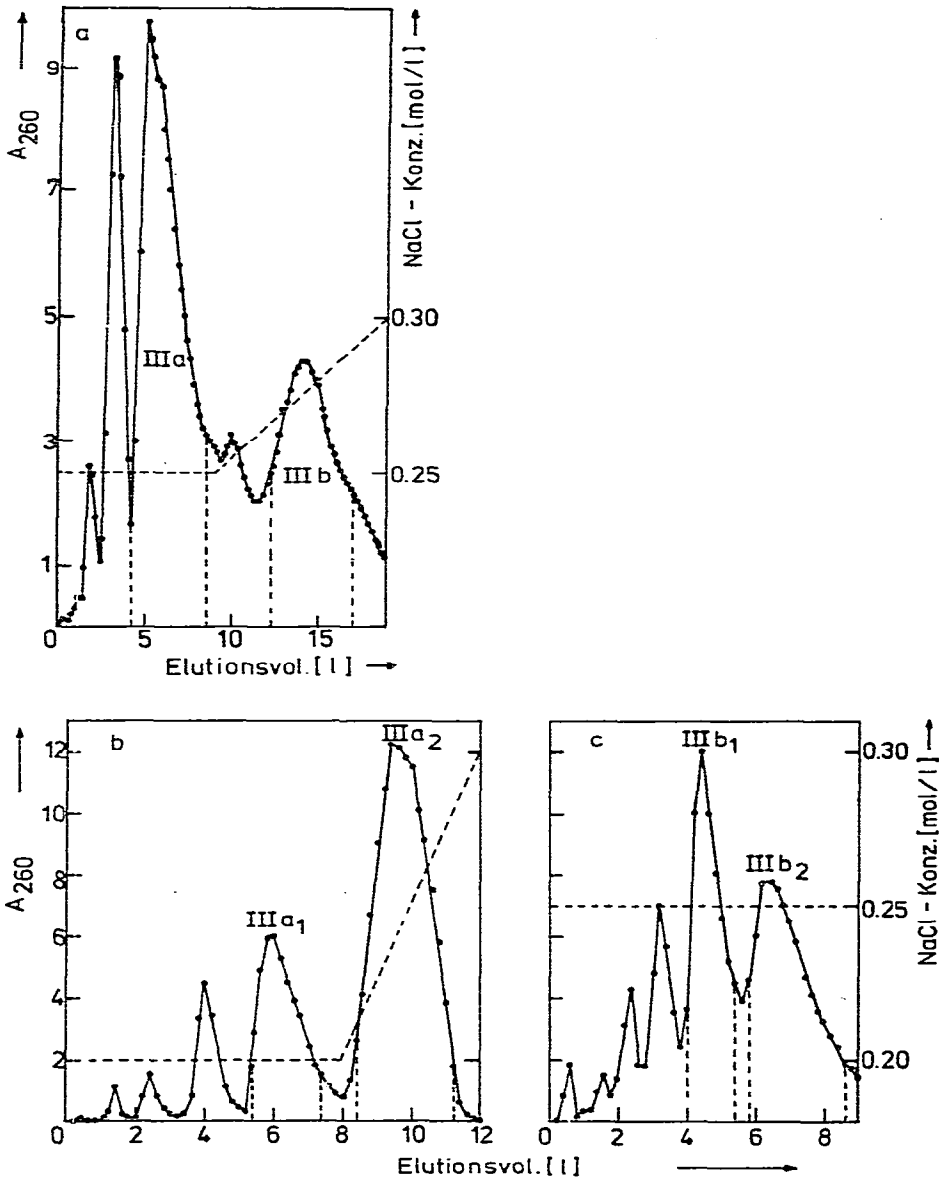


Fig. 4(a). Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung der Pyrimidinnucleotide aus Peak III der Fig. 1 an QAE-Sephadex A-25 bei pH 7.5. Experimentelle Einzelheiten s. Beschreibung der Versuche und Tabelle II. Die Fraktionen von Peak IIIa, b werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, entsalzt und lyophilisiert. (b) Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung des Lyophilisats von Peak IIIa. (c) von Peak IIIb der Fig. 4a an QAE-Sephadex A-25 bei pH 7.5 im NaCl-Gradienten unter Zusatz von 7 M Harnstoff. Die Charakterisierung der Pyrimidinnucleotide, die in Peak IIIa, b, a₁, a₂, b₁ und b₂ eluiert werden, ist in Tabelle III-V aufgeführt.

Tris-HCl. In der vierten Stufe wird die Säule mit *ca.* 1 l 1 M NaCl eluiert. In drei Läufen werden insgesamt 7.5 g des Lyophilisats von Peak II fraktioniert.

Rechromatographie des Lyophilisats von Peak IIc der Fig. 3a (vgl. Fig. 3b). 1.5 g des Lyophilisats von Peak IIc der Fig. 3a werden in 20 ml 7 M Harnstoff gelöst und auf die mit 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschliessend wird die Säule im steigenden NaCl-Gradienten in zwei Stufen eluiert. In der ersten Stufe wird die Säule mit 8 l 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff eluiert. In der zweiten Stufe folgt ein linear steigender NaCl-Gradient: 2 l 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff im Mischgefäss, 2 l 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff im Vorratsgefäss.

Rechromatographie des Lyophilisats von Peak III der Fig. 1 (vgl. Fig. 4a). 3.5 g des Lyophilisats von Peak III der Fig. 1 werden in 20 ml Wasser gelöst und auf die

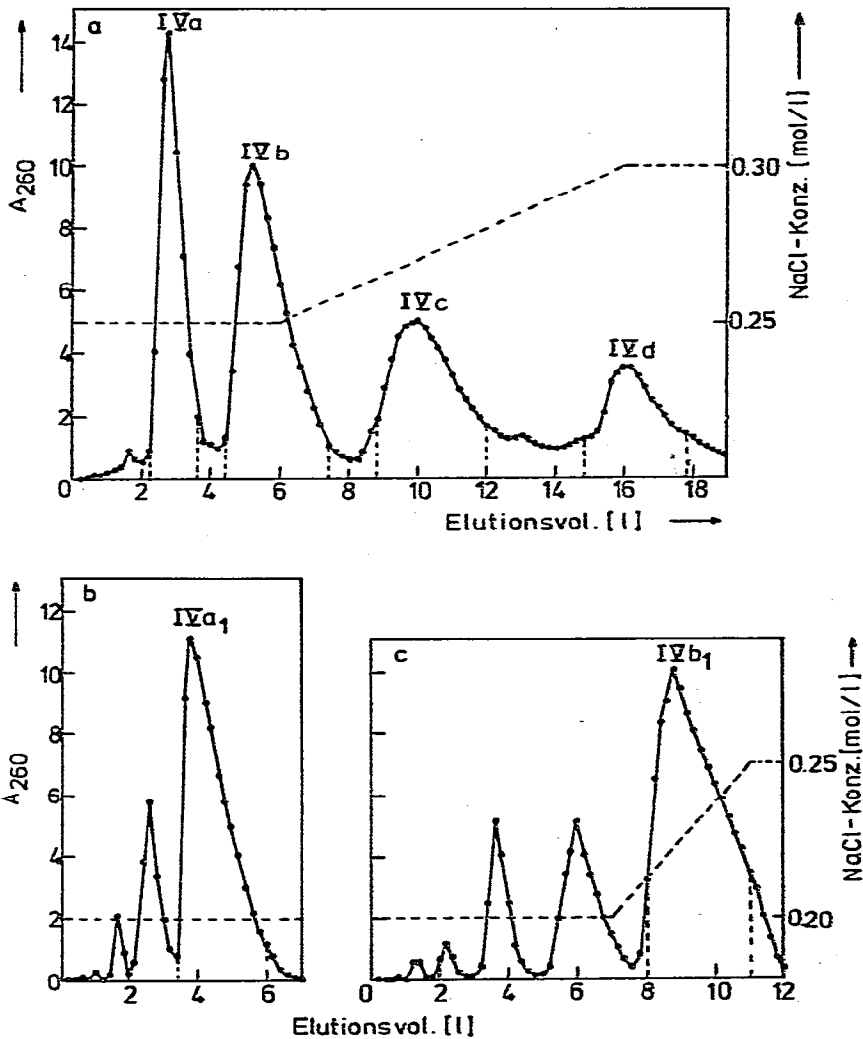


Fig. 5.

