

CHROM. 14,863

## PRÄPARATIVE ISOLIERUNG VON OLIGOGUANOSINPHOSPHATEN AUS DNA-PARTIALHYDROLYSATEN MIT HILFE DER TEMPLATE-CHROMATOGRAPHIE

HERBERT SCHOTT\* und HILDEGARD WATZLAWICK

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

(Eingegangen am 3. Februar 1982; geänderte Fassung eingegangen am 2. März 1982)

---

### SUMMARY

*Preparative isolation of oligoguanosine phosphates from partial hydrolyzates of DNA using template chromatography*

DNA from herring sperm is partially hydrolyzed to oligoguanosine phosphates. High-molecular-weight fragments are isolated from the partial hydrolyzate using DEAE-cellulose and afterwards QAE-Sephadex. The mixture of guanosine oligonucleotides is separated into complementary and non-complementary fragments by template chromatography on two differently substituted polyvinyl alcohol-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-celluloses. Influences of pH as well as the kind of the immobilized oligocytidylic acids upon the results of the template chromatographic separations are discussed. The complementary oligoguanosine phosphates are enzymatically dephosphorylated. Fractionation on QAE-Sephadex yields single substances of the serie (dG)<sub>3-8</sub> on preparative scale, which are chromatographically pure except (dG)<sub>8</sub>. Rechromatography of (dG)<sub>8</sub> on paper yields a pure product (fingerprint).

---

### EINLEITUNG

Desoxyribonucleinsäure (DNA) kann chemisch zu einem Gemisch von Oligoguanosinphosphaten partialhydrolysiert werden. Mit den gebräuchlichen chromatographischen Methoden, die zu einem Trennungsgang kombiniert werden, sind aus dem Hydrolysat bisher Oligoguanosinphosphate mit bis zu 5 Monomereinheiten in präparativen Mengen zugänglich<sup>1</sup>. Unter Einbeziehung der Template-Chromatographie<sup>2</sup>, in der die Spezifität des Basenpaarungsmechanismus nach Watson und Crick zur Trennung genutzt wird, lässt sich der Trennungsgang wesentlich vereinfachen. Ausserdem sind auf diesem Weg Oligoguanosinphosphate mit bis zu 8 Monomereinheiten zugänglich, wie im folgenden gezeigt wird.

### EXPERIMENTELLES

#### *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.). (dG)<sub>5</sub> wird in unserem Labor synthetisiert, 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid (TPS) (EGA-Chemie, Steinheim, B.R.D.); Polyvinylalkohol (PVAL; MG ≈ 70.000) (C. Roth, Karlsruhe, B.R.D.); Pyridin 1 × über KOH destilliert und über Molekularsieb 4 Å aufbewahrt; Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT): über Molekularsieb 4 Å getrocknet; LiChrosorb RP-18, 5 μm (Merck, Darmstadt, B.R.D.).

### Methoden

(A) *Synthese der PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulosen (Fig. 1)*. Typ A der PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose wird auf dem beschriebenen Weg in drei Schritten dargestellt<sup>3</sup>. Typ B wird in zwei Schritten wie folgt synthetisiert. 1.3 g PVAL (MG ≈ 70.000) werden portionsweise in 65 ml ca. 100°C warmes HMPT eingerührt, in der Wärme vollständig gelöst und dann mit 65 ml trockenem Pyridin versetzt. Zu der auf Raumtemperatur abgekühlten Lösung gibt man 2.4 g (4.6 mM) Pyridinium-N-anisoyldeoxycytidin-5'-phosphat (pandC)<sup>4</sup>. Die Suspension wird zur Entfernung eventuell vorhandener Wasserspuren mehrmals mit trockenem Pyridin an der Ölpumpe eingengt. Unter Feuchtigkeitsausschluss werden dann ca. 1.4 g (4.6 mM) TPS und eine Lösung von teilweise polykondensiertem p(ancC)<sub>n</sub> zugegeben. Diese Lösung enthält 2.4 g (4.6 mM) pandC das in 20 ml trockenem Pyridin mit 4.1 g (13.6 mM) TPS 1 h bei Raumtemperatur polykondensiert wird. Die vereinigten Lösungen werden gut verschlossen weitere 12 h polykondensiert und danach mit 150 ml NH<sub>3</sub>conz. unter Eiskühlung versetzt. Nach einwöchiger Ammonolyse wird der Ammoniak am

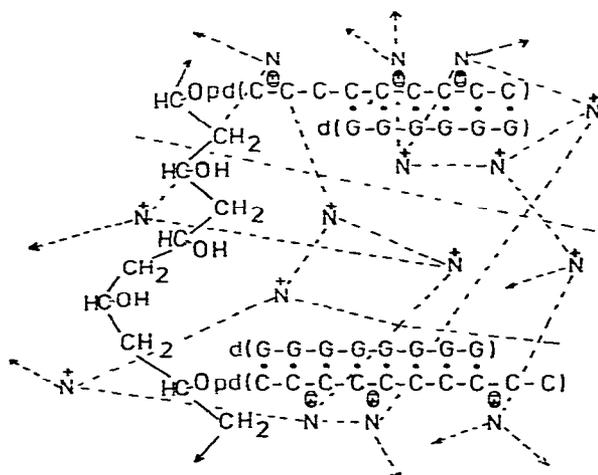


Fig. 1. Schematischer Aufbau der PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulosen.

Rotationsverdampfer entfernt. Die wässrige Lösung, die *ca.* 85,000  $A_{260}$ -Einheiten\* aufweist, wird an einer UM 2 Membran 3 Tage ultrafiltriert. Das Retentat, in dem dann noch *ca.* 51,000  $A_{260}$ -Einheiten verbleiben, wird lyophilisiert und ergibt *ca.* 3.2 g eines gelben Pulvers.

Das Lyophilisat wird in 100 ml Wasser gelöst, mit 75 g. in Wasser gequollener DEAE-Cellulose, versetzt und langsam 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Während der "Beschichtung" nimmt das Quellvolumen der DEAE-Cellulose stark zu. Anschliessend füllt man die erhaltene PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose in die zuverwendende Säule, die danach mit 1 M NaCl so lange eluiert wird, bis die Absorption unter 0.1  $A_{260}$ -Einheiten fällt. Hierbei schrumpft die Säulenfüllung auf das Volumen der DEAE-Cellulose vor ihrer "Beschichtung". Von den zur "Beschichtung" eingesetzten 51,000  $A_{260}$ -Einheiten verbleiben nach der Elution *ca.* 10,000, die unter den Bedingungen der Template-Chromatographie irreversibel gebunden bleiben.

