

CHROM. 12,247

## PRÄPARATIVE ISOLIERUNG VON DESOXYRIBOADENYLSÄUREN AUS HYDROLYSATEN OXIDIERTER HERINGSSPERMEN-DNA MIT HILFE DER TEMPLATE-CHROMATOGRAPHIE\*

H. SCHOTT

Chemisches Institut der Universität, Auf der Morgenstelle 18, 7400 Tübingen (B.R.D.)

(Eingegangen am 19. Juli 1979)

---

### SUMMARY

*Preparative isolation of deoxyriboadenylic acids from hydrolysates of oxidized herring-sperm DNA using template-chromatography*

The alkaline hydrolysis of oxidized DNA from herring sperm yields a complex mixture of deoxyriboadenylic acids. After the removal of the fragments containing 1-3 monomer units by column chromatography, approximately 10% of the partial hydrolysate remains. This remaining fraction which contains the fragments of higher molecular weight is separated into two fractions by the base-pairing mechanism on a PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose column with a two-step temperature gradient. The first fraction eluted at -4°, contains the substances (≈ 95% of the sample) that undergo no base-pairing with the immobilised oligothymidylic acid units.

The remaining 5% of the sample that hybridizes with PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose at -4°, is eluted at 30° (fraction 2). After enzymatic dephosphorylation, homologues of deoxyriboadenylic acid containing up to 8 monomer units are isolated on a preparative scale in chromatographically pure form from fraction 2 using column chromatography. Purity and structure of the isolated adenylic acids are determined by paper chromatography and by enzymatic hydrolysis.

---

### EINLEITUNG

Vor kurzem haben wir über die präparative Isolierung von Oligomeren der Desoxyriboadenylnsäure aus dem Partialhydrolysat oxidiertem Heringsspermen-DNA berichtet<sup>1</sup>. Mit den bekannten chromatographischen Methoden waren bisher nur kurzkettige Oligomere aus dem Partialhydrolysat zugänglich, während definierte

---

\* Bei Abkürzungen werden prinzipiell IUPAC-IUB Regeln befolgt (*Eur. J. Biochem.*, 15 (1970) 203).  $A_{260}$ -Einkt = Nucleotid-Menge in 1 cm<sup>3</sup> Solvens, die bei 260 nm die Absorption 1 ergibt (Schichtdicke 1 cm). PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose = Desoxyoligothymidin-5'-phosphat-DEAE-Cellulose. Tris = a,a-Tris(hydroxymethyl)methylamin.

längere Fragmente nicht isoliert werden konnten. Inzwischen gelang es uns mit Hilfe der Template-Chromatographie, in der die Spezifität des Basenpaarungsmechanismus nach Watson und Crick zur Trennung genutzt wird, aus dem Partialhydrolysat chromatographisch reine Oligodesoxyriboadenylsäuren mit bis zu 8 Monomereinheiten im präparativen Massstab zu isolieren, wie im folgenden gezeigt wird.

## 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.); Nucleinsäurebausteine: dA, pdA (PWA Waldhof, Mannheim, B.R.D.); PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose wurde in unserem Labor synthetisiert<sup>2</sup>.

### Laufmittelsysteme

(A) Ethanol-1 M Ammoniumacetat (pH 7.5) (7:3, v/v); (B) 1-Propanol-konz. Ammoniaklösung-Wasser (55:10:35, v/v/v).

### Vorbehandlung der DNA

Käufliche DNA aus Heringsspermen wird unter den früher beschriebenen Bedingungen<sup>1</sup> mit KMnO<sub>4</sub> oxidiert und anschliessend alkalisch hydrolysiert. Die hierbei erhaltene stark verunreinigte Mischung von Desoxyriboadenylsäuren wird an QAE-Sephadex A-25 im steigenden Salzgradienten bei pH 7.5 fraktioniert. Desoxyriboadenylsäuren mit 1-3 Monomereinheiten, die zusammen mit zahlreichen Verunreinigungen ca. 85% des Partialhydrolyсата ausmachen, verlassen die Säule in 5 gut voneinander getrennten Peaks. Die restlichen ca. 15% des Hydrolyсата werden anschliessend mit 1 M NaCl gemeinsam in Peak VI eluiert. Im folgenden wird die weitere Auftrennung des Lyophilisats von Peak VI beschrieben.

### Säulenchromatographische Trennung des Lyophilisats von Peak VI an PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose (vgl. Fig. 1)

Die in der folgenden Trennung verwendete PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose Säule (20 × 2 cm) ist mit einem Kühlmantel versehen, der mit einem Thermostaten verbunden ist. Die Elution der Säule erfolgt mit 1 M NaCl, 0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6.5). Der Durchfluss wird mit einer Schlauchpumpe auf ca. 40 ml/h eingestellt.