(Fortsetzung S. 188)

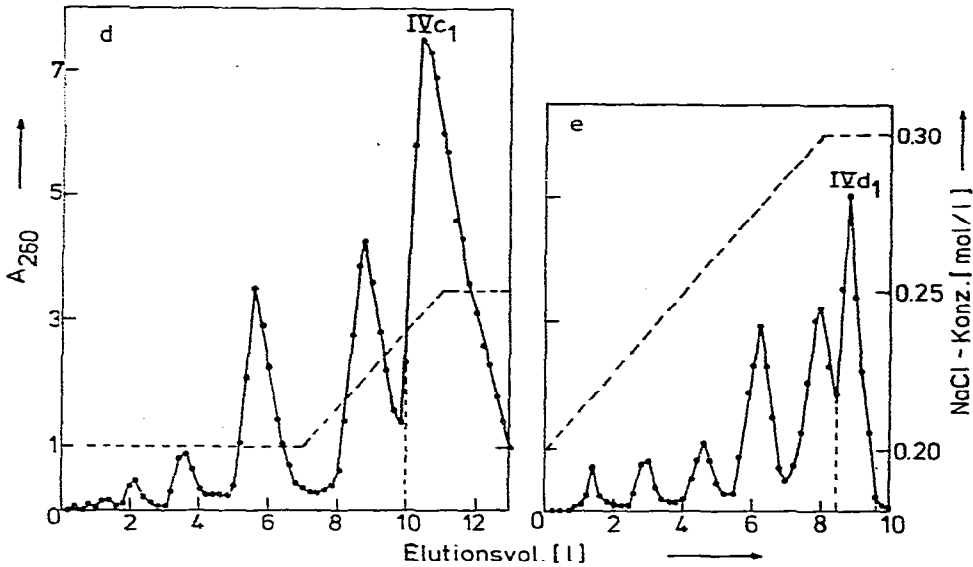


Fig. 5. (a) Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung der Pyrimidinnucleotide aus Peak IV der Fig. 1 an QAE-Sephadex A-25 bei pH 7.5. Experimentelle Einzelheiten s. Beschreibung der Versuche und Tabelle II. Die Fraktionen von Peak IVa-d werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, entsalzt und lyophilisiert. (b) Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung des Lyophilisats von Peak IVa. (c) von Peak IVb. (d) von Peak IVc. (e) von Peak IVd der Fig. 5a an QAE-Sephadex A-25 bei pH 7.5 im NaCl-Gradienten unter Zusatz von 7 M Harnstoff. Die Charakterisierung der Pyrimidinnucleotide, die in Peak IVa-d und a₁-d₁ eluiert werden, ist in Tabelle III-V aufgeführt.

mit 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschliessend wird die Säule im steigenden NaCl-Gradienten in zwei Stufen eluiert. In der ersten Stufe wird die Säule mit 9 l 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl eluiert. In der zweiten Stufe folgt ein linear steigender NaCl-Gradient: 5 l 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl im Mischgefäss; 5 l 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl im Vorratsgefäss. In drei Läufen werden insgesamt 10.5 g des Lyophilisats von Peak III fraktioniert.

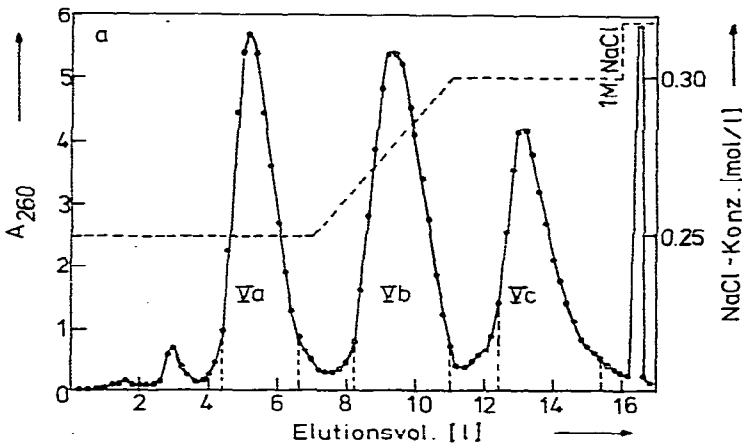


Fig. 6.

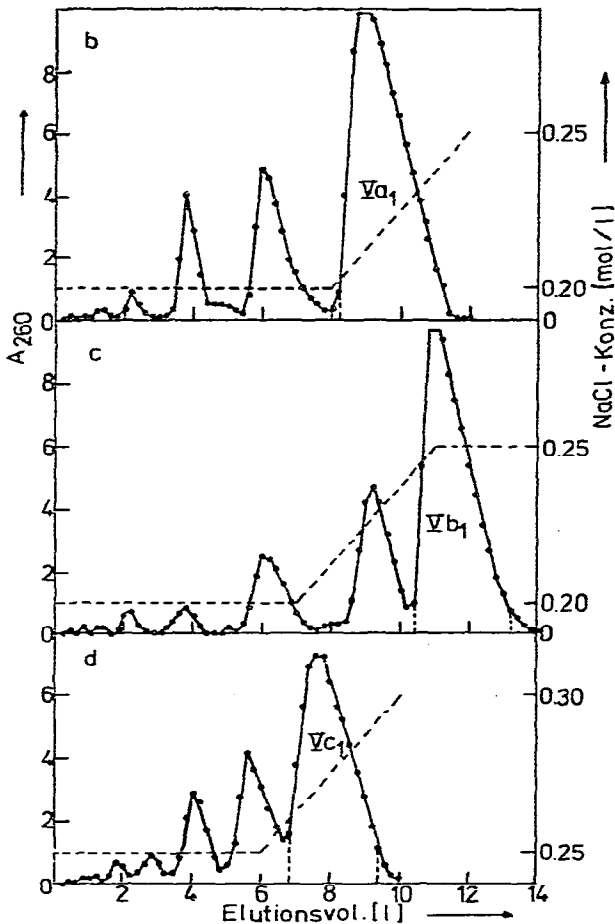


Fig. 6. (a) Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung der Pyrimidinnucleotide aus Peak V der Fig. 1 an QAE-Sephadex A-25 bei pH 7.5. Experimentelle Einzelheiten s. Beschreibung der Versuche und Tabelle II. Die Fraktionen von Peak Va-c werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, entsalzt und lyophilisiert. (b) Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung des Lyophilisats von Peak Va. (c) von Peak Vb. (d) von Peak Vc der Fig. 6a an QAE-Sephadex A-25 bei pH 7.5 im NaCl-Gradienten unter Zusatz von 7 M Harnstoff. Die Charakterisierung der Pyrimidinnucleotide, die in Peak Va-c und a_1 - c_1 eluiert werden, ist in Tabelle III-V aufgeführt.

Rechromatographie des Lyophilisats von Peak IIIa der Fig. 4a (vgl. Fig. 4b).

2 g des Lyophilisats von Peak IIIa der Fig. 4a werden in 20 ml 7 M Harnstoff gelöst und auf die mit 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschliessend wird die Säule im steigenden NaCl-Gradienten in zwei Stufen eluiert. In der ersten Stufe wird die Säule mit 8 l 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff eluiert. In der zweiten Stufe folgt ein linear steigender NaCl-Gradient: 2 l 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff im Mischgefäss; 2 l 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff im Vorratsgefäss.

Rechromatographie des Lyophilisats von Peak IIIb der Fig. 4a (vgl. Fig. 4c).

2 g des Lyophilisats von Peak IIIb der Fig. 4a werden in 20 ml 7 M Harnstoff gelöst und auf die mit 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff äquilibrierte Säule

TABELLE I

ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN FRAKTIONIERUNG (VGL. FIG. 1) VON 15 g (ca. 274,000 A_{260} -EINHEITEN) DES LYOPHILISATS VON PEAK 2 AN QAE-SEPHADEX A-25 IM STEIGENDEN NaCl-GRADIENTEN BEI pH 3.5

Peak	Eluiert bei NaCl-Konz. (M)	Eluierte Mengen		Isolierte Mengen		
		(A_{260} -Einh.)	(%)	(g)	(%)	(%)*
I	0.13	8 800	3.2	0.40	2.8	2.8
II	0.13–0.17	33 000	12.0	1.66	11.1	10.9
III	0.18–0.20	71 000	25.9	3.50	23.3	22.5
IV	0.21–0.28	78 000	28.5	3.70	24.9	24.2
V	0.30	35 400	12.9	1.70	11.3	11.1
VI	1.00	28 000	10.2	1.35	9.0	8.1
		Zwischenfraktionen				
		19 800	7.2	—	—	—

* Gemittelt aus fünf Trennungen.

aufgetragen. Anschliessend wird die Säule mit 9 l 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff eluiert.

Rechromatographie des Lyophilisats von Peak IV der Fig. 1 (vgl. Fig. 5a). 3 g des Lyophilisats von Peak IV der Fig. 1 werden in 10 ml Wasser gelöst und auf die mit 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschliessend wird die Säule in drei Stufen eluiert. In der ersten Stufe wird die Säule mit 6 l 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl eluiert. In der zweiten Stufe folgt ein linear steigender NaCl-Gradient: 5 l 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl im Mischgefäss; 5 l 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl im Vorratsgefäss. In der dritten Stufe eluiert man die Säule mit 3 l 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl. In drei Läufen werden insgesamt 9 g des Lyophilisats von Peak IV fraktioniert.

Rechromatographie des Lyophilisats von Peak IVa der Fig. 5a (vgl. Fig. 5b). 1 g des Lyophilisats von Peak IVa der Fig. 5a werden in 10 ml 7 M Harnstoff gelöst und auf die mit 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschliessend eluiert man die Säule mit 7 l 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff.

Rechromatographie des Lyophilisats von Peak IVb der Fig. 5a (vgl. Fig. 5c). 1.6 g des Lyophilisats von Peak IVb der Fig. 5a werden in 10 ml 7 M Harnstoff gelöst und auf die mit 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschliessend wird die Säule im steigenden NaCl-Gradienten in drei Stufen eluiert. In der ersten Stufe wird die Säule mit 7 l 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff eluiert. In der zweiten Stufe folgt ein linear steigender NaCl-Gradient: 2 l 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff im Mischgefäss; 2 l 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff im Vorratsgefäss. In der dritten Stufe eluiert man die Säule mit 1 l 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff.

Rechromatographie des Lyophilisats von Peak IVc der Fig. 5a (vgl. Fig. 5d). 1.2 g des Lyophilisats von Peak IVc der Fig. 5a werden in 10 ml 7 M Harnstoff gelöst und wie bei Peak IVb der Fig. 5a beschrieben weiterbehandelt. In der dritten Stufe eluiert man die Säule anstelle von 1 l mit 2 l 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff.

Rechromatographie des Lyophilisats von Peak IVd der Fig. 5a (vgl. Fig. 5e).