(B) Säulenchromatographische Fraktionierung der höhermolekularen DNA-Fragmente an QAE-Sephadex A-25. Auf dem früher beschriebenen Weg<sup>1</sup> wird 1 kg Heringsspermen-DNA zu Oligoguanosinphosphaten partialhydrolysiert, die an DEAE-Cellulose säulenchromatographisch in nieder- und höhermolekulare Fragmente vorgetrennt werden. Hierbei erhält man *ca.* 40 g der höhermolekularen Fragmente, die für die folgende Fraktionierung in 5 l Wasser gelöst, auf eine QAE-Sephadex A-25 Säule (55 × 6.5 cm I.D.) mit *ca.* 400 ml/h gepumpt werden. Die Säule ist mit 0.05 M Tris-HCl pH 7.5 äquilibriert. Nach dem Auftragen der Lösung wird bei einer Laufgeschwindigkeit von *ca.* 700 ml/h zunächst mit 8 l Wasser, dann im dreistufigen NaCl-Gradienten, der mit 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) gepuffert ist, wie folgt eluiert: (1) 10 l 0.3 M NaCl; (2) 10 l 0.5 M NaCl; (3) 3 l 2.0 M NaCl. Die Produkte der 0.3-, 0.5- und 2-M Fraktion werden am Rotationsverdampfer konzentriert und anschliessend an einer UM 2 Membran so lange ultrafiltriert, bis das Eluat mit Silbernitrat keine Trübung zeigt. Die salzfreien Retentate werden lyophilisiert, wobei von der 0.3-M Fraktion *ca.* 26 g, von der 0.5-M Fraktion *ca.* 11 g und von der 2-M Fraktion *ca.* 1 g Lyophilisat erhalten werden. Zur weiteren Aufarbeitung wird im folgenden nur das Lyophilisat der 0.5-M Fraktion verwendet.

(C) Template-Chromatographie des Lyophilisats der 0.5-M Fraktion aus (B) an den PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulosen (vgl. Fig. 2). Die zur Template-Chromatographie verwendeten PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose Säulen (40 × 2 cm I.D.) sind mit Kühlmänteln versehen, die mit einem Thermostaten verbunden sind. Die verschiedenen Proben (vgl. Tabelle I) werden in 1–10 ml Elutionspuffer gelöst und bei 30°C auf die Säule aufgetragen. Nachdem die Probenlösung in das Gelbett eingezo-gen ist, wird die Säule auf 0°C gekühlt und dann so lange bei dieser Temperatur eluiert, bis die Absorption des Eluats nach einem steilen Anstieg (Peak I der Fig. 2) auf *ca.* 0.1  $A_{260}$ -Einheiten fällt. Dieser Wert wird nach 1.0–1.5 l erreicht, wobei der Durchfluss auf *ca.* 50 ml/h eingestellt wird. Die Elution erfolgt in Fig. 2a mit 0.5 M NaCl, 0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7); in Fig. 2b zuerst mit 0.5 M NaCl, 0.01 M Natriumacetat (pH 5), dann mit 0.5 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl (pH 9). Unter diesen Bedingungen verlässt in Fig. 2b nach Peak I eine zweite Fraktion (Peak Ia) die Säule, wozu nochmals *ca.* 1.0 l Elutionspuffer benötigt werden. Nachdem Peak I bzw. I und Ia

\*  $A_{260}$ -Einheit = Nucleotid-Menge in 1 cm<sup>3</sup> Solvens, die bei 260 nm die Absorption 1 ergibt (Schichtdicke 1 cm).

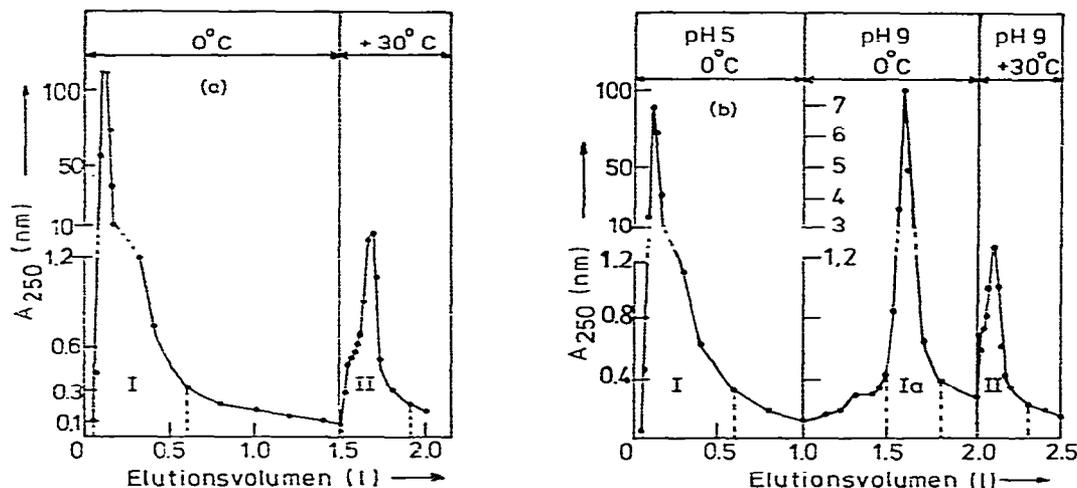


Fig. 2. Elutionsprofile der Template-Chromatographie von jeweils 130 mg (2800  $A_{250}$ -Einheiten) einer Oligoguanosinphosphatmischung (0.5- $M$  Fraktion) an PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose (Typ A). Säulenmasse: 40 × 2 cm I.D. Fließgeschwindigkeit ca. 50 ml/h. Die Säulen wurden im zweistufigen Temperaturgradienten (0 und 30°C) eluiert. Die Elution erfolgt in (a) mit 0.5  $M$  NaCl, 0.01  $M$  Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7). In (b) wird zunächst mit 0.5  $M$  NaCl, 0.01  $M$  Natriumacetat (pH 5) eluiert. Nachdem Peak I die Säule verlassen hat, wird die Elution mit 0.5  $M$  NaCl, 0.01  $M$  Tris-HCl (pH 9) fortgesetzt. Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung werden vereinigt und deren Produkte isoliert.

eluiert sind, stoppt man die Elution und erwärmt die Säule auf 30°C. Bei dieser Temperatur wird die Elution dann fortgesetzt, bis die Absorption nach einem 2. Anstieg (Peak II der Fig. 2a) bzw. nach einem 3. Anstieg (Peak II der Fig. 2b) wieder auf 0.1  $A_{260}$ -Einheiten gesunken ist. Dieser Wert ist nach ca. 0.5 l erreicht. Die Elution bei 30°C erfolgt in Fig. 2a weiterhin mit 0.5  $M$  NaCl–0.01  $M$  Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7), während in Fig. 2b 0.5  $M$  NaCl–(0.01  $M$  Tris-HCl) (pH 9) als Elutionspuffer verwendet wird. Fraktionen zu 20 ml werden gesammelt. Die Elution wird automatisch bei 254 nm registriert. Zusätzlich werden die Absorptionen einiger Fraktionen photometrisch bei 250, 260 und 280 nm nachgemessen. Die Auftragung der bei 250 nm erhaltenen Messwerte gegen das Elutionsvolumen führt zu den Elutionsprofilen der Figuren. Die Fraktionen von Peak I, Ia und II werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, an einer UM 2 Membran entsalzt und anschließend lyophilisiert. Die Lyophilisate von Peak Ia und II aller Läufe werden vereinigt. Zur Isolierung von Einzelsubstanzen werden bspw. 50 mg (1700  $A_{250}$ -Einheiten) der vereinigten Lyophilisate von Peak Ia und II zur Entfernung terminaler Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase behandelt<sup>5</sup>. Anschließend wird der Reaktionsansatz in ca. 30 ml 7  $M$  Harnstoff aufgenommen und wie folgt an einer QAE-Sephadex Säule fraktioniert.