Ca. 100 mg (≈ 1200 A<sub>260</sub>-Einheiten) des Lyophilisats von Peak VI werden in 2 ml des Elutionspuffers gelöst und bei 30° auf die PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose aufgetragen. Nachdem die Probenlösung in das Gelbett eingezogen ist, wird die Säule auf -4° gekühlt und anschliessend so lange bei dieser Temperatur eluiert, bis die Absorption des Eluats nach einem steilen Anstieg (Peak I) unter 0.04 A<sub>260</sub>-Einheiten fällt. Dieser Wert wird nach 300-350 ml erreicht. Dann unterbricht man die Elution und erwärmt die Säule auf 30°. Nachdem die Säule ca. 1 h bei 30° belassen wurde,

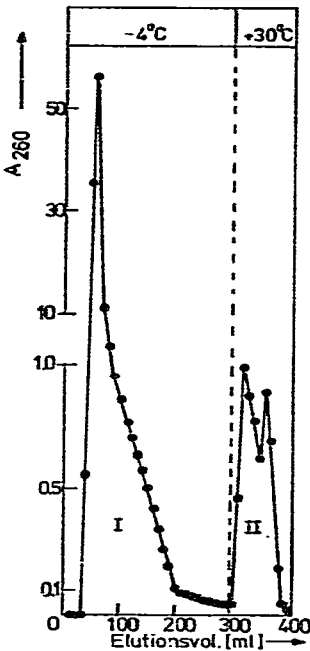


Fig. 1. Elutionsprofil der Template-Chromatographie von ca. 1200  $A_{260}$ -Einheiten einer Mischung höhermolekularer Desoxyriboadenylnsäuren, die aus dem Partialhydrolysat oxidierter Heringsspermen-DNA isoliert wird. Die Trennung wird an einer PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose Säule ( $20 \times 2$  cm) im zweistufigen Temperaturgradienten mit 1 M NaCl, 0,01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6,5) durchgeführt. Durchfluss: 40 ml/h. Die Produkte von Peak II werden vereinigt, entsalzt, lyophilisiert, enzymatisch dephosphoryliert und anschließend an QAE-Sephadex rechromatographiert (vgl. Fig. 2).

wird die Elution fortgesetzt und so lange weitergeführt, bis die Absorption nach dem 2. steilen Anstieg (Peak II) wieder unter 0,04  $A_{260}$ -Einheiten fällt. Hierzu werden ca. 100 ml Elutionspuffer benötigt. Fraktionen zu 10 ml werden gesammelt. Die Absorption jeder Fraktion wird bei 250, 260 und 280 nm spektralphotometrisch gemessen. Die Auftragung der bei  $A_{260}$  erhaltenen Messwerte gegen das Elutionsvolumen führt zu dem in Fig. 1 abgebildeten Elutionsprofil. Die Fraktionen von Peak II der Fig. 1 werden vereinigt, an einer UM 2 Membran entsalzt und anschließend lyophilisiert. Die Lyophilisate von Peak II aus 15 Trennungen, ca. 940  $A_{260}$ -Einheiten, werden vereinigt und anschließend enzymatisch dephosphoryliert.

#### *Enzymatische Dephosphorylierung des Lyophilisats von Peak II der Fig. 1*

Ca. 40 mg (940  $A_{260}$ -Einheiten) der aus 15 Trennungen vereinigten Lyophilisate von Peak II werden in 2 ml Wasser gelöst, mit 0,2 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,1) und 0,1 ml der käuflichen alkalischen Phosphatasesuspension (2000 U) versetzt und anschließend 8–12 h bei 37° inkubiert. Danach wird der Reaktionsansatz mit Wasser auf 15 ml verdünnt und, wie im folgenden beschrieben, an einer QAE-Sephadex A-25 Säule fraktioniert.

*Säulenchromatographische Fraktionierung der dephosphorylierten Produkte aus Peak II der Fig. 1 an QAE-Sephadex A-25 (vgl. Fig. 2)*

Die Reaktionslösung, die nach der enzymatischen Dephosphorylierung anfällt, wird auf eine mit 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) äquilibrierte QAE-Sephadex A-25 Säule (47 × 2 cm) aufgetragen. Anschliessend wird die Säule bei Raumtemperatur zunächst mit 2 l 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit wird mit einer Schlauchpumpe auf ca. 300 ml/h eingestellt. Danach wird die Elution im linear steigenden NaCl Gradienten fortgesetzt, der ebenfalls mit Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist; 4 l 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl im Mischgefäss; 4 l 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl im Vorratsgefäss.