0.37 g des Lyophilisats von Peak IVd der Fig. 5a werden in 10 ml 7 M Harnstoff gelöst und auf die mit 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschliessend wird die Säule im steigenden NaCl-Gradienten in zwei Stufen eluiert. In der ersten Stufe erfolgt die Elution im linear steigenden NaCl-Gradienten: 4 l 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff im Mischgefäss; 4 l 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff im Vorratsgefäss. In der zweiten Stufe wird die Säule mit 2 l 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff eluiert.

Rechromatographie des Lyophilisats von Peak V der Fig. 1 (vgl. Fig. 6a). 1.5 g des Lyophilisats von Peak V der Fig. 1 werden in 10 ml Wasser gelöst und auf die mit 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschliessend wird die Säule im steigenden NaCl-Gradienten in vier Stufen eluiert. In der ersten Stufe wird die Säule mit 7 l 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl eluiert. In der zweiten Stufe folgt ein linear steigender NaCl-Gradient: 2 l 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl im Mischgefäss; 2 l 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl im Vorratsgefäss. In der dritten Stufe wird die Elution mit 5 l 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl fortgesetzt. In der vierten Stufe wird die Säule mit ca. 1 l 1 M NaCl eluiert. In vier Läufer werden insgesamt 6.0 g des Lyophilisats von Peak V fraktioniert.

Rechromatographie des Lyophilisats von Peak Va der Fig. 6a (vgl. Fig. 6b). 1.2 g des Lyophilisats von Peak Va der Fig. 6a werden in 10 ml 7 M Harnstoff gelöst und auf die mit 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschliessend eluiert man die Säule im steigenden NaCl-Gradienten in zwei Stufen. In der ersten Stufe wird die Säule mit 8 l 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff eluiert. In der zweiten Stufe folgt ein linear steigender NaCl-Gradient: 2 l 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff im Mischgefäss; 2 l 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff im Vorratsgefäss.

Rechromatographie des Lyophilisats von Peak Vb der Fig. 6a (vgl. Fig. 6c). 1.2 g des Lyophilisats von Peak Vb der Fig. 6a werden in 10 ml 7 M Harnstoff gelöst und auf die mit 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschliessend eluiert man die Säule im steigenden NaCl-Gradienten in drei Stufen. In der ersten Stufe wird die Säule mit 7 l 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff eluiert. In der zweiten Stufe folgt ein linear steigender NaCl-Gradient: 2 l 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff im Mischgefäss; 2 l 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff im Vorratsgefäss. In der dritten Stufe wird die Säule mit 3 l 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff eluiert.

Rechromatographie des Lyophilisats von Peak Vc der Fig. 6a (vgl. Fig. 6d). 1 g des Lyophilisats von Peak Vc der Fig. 6a wird in 10 ml 7 M Harnstoff gelöst und auf die mit 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschliessend wird die Säule im steigenden NaCl-Gradienten in zwei Stufen eluiert. In der ersten Stufe wird die Säule mit 6 l 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff eluiert. In der zweiten Stufe folgt ein linear steigender NaCl-Gradient: 2 l 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff im Mischgefäss; 2 l 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 7 M Harnstoff im Vorratsgefäss.

ERGEBNISSE

DNA aus Heringsspermen wird chemisch zu einer Pyrimidinnucleotidmischung abgebaut, die anschliessend an DEAE-Cellulose säulenchromatographisch in zwei

TABELLE II

ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN NACHTRENUNGEN DER LYOPHILISATE VON PEAK I-V (FIG. 1); PEAK IIc (FIG. 3a); IIa, b (FIG. 4a); IVa-d (FIG. 5a); Va-c (FIG. 6a)

Die Rechromatographie der Lyophilisate von Peak I-V erfolgt im steigenden NaCl-Gradienten bei pH 7.5. Die Nachtrennung der übrigen Mischungen wird im gleichen Gradienten unter Zusatz von 7 M Harnstoff durchgeführt.

Pyrimidinucleotidmischung		Getrennte Pyrimidinucleotide		Eluiert bei NaCl-Konz. (mM)	Bezeichnung	Reinheitsgrad* (%)	Eluierte Mengen		Isoletierte Mengen			
Peak	Fig.	Aufgetragene Mengen (A_{260} -Einh.)	In Peak				Fig.	(A_{260} -Einh.)	(%)	(mg)	(%)	
I	I	27,800	1.50	Ia	2	200	p(dT) ₂ , p(dC, dT), p(dC) ₂ , (dC) ₂ p	68.3	1700	6.1	60	4.0
				Ib	2	200-210	p(dC, dT) ₂ , p(dC) ₂ , p(dC ₃ , dT)	84.6	4400	15.8	200	13.3
				Ic	2	210-220	p(dC) ₂ p	76.3	3800	13.7	160	10.7
				Id	2	230-235	p(dC ₃ , dT), (dC ₃ , dT)p	86.2	3400	12.2	150	10.0
				Ie	2	240-260	p(dC) ₃ p	75.0	6800	24.5	320	21.3
							Total	20,100	72.4	890	59.3	
II	I	44,300	2.50	IIa	3a	200-210	Zwischenfraktionen p(dC ₃ , dT), (dC ₃ , dT)p	85.2	4000	9.0	220	8.8
				IIb	3a	210-220	p(dC ₂ , dT)p	71.6	8500	19.2	400	16.0
				IIc	3a	230-250	p(dC ₄ , dT) ₂ , p(dC ₃ , dT)p	93.0	15,600	35.2	790	31.6
							Total	28,100	63.4	1410	56.4	
IIc	3a	1.50	1.50	IIc ₁	3b	200	Zwischenfraktionen p(dC ₄ , dT) ₂	≈ 100	16,200	36.6	460	30.6
				IIc ₂	3b	230-300	p(dC ₃ , dT)p	100			670	44.7
							Total	130			75.3	

IIIa	4a	IIIa ₁	4a	250	p(dC ₂ ,dT ₃), p(dC ₂ ,dT ₂)p	86.0	24,000	42.6	1240	35.4
IIIb	4a	IIIb ₁	4a	265-290	p(dC ₃ ,dT ₃), p(dC ₃ ,dT ₂)p	88.0	14,300	25.4	710	20.3
		IIIa ₂	4b	200	Zwischenfraktionen	≈ 100	Total 38,300	68.0	1950	55.7
		IIIb ₂	4c	250	p(dC ₃ ,dT ₃)	≈ 100	18,000	31.9	340	17.0
		IIIb ₂	4c	250	p(dC ₃ ,dT ₂)p	≈ 100			1040	52.0
		IVa	5a	250	p(dC ₂ ,dT ₃)p	≈ 92.3	Total 1380		510	25.5
		IVb	5a	250	p(dC ₃ ,dT ₃)p	≈ 100			770	38.5
		IVc	5a	265-280	p(dT ₃ ,dC)p	70.0	10,600	18.1	Total 280	64.0
		IVd	5a	295-300	p(dC ₂ ,dT ₃)p	70.0	15,000	25.6	480	16.0
					p(dC ₃ ,dT ₃)p	78.0	12,300	21.0	690	23.0
					Zwischenfraktionen		7300	12.5	570	10.0
							Total 45,200	77.2	2040	68.0
							13,000	22.7		
IVa	5a	IVa ₁	5b	200	p(dT ₃)p	86.2			700	70.0
IVb	5a	IVb ₁	5c	210-300	p(dT ₃ ,dC)p	100			1200	75.0
IVc	5a	IVc ₁	5d	235-250	p(dC ₂ ,dT ₃)p	94.2			790	65.8
IVd	5a	IVd ₁	5e	300	p(dC ₃ ,dT ₃)p	66.7			170	46.0
V	I	Va	6a	250	p(dT ₄)p	74.0	10,400	32.7	360	24.0
		Vb	6a	260-300	p(dT ₄ ,dC)p	61.0	9200	28.9	400	26.6
		Vc	6a	300	p(dT ₄ ,dC ₂)p	60.0	6600	20.7	290	19.3
					Zwischenfraktionen		Total 26,200	82.3	1050	69.9
							5600	17.6		
Va	6a	Va ₁	6b	200-240	p(dT ₄)p	100			1000	83.3
Vb	6a	Vb ₁	6c	245-250	p(dT ₄ ,dC)p	93.2			700	58.3
Vc	6a	Vc ₁	6d	260-290	p(dT ₄ ,dC ₂)p	100			600	60.0

* Aus den A₂₆₀-Einheiten der papierchromatographisch nachgetrennten Nucleotide (vgl. Tabelle III) ermittelt.

Fraktionen vorgetrennt wird. Die zweite Fraktion, die mit 1 *M* NaCl von der DEAE-Cellulose-Säule eluiert wird, enthält ein Gemisch langkettiger Pyrimidinnucleotide, das nach folgendem Trennungsgang fraktioniert wird.

