

CHROM. 16,368

PRÄPARATIVE ISOLIERUNG VON HEXA-, HEPTA-, OKTA-, NONA- UND DECAPYRIMIDINOLIGONUCLEOTIDEN AUS HYDROLYSATEN DEPURINIERTER HERINGSSPERMEN DNA

HERBERT SCHOTT

Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, 7400 Tübingen (B.R.D.)
(Eingegangen am 12. Oktober 1983)

SUMMARY

Preparative isolation of hexa-, hepta-, octa-, nona- and decapyrimidine oligonucleotides from hydrolysates of depurinated herring sperm DNA

The pyrimidine oligonucleotides (dT)₅; (dT)₆ and the mixtures of sequence isomers (dC, dT₅); (dC₂, dT₅); (dC₃, dT₄); (dC₄, dT₃); (dC₄, dT₄); (dC₃, dT₅); (dC₂, dT₆); (dC₄, dT₅); (dC₃, dT₆); (dC₂, dT₇); (dC₅, dT₅); (dC₄, dT₆) and (dC₃, dT₇) with or without terminal phosphate groups have been isolated on a preparative scale from hydrolysates of depurinated herring sperm DNA by the following procedure. Herring sperm DNA (1 kg) is chemically depurinated and partially hydrolysed to a mixture of pyrimidine nucleotides. The partial hydrolysate is first separated into a low- and a high-molecular-weight pyrimidine nucleotide mixture by column chromatography on DEAE-cellulose. The mixture of high-molecular-weight pyrimidine nucleotides is subsequently fractionated on QAE-Sephadex. Impurities which are not fully removed by column chromatography are separated by paper chromatography. The compositions of the mixtures of sequence isomers are determined from the data of column, paper and homochromatography; from absorption characteristics and by enzymatic degradation.

EINLEITUNG

In der DNA verschiedener Organismen treten pyrimidinnucleotidreiche Segmente auf. Bei der Einwirkung von Ameisensäure und Diphenylamin wird die DNA bekanntlich depuriniert und diese Pyrimidinoligonucleotide werden aus dem Molekülverband freigesetzt. Das anfallende Partialhydrolysat kann sowohl analytisch untersucht als auch präparativ aufgetrennt werden. Die Analyse dient der Charakterisierung von DNA verschiedener Herkunft¹⁻¹⁴. Die präparative Auftrennung des Partialhydrolyсата bietet einen einfachen Weg zur Darstellung von Pyrimidinoligonucleotiden.

Durch die präparative Aufarbeitung, die mit verschiedenen Trennungsgängen möglich ist, sind Pyrimidinoligonucleotide mit bis zu sieben Monomereinheiten ent-

TABELLE I

BEDINGUNGEN DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN NACHTRENUNGEN DER LYOPHILISIERTEN PEAKFRAKTIONEN AN QAE-SEPHADEX A-25 IN NaCl-GRADIENTEN, DIE MIT 0.05 M TRIS-HCl AUF pH 7.5 GEPUFFERT SIND

Peak Fig.	Lyophilisat von	Aufgetragene Mengen gelöst in Wasser (g)	Säulenmasse I.D. (cm)	Molare NaCl-Konzentrationen der Gradienten					
				1. Stufe		2. Stufe		3. Stufe	
		(ml)		Vol. (l)	Konz. (M)	Mischgefäß	Vorratsgefäß	Vol. (l)	Konz. (M)
II	1	2.00	70 × 3	5	0.30	10	10	10	0.40
IIa	2	0.88	70 × 3	2	0.25*	5	5	5	0.30*
IIb	2	0.20	50 × 2	3	0.25*	2	2	2	0.30*
III	1	3.00	70 × 3	4	0.30	10	10	10	0.40
IIIa	4	0.90	70 × 3	2	0.25*	5	5	5	0.30*
IIIb	4	0.92	70 × 3	2	0.25*	5	5	5	0.30*
IIIc	4	0.33	50 × 2	2	0.25*	2	2	2	0.30*
IV	1	2.50	70 × 3	4	0.30	10	10	10	0.40
IVa	6	0.53	70 × 3	2	0.25*	5	5	5	0.30*
IVb	6	0.54	70 × 3	2	0.25*	5	5	5	0.30*
IVc	6	1.10	70 × 3	2	0.25*	5	5	5	0.30*
IVd	6	0.82	70 × 3	2	0.25*	5	5	5	0.30*
V	1	2.70	70 × 3	10	0.35	1	1.0	—	—
Va	8	0.14	50 × 2	2	0.30	—	—	—	—
Vb	8	1.58	70 × 3	2	0.25*	5	5	5	0.35*
VI	1	2.20	70 × 3	7	0.35	5	5	1	1.0
VIa	10	0.14	50 × 2	1	0.25*	2	2	2	0.30*
VIb	10	0.34	50 × 2	2	0.25*	2	2	2	0.30*
VIc	10	0.36	50 × 2	2	0.25*	2	2	2	0.30*
VId	10	0.39	50 × 2	2	0.25*	2	2	2	0.30*

