

CHROM. 12,880

DARSTELLUNG VON OLIGOMEREN DER DESOXYRIBOGUANYLSÄURE DURCH CHEMISCHE PARTIALHYDROLYSE VON DNA

HERBERT SCHOTT* und HILDEGARD WATZLAWICK

Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, 7400 Tübingen 1 (B.R.D.)

(Eingegangen am 10. März 1980; geänderte Fassung eingegangen am 10. April 1980)

SUMMARY

Preparation of oligomers of deoxyriboguanilyc acids by partial chemical hydrolysis of DNA

A new method for the preparation of oligodeoxyriboguanilyc acids is described. By hydrazinolysis and subsequent alkaline hydrolysis, DNA from herring sperm is degraded to deoxyriboguanilyc acids on a preparative scale. The partial hydrolysate is pre-separated into fractions of high and low molecular weight by column chromatography on basic anion exchanger, and then further fractionated. In this way, it is possible to obtain, on a preparative scale, oligomers of deoxyriboguanilyc acid with differing degrees of phosphorylation up to five monomer units, which are still partially impure. In a final step, the remaining impurities were removed by preparative paper chromatography on cellulose. The advantages and disadvantages of this method over the chemical synthesis of oligodeoxyriboguanilyc acids are discussed.

EINLEITUNG

Oligonucleotide definierter Sequenz sind in präparativen Mengen derzeit nur auf synthetischen Wegen zugänglich. Die verschiedenen Syntheseverfahren, die hierzu zur Verfügung stehen, sind sehr aufwendig und kompliziert¹⁻³.

Vor einiger Zeit wurde mit der Entwicklung eines neuen Konzepts zur Darstellung von Oligonucleotiden begonnen, das ohne chemische Synthese auskommt. Leicht zugänglich DNA wird mit chemischen Methoden im präparativen Massstab selektiv zu Oligonucleotidgemischen abgebaut. Auf diesem Weg kann DNA zur Zeit selektiv zu Pyrimidin-⁴, Purinnucleotid-⁵ oder Oligoadenylsäuregemischen⁵ abgebaut werden. Aus den hierbei anfallenden Partialhydrolysaten werden definierte Verbindungen mit Hilfe eines Trennungsgangs in präparativen Mengen isoliert. In diesem Trennungsgang werden verschiedene chromatographische Methoden, wie Säulenchromatographie an Ionenaustauschern, Papierchromatographie auf Cellulose, präparative Template-Chromatographie und Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromato-

graphie entsprechend den jeweils anstehenden Trennproblemen unterschiedlich eingesetzt und kombiniert. Während die Auftrennung des Pyrimidinnucleotid^{4,6-10} und Oligoadenylnsäuregemisches^{5,11} weitgehend gelöst ist, steht die Aufarbeitung des Purinnucleotidgemisches noch am Anfang.

In der vorliegenden Arbeit wird ein neues Verfahren beschrieben, das die selektive Partialhydrolyse einer DNA zu Oligoguanylsäuren im präparativen Massstab erlaubt. Ausserdem wird ein Trennungsgang aufgezeigt, nach dem die Aufarbeitung des Oligoguanylsäuregemisches mit befriedigenden Ergebnissen möglich ist. In dem verwendeten Trennungsgang werden im wesentlichen wiederum die Methoden kombiniert, die sich zur Fraktionierung der bisher erhaltenen Partialhydrolysate bewährt haben. Da aber Oligoguanylsäuren im Gegensatz zu anderen Oligonucleotiden besonders stark zur Assoziation neigen, treten bei der Auftrennung von Oligoguanylsäuregemischen Komplikationen¹² auf, die zusätzliche Trennschritte erforderlich machen. Trotz dieser Schwierigkeiten sind auf dem im folgenden beschriebenen Weg Oligoguanylsäuren wesentlich einfacher als durch chemische Synthese zugänglich^{12,13}. Ausserdem werden aus dem anfallenden Partialhydrolysat nicht nur die Oligoguanylsäuren erhalten, die auf synthetischem Weg zugänglich sind, sondern auch Verbindungen, die bisher nicht synthetisch dargestellt wurden.

EXPERIMENTELLER TEIL*

Material

Chemikalien. Chemikalien werden in "chemisch reiner" Form verwendet. DEAE-Cellulose (Whatman DE-23, W. & R. Balston, Maidstone, Great Britain); QAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden); Membranen (Amicon, Lexington, MA, 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, Oligonucleotid-5'-Nucleotidhydrolase (EC 3.1.4.1.) (Boehringer, Mannheim, B.R.D.); DNA, Nucleinsäurebausteine: dG, pdG (PWA Waldhof, Mannheim, B.R.D.). Die Referenznucleotide (dG)₂, (dG)₃, (dG)₄, p(dG)₂ und p(dG)₃ werden in unserem Labor synthetisiert.

Laufmittelsysteme. (A) Ethanol-1 M Ammoniumacetat pH 7.5 (7:3), (B) 1-Propanol-konz. NH₄OH (55:10:35), (C) Isobuttersäure-konz. NH₄OH-Wasser (66:1:33).

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

Methoden

Die unter (1)–(6) beschriebenen Ansätze werden drei bis vier mal durchgeführt.

(1) *Partialhydrolyse von Heringsspermen-DNA.* 100 g käufliche Heringsspermen-DNA werden in 200 ml Hydraziniumhydrat gelöst und 4 h bei 60°C gerührt.

* Bei Abkürzungen werden prinzipiell IUPAC-IUB Regeln befolgt (*Eur. J. Biochem.*, 15 (1970) 203). A₂₆₀-Einheit = Nucleotid-Menge in 1 cm³ Solvens, die bei 260 nm die Absorption 1 ergibt (Schichtdicke 1 cm).

Die entstandene, braune Reaktionslösung wird am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt, in Wasser aufgenommen und nochmals abrotiert. Der Sirup wird mit ca. 400 ml Wasser versetzt und von ca. 10 g Rückstand abzentrifugiert. Der klare Überstand wird an einer UM 10 Membran solange ultrafiltriert bis die Absorption des Eluats unter 100 A_{250} -Einheiten sinkt. Das lyophilisierte Retentat ergibt, gemittelt aus drei Ansätzen 37 g eines hellbraunen Pulvers. Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung der depyrimidierten DNA besteht darin, dass der Rückstand der Hydrazinolyse in ca. 500 ml 0.3 M Natriumacetat-Lösung aufgenommen und mit 1.5 l Ethanol versetzt wird. Nach kurzer Zeit setzt sich die depyrimidierte DNA als hellbraunes Öl am Boden ab, das nach Abdekantieren des Überstands wie unter (2) beschrieben aufgearbeitet wird.

(2) *Alkalische Hydrolyse der depyrimidierten Heringsspermen-DNA.* 40 g des Lyophilisats bzw. das gesamte Öl (1) werden mit 1 liter 7 M Kaliumhydroxid versetzt und anschliessend 1 h im siedenden Wasserbad erhitzt. Die Lösung wird auf ca. 0°C abgekühlt und mit 70%iger Perchlorsäure (ca. 520 ml) so langsam neutralisiert, dass die Temperatur nicht über 25°C steigt. Ausgefallenes Kaliumperchlorat wird auf einer Nutsche abgesaugt und mit kaltem Wasser nachgewaschen. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt und an einer UM 10 Membran solange ultrafiltriert, bis das Eluat weniger als 10 A_{250} -Einheiten aufweist. Das lyophilisierte Retentat ergibt, gemittelt aus drei Ansätzen 14 g eines hellbraunen Pulvers.

(3) *Säulenchromatographische Trennung des Partialhydrolysats. Vortrennung an DEAE-Cellulose.* 14 g des Lyophilisats aus (2) werden in 2 l Wasser gelöst und auf eine DEAE-Cellulose-Säule (70 × 3 cm I.D.) mit ca. 400 ml/h gepumpt. Nach dem Auftragen der Lösung wird die Säule bei einer Laufgeschwindigkeit von ca. 800 ml/h zunächst mit 4 l Wasser eluiert. Hierbei sinkt die Absorption des Eluats unter 0.3 A_{250} -Einheiten. Das Eluat wird verworfen. Im zweiten Schritt eluiert man die Säule mit ca. 10 l 0.1 M Natriumchlorid-0.05 M Tris-HCl pH 7.5. Im dritten und letzten Schritt werden die noch adsorbierten Oligonucleotide mit 2 M Natriumchlorid eluiert. Die Produkte der ersten Fraktion, die mit 0.1 M Natriumchlorid-Puffer die DEAE-Cellulose-Säule verlassen, werden vereinigt, am Rotationsverdampfer konzentriert und an einer UM 2 Membran solange ultrafiltriert, bis das Eluat mit Silbernitrat keine Trübung zeigt. Das salzfreie Retentat wird lyophilisiert und ergibt 6-7 g eines gelben Pulvers. Die Produkte der zweiten Fraktion, die mit 2 M Natriumchlorid die Säule verlassen, werden analog aufgearbeitet und ergeben 4-4.5 g eines hellbraunen Lyophilisats.