Zunächst wird das Lyophilisat der zweiten Fraktion an QAE-Sephadex chromatographiert. In diesem Trennschritt, der bei pH 7.5 im vierstufigen NaCl-Gradienten erfolgt, verlassen die Pyrimidinnucleotide in vier Peaks die Säule. Peak 1, der mit 0.19 *M* NaCl eluiert wird, enthält den Rest der niedermolekularen Pyrimidinnucleotide (ca. 22%) die bei der Vortrennung an DEAE-Cellulose nicht vollständig von den langkettigen Fragmenten der zweiten Fraktion abgetrennt werden. Das Lyophilisat von Peak 1 wird daher mit den niedermolekularen Pyrimidinnucleotiden vereinigt, die bei der Vortrennung an DEAE-Cellulose in der ersten Fraktion eluiert werden. Eine weitere Auftrennung dieser Mischung ist nach dem bereits früher beschriebenen Trennungsgang^{17,18} möglich. Peak 2, der mit 0.3 *M* NaCl die QAE-Sephadex-Säule verlässt, enthält ca. 42% der aufgetragenen Mischung. Im dritten Peak, der mit 0.4 *M* NaCl eluiert wird, sind ca. 11% des hochmolekularen Pyrimidinnucleotidgemisches enthalten. Mit 2 *M* NaCl werden im vierten Peak die restlichen ca. 8% der Mischung eluiert. Fraktionen innerhalb der verschiedenen Peaks werden vereinigt, durch Ultrafiltration entsalzt und anschliessend lyophilisiert. In den folgenden Trennschritten wird ausschliesslich das Lyophilisat von Peak 2 weiter fraktioniert, während die Lyophilisate des dritten und vierten Peaks in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden.

Zur Isolierung definierter Pyrimidinnucleotide aus dem sehr komplex zusammengesetzten Lyophilisat des zweiten Peaks nutzen wir wiederum die pH-abhängigen Unterschiede in der Gesamtladung der Pyrimidinnucleotide. Aufgrund der Ladungsunterschiede, die für Pyrimidinnucleotide unterschiedlicher Sequenz berechnet sind²¹, verlassen im Sauren Pyrimidinnucleotide mit überwiegend Cytidyl- vor denen mit überwiegend Thymidylsäureresten einen Anionenaustauscher. Im Alkalischen dagegen richtet sich die Adsorption von Pyrimidinnucleotiden an einem Anionenaustauscher nicht nach der Sequenz, sondern nach der Anzahl der negativ geladenen Phosphatgruppen.

Aus diesen Gründen wird das Lyophilisat von Peak 2 zuerst bei pH 3.5 an QAE-Sephadex säulenchromatographisch im steigenden NaCl-Gradienten fraktioniert. Das Elutionsprofil dieses Trennschrittes, das in Fig. 1 abgebildet ist, weist sechs mehr oder weniger gut voneinander getrennte Hauptpeaks auf, in denen zusammen ca. 92.7% der aufgetragenen Pyrimidinnucleotidmischung eluiert werden. Die Fraktionen von Peak I–VI werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, neutralisiert, durch Ultrafiltration entsalzt und lyophilisiert. Auf diesem Weg kann man ca. 88–98% der in einem Peak eluierten Pyrimidinnucleotide isolieren. Bei der Berechnung der Ausbeute sind Unterschiede in den molaren Extinktionskoeffizienten von Thymidyl- und Cytidylsäure nicht berücksichtigt, so dass Prozentangaben nur Richtwerte darstellen. Das Lyophilisat von Peak VI wird nicht untersucht, sondern mit dem Lyophilisat des dritten Peaks vereinigt, der im vorigen Trennschritt mit 0.4 *M* NaCl bei pH 7.5 von der QAE-Sephadex-Säule eluiert wird. Die Ergebnisse des zweiten Trennschritts sind in Tabelle I zusammengefasst.

Die Lyophilisate von Peak I–V der Fig. 1 werden im anschliessenden dritten Trennschritt an QAE-Sephadex im steigenden NaCl-Gradienten bei pH 7.5 einzeln nachgetrennt (vgl. Fig. 2–6). Bedingungen und Ergebnisse des dritten Trennschritts

sind in Tabelle II aufgeführt. Fraktionen, die zwischen den einzelnen Peaks und mit 1 M NaCl die Säule verlassen, werden nicht untersucht. Diese Fraktionen enthalten, je nach der Auflösung des Elutionsprofils, bis zu 36.6% der aufgetragenen A_{260} -Einheiten. Bei der Isolierung der Pyrimidinnucleotide, die in den vereinigten Peakfraktionen enthalten sind, gehen durchschnittlich ca. 15% einer Pyrimidinnucleotidmischung verloren.

Die Lyophilisate der verschiedenen Peaks werden zunächst papierchromatographisch untersucht und mit Hilfe von Vergleichssubstanzen charakterisiert. Alle im Papierchromatogramm auftretenden Flecken werden ausgeschnitten und eluiert. Im Eluat der einzelnen Flecken bestimmt man spektralphotometrisch die A_{260} -Einheiten und errechnet daraus die prozentuale Zusammensetzung des betreffenden Pyrimidinnucleotidgemischs. Die Ergebnisse der papierchromatographischen Untersuchungen sind in Tabelle III zusammengefasst. Die Auswertung der Papierchromatogramme ergibt, dass nach dem dritten Trennschritt alle Lyophilisate bis auf die von Peak Ia und Ib ein oder zwei Hauptprodukte enthalten, die aber teilweise bis zu 40% verunreinigt sind. Die Verunreinigungen und Nebenprodukte werden nicht untersucht. Die vom Papier eluierten Hauptflecken werden konzentriert und in einem zweiten Laufmittelsystem auf Papier rechromatographiert. Tritt hierbei im Papierchromatogramm nur ein Fleck auf, so bezeichnet man die Substanz üblicherweise mit "chromatographisch rein". Auf einem Papierbogen (60 × 58 cm) können bis zu 800 A_{260} -Einheiten chromatographiert werden, so dass auf diesem Weg praktisch alle Komponenten eines Lyophilisats im präparativen Massstab chromatographisch rein erhältlich sind.

Die Struktur der isolierten Pyrimidinnucleotide bzw. die Bruttosequenz der Sequenzisomerenmischungen werden aus R_F -Werten, Absorptionsverhältnissen und Ergebnissen des enzymatischen Abbaus nach dem in den vorangegangenen Arbeiten¹⁶⁻¹⁸ ausführlich beschriebenen und diskutierten Weg ermittelt. Charakterisierung und Identifizierung der in den Lyophilisaten als Hauptprodukte enthaltenen Pyrimidinnucleotide, die in Tabelle III-V zusammengefasst sind, führen zu folgenden Ergebnissen.

Bei der Rechromatographie (vgl. Fig. 2) wird das Lyophilisat von Peak I der Fig. 1 in 5 Hauptpeaks (Ia-e) aufgetrennt, die teilweise nur unbefriedigend aufgelöst sind, so dass in den Zwischenfraktionen ca. 28% des Lyophilisats verloren gehen. Peak Ia enthält zu 68.3% eine Mischung aus $p(dT)_2$; $p(dC, dT)$ und $p(dC)_2$, $(dC)_2p$, die im Laufmittel B zwar einheitlich wandert, aber im Laufmittel C in drei Flecken aufgetrennt wird. Die Dimeren der Thymidyl- und Cytidylsäuren stimmen vor und nach Phosphatasebehandlung in ihren R_F -Werten und Absorptionsverhältnissen mit denen von synthetischem $p(dT)_2$ und $p(dC)_2$ bzw. $(dT)_2$ und $(dC)_2$ überein. Beim Abbau mit Phosphodiesterase aus Schlangengift bildet sich aus $p(dT)_2$ ausschliesslich pdT. Das Dinucleotid der Cytidylsäure wird dagegen zu pdC, dC und pdCp abgebaut, so dass hier nebeneinander Dimere mit terminalen 5'- bzw. 3'-Phosphatgruppen vorliegen. Die Abbauprodukte werden mit käuflichen Referenzsubstanzen identifiziert. Die Mischung der sequenzisomeren Dinucleotide weist den R_F -Wert von synthetischem pdC-dT auf und wird von Phosphodiesterase in pdC und pdT gespalten. Beim Abbau der dephosphorylierten Verbindungen mit Phosphodiesterase treten $pdC + dC$ und $dpT + dT$ im molaren Verhältnis 1.00:0.88 auf.

Peak Ib enthält zu 84.6% eine Mischung aus $p(dC)_3$, $p(dC_2, dT)$ und $p(dC, dT)_2$, die im Laufmittel B zwar einheitlich wandert, aber im Laufmittel C aufgetrennt wird.

TABELLE III

ERGEBNISSE DER PAPIERCHROMATOGRAPHISCHEN NACHTRENUNG DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCH GETRENNTEN PYRIMIDINNUCLEOTIDE

Papier: Schleier & Schüll Chromatographiepapier 2316.