(D) *Säulenchromatographische Fraktionierung des dephosphorylierten Lyophilisats von Peak Ia, II der Fig. 2 an QAE-Sephadex A-25 (vgl. Fig. 3)*. Die enzymatisch dephosphorylierten Oligoguanosinphosphate (ca. 1700  $A_{250}$ -Einheiten) aus (C) werden in 7  $M$  Harnstoff auf eine mit 0.1  $M$  NaCl, 0.05  $M$  Tris-HCl (pH 7.5), 7  $M$  Harnstoff äquilibrierte QAE-Sephadex-Säule (40 cm × 2 cm I.D.) aufgetragen. Die Säule wird bei Raumtemperatur im linear steigenden NaCl-Gradienten eluiert: 2 l 0.1  $M$  NaCl, 0.05  $M$  Tris-HCl (pH 7.5), 7  $M$  Harnstoff im Mischgefäß; 2 l 0.5  $M$  NaCl,

TABELLE I

BEDINGUNGEN UND ERGEBNISSE DER TEMPLATE-CHROMATOGRAPHIE VON OLIGOGUANOSINPHOSPHATEN AN PVAL- $p(dC)_n$ -DEAE-CELLULOSEN (VGL. FIG. 2)

Säulen- füllung Typ	Aufgetragene Probenmenge		Elutionsbedingungen		Eluierte Mengen		%
	mg	$A_{250}$ -Einh.	Puffer*	Temperatur (°C)	Peak Nr.	$A_{250}$ -Einh.	
A	65	1400	1	0	I	1240	88.6
			1	+ 30	II	130	9.3
B	65	1400	1	0	I	1280	91.4
			1	+ 30	II	100	7.1
A	130	2800	1	0	I**	2490	88.9
			1	+ 30	II**	260	9.3
B	130	2800	1	0	I	2580	92.1
			1	+ 30	II	190	6.8
A	260	5600	1	0	I	4980	88.9
			1	+ 30	II	510	9.1
B	260	5600	1	0	I	5090	90.9
			1	+ 30	II	390	7.0
A	520	10800	1	0	I	10020	92.8
			1	+ 30	II	710	6.6
B	520	10800	1	0	I	10170	94.1
			1	+ 30	II	530	4.9
A	780	15800	1	0	I	14800	93.7
			1	+ 30	II	920	5.8
B	780	15800	1	0	I	14980	94.8
			1	+ 30	II	720	4.6
A	130	2800	2	0	I***	1750	62.5
			3	0	Ia***	680	24.2
			3	+ 30	II***	290	10.4

\* 1 = 0.5 M NaCl, 0.01 M  $Na_2HPO_4$  pH 7; 2 = 0.5 M NaCl, 0.01 M Natriumacetat (pH 5); 3 = 0.5 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl (pH 9).

\*\* Siehe Fig. 2a.

\*\*\* Siehe Fig. 2b.

0.05 M Tris-HCl (pH 7.5), 7 M Harnstoff im Vorratsgefäß. Die Elutionsgeschwindigkeit wird mit einer Schlauchpumpe auf ca. 300 ml/h eingestellt. Nach dem Gradienten wird die Säule mit ca. 400 ml 1 M NaCl eluiert. Fraktionen zu 20 ml werden gesammelt, die von Peak a-f der Fig. 3 innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, an einer UM 2 Membran entsalzt und anschliessend lyophilisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle II zusammengefasst.

(E) Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) der enzymatisch hydrolysierten Oligoguanosinphosphate aus Peak a-f der Fig. 3. Ca. 1  $A_{260}$ -Einheit des jeweiligen Oligoguanosinphosphats wird in 20  $\mu$ l Wasser, 5  $\mu$ l 1 M Tris-HCl (pH 8.1), 5  $\mu$ l 0.1 M  $MgCl_2$  gelöst und mit ca. 5  $\mu$ l der käuflichen Phosphodiesterase aus Schlangengift 6 h bei 37°C inkubiert. Anschliessend wird der Reaktionsansatz an einer RP-18 5  $\mu$ m-Säule (250  $\times$  4.6 mm) mittels eines Spectra-Physics SP 8000 Hochdruckflüssigkeitschromatographen mit folgendem linearen Gradienten bei Raumtemperatur fraktioniert. Lösung A = 0.01 M  $KH_2PO_4$  (pH 5-6); Lösung B = 60% Methanol, 40% Wasser. Innerhalb von 20 min geht A in 60% A, 40%

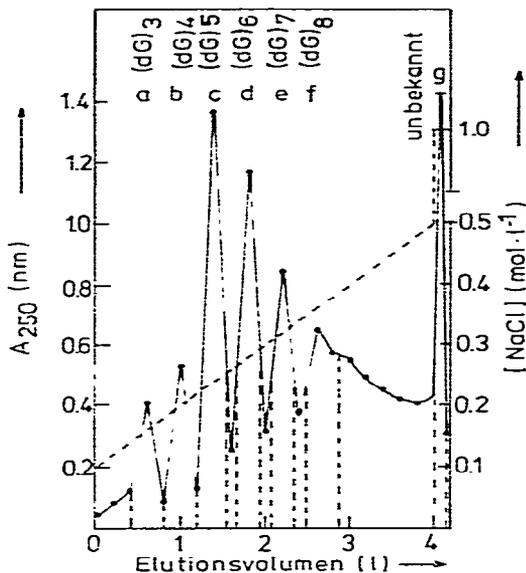


Fig. 3. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung von ca. 1700  $A_{250}$ -Einheiten einer dephosphorylierten Oligoguanosinphosphatmischung (Peak Ia, II der Fig. 2) an QAE-Sephadex A-25. Säulenfüllung:  $40 \times 2$  cm I.D. Die Säule wird bei Raumtemperatur im steigenden NaCl-Gradienten eluiert, der mit  $0.05$  M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert und mit  $7$  M Harnstoff versetzt ist. Fließgeschwindigkeit ca.  $300$  ml/h. Ergebnisse siehe Tabelle II.