(4) *Rechromatographie des Lyophilisats der ersten Fraktion aus (3) an QAE-Sephadex A-25.* 4.4 g (ca. 70,000 A_{250} -Einheiten) des Lyophilisats der ersten Fraktion werden in 50 ml Wasser gelöst und auf eine QAE-Sephadex A-25 Säule (70 × 3 cm I.D.), die mit 0.05 M Natriumchlorid-0.05 M Tris-HCl pH 7.5 äquilibriert ist, aufgetragen (Fig. 1). Nach dem Auftragen der Lösung wird die Säule mit ca. 800 ml/h im steigenden Natriumchlorid-Gradienten, der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist, eluiert wie beschrieben in Tabelle I.

Die Fraktionen von Peak I-VIII der Fig. 1 werden am Rotationsverdampfer konzentriert, durch Ultrafiltration an einer UM 05 Membran entsalzt und lyophilisiert. Die Ausbeuten an Lyophilisaten sind in Tabelle II zusammengefasst.

(5) *Piperidinbehandlung des Lyophilisats der zweiten Fraktion aus (3).* 4 g der höhermolekularen Desoxyriboguanylsäuremischung (zweiten Fraktion) werden in 40

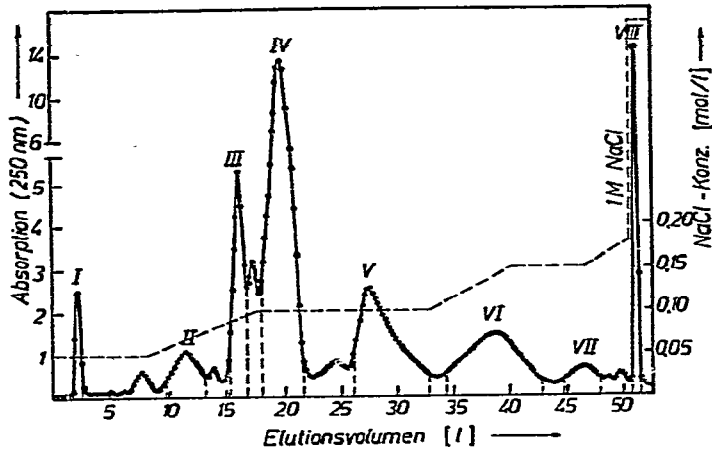


Fig. 1. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Trennung von 4.4 g (ca. 70,000 A_{250} -Einheiten) einer Fraktion niedermolekularer Oligodesoxyriboguanylsäuren, die aus dem Partialhydrolysat einer Heringsspermen-DNA isoliert wird. Säulenfüllung: QAE-Sephadex A-25, 70×3 cm; Durchfluss, 800 ml/h. Die Elution erfolgt bei Raumtemperatur mit dem in der Figur gestrichelt eingezeichneten siebenstufigen Natriumchlorid-Gradienten, der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist. Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung von Peak I-VIII werden vereinigt und aufgearbeitet. Ausbeuten sowie die Identifizierung und Charakterisierung der in Peak I-VI enthaltenen Produkte sind in den Tabellen II, VIII und IX zusammengefasst.

TABELLE I

RECHROMATOGRAPHIE DES LYOPHILISATS AN QAE-SEPHADEX A-25

Elutionsbedingungen		Natriumchlorid-Gradient			
Stufe	Natriumchlorid-Konz.	Im Mischgefäß		Im Vorratsgefäß	
		Volumen (l)	Konzentration (M)	Volumen (l)	Konzentration (M)
1	Konstant	8.0	0.05	—	—
2	Steigend	5.0	0.05	5.0	0.10
3	Konstant	15.0	0.10	—	—
4	Steigend	4.0	0.10	4.0	0.15
5	Konstant	6.0	0.15	—	—
6	Steigend	2.0	0.15	2.0	0.18
7	Konstant	2.0	1.00	—	—

ml Wasser mit 4 g frisch destilliertem Piperidin 30 min bei 90°C gerührt. Anschließend wird die Lösung am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird in 50 ml 0.1 M Kaliumhydroxid 15 min bei 90°C hydrolysiert. Anschliessend wird die Lösung auf 0°C gekühlt, mit 70%iger Perchlorsäure neutralisiert, von ausgefallenem Kaliumperchlorat befreit und säulenchromatographisch aufgetrennt (vgl. Fig. 2).

(6) *Rechromatographie des Lyophilisats der zweiten Fraktion aus (3) nach der Piperidinbehandlung.* Die aus (5) erhaltene Lösung wird mit Wasser auf 100 ml verdünnt und auf eine QAE-Sephadex A-25 Säule (70×3 cm I.D.), die mit 0.05 M

TABELLE II

ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNG VON 4.4 g EINER FRAKTION NIEDERMOLEKULARER OLIGODESOXYRIBOGUANYLSÄUREN AN QAE-SEPHADEX A-25 (VGL. FIG. 1)

Peak	Eluiert bei Natriumchlorid-Konz. (M)	Eluierte Mengen		Isolierte Mengen*	
		A_{250} -Einh.	%	mg	%
I	0.05	900	1.3	20	0.5
II	0.05-0.07	2500	3.6	100	2.3
III	0.09	5800	8.4	290	6.6
IV	0.10	27,200	39.2	850	19.3
V	0.10	9500	13.7	360	8.2
VI	0.11-0.15	6700	9.7	250	5.6
VII	0.15-0.16	1300	1.8	30	0.7
VIII	1.00	3500	5.0	150	3.4
Zwischenfraktionen		12,000	17.3	—	—
Gesamt		69,400		2050	46.6

* Mittelwerte aus drei Ansätzen.

Natriumchlorid-0.05 M Tris-HCl pH 7.5 äquilibriert ist, aufgetragen (Fig. 2). Nach dem Auftragen der Lösung wird die Säule im steigenden Natriumchlorid-Gradienten, der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist, in fünf Stufen eluiert, wie beschrieben in Tabelle III.

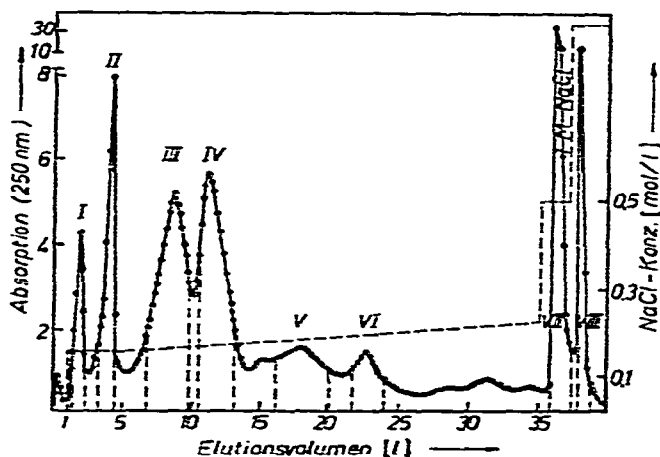


Fig. 2. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Trennung von 4.0 g (ca. 90,000 A_{250} -Einheiten) einer Fraktion höhermolekularer Desoxyriboguanylsäuren, die aus dem Partialhydrolysat der Heringsspermen-DNA isoliert wird. Säulenfüllung: QAE-Sephadex A-25, 70 × 3 cm; Durchfluss, 800 ml/h. Die Elution erfolgt bei Raumtemperatur mit dem in der Figur gestrichelt eingezeichneten fünfstufigen Natriumchlorid-Gradienten, der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist. Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung von Peak I-VIII werden vereinigt und aufgearbeitet. Ausbeuten sowie die Identifizierung und Charakterisierung der in Peak I-VI enthaltene Produkte sind in den Tabellen IV, VII und IX zusammengefasst.

TABELLE III
RECHROMATOGRAPHIE DES LYOPHILISATS AN QAE-SEPHADEX A-25

Elutionsbedingungen		Natriumchlorid-Gradient			
Stufe	Natriumchlorid-Konz.	Im Mischgefäss		Im Vorratsgefäss	
		Volumen (l)	Konzentration (M)	Volumen (l)	Konzentration (M)
1	Konstant	1.0	0.05	—	—
2	Konstant	4.0	0.15	—	—
3	Steigend	15.0	0.15	15.0	0.21
4	Konstant	2.0	0.50	—	—
5	Konstant	2.5	1.00	—	—

Die Fraktionen von Peak I–VIII der Fig. 2 werden am Rotationsverdampfer konzentriert, an einer UM 2 Membran entsalzt und lyophilisiert. Die aus drei Ansätzen gemittelten Ausbeuten an Lyophilisaten sind in Tabelle IV zusammengefasst.

TABELLE IV

ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNG VON 4.0 g EINER FRAKTION HÖHERMOLEKULARER OLIGODESOXYRIBOGUANYLSÄUREN AN QAE-SEPHADEX A-25 (VGL. FIG. 2)

Peak	Eluiert bei Natriumchlorid-Konz. (M)	Eluierte Mengen		Isolierte Mengen*	
		A ₂₅₀ -Einh.	%	mg	%
I	0.15	3600	4.0	90	2.2
II	0.15	4900	5.5	180	4.5
III	0.15–0.16	14,300	15.9	540	13.5
IV	0.16–0.17	12,700	14.2	490	12.2
V	0.18	5400	6.0	240	6.0
VI	0.19–0.20	2900	3.2	140	3.5
VII	0.50	19,000	21.2	830	20.8
VIII	1.00	2800	3.1	140	3.5
Zwischenfraktionen		24,100	26.9	—	—
GesamtGesamt		89,700		2650	66.2

* Mittelwerte aus drei Ansätzen.