* in 7 M Harnstoff.

weder als Gemische von Sequenzisomeren oder teilweise auch als Einzelsubstanzen zugänglich¹⁵⁻²⁸. In der vorliegenden Arbeit wird ein erweiterter chromatographischer Trennungsgang zur Isolierung von Gemischen sequenzisomerer Pyrimidinoligonucleotide mit sechs und mehr Monomereinheiten beschrieben, die bisher noch nicht in präparativen Mengen erhalten wurden.

EXPERIMENTELLES

Reagenzien und Material

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) p.a. (Merck, Darmstadt, B.R.D.), die übrigen Chemikalien werden in "chemisch reiner" Form verwendet. DNA (PWA Waldhof, Mannheim, B.R.D.); QAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden); Enzyme: alkalische Phosphatase, Phosphodiesterase I (Boehringer, Mannheim, B.R.D.); Membranen (Amicon, Lexington, MA, U.S.A.); Chromatographiepapier 2316 (Schleicher & Schüll, Dassel, B.R.D.).

Pufferlösungen

1 M Tris-HCl (pH 7.5): 121 g (1 M) Tris werden in 900 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird mit ca. 50 ml konz. HCl auf pH 7.5 eingestellt und dann mit Wasser auf 1 l aufgefüllt. 1 M Natriumacetat (pH 3.5): 57 ml (1 M) Eisessig werden zu 800 ml Wasser gegeben. Der pH-Wert wird mit 40 ml 2 M NaOH auf pH 3.5 eingestellt und die Lösung mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Papierchromatographie

Die Papierchromatographie erfolgt absteigend auf Cellulosepapier im Laufmittel: 1-Propanol-konz. Ammoniak-Wasser (55:10:35).

Säulenchromatographie

Alle säulenchromatographischen Trennungen erfolgen an QAE-Sephadex A-25 bei Raumtemperatur. Der Durchfluss wird mit einer Schlauchpumpe so eingestellt, dass die 60 × 5 cm Säule mit ca. 800 ml/h, die 70 × 3 cm Säule mit ca. 500 ml/h und die 50 × 2 cm Säule mit ca. 300 ml/h eluiert werden. Fraktionen zu 20 ml werden gesammelt. Die Absorption jeder 10. Fraktion wird spektralphotometrisch bei 250, 260 und 280 nm bestimmt. Die graphische Auftragung der bei 260 nm gemessenen Absorptionswerte gegen das Elutionsvolumen führt zu den abgebildeten Elutionsprofilen. Peakfraktionen werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, durch Ultrafiltration an einer UM-2 Amicon Membran entsalzt und lyophilisiert. Die Fraktionen ausserhalb der Peaks und nicht vereinigte Peakfraktionen werden als Zwischenfraktionen bezeichnet und nicht näher untersucht.

Säulenchromatographische Fraktionierung der höhermolekularen Pyrimidinoligonucleotide (III. Trennschritt aus Schema 1) bei pH 3.5 (vgl. Fig. 1). 12 g (ca. 233,000 A_{260} -Einheiten) der höhermolekularen Pyrimidinoligonucleotide werden in 200 ml Wasser gelöst und auf eine mit 0.05 M NaCl, 0.05 M Natriumacetate (pH 3.5) äquilibrierte Säule (60 × 5 cm I.D.) aufgetragen. Anschliessend wird die Säule im steigenden NaCl-Gradienten, der mit 0.05 M Natriumacetat auf pH 3.5 gepuffert ist, in sechs Stufen eluiert.