B über. Danach wird die Elution isokratisch mit  $60\%$  A,  $40\%$  B fortgesetzt. Der Durchfluss beträgt  $1$  ml/min. Die Retentionszeiten stimmen mit denen von käuflichem dG und pdG überein und liegen für pdG bei  $9.7$  min, für dG bei ca.  $20$  min.

(F) *Homochromatographie und Fingerprint der  $^{32}P$ -markierten Oligoguanosinphosphate*. Die 5'-Hydroxylgruppe des jeweiligen Oligoguanosinphosphats ( $0.05$ – $0.1$   $A_{260}$ -Einheiten) wird mit Hilfe von [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]ATP und  $T_4$  Polynucleotid-Kinase enzymatisch phosphoryliert<sup>12</sup>. Anschliessend wird der Enzymsatz auf eine Dünnschicht-Fertigfolie (Polygram, Cel 300 DEAE/HR-2/15; Macherey und Nagel) aufgetragen. Die Platte wird in einem für zwölf Oligonucleotide bereiteten Partialhydrolysat einer RNA (Homomix)<sup>12</sup> bei  $60^\circ\text{C}$  aufsteigend ca.  $6$ – $12$  h chromatographiert. Die Homochromatographie wird beendet, wenn der blaue Farbstoff einer Farbstoffmischung ( $1\%$  Xylen Cyanol FF,  $1\%$  Säurefuchsin,  $1\%$  Methylorange in Wasser) ca.  $3/4$  der Laufstrecke gewandert ist. Die durch Autoradiographie sichtbar gemachten markierten Oligoguanosinphosphate werden eluiert und anschliessend mit Phosphodiesterase aus Schlangengift partialhydrolysiert. Zur Bestimmung der Kettenlänge wird die eine Hälfte des Partialhydrolysats erneut unter den obigen Bedingungen der Homochromatographie unterzogen.

Zur Sequenzierung der markierten Oligoguanosinphosphate wird die zweite Hälfte der partialhydrolysierten Oligoguanosinphosphate zweidimensional chromatographiert (Fingerprint). In der 1. Dimension erfolgt die Auftrennung des Partialhydrolysats auf Celluloseacetatstreifen (ca.  $30 \times 550$  mm, Schleicher und Schüll) mittels Hochspannungselektrophorese. Die Elektrophorese wird in Pyridin-Eisessig-Wasser

TABELLE II

ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN NACHTRENUNG VON OLIGOGUANOSINPHOSPHATEN AN QAE-SEPHADEX (VGL. FIG. 3), DIE AN DEN PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-CELLULOSEN HYBRIDISIERT UND ANSCHLIESSEND DEPHOSPHORYLIERT WERDEN

Es werden ca. 1700 A<sub>250</sub>-Einheiten fraktioniert.

Peak	Eluiert bei Natriumchlorid-Konz. (M)	Eluierte Mengen		Bezeichnung	R <sub>F</sub> -Werte* relativ zu dem von pdG
		A <sub>250</sub> -Einh.	%		
a	0.14–0.18	86	5.1	(dG) <sub>3</sub>	0.70
b	0.18–0.24	112	6.6	(dG) <sub>4</sub>	0.62
c	0.24–0.25	276	16.2	(dG) <sub>5</sub>	0.36
d	0.26–0.29	228	13.4	(dG) <sub>6</sub>	0.26
e	0.31–0.34	176	10.4	(dG) <sub>7</sub>	0.18
f	0.35–0.38	115	6.8	(dG) <sub>8</sub>	0.09
g	1.00	295	17.4	unbekannt	Bande

\* Papier: Schleicher & Schüll Chromatographiepapier 2316, absteigend. Laufmittel: 1-Propanol-konz. NH<sub>2</sub>OH-Wasser (55:10:35, v/v/v).

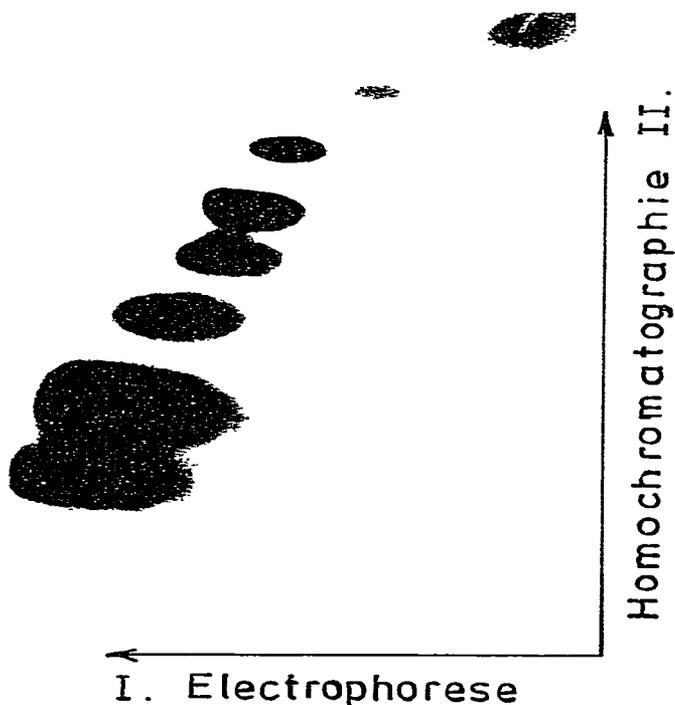


Fig. 4. Autoradiogramm der <sup>32</sup>P markierten, partialhydrolysierten Oligoguanosinphosphate aus Peak f der Fig. 3. Die Auftrennung des Partialhydrolysats erfolgt in der 1. Dimension durch Elektrophorese bei pH 3.5, in der 2. Dimension durch Homochromatographie. Der Fingerprint bestätigt die erwartete Sequenz (dG)<sub>3</sub>.

(1:10:189. v/v/v) pH 3.5 bei 1000 V begonnen. Wenn die erste Trennung des als Marker aufgetragenen obigen Farbstoffgemisches erkennbar ist, wird die Spannung auf 3000 V erhöht. Die Elektrophorese wird abgebrochen, sobald der rote Säurefuchsinfarbstoff etwa die Hälfte der Laufstrecke erreicht hat. Je nach der Oligonucleotidsequenz muss die optimale Laufstrecke von Fall zu Fall empirisch ermittelt werden. Die in der Elektrophorese getrennten Substanzen werden anschliessend vom Celluloseacetatstreifen auf eine Dünnschichtfertigfolie übertragen, indem der aufgelegte Streifen mit feuchtem Papier überschichtet und so eluiert wird. Die auf die Dünnschichtfolie übertragenen Produkte werden dann unter den oben angegebenen Bedingungen homochromatographiert. Das Autoradiogramm (Fingerprint) des zweidimensional chromatographierten Partialhydrolysats von Peak f der Fig. 3 ist in Fig. 4 abgebildet.