(7) Piperidinbehandlung des Lyophilisats von Peak VII der Fig. 2, das aus (6) erhalten wird. 2 g des Lyophilisats von Peak VII der Fig. 2 werden mit 100 ml 50%iger wässriger Piperidinlösung 45 min bei 90°C gerührt. Anschliessend wird die Lösung am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt, der Rückstand in Wasser aufgenommen, nochmals abrotiert und anschliessend gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wird in 50 ml 2 M Kaliumhydroxid 45 min bei 90°C hydrolysiert. Die auf 0°C gekühlte Lösung wird mit 70%iger Perchlorsäure neutralisiert, von ausgefallenem Kaliumperchlorat befreit, an einer UM 2 Membran ultrafiltriert und lyophilisiert. Nach der Gefriertrocknung erhält man 1.7 g eines gelben Pulvers.

(8) Rechromatographie des Lyophilisats von Peak VII der Fig. 2 nach der Piperidinbehandlung an QAE-Sephadex A-25. 1.7 g (ca. 36,000 A₂₅₀-Einheiten) des aus

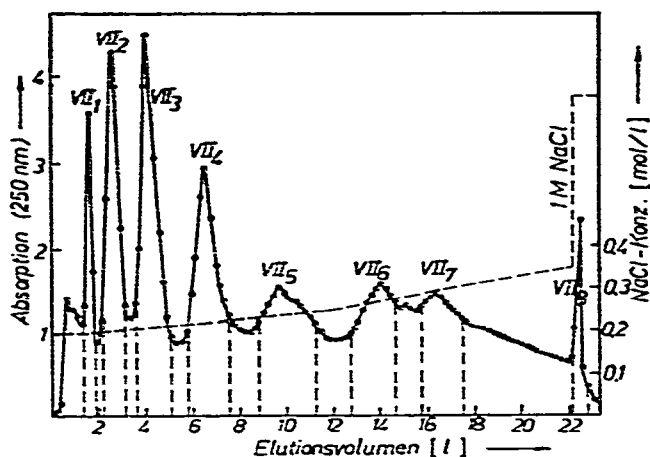


Fig. 3. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung von 1.7 g (ca. 36,000 A_{250} -Einheiten) des Lyophilisats von Peak VII der Fig. 2. Säulenfüllung: QAE-Sephadex A-25, 70×3 cm, Durchfluss, 400 ml/h. Die Elution erfolgt unter Zusatz von 7 M Harnstoff bei Raumtemperatur mit dem in der Figur gestrichelt eingezeichneten vierstufigen Natriumchlorid-Gradienten, der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist. Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung von Peak VII₁₋₇ werden vereinigt und aufgearbeitet. Ausbeuten sowie Identifizierung und Charakterisierung der in Peak VII₁₋₅ enthaltenen Produkte sind in Tabelle VI, VII und IX zusammengefasst.

(7) erhaltenen Lyophilisats werden in 30 ml 7 M Harnstoff gelöst und auf eine mit 0.2 M Natriumchlorid-0.05 M Tris-HCl pH 7.5 in 7 M Harnstoff äquilibrierte QAE-Sephadex A-25 Säule (70×3 cm I.D.) aufgetragen (Fig. 3). Nach dem Auftragen der Lösung wird die Säule im steigenden Natriumchlorid-Gradienten, der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist unter Zusatz von 7 M Harnstoff mit einer Elutionsgeschwindigkeit von ca. 400 ml/h eluiert (Tabelle V).

TABELLE V

RECHROMATOGRAPHIE DES LYOPHILISATS VON PEAK VII AN QAE-SEPHADEX A-25

Elutionsbedingungen		Natriumchlorid-Gradient			
Stufe	Natriumchlorid-Konz.	Im Mischgefäß		Im Vorratsgefäß	
		Volumen (l)	Konzentration (M)	Volumen (l)	Konzentration (M)
1	Konstant	2.0	0.20	—	—
2	Steigend	5.0	0.20	5.0	0.25
3	Steigend	5.0	0.25	5.0	0.35
4	Konstant	1.3	1.00	—	—

Fraktionen von Peak VII₁₋₈ der Fig. 3 werden vereinigt, an einer UM 2 Membran entsalzt und gefriergetrocknet. Die Ausbeuten an Lyophilisaten sind in Tabelle VI zusammengefasst.

(9) *Rechromatographie von Peak VII₆ und VII₇ der Fig. 3 nach enzymatischer Dephosphorylierung an QAE-Sephadex A-25.* Ca. 20 mg (ca. 400 A_{250} -Einheiten) des

TABELLE VI

ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN NACHTRENNUNG DES LYOPHILISATS VON PEAK VII DER FIG. 2 SOWIE DER DEPHOSPHORYLIERTEN PRODUKTE AUS PEAK VII₆ DER FIG. 3 UND AUS PEAK VII₇ DER FIG. 3 AN QAE-SEPHADEX A-25

Wir benützen 1.7 g des Lyophilisats von Peak VII, 20 mg aus Peak VII₆ und 15 mg aus Peak VII₇.

Peak	Eluiert bei Natriumchlorid-Konz. (M)	Eluierte Menge		Isolierte Menge	
		A ₂₅₀ -Einh.	%	mg	%
VII ₁	0.200	1000	2.8	50	2.7
VII ₂	0.200-0.205	3100	8.7	150	8.4
VII ₃	0.205-0.215	3700	10.5	180	10.0
VII ₄	0.220-0.225	3000	8.4	150	8.3
VII ₅	0.230-0.245	3000	8.4	150	8.3
VII ₆	0.260-0.275	2400	6.7	120	6.7
VII ₇	0.290-0.305	2100	5.9	100	5.6
VII ₈	1.000	6100	17.1	300	16.7
Zwischenfraktionen		11,300	31.7	—	—
Gesamt		35,700		1200	66.7
VII _{6a}	0.21-0.22	140	34.1	—	42.0
VII _{6b}	0.23-0.24	130	31.7	—	39.0
VII _{6c}	0.25-0.27	60	14.6	—	17.0
Zwischenfraktion		80	19.5	—	—
Gesamt		410			
VII _{7a}	0.22-0.23	60	26.0	—	30.0
VII _{7b}	0.23-0.25	80	34.8	—	44.0
VII _{7c}	0.26-0.28	50	21.7	—	26.0
Zwischenfraktion		40	17.4	—	—
Gesamt		230			

Lyophilisats von Peak VII₆ bzw. 15 mg (ca. 200 A₂₅₀-Einheiten) des Lyophilisats von Peak VII₇ der Fig. 3 werden jeweils in 100 µl 0.1 M Tris-HCl pH 8.1 gelöst, mit 10 µl käuflicher alkalischer Phosphatase (2000 U) versetzt und 12 h bei 37°C inkubiert. Anschliessend werden die Ansätze an einer QAE-Sephadex A-25 Säule (15 × 1.5 cm I.D.) im linear steigenden Natriumchlorid-Gradienten fraktioniert: 400 ml 0.2 M Natriumchlorid-0.05 M Tris-HCl pH 7.5-7 M Harnstoff im Mischgefäss; 400 ml 0.3 M Natriumchlorid-0.05 M Tris-HCl pH 7.5-7 M Harnstoff im Vorratsgefäss (Fig. 4). Fraktionen von Peak VII_{6a,b} und VII_{7a} werden vereinigt, entsalzt, lyophilisiert und identifiziert (vgl. Tabelle VII und IX).

ERGEBNISSE

Zur Darstellung von Oligodesoxyriboguanylsäuren wird als "Rohstoffquelle" DNA aus Heringsspermen in "technisch reiner" Form verwendet, die in Kilogramm Mengen verhältnismässig einfach zugänglich ist. Die selektive Partialhydrolyse der DNA zu Oligomeren der Desoxyriboguanylsäure erfolgt in zwei Schritten.