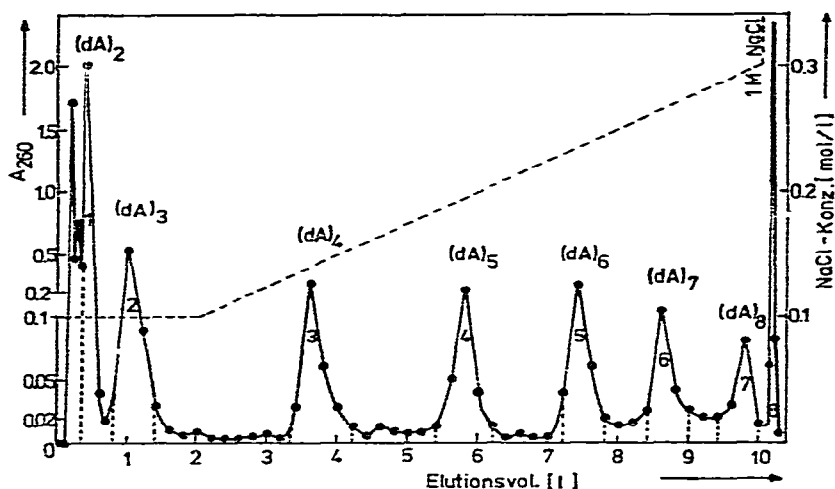


Fig. 2. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung von ca. 940  $A_{260}$ -Einheiten der vereinigten, dephosphorylierten Lyophilisate von Peak II der Fig. 1. Die Rechromatographie wird bei Raumtemperatur an einer QAE-Sephadex A-25 Säule (47 × 2 cm) im steigenden NaCl-Gradienten (pH 7.5) durchgeführt. Experimentelle Einzelheiten s. Beschreibung der Versuche und Tabelle I. Die Charakterisierung der Oligodesoxyriboadenylicsäuren, die in Peak 1-7 eluiert werden, ist in Tabelle II aufgeführt.

Nach diesem Gradienten wird die Säule mit ca. 0.5 l 1 M NaCl eluiert. Fraktionen zu 20 ml werden gesammelt. Von den ersten 50 Fraktionen wird die Absorption jeder fünften, von den folgenden die jeder zehnten Fraktion bei 260 nm gemessen. Das graphische Auftragen der Messwerte gegen das Elutionsprofil führt zu dem in Fig. 2 abgebildeten Elutionsprofil. Fraktionen von Peak 1-7 werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt und durch Ultrafiltration entsalzt. Die Entsalzung der Produkte aus Peak 1-3 wird an einer UM 0.5 durchgeführt, während die Fraktionen von Peak 4-7 an einer UM 2 Membran entsalzt werden. Das Retentat ist salzfrei, wenn im Eluat bei Zusatz von  $\text{AgNO}_3$  keine Trübung auftritt. Die entsalzten Lösungen werden im Vacuum konzentriert und anschliessend auf Papier chromatographiert. Die Trennergebnisse sind in Tabelle I zusammengefasst.

TABELLE I

ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN NACHTRENNUNG VON 940  $A_{260}$ -EINHEITEN DER OLIGODESOXYRIBOADENYLSÄUREMISCHUNG, DIE AN  $PV(pT)_2$ -DEAE-CELLULOSE IN PEAK II DER FIG. 1 BEI 30° ELUIERT WIRD

Die Rechromatographie der dephosphorylierten Oligonucleotide wird an QAE-Sephadex A-25 im steigenden NaCl-Gradienten bei pH 7.5 durchgeführt. Säulenmasse: 47 × 2 cm; Durchfluss: 300 ml/h.

Peak aus Fig. 2	Eluiert bei NaCl-Konz. (M)	Isolierte Oligodesoxyriboadenylsäuren		
		$A_{260}$ -Einh.	Anteil der Mischung (%)	Bezeichnung
1	0.10	136*	14.4	(dA) <sub>2</sub>
2	0.10	82*	8.7	(dA) <sub>3</sub>
3	0.13–0.15	41*	4.4	(dA) <sub>4</sub>
4	0.18–0.20	36*	3.8	(dA) <sub>5</sub>
5	0.21–0.24	43*	4.6	(dA) <sub>6</sub>
6	0.26–0.27	52*	5.5	(dA) <sub>7</sub>
7	0.29–0.30	44*	4.7	(dA) <sub>8</sub>
8	1 M	146	15.5	Unbekannt
Zwischenfraktionen		112	11.9	Unbekannt

\* Nach der Entsalzung.

#### Enzymatische Spaltung der Oligodesoxyriboadenylsäure mit Phosphodiesterase aus Schlangengift

Zur enzymatischen Hydrolyse werden ca. 10–15  $A_{260}$ -Einheiten der betreffenden Oligoadenylsäure vom Papier eluiert. Das Eluat, ca. 100–150  $\mu$ l, wird mit 10  $\mu$ l 0.1 M  $MgCl_2$ -Lösung, 10  $\mu$ l 1 M Tris-HCl (pH 8.1) und 10  $\mu$ l der käuflichen Enzymlösung versetzt.