Pyrimidin-nucleotide aus		Auftretende Flecken		R_F -Werte relativ zu denen von pdT				Identifizierte Pyrimidin-nucleotide
				Ohne Phosphatase-Behandlung im Laufmittel		Nach Phosphatase-Behandlung im Laufmittel		
Peak	Fig.	Nr.	Peakanteil (%)	B	C	B	A	
Ia	2	1	7.4	1.27				
		2	13.2	0.98				
		3a	68.3	0.83	1.18		1.34	p(dC) ₂ , (dC) ₂ p p(dC, dT) p(dT) ₂
		3b		0.83	0.95		1.74	
		3c		0.83	0.73		2.06	
		4	5.0	0.68				
5	6.1	0.59						
Ib	2	1	2.9	1.04				
		2	8.0	0.89				
		3a	84.6	0.71	1.12		0.69	p(dC) ₃ p(dC ₂ , dT) p(dC, dT ₂)
		3b		0.71	0.90		0.84	
		3c		0.71	0.70		1.07	
4	4.5	0.51						
Ic	2	1	23.7	0.71				
		2	76.3	0.51	0.70		1.34	p(dC) ₂ p
Id	2	1	13.8	0.86				
		2	86.2	0.60	0.78		0.34	p(dC ₃ , dT); (dC ₃ , dT)p
Ie	2	1	25.0	0.60				
		2	75.0	0.48	0.54		0.69	p(dC) ₃ p
IIa	3a	1	14.8	0.94				
		2	85.2	0.60	0.75		0.34	p(dC ₃ , dT), (dC ₃ , dT)p
IIb	3a	1	28.4					
		2	71.6	0.57	0.62		0.84	p(dC ₂ , dT)p
IIc ₁	3b	1*	100	0.39	0.95			
		2*		0.39	0.79			
		3		0.39	0.43	0.69		p(dC ₄ , dT ₂) p(dC ₃ , dT)p
IIc ₂	3b	1	100	0.30	0.34	0.88		
IIIa ₁	4b	1*	100	0.53	0.66			
		2*		0.53	0.55			
		3		0.53	0.44	0.80	0.50	p(dC ₂ , dT ₃)
IIIa ₂	4b	1*	100	0.40	0.48			
		2		0.40	0.35	1.00		p(dC ₂ , dT ₂)p
IIIb ₁	4c	1	7.5	0.58				
		2*	92.5	0.35	0.50			
		3		0.35	0.36	0.68		p(dC ₃ , dT ₃)
1*	100	0.29		0.41				
2		0.29	0.24	0.78		p(dC ₃ , dT ₂)p		
IVa ₁	5b	1	13.8	0.70				
		2	86.2	0.47	0.54			
		3		0.47	0.27		1.42	p(dT) ₃ p p(dC, dT ₃)p
IVb ₁	5c	1		100	0.45	0.20	1.06	

TABELLE III (Fortsetzung)

Peak	Fig.	Aufretende Flecken		R_F -Werte relativ zu denen von pdT				Identifizierte Pyrimidin-nucleotide Bezeichnung
		Nr.	Peak-anteil (%)	Ohne Phosphatase-Behandlung im Laufmittel		Nach Phosphatase-Behandlung im Laufmittel		
				B	C	B	A	
IVc ₁	5d	1	5.8	0.45				p(dC ₂ ,dT ₃)p
		2	94.2	0.29	0.19	0.80		
IVd ₁	5e	1	6.5	0.53				p(dC ₃ ,dT ₃)p
		2	26.8	0.33				
		3	66.7	0.17	0.09	0.68		
Va ₁	6b	1	100	0.47	0.16	1.11		p(dT) ₄ p
Vb ₁	6c	1	6.8	0.53				p(dC,dT ₄)p
		2	93.2	0.36	0.13	0.87		
Vc ₁	6d	1	100	0.21	0.11	0.75		p(dC ₂ ,dT ₄)p

* Spuren.

TABELLE IV

BERECHNETE UND BEOBACHTETE ABSORPTIONSVERHÄLTNISSE DER AUS HYDROLYSATEN DEPURINIERTER HERINGSSPERMEN-DNA ISOLIERTEN PYRIMIDINNUCLEOTIDE

Peak	Fig.	Pyrimidinnucleotide nach Phosphatase-Behandlung Bezeichnung	Absorptionsverhältnisse bei pH 7.0			
			250:260		280:260	
			Ber.	Beob.	Ber.	Beob.
Ia	2	(dT) ₂	0.65	0.66	0.73	0.71
Ia	2	(dC,dT)	0.73	0.73	0.84	0.78
Ia	2	(dC) ₂	0.82	0.84	0.98	0.93
Ic	2	(dC) ₂	0.82	0.84	0.98	0.97
Ib	2	(dC) ₃	0.82	0.83	0.98	0.95
Ic	2	(dC) ₃	0.82	0.83	0.98	1.00
Ib	2	(dC,dT ₂)	0.70	0.72	0.80	0.79
Ib	2	(dC ₂ ,dT)	0.76	0.76	0.88	0.85
IIb	3a	(dC ₂ ,dT)	0.76	0.76	0.88	0.88
Id	2	(dC ₃ ,dT)	0.78	0.78	0.92	0.91
IIa	3a	(dC ₃ ,dT)	0.78	0.79	0.92	0.90
IIc ₂	3b	(dC ₃ ,dT)	0.78	0.79	0.92	0.93
IIc ₁	3b	(dC ₄ ,dT ₂)	0.76	0.79	0.88	0.82
IIIa ₁	4b	(dC ₂ ,dT ₃)	0.72	0.72	0.82	0.80
IIIa ₂	4b	(dC ₂ ,dT ₂)	0.73	0.74	0.84	0.84
IIIb ₁	4c	(dC ₃ ,dT ₃)	0.73	0.73	0.84	0.85
IIIb ₂	4c	(dC ₃ ,dT ₂)	0.75	0.76	0.88	0.85
IVa ₁	5b	(dT) ₃	0.65	0.66	0.73	0.69
IVb ₁	5c	(dC,dT ₃)	0.69	0.71	0.79	0.73
IVc ₁	5d	(dC ₂ ,dT ₃)	0.72	0.72	0.82	0.79
IVd ₁	5e	(dC ₃ ,dT ₃)	0.73	0.75	0.84	0.84
Va ₁	6b	(dT) ₄	0.65	0.65	0.73	0.69
Vb ₁	6c	(dC,dT ₄)	0.68	0.68	0.77	0.74
Vc ₁	6d	(dC ₂ ,dT ₄)	0.70	0.72	0.80	0.77

TABELLE V

ERGEBNISSE DER PHOSPHODIESTERASESPALTUNG VON PYRIMIDINNUCLEOTIDEN, DIE AUS HYDROLYSATEN DEPURINIERTER HERINGSSPERMEN-DNA ISOLIERT UND MIT PHOSPHATASE DEPHOSPHORYLIERT WURDEN

Peak	Fig.	Pyrimidin- nucleotide- Bezeichnung	Spaltprodukte	Verhältnis der Spaltprodukte	
				Erwartet	Beob.
Ia	2	(dT) ₂	pdT,dT	1 : 1	1.00 : 1.06
Ia	2	(dC,dT)	pdT,pdC,dT,dC	(pdC+dC) : (pdT+dT) 1 : 1	1.00 : 0.88
Ia	2	(dC) ₂	pdC,dC	1 : 1	1.00 : 0.89
Ic	2	(dC) ₂	pdC,dC	1 : 1	1.00 : 0.94
Ib	2	(dC) ₃	pdC,dC	2 : 1	2.11 : 1.00
Ie	2	(dC) ₃	pdC,dC	2 : 1	1.94 : 1.00
Ib	2	(dC,dT ₂)	pdC,pdT,dT,dC	(pdC+dC) : (pdT+dT) 1 : 2	1.00 : 1.76
Ib	2	(dC ₂ ,dT)	pdT,pdC,dT,dC	(pdC+dC) : (pdT+dT) 2 : 1	2.31 : 1.00
IIb	3a	(dC ₂ ,dT)	pdT,pdC,dT,dC	(pdC+dC) : (pdT+dT) 2 : 1	2.09 : 1.00
Id	2	(dC ₃ ,dT)	pdT,pdC,dT,dC	(pdC+dC) : (pdT+dT) 3 : 1	3.05 : 1.00
IIa	3a	(dC ₃ ,dT)	pdT,pdC,dT,dC	(pdC+dC) : (pdT+dT) 3 : 1	3.07 : 1.00
IIc ₂	3b	(dC ₃ ,dT)	pdT,pdC,dT,dC	(pdC+dC) : (pdT+dT) 3 : 1	3.04 : 1.00
IIc ₁	3b	(dC ₄ ,dT ₂)	pdT,pdC,dT,dC	(pdC+dC) : (pdT+dT) 2 : 1	2.19 : 1.00
IIIa ₂	4b	(dC ₂ ,dT ₂)	pdT,pdC,dT,dC	(pdC+dC) : (pdT+dT) 1 : 1	1.02 : 1.00
IIIb ₁	4c	p(dC ₃ ,dT ₃)	pdC,pdT	1 : 1	1.27 : 1.00
IIIb ₁	4c	(dC ₃ ,dT ₃)	pdT,pdC,dT,dC	(pdC+dC) : (pdT+dT) 1 : 1	1.16 : 1.00
IIIb ₂	4c	(dC ₃ ,dT ₂)	pdT,pdC,dT,dC	(pdC+dC) : (pdT+dT) 1.5 : 1	1.50 : 1.00
IIIa ₁	4b	(dC ₂ ,dT ₃)	pdT,pdC,dT,dC	(pdC+dC) : (pdT+dT) 1 : 1.5	1.00 : 1.32
IVa ₁	5b	(dT) ₃	pdT,dT	2 : 1	2.15 : 1.00
IVb ₁	5c	(dC,dT ₃)	pdT,pdC,dT,dC	(pdC+dC) : (pdT+dT) 1 : 3	1.00 : 2.85
IVc ₁	5d	(dC ₂ ,dT ₃)	pdT,pdC,dT,dC	(pdC+dC) : (pdT+dT) 1 : 1.5	1.00 : 1.39
IVd ₁	5e	(dC ₃ ,dT ₃)	pdT,pdC,dT,dC	(pdC+dC) : (pdT+dT) 1 : 1	1.11 : 1.00
Va ₁	6b	(dT) ₄	pdT,dT	3 : 1	3.03 : 1.00
Vb ₁	6c	(dC,dT ₄)	pdT,pdC,dT,dC	(pdC+dC) : (pdT+dT) 1 : 4	1.00 : 3.97
Vc ₁	6d	(dC ₂ ,dT ₄)	pdT,pdC,dT,dC	(pdC+dC) : (pdT+dT) 1 : 2	1.00 : 1.80

Peak Ic enthält zu 76.3% p(dC)₂p. Die gemessenen Absorptionsverhältnisse der Verbindungen stimmen mit den für p(dC)₂p berechneten Werten überein. Nach Phosphatasebehandlung erhält man ein einheitliches Produkt, das im R_F-Wert mit dem von synthetischem (dC)₂ übereinstimmt und mit Phosphodiesterase zu pdC und dC im molaren Verhältnis 1.00:0.94 abgebaut wird.