Zunächst wird die DNA nach der, von Türlér und Chargaff¹⁴ für Milligramm Ansätze konzipierten Methode, die wir nach entsprechenden Änderungen im 100 g

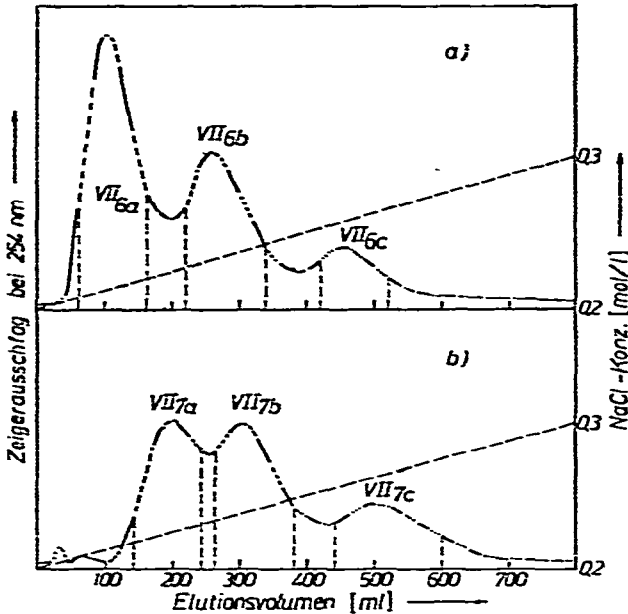


Fig. 4. Automatisch bei 254 nm registriertes Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung der dephosphorylierten Produkte (a) aus Peak VII₆ und (b) aus Peak VII₇ der Fig. 3. Säulenfüllung: QAE-Sephadex A-25, 15 × 1.5 cm; Durchfluss, 400 ml/h. Die Elution erfolgt unter Zusatz von 7 M Harnstoff bei Raumtemperatur mit dem gestrichelt eingezeichneten, linear steigenden Natriumchlorid-Gradienten, der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist. Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung werden aufgearbeitet und untersucht. Ausbeuten und Charakterisierung der in Peak VII_{6a, b} und VII_{7a, b} enthaltenen Produkte sind in Tabelle VI, VII und IX zusammengefasst.

Masstab durchführen, durch Hydrazinolyse deypyrimidiniert. Die hierbei erhaltene deypyrimidinierte DNA wird von unlöslichen Bestandteilen abzentrifugiert, ultrafiltriert und anschliessend gefriergetrocknet, wobei ca. 35–40 g eines hellgelben Lyophilisats erhalten werden. Die Isolierung der deypyrimidinierten DNA gelingt auch durch Fällung mit Ethanol, wobei sich die DNA als Öl am Boden absetzt.

Das Lyophilisat bzw. das bei der Ethanol-fällung erhaltene Öl werden anschliessend mit 7 M Kaliumhydroxid behandelt. Unter diesen Bedingungen werden die Adeninbasen der deypyrimidinierten DNA zerstört, während die weitgehend unbeschädigten Guanylsäuresegmente aus dem Molekülverband der deypyrimidinierten DNA freigesetzt werden. Das Partialhydrolysat wird mit Perchlorsäure neutralisiert, vom ausgefallenen Kaliumperchlorat befreit, ultrafiltriert und lyophilisiert. Die Neutralisation bspw. mit Salzsäure anstelle von Perchlorsäure durchzuführen empfiehlt sich nicht, da zur Entfernung des Natriumchlorid die Lösung wesentlich länger ultrafiltriert werden muss, wodurch Depolymerisation und damit verbunden ein Verlust an Oligodesoxyriboguanylsäuren begünstigt werden. Nach der Hydrazinolyse und alkalischen Spaltung verbleiben von den eingesetzten 100 g Heringsspermen-DNA ca. 13–15 g eines Oligodesoxyriboguanylsäuregemisches, das auf dem im folgenden beschriebenen Weg chromatographisch aufgetrennt wird.

Da natürliche DNA in ihrem Molekülverband überwiegend kurze aber nur wenige länger-kettige Oligodesoxyriboguanylsäuresegmente aufweist, wird ein Oligo-

TABELLE VII

ERGEBNISSE DER PAPIERCHROMATOGRAPHISCHEN UNTERSUCHUNG DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCH GETRENNTEN HÖHERMOLEKULAREN DESOXYRIBOGUANYLSÄUREN VON PEAK I-VI DER FIG. 2, PEAK VII₁₋₇ DER FIG. 3, PEAK VII_{6a-6c} DER FIG. 4a UND PEAK VII_{7a-7c} DER FIG. 4b

Papier: Schleicher & Schüll Chromatographiepapier 2316.

Peak	Auftretende Flecken		R_F Werte relativ zu denen von pdG			Identifizierte Guanylsäuren (Bezeichnung)
	Nr.	Anteil der A_{250} -Einh. (%)	ohne Phosphatasebehandlung		nach Phosphatasebehandlung	
			Laufmittel		Laufmittel	
			B	C	B	
I	1	100	1.00	1.00	1.90	pdG, dGp
II	1	11	1.00			Nicht untersucht
	2	12	0.80		1.20	p(dG) ₂ , (dG) ₂ p
	3	77	0.72	0.53	1.90	pdGp
III	1	24	0.80		1.20	p(dG) ₂ , (dG) ₂ p
	2	59	0.66	0.37	1.57	pd(R*, G)p
	3	17	0.50		0.98	pd(G ₂ , R*)
IV	1	11	0.50		0.70	p(dG) ₃ , (dG) ₃ p
	2	89	0.37	0.31	1.20	p(dG) ₃ , (dG) ₃ p
V	1	11	0.59			p(dG) ₂ p
	2	54	0.29	0.16	0.70	Nicht untersucht
	3	35	0.45		0.59	p(dG) ₃ p
VI	1	38	0.39		0.84	pd(G ₃ , R*)
	2	62	0.19		0.60	Nicht untersucht
VII ₁	1	97	0.70		0.70	p(dG) ₄ p
	2	36	0.90		1.57	(dG) ₃
VII ₂	1	64	0.80		1.20	pd(G, R*)
	2	22	0.75		1.20	p(dG) ₂ , (dG) ₂ p
VII ₃	1	50	0.75		1.90	p(dG) ₂ , (dG) ₂ p
	2	28	0.50		0.70	pdGp
VII ₄	1	11	0.91			p(dG) ₃ , (dG) ₃ p
	2	23	0.71			Nicht untersucht
	3	20	0.60			Nicht untersucht
	4	46	0.35		1.20	Nicht untersucht
VII ₅	1	38	0.45		0.70	p(dG) ₂ p
	2	42	0.37		1.20	p(dG) ₃ p
	3	8	0.25		0.70	Nicht untersucht
VII ₆	a	12	0.25		0.60	p(dG) ₃ p
	b	42			0.60	p(dG) ₄ , (dG) ₄ p
	c	38			0.30	(dG) ₄
VII ₇	a	16				(dG) ₅
	b	30			0.30	Nicht untersucht
	c	44				(dG) ₅
	c	26				Nicht untersucht

* Nicht identifizierte Monomereinheit.

desoxyriboguanylsäuregemisch, das bei der selektiven chemischen Partialhydrolyse einer DNA anfällt, vorallem niedermolekulare Oligodesoxyriboguanylsäuren enthalten. Es ist daher zweckmässig, das Partialhydrolysat nicht auf einmal zu frak-

tionieren, sondern zunächst den Überschuss an nieder- von den höhermolekularen Fragmenten abzutrennen. Hierzu wird das Lyophilisat säulenchromatographisch an dem schwach basischen Anionenaustauscher DEAE-Cellulose zuerst in zwei Fraktionen vorgetrennt. In der ersten Fraktion verlassen mit 0.1 *M* Natriumchlorid–0.05 *M* Tris–HCl (pH 7.5) niedermolekulare Fragmente die Säule, die ca. 60% des aufgetragenen Partialhydrolysats ausmachen. Die restlichen ca. 40% werden in der zweiten Fraktion mit 2 *M* Natriumchlorid eluiert. Beide Fraktionen werden ultrafiltriert, lyophilisiert und anschliessend an dem stark basischen Anionenaustauscher QAE-Sephadex A-25 rechromatographiert.

Isolierung und Identifizierung der Oligodesoxyriboguanylsäuren aus der ersten Fraktion

Die säulenchromatographische Fraktionierung der niedermolekularen Fragmente aus der ersten Fraktion, die im siebenstufigen Natriumchlorid-Gradienten an QAE-Sephadex A-25 erfolgt, führt zu acht mehr oder weniger gut aufgelösten Peaks (vgl. Fig. 1). Fraktionen zu ca. 20 ml werden gesammelt. Ca. jede zehnte Fraktion wird photometrisch gemessen. Die graphische Auftragung der gemessenen Absorptionswerte gegen das Elutionsvolumen führt zu den in den Figuren abgebildeten Elutionsprofilen.

Die gemessenen Absorptionsverhältnisse der Peakfraktionen ($A_{250}/A_{260} = 1.10$ – 1.15 , $A_{280}/A_{260} = 0.63$ – 0.66) weisen bereits deutlich auf Oligomere der Desoxyriboguanylsäure hin, die bei pH 7 Werte von $A_{250}/A_{260} = 1.15 \pm 0.02$ und $A_{280}/A_{260} = 0.67 \pm 0.02$ aufweist. Den Absorptionsverhältnissen lässt sich ausserdem entnehmen, dass die Peakfraktionen allenfalls nur geringfügig mit adenyssäurehaltigen Fragmenten verunreinigt sein können. Die Anwesenheit von Desoxyriboadenyssäuren deren Absorptionsverhältnisse ($A_{250}/A_{260} = 0.80$ – 0.84 , $A_{280}/A_{260} = 0.15$ – 0.24) weit unter denen für Desoxyriboguanylsäure liegen, hätte eine deutliche Abnahme der Absorptionsverhältnisse der Peakfraktionen zur Folge.

Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung werden vereinigt, durch Ultrafiltration entsalzt und lyophilisiert. Elutionsbedingungen und Ausbeuten, die bei der Fraktionierung der niedermolekularen Desoxyriboguanylsäuremischung erhalten werden, sind in Tabelle II zusammengefasst. Nach der säulenchromatographischen Trennung werden von der ursprünglich aufgetragenen Mischung nur ca. 47% erhalten. Der hohe Verlust wird dadurch verursacht, dass ca. 17% in Zwischenfraktionen, weitere 36% aber bei der Aufarbeitung, vorallem bedingt durch die Ultrafiltration, verloren gehen. Der Verlust bei der Ultrafiltration basiert einerseits auf der Ausschlussgrenze und unterschiedlichen Güte der Membran und andererseits darauf, dass im Verlauf der Ultrafiltration terminale Phosphatgruppen hydrolytisch abgespalten werden und ein Teil der Oligonucleotide depolymerisiert. Dephosphorylierte bzw. verkürzte Fragmente können die Membran leichter passieren, da die Retention eines Oligonucleotids nicht nur von der Molekülgrösse sondern massgeblich von der Anzahl seiner negativ geladenen Phosphatgruppen bestimmt wird.

Die Lyophilisate von Peak I–VI werden papierchromatographisch untersucht und mit Hilfe von Vergleichssubstanzen charakterisiert. Die Lyophilisate von Peak VII und VIII werden mit dem Gemisch der höhermolekularen Desoxyriboguanylsäuren (zweiter Fraktion) vereinigt. Aufgrund der papierchromatographischen Untersuchung enthalten Peak I–VI jeweils ein Hauptprodukt und bis zu zwei Neben-

produkte, die unterschiedlich schnell wandern (vgl. Tabelle VIII). Zur Bestimmung der prozentualen Zusammensetzung eines Lyophilisats werden alle im Papierchromatogramm auftretenden Flecken quantitativ vom Papier eluiert. Im Eluat der einzelnen Flecken bestimmt man die A_{250} -Einheiten und errechnet daraus die prozentuale Zusammensetzung des jeweiligen Lyophilisats. Hierbei zeigt sich, dass die Hauptprodukte ca. 70–100% eines Lyophilisats ausmachen. Zusätzlich wird die Absorption jedes Fleckens bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Aus den Verhältnissen A_{250}/A_{260} und A_{280}/A_{260} lässt sich ersehen, ob der betreffende Fleck von einem Homologen der Desoxyriboguanylsäure oder von einer Verunreinigung stammt. Als Verunreinigungen bezeichnen wir alle Substanzen, deren Absorptionsverhältnisse mehr als ± 0.04 von den für Desoxyriboguanylsäure angegebenen Werten abweichen ($A_{250}/A_{260} = 1.15$; $A_{280}/A_{260} = 0.67$). Die Eluate der Hauptflecken werden in einem zweiten Laufmittel papierchromatographisch nachgetrennt. Hierbei wandern die Produkte einheitlich und können somit als chromatographisch rein bezeichnet werden.

TABELLE VIII

ERGEBNISSE DER PAPIERCHROMATOGRAPHISCHEN UNTERSUCHUNG DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCH GETRENNTEN NIEDERMOLEKULAREN DESOXYRIBOGUANYLÄUREN AUS PEAK I-VI DER FIG. 1

Papier: Schleicher & Schüll Chromatographiepapier 2316.

Peak	Aufiretende Flecken		R_F Werte relativ zu denen von pdG			Identifizierte Guanylsäuren (Bezeichnung)
	Nr.	Anteil der A_{250} -Einh. (%)	ohne Phosphatasebehandlung Laufmittel		nach Phosphatasebehandlung Laufmittel	
			A	B	B	
I	1	100	1.70	1.20	1.20	(dG) ₂
II	1	95	0.46	0.70	0.70	(dG) ₃
	2	5	1.00			Nicht untersucht
III	1	66	1.00	1.00	1.80	pdG, dGp
	2	31	0.69	0.88	1.57	pd(G, R [*])
	3	3	0.32	0.80	1.20	p(dG) ₂ , (dG) ₂ p
IV	1	93	0.32	0.80	1.20	p(dG) ₂ , (dG) ₂ p
	2	7		0.97		Nicht untersucht
V	1	90	0.13	0.72	1.80	pdGp
	2	6		1.10		Nicht untersucht
	3	4		0.88		Nicht untersucht
VI	1	23	0.41	0.88		Nicht untersucht
	2	70	0.16	0.67	0.98	pd(G ₂ , R [*])
	3	7		0.50	0.70	p(dG) ₃ , (dG) ₃ p

* Nicht identifizierte Monomereinheit.

Die Kettenlänge der isolierten Oligodesoxyriboguanylsäuren lässt sich aus dem säulenchromatographischen Verhalten bereits abschätzen und anhand der R_F -Werte, die mit denen synthetischer Oligodesoxyriboguanylsäuren verglichen werden, zuverlässig bestimmen. Zusätzlich wird die Anzahl der Monomereinheiten sowie der terminalen Phosphatgruppen aus den Ergebnissen des enzymatischen Abbaus bestimmt⁵. Hierzu werden die Eluate der zweifach chromatographierten Haupt-

produkte zuerst mit alkalischer Phosphatase behandelt. Alkalische Phosphatase entfernt terminale Phosphatgruppen. Nach dem Phosphataseabbau wird papierchromatographisch einerseits die Vollständigkeit der Dephosphorylierung und andererseits nochmals die Reinheit der Oligonucleotide überprüft. Der Verlust von Phosphatendgruppen verursacht einen deutlichen Anstieg im R_F -Wert eines Oligonucleotids. Aus dem Vergleich der R_F -Werte vor und nach der Dephosphorylierung (vgl. Tabelle VIII) lässt sich feststellen, ob im ursprünglichen Nucleotid eine, zwei oder keine terminalen Phosphatgruppen vorhanden sind. Die dephosphorylierten Oligonucleotide werden vom Papier eluiert und zur Bestimmung der Kettenlänge mit Phosphodiesterase aus Schlangengift hydrolysiert.

Aus dephosphorylierten Oligonucleotiden werden, vom 3'-Ende beginnend, 5'-Mononucleotide schrittweise freigesetzt, wobei der 5'-terminale Baustein als Nucleosid erhalten wird. Nach der Phosphodiesterasespaltung wird das Hydrolysat im Papierchromatogramm aufgetrennt. Im Hydrolysat der Hauptprodukte von Peak I-V sind nur die zu erwartenden Spaltprodukte pdG und dG enthalten, die mit käuflichen Referenzsubstanzen und aufgrund ihrer Absorptionsverhältnisse eindeutig identifiziert werden. Die Spaltprodukte werden quantitativ vom Papier eluiert. Aus dem Verhältnis der A_{250} -Einheiten von Mononucleotid zu Nucleosid errechnet sich die Kettenlänge (vgl. Tabelle IX). Bei der enzymatischen Hydrolyse des Nebenproduktes von Peak III (Fleck 2) bzw. des Hauptproduktes von Peak VI treten ausser dG und pdG noch weitere Abbauprodukte auf, deren R_F -Werte geringfügig über denen von pdG und dG liegen. Ausserdem weisen die Absorptionsverhältnisse der unbekanntenen, mit dR und pdR bezeichneten Spaltprodukte weder auf Guanylsäure noch auf andere Nucleotide oder Nucleoside hin. Vermutlich handelt es sich bei diesen Verbindungen um zerstörte Nucleotideinheiten, die bei der alkalischen Hydrolyse nicht vollständig aus dem Oligonucleotidverband entfernt werden. Oligodesoxyriboguanylsäuren, die Reste zerstörter Nucleotideinheiten im Molekül aufweisen, treten, wie später gezeigt wird, auch in der Fraktion der höhermolekularen Desoxyriboguanylsäuren auf, werden aber nicht näher untersucht. Bemerkenswert ist, dass die zerstörten Nucleotidfragmente, den Phosphodiesteraseabbau nicht inhibieren. Teilweise zerstörte Monomereinheiten im Molekülverband einer Oligodesoxyriboguanylsäure sind auch daran zu erkennen, dass sich die Absorptionsverhältnisse dieser Oligonucleotide geringfügig aber signifikant von denen der Oligodesoxyriboguanylsäuren unterscheiden.

Die Position der terminalen Phosphatgruppe eines Oligonucleotids lässt sich durch enzymatische Spaltung mit Phosphodiesterase aus Schlangengift eindeutig ermitteln. Oligonucleotide, die ihre terminale Phosphatgruppe am 5'-Ende tragen, werden ausschliesslich zu 5'-Mononucleotiden abgebaut. Aus Oligonucleotiden, die am 3'-Ende phosphoryliert sind, werden neben 5'-Mononucleotiden auch Nucleoside und andere Spaltprodukte freigesetzt. Bei der enzymatischen Spaltung der isolierten Oligonucleotide zeigt sich aufgrund der molaren Verhältnisse der Spaltprodukte, dass die Nucleotide als Isomergemische erhalten werden, in denen vor allem 5'- neben wenigen 3'-Komponenten vorliegen.