Der Reaktionsansatz wird 3 h bei 37° inkubiert und anschliessend auf Papier im Laufmittelsystem A aufgetrennt. Die Flecken von dA und pdA werden vom Papier eluiert. Die Absorption der Eluate wird bei 260 nm gemessen. Aus dem Verhältnis der Messwerte von dA zu pdA errechnet sich die Kettenlänge der ursprünglichen Oligoadenylsäure.

#### ERGEBNISSE

DNA aus Heringsspermen wird im 30 g Ansatz auf dem früher beschriebenen Weg mit  $KMnO_4$  oxidiert<sup>1</sup>. Hierdurch werden die Nucleobasen Thymin, Cytosin und Guanosen im Molekülverband der DNA zerstört, während Adenin unter diesen Bedingungen nicht merklich angegriffen wird. Aus der oxidierten DNA werden nach Hydrazinolyse und durch anschliessende alkalische Hydrolyse Oligodesoxyriboadenylsäuren freigesetzt. Die durchschnittliche Ausbeute an DNA-Hydrolysat liegt bei ca. 30% ( $\approx$  9 g).

Bei der säulenchromatographischen Fraktionierung dieses sehr komplex zusammengesetzten Partialhydrolysats, die im 5 g Ansatz an QAE-Sephadex durchgeführt wird, werden ca. 55% des Hydrolysats in 5 deutlich voneinander getrennten Peaks eluiert. Ca. 30% gehen in den Fraktionen zwischen den verschiedenen Peaks

verloren, während die restlichen *ca.* 15% in Peak VI mit 1 *M* NaCl die Säule verlassen (vgl. Fig. 1 der früheren Arbeit<sup>1</sup>). Nach Entsalzung erhält man *ca.* 500 mg des Lyophilisats von Peak VI, die *ca.* 3% der eingesetzten DNA-Menge ausmachen.

Durch Rechromatographie der Produkte aus Peak 1–5 werden unterschiedlich phosphorylierte Oligomere der Desoxyriboadenylsäure und unvollständig hydrolysierte Fragmente mit bis zu 3 Monomereinheiten in chromatographisch reiner Form erhalten. Aus dem Lyophilisat von Peak VI, das die länger-kettigen Oligoadenylsäuren enthält, sind mit den gebräuchlichen chromatographischen Methoden bisher nur  $p(dA)_4p$  und die Mischung der Sequenzisomeren  $p(dA)_6$ ,  $(dA)_6p$  zugänglich, die zusammen *ca.* 30% dieses Lyophilisats ausmachen. Die restlichen Produkte aus Peak VI konnten bislang nicht aufgetrennt werden, obwohl wir hierzu zahlreiche Trennversuche unternommen haben, in denen Temperatur und pH-Wert variiert und ausser QAE-Sephadex auch DEAE-Cellulose verwendet wurden. Auch der Zusatz von 7 *M* Harnstoff zum Elutionpuffer führte zu keinem Erfolg.

Erst mit Hilfe der Template-Chromatographie an  $PV(pT)_n$ -DEAE-Cellulose gelang eine befriedigende Auftrennung des Lyophilisats an Peak VI und damit die präparative Isolierung höhermolekularer Oligodesoxyriboadenylsäuren definierter Sequenz. Bei der  $PV(pT)_n$ -DEAE-Cellulose handelt es sich um DEAE-Cellulose, die mit kovalent an Polyvinylalkohol (PV) gebundenen Oligomeren der Desoxyribothymidylsäure  $(pT)_n$  beladen ist. Dieses Trennmateriale haben wir früher zur präparativen Trennung synthetischer Oligoadenylsäuren eingesetzt<sup>2</sup>. Die Template-Chromatographie basiert auf dem Basenpaarungsmechanismus nach Watson und Crick. Unter Bedingungen, bei denen Oligonucleotide mit komplementären Partnern Basenpaare ausbilden, werden Oligodesoxyriboadenylsäuren an den stationär gebundenen komplementären Desoxyribothymidylsäureresten spezifisch adsorbiert, während Verunreinigungen und alle Fragmente, die keine Basenpaarung eingehen, eluiert werden. Anschliessend werden die hybridisierten Oligonucleotide bei Temperaturerhöhung desorbiert, da die Basenpaarung oberhalb der sogenannten Schmelztemperatur aufgehoben wird. Die Template-Chromatographie wird bisher vor allem in analytischen Trennungen eingesetzt wie bspw. zur Isolierung verschiedenster mRNA, die mit Hilfe von Oligo(dT)-Cellulose durchgeführt wird. Zur präparativen Isolierung natürlicher DNA-Fragmente wurde dieses spezifische Trennverfahren noch nicht genutzt.