Die niedermolekularen Pyrimidinnucleotide, die in Peak Ia–c eluiert werden und ca. 36% des Lyophilisats von Peak I der Fig. 1 ausmachen, sind Reste aus Peak 1, mit denen Peak 2 nach dem ersten Trennschritt an QAE-Sephadex noch verunreinigt ist.

Peak Id enthält zu 86.2% eine Mischung der sequenzisomeren Tetranucleotide $p(dC_3, dT)$; $(dC_3, dT)p$. Die Mischung wandert vor und nach Phosphatasebehandlung im Papierchromatogramm als einheitlicher Fleck, dessen Absorptionsverhältnisse mit den für (dC_3, dT) berechneten Werten übereinstimmen. Nach enzymatischer Hydrolyse mit Phosphodiesterase findet man im Hydrolysat ausser den zu erwartenden Hauptprodukten pdT and pdC auch Spuren von $pdTp$ und $pdCp$ neben unabgebauten Ausgangsverbindungen. Das Auftreten der Nucleosiddiphosphate zeigt, dass in der Mischung der Sequenzisomeren vor allem Nucleotide mit terminalen 5'-Phosphatgruppen neben nur geringen Mengen an 3'-Oligonucleotiden vorhanden sind. Beim Abbau der dephosphorylierten Tetranucleotide mit Phosphodiesterase treten dC , pdC , pdT und dT in dem für (dC_3, dT) zu erwartenden molaren Verhältnis auf.

Peak Ie weist zu 75% $p(dC)_3p$ auf. Die gemessenen Absorptionsverhältnisse stimmen mit den für $p(dC)_3p$ berechneten Werten sehr gut überein. Nach Phosphatasebehandlung erhält man ein einheitliches Produkt, das im Papierchromatogramm mit synthetischem $(dC)_3$ identisch ist und mit Phosphodiesterase zu pdC und dC im molaren Verhältnis 1.94:1.00 gespalten wird.

Bei der Rechromatographie (vgl. Fig. 3a) des Lyophilisats von Peak II der Fig. 1 treten drei Hauptpeaks (IIa–c) auf, in denen insgesamt 63.4% der aufgetragenen Pyrimidinnucleotidmischung eluiert werden.

Peak IIa enthält zu 85.2% eine Mischung der sequenzisomeren Tetranucleotide $p(dC_3, dT)$, $(dC_3, dT)p$, die mit den Tetranucleotiden aus Peak Id der Fig. 2 identisch sind. Die Sequenzisomeren werden beim zweiten Trennschritt (vgl. Fig. 1) vermutlich im Abstieg von Peak I und im Anstieg von Peak II eluiert.

In Peak IIb werden zu 71.6% $p(dC_2, dT)p$ gefunden. Die Absorptionsverhältnisse der Sequenzisomerenmischung entsprechen den für $p(dC_2, dT)p$ berechneten Werten. Die dephosphorylierten Sequenzisomeren bilden im Papierchromatogramm nur einen Fleck, dessen R_F -Wert dem von synthetischem $(dC)_2-dT$ entspricht. Mit Phosphodiesterase werden die dephosphorylierten Verbindungen zu dC , dT , pdC und pdT hydrolysiert, wobei die Summen aus $dC + pdC$ und $pdT + dT$ im molaren Verhältnis 2.09:1.00 auftreten. Die Trinucleotidphosphate, die im Peak IIb eluiert werden und ca. 19.2% des Lyophilisats von Peak II der Fig. 1 ausmachen, sind wiederum Reste aus Peak 1 mit denen Peak 2 nach dem ersten Trennschritt an QAE-Sephadex verunreinigt ist.

Peak IIc weist zwei verunreinigte Hauptprodukte auf, die an QAE-Sephadex A-25 im steigenden NaCl-Gradienten unter Zusatz von 7 M Harnstoff in Peak IIc₁ bzw. IIc₂ der Fig. 3b getrennt werden.

Peak IIc₁ enthält zu fast 100% eine Mischung der sequenzisomeren Hexanucleotide $p(dC_4, dT_2)$ die sich im Laufmittel B einheitlich verhält, während im Laufmittel C neben dem Hauptfleck noch zwei Nebenflecke als Spuren auftreten. Die Absorptionsverhältnisse der Hauptflecken entsprechen den für (dC_4, dT_2) berechneten Werten. Nach der enzymatischen Dephosphorylierung wandert die Mischung als einheitlicher Fleck und wird mit Phosphodiesterase vollständig zu pdC , dC , pdT und dT abgebaut, wobei die Summen aus $pdC + dC$ und $pdT + dT$ im molaren Ver-

hältnis 2.19:1.00 auftreten. Die geringe Zunahme des R_F -Wertes nach Phosphataseabbau zeigt, dass nur eine terminale Phosphatgruppe abgespalten wird. Die terminale Phosphatgruppe befindet sich vor allem am 5'-Ende, da die Sequenzisomeren fast vollständig mit Phosphodiesterase zu pdC und pdT abgebaut werden. Die nicht abgebauten Sequenzisomeren tragen vermutlich terminale 3'-Phosphatgruppen, die den Angriff der Phosphodiesterase verhindern.

Peak IIc₂ weist eine chromatographisch reine Mischung der sequenzisomeren Tetranucleotide p(dC₃, dT)p auf. Nach Phosphatasebehandlung erhält man ein einheitlich wanderndes Produkt, das in den Absorptionsverhältnissen sowie enzymatischen Abbauprodukten den zu erwartenden Werten entspricht und im R_F -Wert mit den dephosphorylierten sequenzisomeren Tetranucleotiden (dC₃, dT) aus Peak Id identisch ist. Nach Phosphatasebehandlung steigt der R_F -Wert der Sequenzisomeren von 0.30 auf 0.88, so dass die Verbindungen bei der Dephosphorylierung vermutlich zwei terminale Phosphatgruppen verlieren.

Bei der Rechromatographie (vgl. Fig. 4a) des Lyophilisats von Peak III der Fig. 1 werden in Peak IIIa und IIIb jeweils zwei Hauptprodukte eluiert, die zusammen 68% der aufgetragenen A_{260} -Einheiten ausmachen. Die Pyrimidinnucleotide von Peak IIIa und IIIb werden anschliessend an QAE-Sephadex unter Zusatz von 7 M Harnstoff im NaCl-Gradienten nachgetrennt. Hierbei werden die beiden Hauptprodukte aus Peak IIIa, wie Fig. 4b zeigt, in Peak IIIa₁ und IIIa₂ getrennt. Die Rechromatographie von Peak IIIb, die in Fig. 4c abgebildet ist, führt nur teilweise zur Auftrennung der beiden Hauptprodukte, die in Peak IIIb₁ und IIIb₂ die Säule verlassen.

Peak IIIa₁ enthält zu fast 100% p(dC₂, dT₃). Die Mischung der sequenzisomeren Pentanucleotide wandert im Laufmittelsystem B einheitlich, während im Laufmittel C ausser dem Hauptfleck noch zwei Nebenflecken gefunden werden, die als Spuren auftreten. Die gemessenen Absorptionsverhältnisse des Hauptflecken entsprechen den zu erwartenden Werten. Nach dem Abbau mit Phosphatase steigt der R_F -Wert der Mischung von 0.53 nur auf 0.80, so dass die Sequenzisomeren vermutlich nur eine terminale Phosphatgruppe aufweisen. Die Phosphatgruppe sitzt vor allem am 5'-Ende, da über 80% der Sequenzisomeren mit Phosphodiesterase in pdC und pdT gespalten werden. Die nicht spaltbaren Produkte sind vermutlich am 3'-Ende phosphoryliert. Die dephosphorylierten Sequenzisomeren werden mit Phosphodiesterase zu pdC, dC, dT und pdT abgebaut, wobei die Summen aus pdC + dC und pdT + dT im molaren Verhältnis 1.00:1.32 auftreten.

Peak IIIa₂ weist zu fast 100% p(dC₂, dT₂)p auf. Die Mischung der sequenzisomeren Tetranucleotide wandert im Laufmittel B einheitlich, während im Laufmittel C neben dem Hauptfleck ein als Spur auftretender Nebenfleck gefunden wird. Die gemessenen Absorptionsverhältnisse stimmen sehr gut mit den berechneten Werten überein. Bei Behandlung mit Phosphatase verlieren die Sequenzisomeren vermutlich zwei terminale Phosphatgruppen, da der R_F -Wert von 0.40 auf 1.00 ansteigt. Die dephosphorylierten Tetranucleotide bilden im Papierchromatogramm einen Fleck und werden von Phosphodiesterase zu pdC, dC, pdT und dT gespalten. Das molare Verhältnis der Abbauprodukte spricht eindeutig für (dC₂, dT₂).

Peak IIIb₁ enthält zu 92.3% p(dC₃, dT₃). Die Verunreinigungen lassen sich papierchromatographisch im Laufmittel B und C vollständig entfernen, so dass die Mischung der sequenzisomeren Hexanucleotide auf diesem Weg chromatographisch rein erhalten wird. Die Absorptionsverhältnisse der chromatographisch reinen

Mischung entsprechen sehr gut den berechneten Werten. Nach Phosphatasebehandlung erhält man wiederum einen einheitlich wandernden Fleck, der mit Phosphodiesterase zu pdC, dC, pdT und dT abgebaut wird. Das molare Verhältnis der Spaltprodukte spricht eindeutig für (dC₃, dT₃). Die Mischung der sequenzisomeren Hexanucleotide wird mit Phosphodiesterase vollständig in pdC und pdT gespalten, wobei die Spaltprodukte im molaren Verhältnis 1.27:1.00 auftreten.