Die Untersuchungen der Lyophilisate von Peak I-VI führen zu folgenden Ergebnissen. Die isomeren Dinucleotide p(dG)₂, (dG)₂p, die in Peak IV in 93%iger Reinheit die Säule verlassen, stellen mit 41% den Hauptanteil des niedermolekularen Oligodesoxyriboguanylsäuregemisches der ersten Fraktion. Ein weiteres Haupt-

TABELLE IX

ENZYMATISCHE HYDROLYSE DER ISOLIERTEN, DEPHOSPHORYLIERTEN OLIGODESOXYRIBOGUANYLSÄUREN DER ERSTEN UND ZWEITEN FRAKTION MIT PHOSPHODIESTERASE AUS SCHLANGENGIFT

Guanylsäuren aus Peak (Flecken) Fig.	Bezeichnung	Dephosphorylierte Guanylsäuren (Bezeichnung)	Spaltprodukte	Phosphodiesterasehydrolyse Verhältnis der Spaltprodukte	
				erwartet	gefunden
III(3)1, IV(1)1, II(2)2, III(1)2, VII ₂ (2)3, VII ₃ (1)3, VI(3)1, III(3)2, IV(1)2, VII ₃ (2)3, VII ₄ (4)3, VII ₅ (3)3, IV(2)2, VII ₄ (4)3, VII ₅ (2)3, V(2)2, VII ₅ (3)3, VI(2)2, I(1)1, II(1)1, VII ₁ (1)3, VII _{6a} 4, VII _{6b} 4, VII _{7a} 4, III(2)1, III(2)2, VII ₂ (1)3, VI(2)1, III(2)2,	(dG) ₂ p, p(dG) ₂	(dG) ₂	pdG, dG	1:1	1.05:1
	(dG) ₃ p, p(dG) ₃	(dG) ₃	pdG, dG	2:1	2.04:1
	p(dG) ₄ , p(dG) ₂ p	(dG) ₄ , (dG) ₂	pdG, dG, pdG, dG	3:1, 1:1	2.87:1, 0.88:1
	p(dG) ₃ p, p(dG) ₄ p	(dG) ₃ , (dG) ₄	pdG, dG, pdG, dG	2:1, 3:1	2.05:1, 2.90:1
	(dG) ₂	(dG) ₂	pdG, dG	1:1	1.18:1
	(dG) ₃	(dG) ₃	pdG, dG	2:1	1.88:1
	(dG) ₄	(dG) ₄	pdG, dG	3:1	3.12:1
	(dG) ₅	(dG) ₅	pdG, dG	4:1	3.90:1
	pd(G, R [*])	d(G, R [*])	pdG, dG, pdR [*] , dR [*]	—	—
	pd(G ₂ , R [*])	d(G ₂ , R [*])	pdG, dG, pdR [*]	—	—
V(3)2, III(2)2,	pd(G ₃ , R [*]) pd(G, R [*])p	d(G ₃ , R [*]) d(G, R [*])	pdG, dG, pdR [*] , pdG, dG, pdR [*] , dR [*]	—	—

* Nicht näher identifizierte Monomereinheit.

produkt (ca. 18%) bildet pdGp, das 90% des Lyophilisats von Peak V ausmacht. Die restlichen ca. 40% der isolierten Verbindungen entfallen auf unterschiedlich phosphorylierte Mono- bis Trimere der Desoxyriboguanylsäure bzw. auf Oligodesoxyriboguanylsäuren deren Monomereinheiten teilweise zerstört sind.

Isolierung und Identifizierung der Desoxyriboguanylsäuren aus der zweiten Fraktion

Vor der Rechromatographie der zweiten Fraktion wird das Lyophilisat der höhermolekularen Oligodesoxyriboguanylsäuren zunächst mit 10%iger wässriger Piperidinlösung behandelt und anschliessend nochmals alkalisch hydrolysiert. Hierdurch sollen nach den Angaben von Maxam und Gilbert¹⁵, die sich allerdings nur auf analytische Ansätze beziehen, möglicherweise vorhandene, teilweise zerstörte Nucleotideinheiten aus den Oligonucleotiden freigesetzt werden.

Nach der alkalischen Hydrolyse wird das neutralisierte, entsalzte Oligodesoxyriboguanylsäuregemisch säulenchromatographisch im fünfstufigen Natriumchlorid-Gradienten an QAE-Sephadex A-25 fraktioniert (vgl. Fig. 2). Ca 73% der aufgetragenen Mischung werden in acht mehr oder weniger gut voneinander getrennten

Peaks eluiert, während die restlichen *ca.* 27% in Fraktionen zwischen den Peaks die Säule verlassen. Die Aufarbeitung der Fraktionen von Peak I–VIII, die innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt werden, erfolgt auf dem oben beschriebenen Weg. Bedingungen und Ausbeuten der Rechromatographie sind in Tabelle IV zusammengefasst.

Die Lyophilisate von Peak I–VI der Fig. 2, die *ca.* 40% der isolierten Oligodesoxyriboguanylsäuren enthalten, werden papierchromatographisch untersucht. Das Lyophilisat von Peak VII, das *ca.* 21% der isolierten, höhermolekularen Desoxyriboguanylsäuren ausmacht, wird nochmals rechromatographiert (vgl. Fig. 3), während Peak VIII nicht identifiziert wird.

Die Auswertung der Papierchromatogramme ergibt, dass in den Lyophilisaten von Peak II–VI der Fig. 2 ein bis zwei Haupt- und mehrere Nebenprodukte enthalten sind. Charakterisierung und Identifizierung der, in den verschiedenen Lyophilisaten enthaltenen Desoxyriboguanylsäuren, die auf dem oben beschriebenen Weg durchgeführt werden, sind in Tabelle VII und IX zusammengefasst und führen im einzelnen zu folgenden Ergebnissen.

Peak I enthält ausschliesslich ein Gemisch der Monomeren pdG, dGp, die mit Phosphatase zu dG abgebaut werden. Das Lyophilisat von Peak II setzt sich zu 77% aus pdGp, zu 12% aus der Mischung der isomeren Dinucleotide p(dG)₂, (dG)₂p und zu 11% aus nicht näher identifizierten Produkten zusammen. pdGp wandert im Papierchromatogramm in beiden Laufmitteln als einheitlicher Fleck und wird mit Phosphatase zu dG dephosphoryliert. Die Mischung p(dG)₂, (dG)₂p verhält sich im Laufmittel A und B homogen und weist einen R_F -Wert auf, der mit dem von synthetischem p(dG)₂ identisch ist. Das Lyophilisat von Peak III bildet im Papierchromatogramm einen Haupt- und zwei Nebenflecken. Der Hauptfleck, auf den 59% der aufgetragenen A₂₅₀-Einheiten entfallen, enthält Oligodesoxyriboguanylsäuren, die teilweise zerstörte Nucleotideinheiten tragen. Nach der Phosphatasebehandlung erhält man zwei Produkte, aus denen mit Phosphodiesterase ausser pdG und dG noch andere Fragmente freigesetzt werden. Der schneller wandernde Nebenfleck aus Peak III, der 24% des aufgetragenen Lyophilisats ausmacht, stammt von den isomeren Dinucleotiden p(dG)₂, (dG)₂p, die auch in Peak II gefunden werden. Das langsam laufende Nebenprodukt, das zu 17% in Peak III enthalten ist, erweist sich als ein Gemisch der isomeren Trinucleotide p(dG)₃, (dG)₃p, das im R_F -Wert mit dem von synthetischem p(dG)₃ übereinstimmt. Nach Phosphatasebehandlung entsteht (dG)₃, das mit Phosphodiesterase zu pdG und dG im Verhältnis 2.04:1.00 gespalten wird. Im Lyophilisat von Peak IV ist zu 89% p(dG)₂p enthalten. Nach Dephosphorylierung mit Phosphatase steigt der R_F -Wert der Substanz von 0.37 auf 1.20 an und ist dann mit dem von synthetischem (dG)₂ identisch. Das dephosphorylierte Produkt wird mit Phosphodiesterase zu pdG und dG im Verhältnis 0.88:1.00 hydrolysiert. Das Nebenprodukt aus Peak IV erweist sich als ein Gemisch aus p(dG)₃, (dG)₃p, dessen R_F -Wert vor Phosphatasebehandlung mit dem von synthetischem p(dG)₃, nach Phosphatasebehandlung mit dem von synthetischem (dG)₃ übereinstimmt. Das Lyophilisat von Peak V bildet im Papierchromatogramm zwei Haupt- und einen Nebenflecken. Das Hauptprodukt mit dem R_F -Wert von 0.29, das zu 54% im Lyophilisat enthalten ist, wird als p(dG)₃p identifiziert. Das zweite Hauptprodukt, das zu 35% im Lyophilisat auftritt und einen R_F -Wert von 0.45 aufweist, enthält Oligodesoxyriboguanylsäuren mit teilweise zerstörten Monomereinheiten, die nicht