Die Auftrennung der länger-kettigen Oligodesoxyriboadenylsäuren aus Peak VI wird mit Hilfe der Template-Chromatographie an  $PV(pT)_n$ -DEAE-Cellulose wie folgt durchgeführt. 100–500 mg (1200–5000  $A_{260}$ -Einheiten) des Lyophilisats von Peak VI werden in *ca.* 2 ml des Elutionspuffers 1 *M* NaCl, 0.01 *M*  $Na_2HPO_4$  (pH 6.5) gelöst und auf die, auf 30° erwärmte  $PV(pT)_n$ -DEAE-Cellulose Säule (20 × 2 cm) aufgetragen. Anschliessend wird die Säule auf –4° gekühlt und zunächst bei dieser Temperatur mit dem gleichen Puffer eluiert (vgl. Fig. 1). Unter diesen Bedingungen werden die nicht komplementären Verbindungen und die kurzen Oligoadenylsäuren der mobilen Phase, die keine Basenpaare ausbilden, in Peak I der Fig. 1 eluiert, während die komplementären länger-kettigen Oligoadenylsäuren über den Basenpaarungsmechanismus an den immobilisierten Oligothymidylsäureresten der stationären Phase adsorbiert werden. Die adsorbierten Oligoadenylsäuren werden anschliessend in einem "Temperaturstoss", der oberhalb ihrer Schmelztemperatur liegt, auf einmal desorbiert und gemeinsam in Peak II der Fig. 1 von der  $PV(pT)_n$ -

DEAE-Cellulose eluiert. Da vermutlich im Partialhydrolysat der oxidierten Heringspermen-DNA Oligoadenylnsäuren mit mehr als 9 Monomereinheiten nicht auftreten, wählen wir als "Temperaturstoss" 30°, da bspw. p(dA)<sub>9</sub> zwischen 25 und 32° von einer Oligo(dT)-Cellulose Säule eluiert wird<sup>3</sup>.

Von der aufgetragenen Probe verlassen in Peak I bereits 95–97% bei –4° die Säule, während nur 3–5% (70–150 A<sub>260</sub>-Einheiten) hybridisieren. Die Ausbeute an adsorbiertem Material (Peak II) hängt von der aufgetragenen Probenmenge ab. Die prozentual höchste Ausbeute erhält man bei der Auftrennung von ca. 1200 A<sub>260</sub>-Einheiten, von denen durchschnittlich 6% bei –4° gebunden und bei 30° eluiert werden, während dagegen von 5000 aufgetragenen A<sub>260</sub>-Einheiten nur ca. 3% in Peak II erhalten werden.

Die Kapazität der PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose ist im Vergleich zu den früheren Trennungen, in denen synthetische Oligodesoxyriboadenylnsäuren fraktioniert wurden, drastisch erniedrigt<sup>2</sup>. Dies ist sicherlich darauf zurückzuführen, dass die eingesetzte PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose über 4 Jahre in zahlreichen Trennungen verwendet wurde und hierdurch den grössten Teil ihrer ursprünglichen Kapazität durch Alterung verloren hat. Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass die PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose ein verhältnismässig stabiles Trennmateriale darstellt, dass über einen bemerkenswert langen Zeitraum verwendet werden kann.

Die Fraktionen von Peak I und II werden durch Ultrafiltration entsalzt und lyophilisiert. Das Lyophilisat von Peak I wird nochmals an PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose nachgetrennt, während die Produkte aus Peak II aus mehreren Läufen gesammelt und dann gemeinsam an QAE-Sephac<sup>®</sup>x fraktioniert werden.

Überraschenderweise werden bei der Rechromatographie der in Peak I eluierten Produkte 3–5% der aufgetragenen A<sub>260</sub>-Einheiten bei –4° an der PV(pT)-DEAE-Cellulose adsorbiert und bei 30° in Peak II eluiert. Selbst nach dreimaliger Rechromatographie der gleichen Probe werden im 4. Lauf immer noch 2% adsorbiert. Dieses unerwartete Ergebnis erklären wir damit, dass Peak I kurze Oligoadenylnsäuren enthält, die aufgrund ihrer terminalen Phosphatgruppen keine Basenpaare ausbilden. Aus eigenen und aus anderen Arbeiten<sup>4</sup> wissen wir, dass terminale Phosphatgruppen bei kurzen DNA-Fragmenten die Ausbildung von Basenpaaren erschweren oder gar verhindern. Bspw. werden Trinucleosiddiphosphate der Desoxyriboadenylnsäure an PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose stärker als Trinucleotide adsorbiert, während Trinucleotidphosphate nicht adsorbiert werden. Da die terminalen Phosphatgruppen hydrolyseempfindlich sind<sup>5,6</sup>, werden vermutlich bei der Entsatzung und Aufarbeitung der Produkte von Peak I einige Oligonucleotide dephosphoryliert. Die dephosphorylierten Verbindungen sind in der Lage Basenpaare auszubilden und werden bei der Rechromatographie der Mischung aus Peak I adsorbiert und dann in Peak II eluiert.