Peak IIIb₂ weist eine chromatographisch reine Mischung der Sequenzisomeren p(dC₃, dT₂)p auf. Eine Verunreinigung tritt neben dem Hauptfleck im Laufmittel C als Spur auf. Die Absorptionsverhältnisse stimmen mit den für p(dC₃, dT₂)p berechneten Werten sehr gut überein. Nach der Behandlung mit Phosphatase steigt der R_F-Wert von 0.29 auf 0.78, so dass hierbei sicherlich zwei terminale Phosphatgruppen abgespalten werden. Die dephosphorylierten Pentanucleotide wandern einheitlich und werden mit Phosphodiesterase zu pdC, dC, pdT und dT abgebaut. Das molare Verhältnis der Spaltprodukte spricht eindeutig für (dC₃, dT₂).

Bei der Rechromatographie (vgl. Fig. 5a) werden 77% des Lyophilisats von Peak IV der Fig. 1 in den vier deutlich voneinander getrennten Peaks IVa–d eluiert. Die vier Peaks enthalten jeweils ein Hauptprodukt, das aber mehr oder weniger stark verunreinigt ist. Die Lyophilisate von Peak IVa–d werden daher an QAE-Sephadex unter Zusatz von 7 M Harnstoff im NaCl-Gradienten nachgetrennt.

Peak IVa₁, der bei der Rechromatographie des Lyophilisats von Peak IVa (vgl. Fig. 5b) als Hauptprodukt erhalten wird, enthält zu 86.2% p(dT)₃p. Die Verunreinigungen werden papierchromatographisch im Laufmittel B und C vollständig entfernt. Das chromatographisch reine Produkt wandert nach Phosphatasebehandlung im Papierchromatogramm einheitlich und ist in den Absorptionsverhältnissen, im R_F-Wert und beim enzymatischen Abbau mit Phosphodiesterase mit synthetischem (dT)₂ identisch.

Peak IVb₁, der bei der Rechromatographie des Lyophilisats von Peak IVb (vgl. Fig. 5c) als Hauptprodukt auftritt, besteht zu 100% aus p(dC, dT₃)p. Die gemessenen Absorptionsverhältnisse der sequenzisomeren Tetranucleotide entsprechen den berechneten Werten. Die dephosphorylierten Sequenzisomeren werden von Phosphodiesterase vollständig zu pdC, dC, pdT und dT abgebaut. Das molare Verhältnis der Spaltprodukte entspricht den für (dC, dT₃) zu erwartenden Werten.

Bei der Rechromatographie des Lyophilisats von Peak IVc (vgl. Fig. 5d) werden im Hauptpeak IVc₁ 94.2% p(dC₂, dT₃)p eluiert. Die Verunreinigungen werden papierchromatographisch im Laufmittel B entfernt. Die chromatographisch reine Mischung der sequenzisomeren Pentanucleotide wird mit Phosphatase vollständig abgebaut. Die Absorptionsverhältnisse der dephosphorylierten Sequenzisomeren entsprechen sehr gut den für (dC₂, dT₃) berechneten Werten. Beim Abbau der dephosphorylierten Pentanucleotide mit Phosphodiesterase treten pdC + dC und pdT + dT im molaren Verhältnis 1.00:1.39 auf.

Bei der Nachtrennung des Lyophilisats von Peak IVd (vgl. Fig. 5e) erhält man fünf kleine Peaks und den Hauptpeak IVd₁, der zu 66.7% p(dC₃, dT₃)p enthält. Die Nebenprodukte des Hauptpeaks werden papierchromatographisch im Laufmittel B entfernt. Die gemessenen Absorptionsverhältnisse der chromatographisch reinen Mischung der sequenzisomeren Hexanucleotide stimmen sehr gut mit den berechneten Werten überein. Nach Phosphataseabbau wandert die Mischung im Papierchromatogramm als ein Fleck und wird mit Phosphodiesterase vollständig in pdC, dC,

pdT und dT gespalten. Die molaren Verhältnisse, in denen die Abbauprodukte gebildet werden, sprechen eindeutig für (dC_3, dT_3) .

Das Lyophilisat von Peak V der Fig. 1 wird bei der Rechromatographie (vgl. Fig. 6a) zu ca. 82.3% in Peak Va-c eluiert. Peak Va-c enthalten zwar jeweils nur ein Hauptprodukt, das aber teilweise verunreinigt ist. Aus diesem Grund werden die Lyophilisate von Peak Va-c an QAE-Sephadex unter Zusatz von 7 M Harnstoff im NaCl-Gradienten nachgetrennt (vgl. Fig. 6b-d).

Peak Va₁, der bei der Rechromatographie (vgl. Fig. 6b) des Lyophilisats von Peak Va als Hauptpeak auftritt, enthält chromatographisch reines $p(dT)_4p$. Die Verbindung ist nach Phosphatasebehandlung mit synthetischem $(dT)_4$ identisch.

Peak Vb₁, der bei der Rechromatographie (vgl. Fig. 6c) des Lyophilisats von Peak Vb als Hauptprodukt auftritt, enthält zu 93.2% $p(dT_4, dC)p$. Die Verunreinigungen werden papierchromatographisch im Laufmittel B entfernt. Nach Phosphatasebehandlung wandert die Mischung der sequenzisomeren Pentanucleotide einheitlich, entspricht in den Absorptionsverhältnissen den für (dT_4, dC) berechneten Werten und wird mit Phosphodiesterase vollständig zu pdC, dC, pdT und dT abgebaut. Das molare Verhältnis, in dem die Spaltprodukte auftreten, spricht eindeutig für (dT_4, dC) .

Peak Vc, der bei der Nachtrennung (vgl. Fig. 6d) des Lyophilisats von Peak Vc als Hauptpeak auftritt, enthält chromatographisch reines $p(dT_4, dC_2)p$. Die Mischung der sequenzisomeren Hexanucleotide bildet nach Phosphatasebehandlung nur einen Fleck, dessen Absorptionsverhältnisse den für (dC_2, dT_4) berechneten Werten entsprechen und der mit Phosphodiesterase vollständig in pdC, dC, dT und pdT gespalten wird. Das molare Verhältnis, in dem die Spaltprodukte auftreten, entspricht dem für (dC_2, dT_4) zu erwartenden Wert.

DISKUSSION

Natürlich vorkommende DNA weist im Molekülverband vor allem kurze und nur wenige lange Pyrimidinnucleotidsequenzen auf. Daher treten im Partialhydrolysat einer depurinierten DNA vor allem Pyrimidinnucleotide mit 1-4 Monomereinheiten auf, während längere Fragmente nur in geringen Mengen vorhanden sind. Zur präparativen Isolierung der, in unterschiedlichen Mengen auftretenden DNA-Fragmente ist es daher zweckmässig, die Auftrennung des Partialhydrolysats nicht in einem einzigen Trennschritt, sondern in mehreren nacheinanderfolgenden Schritten durchzuführen. Mit Hilfe eines Trennungsgangs können dann Nebenprodukte aus dem Hydrolysat isoliert werden, die in analytischen Trennungen, in denen das gesamte Hydrolysat in einem Schritt fraktioniert wird, nicht zugänglich sind. So erhalten wir bei der präparativen Auftrennung des Partialhydrolysats nach dem von uns entwickelten Trennungsgang bspw. Oligonucleotide mit nur einer terminalen Phosphatgruppe, die bei analytischen Trennungen nicht beschrieben sind.

Die zahlreichen Nebenpeaks, die bei einer präparativen Fraktionierung des Partialhydrolysats auftreten, zeigen ausserdem, dass beim chemischen Abbau einer depurinierten DNA eine Vielzahl von Spaltprodukten gebildet werden, die bei analytischen Trennungen nicht in Erscheinung treten. Aufgrund unserer Trennergebnisse nehmen wir an, dass der chemische Abbaumechanismus^{2,3,10,22-24}, der aus den Ergebnissen der analytischen Trennungen abgeleitet ist, nur teilweise zutrifft.