näher untersucht werden. Peak VI weist zu 62% $p(dG)_4p$ auf, das nach Phosphatasebehandlung im R_F -Wert mit dem von synthetischen $(dG)_4$ identisch ist und mit Phosphodiesterase zu pdG und dG im Verhältnis 2.9:1.0 hydrolysiert wird. Das Nebenprodukt aus Peak VI wird nicht untersucht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aus der Fraktion der höhermolekularen Oligodesoxyriboguanylsäuren in diesem Trennschritt $p(dG)_2p$ (12.2%) sowie nicht näher identifizierte DNA-Fragmente (13.5%) als Hauptprodukte isoliert werden. Ausserdem werden in geringen Mengen Tri- und Tetramere der Desoxyriboguanylsäure sowie Mononucleotide und Mononucleotidphosphate erhalten, die zusammen ca. 16% ausmachen. Die Anwesenheit bspw. der gleichen Monomeren, die auch in der ersten Fraktion auftreten, lässt sich teilweise damit erklären, dass Oligodesoxyriboguanylsäuren sowohl durch die Piperidinbehandlung als auch während der Aufarbeitung zum Teil abgebaut werden. Es ist aber auch denkbar, dass länger-kettige Oligodesoxyriboguanylsäuren mit kurzen Fragmenten Assoziate bilden, wodurch Produkte der ersten Fraktion in die zweite Fraktion gelangen können.

Die Ergebnisse zeigen auch, dass durch Behandlung mit 10%iger wässriger Piperidinlösung eine vollständige Entfernung der Nucleotidbruchstücke aus dem Molekülverband der Oligodesoxyriboguanylsäuren nicht erreicht wird. Vermutlich enthält auch Peak VII, der in diesem Trennschritt nicht aufgetrennt wird, DNA-Fragmente, deren Monomereinheiten teilweise zerstört sind. Zur Entfernung dieser Fragmente wird das Lyophilisat von Peak VII mit 50%iger wässriger Piperidinlösung und anschliessend nochmals mit Alkali behandelt. Der neutralisierte und entsalzte Reaktionsansatz wird säulenchromatographisch nachgetrennt.

Rechromatographie von Peak VII der Fig. 2

Das nach der Piperidinbehandlung erhaltene Lyophilisat wird an QAE-Sephadex A-25 unter Zusatz von 7 M Harnstoff im vierstufigen Natriumchlorid-Gradienten fraktioniert, wobei acht teilweise gut voneinander getrennte Peaks erhalten werden (vgl. Fig. 3), in denen 70% des aufgetragenen Lyophilisats die Säule verlassen. Bedingungen und Ausbeuten der Rechromatographie sind in Tabelle VI zusammengefasst. Die Fraktionen von Peak VII₁₋₇ werden auf dem beschriebenen Weg aufgearbeitet und die hierbei erhaltenen Lyophilisate papierchromatographisch untersucht. Peak VII₈ wird nicht näher identifiziert. Die Produkte aller im Papierchromatogramm auftretenden Flecken werden eluiert, mit Hilfe von Absorptionsverhältnissen, R_F -Werten und den Ergebnissen des enzymatischen Abbaus identifiziert und charakterisiert. Die Auswertung dieser Untersuchungen führt im einzelnen zu den in Tabelle VII und IX zusammengestellten Ergebnissen.

Peak VII₁ enthält zu 97% $(dG)_3$. Peak VII₂ setzt sich zu 64% aus $p(dG)_2$, $(dG)_2p$ und zu 36% aus DNA-Fragmenten zusammen, die teilweise zerstörte Nucleotideinheiten aufweisen und daher nicht näher identifiziert werden. Peak VII₃ weist zu 72% ein Gemisch aus 30% $p(dG)_2$, $(dG)_2p$ und 70% $pdGp$ auf, das nach Phosphatasebehandlung im Papierchromatogramm zwei unterschiedlich schnell wandernde Flecken, dG und $(dG)_2$ bildet. Die restlichen 28% des Lyophilisats von Peak VII₃ entfallen auf $p(dG)_3$, $(dG)_3p$. Das Lyophilisat von Peak VII₄ bildet im Papierchromatogramm neben drei nicht näher identifizierten schwachen Flecken einen Hauptfleck. Das Hauptprodukt, das 46% von Peak VII₄ ausmacht, erweist sich

als Gemisch aus $p(dG)_3p$ und $p(dG)_2p$, das nach Phosphatasebehandlung in $(dG)_3$ und $(dG)_2$ überführt und papierchromatographisch aufgetrennt wird. Peak VII₅ enthält zu ca. 42% $p(dG)_2p$, zu 38% nicht identifizierte Verbindungen und zu 20% ein Gemisch aus 40% $p(dG)_3p$ und 60% $p(dG)_4p$. Die Anwesenheit von Oligodesoxyriboguanylsäuren in Peak VII, die auch in der Mischung der niedermolekularen Oligodesoxyriboguanylsäuren auftreten, spricht dafür, dass länger-kettige Oligodesoxyriboguanylsäuren sowohl durch die Piperidinbehandlung und während der Aufarbeitung teilweise dephosphoryliert und depolymerisiert werden, als auch niedermolekulare Verbindungen aus anderen Fraktionen verschleppen.

Die Lyophilisate von Peak VII₆ und VII₇ bilden im Papierchromatogramm Banden, so dass eine eindeutige Identifizierung einzelner Komponenten nicht möglich ist. Aus diesem Grund wird ein Teil der Lyophilisate enzymatisch mit Phosphatase dephosphoryliert und nochmals an QAE-Sephadex A-25 unter Zusatz von 7 M Harnstoff rechromatographiert (vgl. Fig. 4). Nach der Aufarbeitung der Peakfraktionen, werden die Komponenten, die in Peak VII_{6a-b} und VII_{7a} die Säule verlassen, auf dem oben beschriebenen Weg identifiziert und charakterisiert. R_F -Werte und Ergebnisse des enzymatischen Abbaus sind in Tabelle VIII und IX zusammengefasst. Die Auswertung der Untersuchungsergebnisse zeigt, dass in Peak VII_{6a} $(dG)_4$, in Peak VII_{6b} und VII_{7a} jeweils $(dG)_5$ enthalten sind. Die Nucleosidphosphate werden bei der enzymatischen Dephosphorylierung vermutlich aus den entsprechenden Nucleotidphosphaten gebildet. Peak VII_{6c}, VII_{7b} und VII_{7c} werden nicht näher untersucht. Einerseits ist die Identifizierung wegen der sehr niedrigen R_F -Werte der Komponenten sehr mühsam und andererseits treten diese Produkte in so geringer Konzentration im Partialhydrolysat auf, dass eine Isolierung mit den gegenwärtig verfügbaren chromatographischen Methoden zu aufwendig und nicht lohnend erscheint. Zur Zeit versuchen wir mit Hilfe der Template-Chromatographie die im Partialhydrolysat enthaltenen höhermolekularen Oligodesoxyriboguanylsäuren, die auf diesem, hier beschriebenen Weg nicht zugänglich sind, zu isolieren.

DISKUSSION

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die selektive, chemische Partialhydrolyse einer DNA, die bisher nur als analytische Methode zur DNA Sequenzierung genutzt wird, einen neuen Weg zur präparativen Darstellung definierter Oligodesoxyriboguanylsäuren eröffnet. Für präparative Zwecke muss die analytische Methode allerdings in einigen Punkten wesentlich geändert werden. So ist bspw. mit 1.5 M Kaliumhydroxid die vollständige Spaltung der Adeninreste eines Purinnucleotids nicht möglich. Selbst mit 7 M Kaliumhydroxid wird die quantitative Entfernung der Adenylsäureeinheiten nicht erreicht, obwohl unter diesen Bedingungen bereits die Guanylsäurereste geringfügig angegriffen werden. Die hydrolytische Entfernung der, aus den zerstörten Adenylsäureeinheiten stammenden Reste, die nach der Kaliumhydroxid-Spaltung im Molekülverband einiger Oligodesoxyriboguanylsäuren verbleiben, gelingt weder mit 10%iger noch mit 50%iger wässriger Piperidinlösung vollständig. Der Verbleib von Oligodesoxyriboguanylsäuren mit zum Teil zerstörten Monomereinheiten kompliziert die Isolierung definierter Verbindungen erheblich. Von Nachteil ist auch, dass einige Oligodesoxyriboguanylsäuren während der Aufarbeitung des Partialhydrolysats terminale Phosphatgruppen verlieren und teilweise depolymerisieren.

Nach der säulenchromatographischen Trennung weist die Mehrzahl der isolierten Verbindungen eine mehr oder weniger grosse Anzahl an Verunreinigungen auf, die durch präparative Papierchromatographie aber vollständig entfernt werden können. Diese Trennungen sind mit erheblichen Verlusten verbunden, da nur ein Teil der aufgetragenen Oligodesoxyriboguanylsäuren im Papierchromatogramm wandert, während die Hauptmenge am Start verbleibt.