Zur Identifizierung und Charakterisierung der Produkte aus Peak II wird das Lyophilisat an QAE-Sephadex nachgetrennt (vgl. Fig. 2). Zur Rechromatographie werden die Lyophilisate von Peak II aus 15 Trennungen (insgesamt ca. 940 A<sub>260</sub>-Einheiten) vereinigt. Da in Peak II vermutlich unterschiedlich phosphorylierte Oligoadenylnsäuren enthalten sind, so dass eine verhältnismässig komplex zusammengesetzte Mischung vorliegt, wird das Lyophilisat vor der Rechromatographie zur Entfernung der terminalen Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase behandelt. Nach der enzymatischen Dephosphorylierung erhält man eine Mischung homologer

Oligoadenylsäuren ( $(dA)_n$ ), die sich ohne Schwierigkeiten an QAE-Sephadex wie folgt auftrennen lässt.

Die Lösung der dephosphorylierten Produkte wird auf die Säule aufgetragen und bei Raumtemperatur in steigenden NaCl-Gradienten eluiert (vgl. Fig. 2). Zunächst eluiert man die Säule mit 0.1 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5), wobei in Peak 1 und 2 ca. 15% bzw. 10% der aufgetragenen Mischung die Säule verlassen. Anschliessend wird die Elution mit einem linear steigenden NaCl-Gradienten fortgesetzt. Hierbei werden nacheinander Peak 3–7 eluiert, die jeweils zwischen 5 und 7% der aufgetragenen Probelösung enthalten. In den Fraktionen zwischen den Peaks werden ca. 12% des Lyophilisats von Peak II eluiert, während die restlichen ca. 16% mit 1 M NaCl in Peak 8 die Säule verlassen. Die Zwischenfraktionen sowie die Produkte aus Peak 8 werden verworfen. Die Peakfraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung werden vereinigt und entsalzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengefasst. Nach der Rechromatographie werden von der ursprünglichen Mischung, die die PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose bei 30° in Peak II verlässt, nur noch etwa 45% erhalten. Oligoadenylsäuren mit 4 und mehr Monomereinheiten, die aufgrund der Ergebnisse analytischer Trennungen<sup>7</sup> etwa 3–4% des Partialhydrolysates ausmachen sollten, werden bei der präparativen Aufarbeitung des Partialhydrolysates der oxidierten Heringsspermen-DNA nur in Mengen zwischen 0.1 und 0.05% bezogen auf die eingesetzte DNA erhalten.

Die niedrige Ausbeute führen wir darauf zurück, dass bei der Aufarbeitung des Partialhydrolysates ein Teil verlorenght und länger-kettige zu kürzeren Fragmenten abgebaut werden. Bereits bei der Ultrafiltration gehen bis zu 20% der in einem Peak eluierten Oligoadenylsäuren verloren. Dieser Verlust ist nicht nur darauf zurückzuführen, dass die Membran Oligonucleotide nicht vollständig zurückhält, sondern vor allem darauf, dass ein Teil der Oligoadenylsäuren während der Ultrafiltration hydrolysiert. Ein deutlicher Beweis für den Partialabbau der Oligoadenylsäuren während der Aufarbeitung zeigt sich darin, dass bei der Rechromatographie der Produkte aus Peak II, Di- und Trinucleotide gefunden werden. Da diese Verbindung bei den vorangehenden Trennschritten<sup>1</sup> an QAE-Sephadex bereits aus dem Partialhydrolysat entfernt werden, können sie somit nicht in Peak VI enthalten sein und müssen daher erst nachträglich aus den länger-kettigen Fragmenten durch partiellen Abbau gebildet worden sein. Ausserdem werden Dimere der Adenylsäure an PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose nicht adsorbiert, so dass sie bei der Template-Chromatographie die Säule in Peak I verlassen würden und nicht in Peak II gelangen können.

Zur Bestimmung der Reinheit und Identifizierung werden die Produkte der entsalzten Peakfraktionen (Peak 1–7 der Fig. 2) papierchromatographisch untersucht. Im Papierchromatogramm wandern die Produkte in einheitlichen Flecken unterschiedlich schnell (vgl. Tabelle II). Das Absorptionsverhältnis der vom Papier eluierten Oligonucleotide von 250/260 und 280/260 entspricht den für Oligoadenylsäuren charakteristischen Werten von 0.82 bzw. 0.20. Diese Daten zeigen bereits, dass in Peak 1–7 Oligomere der Desoxyriboadenylsäure mit steigender Kettengliederzahl in chromatographisch reiner Form enthalten sind. Dieser Befund wird durch die enzymatische Hydrolyse mit Phosphodiesterase aus Schlangengift zusätzlich bestätigt.