## ERGEBNISSE

DNA aus Heringsspermen wird nach dem bereits früher beschriebenen Verfahren<sup>1</sup>, das in Schema I zusammengefasst ist, durch Hydrazinolyse zunächst depyrimidiniert und dann durch alkalische Hydrolyse selektiv zu Oligoguanosinphosphaten abgebaut.

- DNA (100 g)
- (1) (a) Hydraziniumhydrat, 4 h. 60 C  
 ↓ (b) Ultrafiltration  
 Depyrimidinierte DNA (≈ 37 g)  
 (a) 7 M KOH, 1 h. 100 C
- (2) (b) Neutralisation (HClO<sub>4</sub>)  
 ↓ (c) Ultrafiltration  
 Oligoguanosinphosphatgemisch (≈ 14 g)

Schema I. Chemischer Abbau einer DNA zu oligoguanosinphosphaten.

Aus dem erhaltenen Oligoguanosinphosphatgemisch können nach dem in Fig. 5 aufgeführten Weg Einzelsubstanzen der Reihe (dG)<sub>3-8</sub> in präparativen Mengen isoliert werden.

Zunächst wird der grosse Überschuss der niedermolekularen Verbindungen an DEAE-Cellulose säulenchromatographisch im zweistufigen NaCl-Gradienten von den höhermolekularen DNA-Fragmenten weitgehend abgetrennt. Die höhermolekularen Fragmente werden dann an QAE-Sephadex mit einem dreistufigen NaCl-Gradienten (0.3. 0.5. 2.0 M NaCl) in 3 Fraktionen getrennt. Die 0.3-M und 2.0-M Fraktion werden in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Zur Isolierung der Oligoguanosinphosphate wird ausschliesslich die 0.5-M Fraktion verwendet. Von dieser Fraktion verbleiben nach Entsalzen und Lyophilisieren ca. 1.1 g, wenn ca. 100 g DNA aus Heringsspermen der Partialhydrolyse unterworfen und auf dem beschriebenen Weg fraktioniert werden. Die 0.5-M Fraktion, die zu ca. zweidrittel unerwünschte Spaltprodukte und teilweise abgebaute Oligoguanosinphosphate aufweist, kann mit Hilfe der Template-Chromatographie<sup>2</sup> aufgetrennt werden, während herkömmliche Trennverfahren versagen. Nach diesem Trennschritt, in dem hybridisierende von nicht hybridisierenden DNA-Fragmenten über den Basenpaarungsmechanismus getrennt werden, wird das erhaltene Gemisch der hybridisierenden Oligogua-

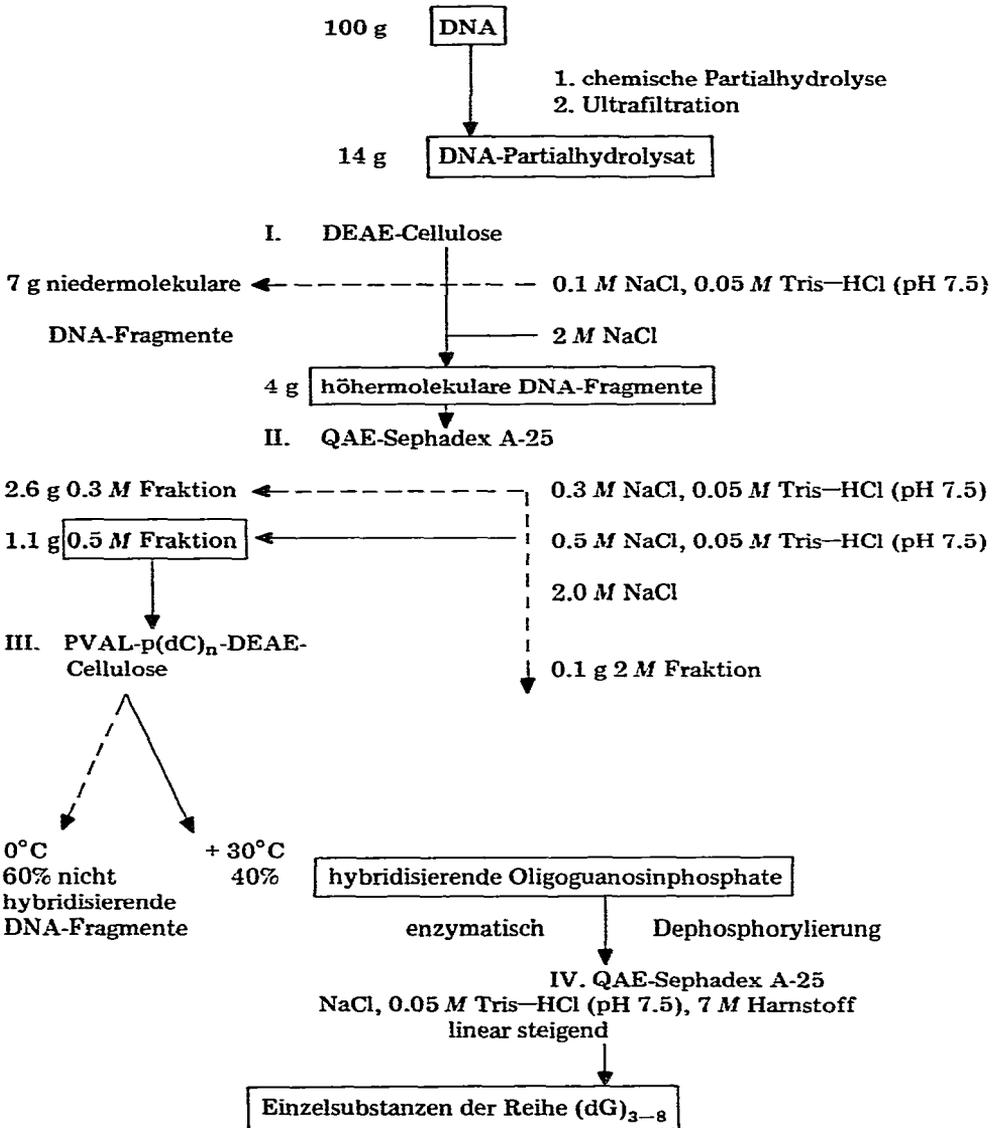


Fig. 5. Trennungsgang zur Isolierung von Oligoguanosinphosphaten der Reihe (dG)<sub>3-8</sub> aus 100 g partialhydrolysierten Heringsspermen-DNA.

nosinphosphate enzymatisch dephosphoryliert<sup>5</sup>. Das Gemisch kann anschliessend mühelos an QAE-Sephadex in Einzelsubstanzen der Reihe (dG)<sub>3-8</sub> fraktioniert werden.