Ein wesentlicher Bestandteil unseres Trennungsgangs bildet die Ultrafiltration. Dieses Verfahren ermöglicht eine schnelle und einfache Entsalzung der, nach jedem säulenchromatographischen Trennschritt anfallenden Fraktionen. Ausserdem eignet sich die Ultrafiltration zur Abtrennung niedermolekularer Fragmente. Bspw. werden durch Ultrafiltration des Partialhydrolysats an einer UM 10 Membran Fragmente mit vier und mehr Monomereinheiten zu ca. 80% zurückgehalten, während alle kurzen Pyrimidinnucleotide die Membran passieren. Auf diesem Weg lassen sich die im Partialhydrolysats als Spuren auftretenden langkettigen DNA-Fragmente sehr einfach im Retentat anreichern, wobei der Überschuss an kurzen Fragmenten aus dem Hydrolysats entfernt wird.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass das Partialhydrolysats einer depurinierten Heringsspermen DNA zu 90% Pyrimidinnucleotide mit 1-6 Monomereinheiten aber

TABELLE VI

PYRIMIDINNUCLEOTIDE UND MISCHUNGEN VON SEQUENZISOMEREN, DIE IM PRÄPARATIVEN MASSTAB AUS HYDROLYSATEN DEPURINIERTER HERINGSSPERMEN-DNA ISOLIERT WERDEN

<i>Pyrimidinnucleotide</i>	<i>Mischungen von Sequenzisomeren</i>	
pdCp	p(dC,dT)	p(dC,dT)p
pdTp	p(dC,dT ₂)	p(dC,dT ₂)p
p(dC) ₂	p(dU,dT ₂), (dU,dT ₂)p	
p(dT) ₂	p(dC ₂ ,dT)	p(dC ₂ ,dT)p
p(dT) ₂ p	p(dC ₃ ,dT), (dC ₃ ,dT)p	p(dC ₃ ,dT)p
p(dC) ₂ p	p(dC ₂ ,dT ₂)	p(dC ₂ ,dT ₂)p
p(dC) ₃	p(dC,dT ₃)	p(dC,dT ₃)p
p(dT) ₃	p(dC ₂ ,dT ₃)	p(dC ₂ ,dT ₃)p
p(dC) ₃ p		p(dC ₃ ,dT ₂)p
p(dT) ₃ p		p(dC,dT ₄)p
p(dT) ₄ p	p(dC ₄ ,dT ₂)	
	p(dC ₃ ,dT ₃)	p(dC ₃ ,dT ₃)p
		p(dC ₂ ,dT ₄)p
dC-dT		
dT-dC		
dC-dC-dT		
dC-dT-dC		
dT-dC-dC		
dT-dT-dC		
dC-dT-dT		
dT-dC-dT		
dC-dC-dC-dT		
dT-dC-dC-dC		
dC-dT-dC-dC		
dC-dC-dT-dC		
dT-dT-dC-dC		
dT-dC-dT-dC		
dT-dC-dC-dT		
dC-dT-dC-dT		
dC-dC-dT-dT		
dC-dT-dT-dC		
dT-dT-dT-dC		
dT-dT-dC-dT		
dT-dC-dT-dT		
dC-dT-dT-dT		

höchstens 10% längere Fragmente enthält. Alle bisher isolierten Pyrimidinnucleotide sind aus dem Partialhydrolysat weitaus einfacher als durch chemische Synthese zugänglich und in Tabelle VI zusammengefasst. Bemerkenswert erscheint uns, dass wir im Partialhydrolysat der Heringsspermen-DNA Homologe der Cytidylsäure mit höchstens 3 Monomereinheiten finden. Dieser Befund lässt sich damit erklären, dass DNA aus Heringsspermen möglicherweise nur wenige oder keine Sequenzen mit vier und mehr aufeinanderfolgenden Cytidylsäureeinheiten aufweist. Eine andere Erklärung wäre, dass einige der Cytidylsäurereste in käuflicher DNA desaminiert sind²⁵ oder beim Abbau in Uridylsäurereste überführt werden². Da wir bei der Auftrennung des Partialhydrolysats bisher nur ein Fragment mit einem Uridylsäurerest finden, vermuten wir, dass die desaminierten Pyrimidinnucleotide in den zahlreichen Nebenpeaks eluiert werden, die wir nicht untersuchen.

Die isolierten Pyrimidinnucleotide erfüllen die Kriterien, nach denen Reinheit und Sequenz synthetischer Oligonucleotide üblicherweise überprüft werden. Einige der Homologen der Cytidyl- und Thymidylsäure übertreffen entsprechende synthetische Produkte an Reinheit. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass bei der chemischen Synthese bspw. Pyrophosphatderivate und zyklische Verbindungen gebildet werden, die schwierig zu entfernen sind. Diese Verbindungen treten aber im Partialhydrolysat einer DNA nicht auf. Reinheit und Struktur der isolierten Oligonucleotide werden zusätzlich mit Hilfe der sehr empfindlichen Hochdruckchromatographie an Ionenaustauschern überprüft und eindeutig bestätigt.

Durch chemischen Partialabbau einer DNA sind bisher nur Purinoligonucleotid-, Pyrimidinoligonucleotid- und Oligoadenylsäuregemische im präparativen Massstab erhältlich, so dass bislang nur eine bedingte Zahl von definierten DNA-Fragmenten auf diesem Weg zugänglich ist. Sicherlich lässt sich der chemische Abbau auch so lenken, dass DNA-Fragmente mit Purin-Pyrimidinnucleotideinheiten selektiv aus dem Molekülverband freigesetzt werden. Aus diesen Oligonucleotidgemischen wird man vermutlich nach einem modifizierten Trennungsgang weitere definierte Fragmente im präparativen Massstab isolieren können. Zur Zeit prüfen wir diese Möglichkeiten. Hierbei dienen uns die Mischungen der sequenzisomeren Pyrimidinnucleotide als nützliche Modeliverbindungen.

DANK

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft grosszügig unterstützt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Pyrimidinnucleotide $p(dC)_3p$, $p(dT)_3p$, $p(dT)_4p$ sowie die Mischungen der Sequenzisomeren $p(dC_3, dT)$, $(dC_3, dT)p$; $p(dC_3, dT)p$; $p(dC_2, dT_2)p$; $p(dC, dT_3)p$; $p(dC_3, dT_2)p$; $p(dC_2, dT_3)$; $p(dC_2, dT_3)p$; $p(dC, dT_4)p$; $p(dC_4, dT_2)$; $p(dC_3, dT_3)$; $p(dC_3, dT_3)p$ und $p(dC_2, dT_4)p$ werden aus Hydrolysaten depuriniertes Heringsspermen-DNA im präparativen Massstab chromatographisch isoliert. Das DNA-Hydrolysat wird zunächst bei pH 7.5 an DEAE-Cellulose säulenchromatographisch in nieder- und hochmolekulare Pyrimidinnucleotide vorgetrennt. Die hochmolekulare Pyrimidinnucleotidmischung wird bei der anschliessenden Fraktionierung an

QAE-Sephadex bei pH 7.5 in 4 Peaks eluiert. Die Pyrimidinnucleotide werden aus Peak 2 zur weiteren Auftrennung zunächst an QAE-Sephadex bei pH 3.5 nachgetrennt. Hierbei werden Pyrimidinnucleotide mit überwiegend Cytidyl- von denen mit überwiegend Thymidylsäurebausteinen getrennt, die anschliessend bei pH 7.5 an QAE-Sephadex nach der Anzahl ihrer Phosphatladungen eluiert und in 70–93% Reinheit erhalten werden. Abschliessend werden die Pyrimidinnucleotide und Mischungen der Sequenzisomeren nochmals bei pH 7.5 an QAE-Sephadex unter Zusatz von 7 M Harnstoff chromatographiert und grösstenteils in chromatographisch reiner Form erhalten. Verunreinigungen, die säulenchromatographisch nicht entfernt werden können, werden im Papierchromatogramm abgetrennt. Die Sequenz der isolierten DNA-Fragmente und die Zusammensetzung der Sequenzisomerenmischung wird aus chromatographischen Daten, Absorptionsverhältnissen und durch enzymatischen Abbau ermittelt.

LITERATUR

- 1 T. Y. Shen, *Angew. Chem.*, 82 (1970) 730.
- 2 H. S. Shapiro und E. Chargaff, *Biochim. Biophys. Acta*, 91 (1964) 262.
- 3 K. Burton, *Methods Enzymol.*, 12A (1967) 222.
- 4 G. B. Peterson und J. M. Reeves, *Biochim. Biophys. Acta*, 179 (1969) 510.
- 5 A. S. Jones, G. W. Ross, S. Takemura, T. W. Thompson und R. T. Walker, *J. Chem. Soc.*, (1964) 373.
- 6 A. S. Jones und R. T. Walker, *Nature (London)*, 202 (1964) 24.
- 7 A. S. Jones und R. T. Walker, *Nature (London)*, 202 (1964) 1108.
- 8 S. Shapiro und E. Chargaff, *Biochemistry*, 5 (1966) 3012.
- 9 A. S. Jones, A. M. Mian und R. T. Walker, *J. Chem. Soc.*, (1968) 2042.
- 10 H. Türler, J. Buchowicz und E. Chargaff, *Biochim. Biophys. Acta*, 195 (1969) 456.
- 11 V. Ling, *J. Mol. Biol.*, 64 (1972) 87.
- 12 M. D. Kirnos, V. K. Vasilyev und B. F. Vanyushin, *J. Chromatogr.*, 104 (1975) 113.
- 13 H. Priess und W. Zillig, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 342 (1965) 73.
- 14 T. Friedmann und D. M. Brown, *Nucleic Acids Res.*, 5 (1978) 615.
- 15 A. Maxam und W. Gilbert, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 74 (1977) 560.
- 16 H. Schott und M. Schwarz, *J. Chromatogr.*, 157 (1978) 197.
- 17 H. Schott und M. Schwarz, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 358 (1977) 949.
- 18 H. Schott und M. Schwarz, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 359 (1978) 617.
- 19 M. Dizdaroglu und W. Hermes, *Biochemistry*, zur Veröffentlichung vorgelegt.
- 20 M. Dizdaroglu, W. Hermes, C. v. Sonntag und H. Schott, *J. Chromatogr.*, 169 (1979) 429.
- 21 A. L. Mazin und B. F. Vanyushin, *Biokhimiya*, 32 (1967) 377.
- 22 K. Burton und G. B. Peterson, *Biochem. J.*, 75 (1960) 17.
- 23 V. Habermann, *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 28 (1963) 510.
- 24 K. W. Brammer, A. S. Jones, A. M. Mian und R. T. Walker, *Biochim. Biophys. Acta*, 166 (1968) 732.
- 25 C. R. Bayley, K. W. Brammer und A. S. Jones, *J. Chem. Soc.*, (1961) 1903.