Phosphodiesterase baut bekanntlich Oligonucleotide vom 3'-Ende schrittweise



TABELLE II

PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE  $R_F$ -WERTE\* UND ERGEBNISSE DER ENZYMATISCHEN HYDROLYSE DER ISOLIERTEN OLIGODESOXYRIBOADENYLSÄUREN MIT PHOSPHODIESTERASE AUS SCHLANGENGIFT

Desoxyadenylsäuren Bezeichnung	$R_F$ -Werte absteigend relativ zu pdA im Laufmittelsystem B**	Spaltprodukte nach Phosphodiesterase- Behandlung Bezeichnung	Verhältnisse	
			Erwartet	Beobachtet
(dA) <sub>2</sub>	1.39	dA, pdA	1:1	1.00:1.05
(dA) <sub>3</sub>	1.08	dA, pdA	1:2	1.00:1.93
(dA) <sub>4</sub>	0.88	dA, pdA	1:3	1.00:2.42
(dA) <sub>5</sub>	0.68	dA, pdA	1:4	1.00:3.88
(dA) <sub>6</sub>	0.51	dA, pdA	1:5	1.00:4.84
(dA) <sub>7</sub>	0.39	dA, pdA	1:6	1.00:5.60
(dA) <sub>8</sub>	0.24	dA, pdA	1:7	1.00:6.84

\* Papier: Schleicher & Schüll, Nr. 2316.

\*\* 1-Propanol-konz. Ammoniaklösung-Wasser (55:10:35, v/v/v).

ab, wobei dephosphorylierte Oligodesoxyriboadenylsäuren zu pdA und der 5'-terminale Baustein zu dA abgebaut werden. Zur Bestimmung der Kettenlänge wird ein Aliquot des betreffenden Fleckens mit Phosphodiesterase hydrolysiert und anschliessend erneut auf Papier chromatographiert. Hierbei zeigt sich, dass die Oligonucleotide aus Peak 1-7 vollständig abgebaut werden. Als Spaltprodukte treten ausschliesslich pdA und dA auf, die mit Referenzsubstanzen und aus den Absorptionsverhältnissen bei 250/260 und 280/260 identifiziert werden. Andere Nucleoside und Nucleotide werden im Papierchromatogramm nicht gefunden. Die Ergebnisse des enzymatischen Abbaus sind in Tabelle II zusammengefasst.

## DISKUSSION

Bei der Partialhydrolyse einer oxidierten DNA entsteht ein sehr komplex zusammengesetztes Gemisch verschiedenster Oligodesoxyriboadenylsäuren und anderer Hydrolyseprodukte. Die Ergebnisse früherer analytischer Arbeiten lassen nur den Schluss zu, dass im Partialhydrolysat Oligoadenylsäuren mit bis zu 5 Monomereinheiten enthalten sind<sup>6-8</sup>. Wir haben nicht nur die vermuteten Fragmente, sondern darüber hinaus auch Oligoadenylsäuren mit bis zu 8 Monomereinheiten und andere, bisher nicht beschriebene Fragmente im präparativen Massstab aus dem Partialhydrolysat isoliert und charakterisiert.

Unsere Ergebnisse zeigen ausserdem, dass sich die Template-Chromatographie für präparative Trennungen ausgezeichnet eignet und praktikabel gehandhabt werden kann. Während bei der Template-Chromatographie im analytischen Massstab die hybridisierten Oligoadenylsäuren von einer Oligo(dT)-Cellulose Säule im stufenförmigen<sup>9</sup> oder linearen Temperaturgradienten<sup>3</sup> nacheinander eluiert werden, verwenden wir in der präparativen Template-Chromatographie zur Elution der adsorbierten Oligoadenylsäuren einen "Temperaturstoss". Hierdurch werden alle hybridisierten Oligonucleotide auf einmal desorbiert und können anschliessend an QAE-Sephadex nachgetrennt werden. In dem von uns gewählten Weg sehen wir ge-

genüber der Verwendung eines Temperaturgradienten folgende Vorteile. Die termisch labilen Oligoadenylsäuren werden nur kurzfristig belastet und fallen in einem kleinen Elutionsvolumen an, das schnell entsalzt und aufgearbeitet werden kann. Ausserdem werden Gemische von Oligoadenylsäuren an QAE-Sephadex im Salzgradienten weitaus besser und schneller aufgetrennt als bspw. an Oligo(dT)-Cellulose im Temperaturgradienten. Die hohe Kapazität von QAE-Sephadex ermöglicht ausserdem die Produkte aus mehreren Läufen, die an der PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose durchgeführt werden, zu vereinen und dann gemeinsam in einem Lauf an QAE-Sephadex nachzutrennen.