Die Template-Chromatographie erfolgt an den von uns synthetisierten PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulosen. Bei diesem Trennmateriale, dessen Aufbau in Fig. 1 schematisch dargestellt ist, handelt es sich um käufliche DEAE-Cellulose, die mit kovalent an PVAL gebundenen, synthetischen Oligomeren der Desoxyribocytidylsäure p(dC)<sub>n</sub> "beschichtet" ist. Ionische Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen, die sich

zwischen den polymergebundenen Oligonucleotiden und den funktionellen Gruppen der DEAE-Cellulose-Matrix zustande kommen, reichen aus, um die "Oligonucleotidbeschichtung" unter den angewendeten chromatographischen Bedingungen aufrecht zu erhalten.

Zur Template-Chromatographie werden zwei unterschiedliche Typen (A, B) der PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose verwendet. Die Darstellung von Typ A erfolgt in einer dreistufigen Synthese<sup>3</sup>. Zunächst werden nach der Diestermethode durch Polykondensation von N-Anisoyl-desoxycytidin-5'-phosphat geschützte Oligomere der Desoxyribocytidylsäure dargestellt. Die Homologen mit vier und mehr Monomereinheiten werden im zweiten Reaktionsschritt über ihre 5'-Phosphatgruppen an freie Hydroxylgruppen von PVAL kondensiert. Nach der ammoniakalischen Entfernung der Nucleobasenschutzgruppen werden im dritten Reaktionsschritt die polymergebundenen Oligodesoxycytidylsäuren an DEAE-Cellulose irreversibel adsorbiert. Der dreistufige Syntheseweg gewährleistet die Immobilisierung längererkettiger Desoxyribocytidylsäuren, da kurzzeitige Fragmente an mehreren Stellen der Synthese ausgesondert werden. Typ B der PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose wird in Analogie zur Darstellung der Oligonucleotid-Cellulosen<sup>6-9</sup> in einer zweistufigen Synthese dargestellt. Hierzu wird im 1. Schritt N-Anisoyl-desoxycytidin-5'-phosphat nach der Diestermethode in Anwesenheit von PVAL polykondensiert. Im 2. Schritt werden die polymergebundenen Oligodesoxycytidylsäuren nach Entfernung der Basenschutzgruppen, wie bei Typ A ausgeführt, an die DEAE-Cellulose fixiert. Die Darstellung von Typ B ist zwar einfacher durchzuführen, hat aber den Nachteil, dass vor allem mono-trimere Oligocytidylsäuren immobilisiert werden, da längererkettige Cytidylsäuren bei der Polykondensation nur in geringen Mengen gebildet werden. In der zur Füllung einer Säule (40 × 2 cm I.D.) verwendeten PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose sind bei Typ A ca. 6000 A<sub>260</sub>-Einheiten Oligocytidylsäuren mit 4 bis vermutlich 12 Monomereinheiten immobilisiert, während Typ B in der gleichen Menge ca. 10.000 A<sub>260</sub>-Einheiten an Oligocytidylsäuren mit 1 bis vermutlich 12 Monomereinheiten aufweist, wobei der Anteil der Mono-Trimeren sicherlich über 50% liegt. Mit Hilfe der unterschiedlich derivatisierten PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulosen wird untersucht, wie sich die Beladung und der erhöhte Anteil längererkettiger immobilisierter Oligocytidylsäuren auf die Trenneigenschaften auswirken. Da im Partialhydrolysat einer Heringsspermen-DNA Oligoguanosinphosphate mit über 8 Monomereinheiten in präparativen Mengen vermutlich nicht auftreten, wird die 0.5-M Fraktion im folgenden zweistufigen Temperatur-Gradienten an den PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulosen fraktioniert. Zur Adsorption von Oligomeren mit 3 und mehr Monomereinheiten wird die Mischung bei 0°C aufgetragen. Zur Desorption der hybridisierten Oligomeren wird die Säule bei 30°C eluiert, da basengepaarte Oktamere in diesem Temperaturbereich "schmelzen".

Ein zweistufiger Temperaturgradient hat gegenüber mehrstufigen oder linear ansteigenden Temperaturgradienten, die bisweilen in der Template-Chromatographie angewendet werden<sup>8-9</sup>, verschiedene Vorteile. Die thermisch labilen DNA-Fragmente werden nur kurzfristig belastet und verlassen in einem kleinen, schnell zu entsalzenden Volumen die Säule. Das erhaltene Gemisch lässt sich anschliessend an Anionenaustauschern im steigenden Salzgradienten wesentlich effektiver in Einzelsubstanzen fraktionieren, als dies in der Template-Chromatographie mit einem langsam steigenden Temperaturgradienten möglich ist.

Zur Template-Chromatographie wird die jeweilige Menge des Lyophilisats der 0.5-*M* Fraktion, von dem bis zu 780 mg pro Lauf chromatographiert werden (vgl. Tabelle I), im Elutionspuffer gelöst auf die 30°C warme Säulenfüllung aufgetragen. Dann kühlt man die Säule auf 0°C und eluiert im 1. Schritt alle DNA-Fragmente, die keine Basenpaarung mit den immobilisierten Oligocytidylsäuren eingehen. Oligoguanosinphosphate, die bei 0°C basengepaart sind, verlassen im 2. Schritt bei 30°C gemeinsam die Säule, da bei dieser Temperatur die Basenpaarung zwischen komplementären Tri-Octanucleotiden aufgehoben wird. Der Elutionsvorgang aller Läufe wird photometrisch verfolgt. Da sich die Elutionsprofile nicht prinzipiell unterscheiden, ist als stellvertretendes Beispiel in Fig. 2a das Elutionsprofil der Trennung abgebildet, in der 130 mg des Lyophilisats chromatographiert werden.

Der Anteil der hybridisierten DNA-Fragmente steigt mit der Erhöhung der aufgetragenen Lyophilisatmenge unterschiedlich. Im Bereich von 65–260 mg (1400–5600  $A_{250}$ -Einheiten) nimmt die Menge an adsorbierten Oligoguanosinphosphaten proportional mit der aufgetragenen Lyophilisatmengen zu, da jeweils *ca.* 9% bei 30°C in Peak II eluiert werden. Bei weiterer Erhöhung der aufgetragenen Menge werden zwar noch mehr, prozentual aber weniger  $A_{250}$ -Einheiten adsorbiert. Aus der Menge der adsorbierten Oligoguanosinphosphate lässt sich abschätzen, dass die verwendete Gelmenge von Typ A bis zu 1000  $A_{250}$ -Einheiten über ihre immobilisierten Oligocytidylsäuren adsorbiert. Die höhere Kapazität der PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose von Typ A entspricht dem bekannten Befund, dass länger-kettige Oligonucleotide die Basenpaarung begünstigen, während immobilisierten Mono- und Dimere nur unwesentlich daran beteiligt sind. Obwohl Typ A der PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose im Vergleich zu Typ B eine deutlich höhere Kapazität aufweist, ist die aufwendigere Synthese hiermit kaum zu rechtfertigen.