Auf dem hier beschriebenen Weg sind definierte Nucleoside und Nucleotidphosphate aus dem Partialhydrolysat zugänglich. Nucleotide werden als Isomeren-gemisch isoliert, das mit den zur Zeit verfügbaren Methoden nicht in 5'- bzw. 3'-Komponenten getrennt werden kann. Dieser Nachteil der Methode ist aber in Hinblick auf die von uns geplante Verwendung der isolierten Oligodesoxyriboguanylsäuren unwesentlich. 5'-Oligonucleotide, die bspw. als Bauelemente zur enzymatischen Darstellung von DNA in Betracht kommen, werden in der Regel radioaktiv markiert eingesetzt. Markierte 5'-Oligonucleotide werden aber aus Oligonucleosidphosphaten durch enzymatische Phosphorylierung der 5'-Enden mit radioaktivem Phosphat dargestellt. Aus diesem Grund ist es unerheblich, ob Oligonucleotide als Isomeren-gemisch oder als reine 5'- bzw. 3'-Verbindungen isoliert werden können, da alle Verbindungen vor der enzymatischen Phosphorylierung sowieso zunächst enzymatisch dephosphoryliert werden müssen. Die enzymatische Dephosphorylierung bereitet selbst bei präparativen Mengen keine Schwierigkeiten.

Hervorzuheben ist auch, dass aus dem Partialhydrolysat ausser Oligonucleosidphosphaten und Oligonucleotiden auch mono- bis tetramere Nucleotidphosphate erhältlich sind. Abgesehen von 5',3'-Desoxyriboguanosinbisphosphat sind Oligomere mit zwei terminalen Phosphatgruppen bislang noch nicht synthetisiert worden, so dass auf diesem Weg eine neue Substanzklasse zugänglich ist, der in jüngster Zeit eine besondere Rolle zukommt. So gelingt bspw. mit Mononucleotidphosphaten die schrittweise enzymatische Verlängerung von Oligonucleotiden¹⁶. Es ist ebenso denkbar, dass auch Oligonucleotidphosphate zur blockweisen enzymatischen Synthese von DNA-Fragmenten verwendet werden könnten. Diese vielversprechende Möglichkeit wurde vermutlich bisher nicht in Erwägung gezogen, da eine chemische Synthese der erforderlichen Oligonucleotidphosphate zu aufwendig erscheint. Aus Partialhydrolysaten einer DNA sind Oligonucleotidphosphate sehr einfach zugänglich, so dass hierdurch eine wesentliche Voraussetzung für eine möglicherweise semisynthetische Darstellung von DNA geschaffen wurde.

Trotz mancher Schwachstellen und Nachteile der hier beschriebenen Methode zur Darstellung von Oligodesoxyriboguanylsäuren, weist das Verfahren dennoch erhebliche Vorteile gegenüber der chemischen Synthese auf. Abgesehen davon, dass die chemische Polykondensation im Unterschied zur Partialhydrolyse sehr komplizierte Techniken erfordert und zu dem nur in geringen Ausbeuten abläuft, erhält man komplex zusammengesetzte Gemische verschiedenster Kondensationsprodukte. Die Isolierung definierter, chromatographisch reiner Oligodesoxyriboguanylsäuren aus einem Polykondensat, das neben den gewünschten linearen Kondensationsprodukten auch cyclische und Pyrophosphatderivate aufweist, ist in vielen Fällen aufwendiger als die Gewinnung von Oligodesoxyriboguanylsäuren aus einem DNA-Partialhydrolysat. Manche Oligodesoxyriboguanylsäuren sind auf dem hier beschriebenen Weg sicherlich einfacher als durch chemische Synthese zugänglich.

In Tabelle X sind in etwa die Mengen angegeben, in denen die verschiedenen

TABELLE X

HOCHGERECHNETE MENGEN AN DESOXYRIBOGUANYLSÄUREN, DIE DURCH CHEMISCHE PARTIALHYDROLYSE UND CHROMATOGRAPHISCHE AUFARBEITUNG AUS 100 g HERINGSSPERMEN-DNA IN CHROMATOGRAPHISCH REINER FORM ZUGÄNGLICH SIND

Nucleotidphosphate		Mischung der Isomeren 3'- und 5'-Nucleotide		Oligonucleosidphosphate	
Bezeichnung	Mengen (mg)	Bezeichnung	Mengen (mg)	Bezeichnung	Mengen (mg)
pdGp	870	pdG, dGp	490		
p(dG) ₂ p	670	p(dG) ₂ , (dG) ₂ p	1800	(dG) ₂	40 2470*
p(dG) ₃ p	210	p(dG) ₃ , (dG) ₃ p	270	(dG) ₃	240 480*
p(dG) ₄ p	120	p(dG) ₄ , (dG) ₄ p	10	(dG) ₄	30 130*
				(dG) ₅	50

* Durch enzymatische Dephosphorylierung der isolierten Nucleotide und Nucleotidphosphate.

Oligodesoxyriboguanylsäuren aus 100 g Heringsspermen DNA erhalten werden. Die Ausbeute lässt sich vermutlich erhöhen, wenn anstelle der hier eingesetzten A-T-reichen Heringsspermen DNA, eine G-C-reiche DNA als Rohstoffquelle verwendet wird.

Der überschlagsmäßige Vergleich zwischen den Mengen an Di- bis Pentameren der Desoxyriboguanylsäure, die aus 100 g Heringsspermen-DNA zugänglich sind (4.4 g) und denen, die bei einer chemischen Polykondensation von 1 mMol geschützten Desoxyriboguanosin-5'-phosphat erhalten werden (14 mg)¹², liefert ein bemerkenswertes Ergebnis. Zur Darstellung von ca. 4 g an Oligodesoxyriboguanylsäuren mit 2-5 Monomereinheiten, die aus 100 g Heringsspermen-DNA zugänglich sind, müsste man etwa 300 mal die, in der Literatur beschriebene, Polykondensation durchführen. Wenn man ausserdem noch berücksichtigt, dass aus einem Polykondensat bisher nur Oligomere mit bis zu 5 Monomereinheiten isoliert werden können, wobei die Sequenz und Reinheit einiger Homologe nicht eindeutig bestimmt werden konnte, dann stellt der hier beschriebene Weg zweifelsohne eine sehr attraktive Alternative zur chemischen Polykondensation dar.

DANK

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft grosszügig unterstützt. H.W. dankt dem Cusanuswerk für die Gewährung eines Stipendiums.

ZUSAMMENFASSUNG

Ein neuer Weg zur Darstellung von Oligodesoxyriboguanylsäuren wird beschrieben. DNA aus Heringsspermen wird im präparativen Massstab durch Hydrazinolyse, alkalische Hydrolyse und Piperidinbehandlung zu Desoxyriboguanylsäuren abgebaut. Das anfallende Partialhydrolysat wird säulenchromatographisch an basischen Anionenaustauschern zunächst in nieder- und höhermolekulare Fragmente vorgetrennt, die anschliessend fraktioniert werden. Hierbei werden in präparativen Mengen definierte, unterschiedlich phosphorylierte Oligomere der Desoxyribo-

guanylsäure mit bis zu fünf Monomereinheiten erhalten, die zum Teil aber noch verunreinigt sind. Die Verunreinigungen werden anschliessend durch präparative Papierchromatographie auf Cellulose vollständig entfernt. Vor- und Nachteil dieses Verfahrens gegenüber der chemischen Synthese von Oligodesoxyriboguanylsäuren werden diskutiert.

LITERATUR

- 1 H. Kössel und H. Seliger, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 32 (1975) 298.
- 2 R. Wu, C. P. Bahl und S. A. Narang, *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, 21 (1978) 102.
- 3 H. Schott, in Th. Wieland, R. Geiger und A. Eberle (Herausgeber), *Perspectives in Peptide Chemistry*, Karger, Basel, 1980, im Druck.
- 4 H. Schott und M. Schwarz, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 358 (1977) 949.
- 5 H. Schott und M. Schwarz, *J. Chromatogr.*, 157 (1978) 197.
- 6 H. Schott und M. Schwarz, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 359 (1978) 617.
- 7 H. Schott, *Nucleic Acids Research Special Publication*, 4 (1978) 161.
- 8 M. Dizdaroglu, W. Hermes, C. von Sonntag und H. Schott, *J. Chromatogr.*, 169 (1979) 429.
- 9 H. Schott, *J. Chromatogr.*, 172 (1979) 179.
- 10 M. Dizdaroglu, M. G. Simic and H. Schott, *J. Chromatogr.*, 188 (1980) 273.
- 11 H. Schott, *J. Chromatogr.*, 187 (1980) 119.
- 12 R. K. Ralph, W. J. Conners, H. Schaller und H. G. Khorana, *J. Amer. Chem. Soc.*, 85 (1963) 1983.
- 13 H. Schott und H. Watzlawick, *Makromol. Chem.*, im Druck.
- 14 H. Türler und E. Chargaff, *Biochim. Biophys. Acta*, 195 (1968) 446.
- 15 A. M. Maxam und W. Gilbert, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 74 (1977) 560.
- 16 D. M. Hinton, J. A. Baez und R. I. Gumpert, *Biochemistry*, 17 (1978) 5091.