Trotz des prozentual sehr niedrigen Anteils der längerkettigen Oligoadenylsäuren am Partialhydrolysat der oxidierten Heringsspermen-DNA erhält man bei der praktikabel zu handhabenden Aufarbeitung von ca. 30 g DNA diese Fragmente etwa in den Mengen, in denen längerkettige Oligoadenylsäuren bei der chemischen Polykondensation<sup>5</sup> von ca. 1 mmol Desoxyriboadenosin-5'-monophosphat anfallen.

Die Polykondensation, die zur Zeit das einfachste Verfahren zur Synthese von Oligoadenylsäure in präparativen Mengen darstellt, erfordert vom Ausgangsmaterial bis zum Polykondensat bereits sehr komplizierte Reaktionsschritte, wie bspw. die Einführung der Schutzgruppen und die Kondensationsreaktion. Nach der Polykondensation erhält man eine komplex zusammengesetzte Mischung, in der ausser den linearen Kondensationsprodukten auch zyklische Verbindungen und Pyrophosphatderivate enthalten sind, die die Isolierung der gewünschten Produkte erschweren. Die Gewinnung definierter Fragmente aus dem Polykondensat erfordert somit etwa den gleichen Aufwand wie die Aufarbeitung eines Partialhydrolysats. Da die Partialhydrolyse einer DNA im Gegensatz zur Polykondensation von Mononucleotiden keine wesentlichen Schwierigkeiten bereitet, stellt die präparative Isolierung der Oligoadenylsäuren eine einfache Alternative zur sehr aufwendigen und komplizierten chemischen Synthese dar.

Aus dem Partialhydrolysat einer oxidierten DNA sind ausser den linearen Oligonucleotiden auch Fragmente erhältlich, die an beiden Enden Phosphatgruppen tragen. Diese Oligonucleotidphosphate, die in präparativen Mengen bisher nur auf einem komplizierten chemischen Syntheseweg erhalten werden, sind in jüngster Zeit von besonderem Interesse, da mit ihrer Hilfe ein schrittweiser enzymatischer Aufbau von definierten DNA-Fragmenten möglich ist<sup>10</sup>. Der von uns aufgezeigte Weg zur präparativen Isolierung dieser Fragmente kann möglicherweise dazu beitragen, dass diese neue aussichtsreiche Entwicklung schneller vorangetrieben wird.

#### DANK

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft grosszügig unterstützt.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Bei der alkalischen Hydrolyse oxidierter Heringsspermen-DNA erhält man ein komplexes Gemisch von Desoxyriboadenylsäuren. Nach der säulenchromatographischen Entfernung der Fragmente mit 1-3 Monomereinheiten verbleiben noch ca. 10% des Partialhydrolysats. Dieser Rest, der die höhermolekularen Fragmente

enthält, wird an einer PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose Säule über den Basenpaarungsmechanismus im zweistufigen Temperaturgradienten in 2 Fraktionen getrennt. Die 1. Fraktion, die bei -4° eluiert wird, enthält die Verbindung (≈ 95% der aufgetragenen Probe), die keine Basenpaare mit den immobilisierten Oligothymidylsäuren eingehen. Die restlichen ca. 5%, die bei -4° an der PV(pT)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose hybridisieren, verlassen bei 30° in der 2. Fraktion die Säule. Aus der 2. Fraktion werden nach enzymatischer Dephosphorylierung Homologe der Desoxyriboadenylsäure mit bis zu 8 Monomereinheiten chromatographisch rein im präparativen Massstab säulenchromatographisch isoliert. Reinheit und Struktur der isolierten Adenylsäuren werden papierchromatographisch und durch enzymatische Hydrolyse ermittelt.

#### LITERATUR

- 1 H. Schott und M. Schwarz, *J. Chromatogr.*, 157 (1978) 197.
- 2 H. Schott, *J. Chromatogr.*, 96 (1974) 79.
- 3 C. R. Astell, M. T. Doel, P. A. Jahnke and M. Smith, *Biochemistry*, 12 (1973) 5068.
- 4 C. R. Astell and M. Smith, *Biochemistry*, 11 (1972) 4114.
- 5 R. K. Ralph and H. G. Khorana, *J. Amer. Chem. Soc.*, 83 (1961) 2926.
- 6 H. Türler, J. Buchowicz and E. Chargaff, *Biochim. Biophys. Acta*, 195 (1969) 456.
- 7 A. S. Jones and R. T. Walker, *Nature (London)*, 202 (1964) 24, 1108.
- 8 A. S. Jones, G. W. Ross, S. Takemura, T. W. Thompson and R. T. Walker, *J. Chem. Soc.*, (1964) 373.
- 9 P. T. Gilham, *J. Amer. Chem. Soc.*, 86 (1964) 4982.
- 10 D. M. Hinton, J. A. Baez and R. I. Gumpert, *Biochemistry*, 17 (1978) 5091.