Bei der chemischen Partialhydrolyse einer DNA werden bevorzugt Fragmente mit terminalen Phosphatgruppen gebildet, die eine Hybridisierung der kurzen Oligomeren erschweren oder gar verhindern. Da in Peak I kurze Oligoguanosinphosphate mit terminalen Phosphatgruppen zu vermuten sind, wird das Lyophilisat von Peak I mit alkalischer Phosphatase zur Entfernung terminaler Phosphatgruppen inkubiert<sup>5</sup> und erneut der Template-Chromatographie unterworfen. Von bspw. 2800  $A_{250}$ -Einheiten des enzymatisch behandelten Lyophilisats werden an Typ A der PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE *ca.* 800  $A_{250}$ -Einheiten adsorbiert, während vor der Phosphatasebehandlung im gleichen Lyophilisat keine hybridisierenden Produkte mehr gefunden werden. Aus dem Lyophilisat der 0.5-*M* Fraktion sind *ca.* 9% hybridisierende Oligoguanosinphosphate direkt erhältlich, während weitere *ca.* 30% erst nach enzymatischer Dephosphorylierung hybridisieren. Die restlichen 60% sind nicht näher bestimmbare DNA-Fragmente, die im Molekülverband vermutlich so viele zerstörte Nucleobasen aufweisen, dass eine ausreichend stabile Basenpaarung verhindert wird. Da sich diese Fragmente aufgrund ihrer intakten Polymerhauptkette in ihrer Gesamtladung allenfalls geringfügig von gleichlangen hybridisierenden Oligoguanosinphosphaten unterscheiden, ist es naheliegend, dass mit herkömmlichen chromatographischen Methoden (bspw. Ionenaustauschern) die präparative Auftrennung der 0.5-*M* Fraktion nicht gelingt.

Bei der Wechselwirkung von Poly(G) mit Oligo(C) in Lösung werden, in Abhängigkeit vom pH-Wert, neben den komplementären G·C Assoziaten, die im Sinne von Watson und Crick basengepaart sind, auch Assoziante von 2 C·G oder 2 G·C

beobachtet<sup>10,11</sup>. Zur Prüfung, ob derartige Komplexe auch während der Template-Chromatographie auftreten, wird der Einfluss des pH-Wertes auf die Trenneigenschaften der PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulosen untersucht. Hierzu werden bspw. 130 mg (ca. 2800 A<sub>250</sub>-Einheiten) des Lyophilisats der 0.5-M Fraktion auf die PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulose (Typ A) bei 0°C aufgetragen. Anschliessend werden bei dieser Temperatur in Peak I der Fig. 2b mit 0.5 M NaCl, 0.01 M Natriumacetat (pH 5) nicht hybridisierende DNA-Fragmente eluiert. Im 2. Schritt, der ebenfalls bei 0°C erfolgt, werden mit 0.5 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl (pH 9) in Peak Ia Oligoguanosinphosphate eluiert, die vermutlich bei pH 5 und 0°C mit den basengepaarten Oligonucleotiden höherkoordinierte Assoziate ausbilden, die bei pH 9 dissoziieren. Hierbei bleibt aber die Watson-Crick-Basenpaarung zwischen den Oligoguanosinphosphaten der mobilen und den Oligocytidylsäuren der stationären Phase im wesentlichen erhalten. Bei 30°C verlassen die restlichen Oligoguanosinphosphate die Säule, da dann die Basenpaarung vollständig aufgehoben ist. Die Mengen der bei 0°C, pH 9 und 30°C, pH 9 eluierten DNA-Fragmente (24 bzw. 10%) lassen keine eindeutige Aussage über die Koordination dieser pH abhängigen Assoziate zu. In Peak Ib und II werden in etwa die gleichen Produkte eluiert.

Zur Isolierung definierter Einzelsubstanzen werden die, in der Template-Chromatographie hybridisierenden Produkte aus Peak Ib bzw. II der Fig. 2 durch Ultrafiltration entsalzt und lyophilisiert. Bei der papierchromatographischen Untersuchung zeigt sich, dass in beiden Peaks im wesentlichen die gleichen Produkte enthalten sind. Die Lyophilisate von Peak Ia und II werden daher vereinigt und anschliessend an QAE-Sephadex fraktioniert. Zur Vereinfachung der Trennung werden vorher eventuell noch vorhandene terminale Phosphatgruppen der Oligoguanosinphosphate mit alkalischer Phosphatase enzymatisch entfernt. Hierbei resultieren Homologe der Reihe (dG)<sub>n</sub>, die ohne Schwierigkeiten auf dem folgenden Weg an QAE-Sephadex A-25 in Einzelsubstanzen getrennt werden (vgl. Fig. 3, Tabelle II).

Die Lösung der dephosphorylierten Oligoguanosinphosphate (bspw. 1700 A<sub>250</sub>-Einheiten) wird auf eine QAE-Sephadex A-25 Säule aufgetragen und bei Raumtemperatur im linear steigenden NaCl Gradienten eluiert, der mit Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert und mit 7 M Harnstoff versetzt ist. Unter diesen Bedingungen verlassen Peak a-f der Fig. 3 die Säule. Nach dem Gradienten werden mit 1 M NaCl restliche, nicht näher untersuchte Produkte in Peak g eluiert. Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung werden vereinigt, die Menge darin enthaltener Oligoguanosinphosphate photometrisch bestimmt, durch Ultrafiltration entsalzt und lyophilisiert. Bei der Ultrafiltration können, vor allem bedingt durch eine Depolymerisation der Oligoguanosinphosphate, bis zu 20% verloren gehen. Bei kleineren Salzmengen empfiehlt es sich daher, die Entsalzung säulenchromatographisch bspw. an Sephadex G-10 durchzuführen. Die Trennergebnisse sind in Tabelle II zusammengefasst.

Zur Identifizierung der in Peak a-g eluierten Oligoguanosinphosphate werden Aliquote der Lyophilisate mit (dG)<sub>5</sub> als Referenz auf Papier chromatographiert. Die Lyophilisate von Peak a-e bilden einheitliche Flecken. Die Produkte aus Peak f wandern in einer teilweise aufgelösten Bande, während die von Peak g eine nicht aufgelöste Bande bilden und daher nicht näher untersucht werden. Aus den R<sub>F</sub>-Werten (siehe Tabelle II), UV-Absorptionsverhältnissen und Ergebnissen der enzymatischen Hydrolyse mit Phosphodiesterase aus Schlangengift; Daten, die üblicherweise zur eindeutigen Identifizierung von homologen Oligonucleotiden ausreichen,

folgt, dass in Peak a–e nacheinander  $(dG)_3$ ,  $(dG)_4$ ,  $(dG)_5$ ,  $(dG)_6$  und  $(dG)_7$  in chromatographisch reiner Form die Säule verlassen, während Peak f neben verschiedenen Verunreinigungen  $(dG)_8$  als Hauptprodukt enthält. Die Verunreinigungen sind vermutlich Oligoguanosinphosphate, die in ihrem Molekülverband neben intakten auch in den Nucleobasen zerstörte Bereiche aufweisen. Für diese Annahme spricht, dass die UV-Absorptionsverhältnisse merklich von denen für Oligoguanosinphosphate entsprechenden Werten abweichen. Die teilweise zerstörten Oligoguanosinphosphate hybridisieren über ihre intakten Segmente mit den immobilisierten Oligocytidylsäuren und gelangen somit in die Fraktionen der hybridisierenden Oligoguanosinphosphate.

Zur Überprüfung der getroffenen Identifizierung werden mit den papierchromatographisch gereinigten Lyophilisaten von Peak a–f, die vom Papier eluiert werden, folgende zusätzliche Bestimmungen durchgeführt. Die Spaltprodukte, die bei der Hydrolyse der Oligoguanosinphosphate mit Phosphodiesterase aus Schlangengift anfallen, werden an einer RP-18-Säule mit Hilfe Hochdruckflüssigkeitschromatographie getrennt. Hierbei zeigt sich, dass über 99% der Hydrolysate aus pdG und dG bestehen und keine anderen Monomereinheiten nachweisbar aus den Oligoguanosinphosphaten freigesetzt werden.

Zur eindeutigen Bestimmung der Kettenlänge werden Aliquote der papierchromatographisch gereinigten Lyophilisate von Peak a–f mit  $T_4$ -Polynucleotidkinase in der 5'-Position mit Hilfe von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  phosphoryliert und anschliessend der Homochromatographie unterzogen<sup>12</sup>. Die Autoradiogramme, die nach der Homochromatographie erhalten werden, bestätigen, dass in den Lyophilisaten von Peak a–e reine Oligoguanosinphosphate der Reihe  $(dG)_{3-7}$  vorliegen, während Peak f ausser einem Hauptprodukt noch geringfügige Verunreinigungen ( $< 5\%$ ) aufweist, die oberhalb und unterhalb des Hauptprodukts wandern. Der  $^{32}\text{P}$ -markierte Hauptfleck im Homochromatogramm von Peak f wird zur Sequenzierung aus der Dünnschichtplatte isoliert, mit Phosphodiesterase aus Schlangengift partialhydrolysiert und anschliessend nach der Fingerprintmethode<sup>13</sup> zweidimensional chromatographiert. Das Autoradiogramm des Fingerprints (vgl. Fig. 4) bestätigt eindeutig, dass aus dem Lyophilisat von Peak f durch papierchromatographische Reinigung  $(dG)_8$  erhalten wird.

Bei der hier beschriebenen, für den Labormassstab dimensionierten Methode, werden Oligoguanosinphosphate mit bis zu 8 Monomereinheiten in Mengen erhalten, mit denen in der chemisch-enzymatischen Gensynthese üblicherweise gearbeitet wird. Der Massstab lässt sich aber nach Belieben erweitern. Der Vorteil der Methode gegenüber der chemischen Synthese liegt vor allem darin, dass die Isolierung weitaus einfacher zu praktizieren ist, als der Syntheseweg. Der chemische Aufbau eines Oligonucleotids aus Monomereinheiten ist in der Regel Spezialisten vorbehalten. Falls die Synthese gelingt, steht in jedem Fall am Ende eine umfangreiche Reinigung bevor, in der das gewünschte Oligonucleotid von einer Vielzahl sehr ähnlicher Nebenprodukte mit falschen und/oder unvollständigen Sequenzen getrennt werden muss. Die chromatographische Isolierung als Alternative zur chemischen Synthese ist allerdings auf natürliche DNA-Sequenzen beschränkt, die einerseits gehäuft in einer DNA auftreten und andererseits unversehrt aus dem Molekülverband durch Partialhydrolyse freigesetzt werden können. In diesen Fällen stellt die Isolierung eine einfache Alternative zur chemischen Synthese dar.

## DANK

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

## ZUSAMMENFASSUNG

DNA aus Heringsspermen wird chemisch zu Oligoguanosinphosphaten partialhydrolysiert. Aus dem Partialhydrolysat werden zunächst mit DEAE-Cellulose, dann mit QAE-Sephadex höhermolekulare Fragmente isoliert. Das Gemisch der höhermolekularen Oligoguanosinphosphate wird mit Hilfe der Template-Chromatographie an zwei unterschiedlich substituierten PVAL-p(dC)<sub>n</sub>-DEAE-Cellulosen in hybridisierende und nicht hybridisierende Oligoguanosinphosphate getrennt. Einflüsse des pH-Wertes sowie der immobilisierten Oligocytidylsäuren auf die Ergebnisse der Template-Chromatographie werden untersucht. Die hybridisierenden Oligoguanosinphosphate werden enzymatisch dephosphoryliert, an QAE-Sephadex in Einzelsubstanzen der Reihe (dG)<sub>3-8</sub> fraktioniert und hierbei bis auf (dG)<sub>8</sub> chromatographisch rein in präparativen Mengen erhalten. (dG)<sub>8</sub> wird papierchromatographisch nachgetrennt und hierbei chromatographisch rein erhalten, was durch "Fingerprint" bestätigt wird.

## LITERATUR

- 1 H. Schott und H. Watzlawick, *J. Chromatogr.*, 196 (1980) 435.
- 2 H. Schott und E. Bayer, *Adv. Chromatogr.*, 17 (1979) 187.
- 3 H. Schott und H. Watzlawick, *Makromol. Chem.*, 182 (1981) 119.
- 4 H. G. Khorana, A. F. Turner und J. P. Vizolyi, *J. Amer. Chem. Soc.*, 83 (1961) 686.
- 5 H. Schott, *Makromol. Chem.*, 182 (1981) 2015.
- 6 P. Gilham, *J. Amer. Chem. Soc.*, 86 (1964) 4982.
- 7 P. Gilham, *Methods Enzymol.*, 21 (1971) 191.
- 8 C. Astell und M. Smith, *Biochemistry*, 11 (1972) 4114.
- 9 C. Astell, M. Doel, P. Jahnke und M. Smith, *Biochemistry*, 12 (1973) 5068.
- 10 M. Lipsett, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 1256.
- 11 D. Thiele und W. Guschelbauer, *Biopolymers*, 10 (1971) 143.
- 12 E. Jay, R. Bambara, R. Padmanabhan und R. Wu, *Nucleic Acids Res.*, 1 (1974) 331.
- 13 J. E. Donelson, B. G. Barel, H. L. Weith, H. Kössel und H. Schott, *Eur. J. Biochem.*, 58 (1975) 383.