In der 1. Stufe erfolgt die Elution der Säule mit 5 l 0.25 M NaCl, 0.05 M

Natriumacetat. In der 2. Stufe folgt ein linear steigender Gradient: 5 l 0.25 M NaCl, 0.05 M Natriumacetat im Mischgefäß; 5 l 0.30 M NaCl, 0.05 M Natriumacetat im Vorratsgefäß. In der 3. Stufe wird die Säule mit 5 l 0.30 M NaCl, 0.05 M Natriumacetat eluiert. In der 4. Stufe folgt der zweite linear steigende Gradient: 5 l 0.30 M NaCl, 0.05 M Natriumacetat im Mischgefäß; 5 l 0.40 M NaCl, 0.05 M Natriumacetat im Vorratsgefäß. In der 5. Stufe wird die Säule mit 2 l 0.40 M NaCl, 0.05 M Natriumacetat, in der 6. Stufe mit 1 l 2 M NaCl eluiert. Die vereinigten Peakfraktionen werden mit NaOH neutralisiert und anschliessend durch Ultrafiltration entsalzt. In zwei Läufen werden 24 g auf diesem Weg fraktioniert. Die Lyophilisate von Peak II–VI werden wie folgt nachgetrennt.

Rechromatographie der Pyrimidinoligonucleotidgemische aus Peak II–VI der Fig. 1 (IV. und V. Trennschritt aus Schema 1) bei pH 7.5. Die Lyophilisate werden entsprechend den Angaben der Tabelle I entweder in Wasser oder 7 M Harnstoff gelöst auf die Säulen aufgetragen. Die Elution erfolgt mit steigenden NaCl-Gradienten, die mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert sind, ohne oder mit Zusatz von 7 M Harnstoff. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefasst.

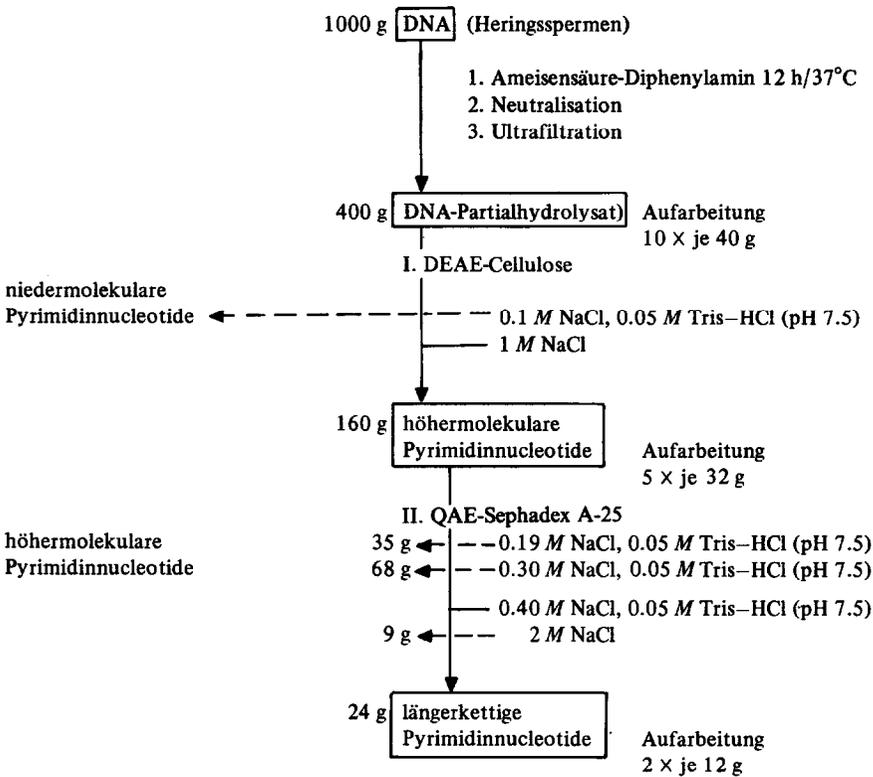
ERGEBNISSE

DNA aus Heringspermen, die in grösseren Mengen leicht zugänglich ist, wird zu Pyrimidinoligonucleotiden partialhydrolysiert, die anschliessend nach dem in Schema 1 aufgeführten Weg chromatographisch aufgetrennt werden.

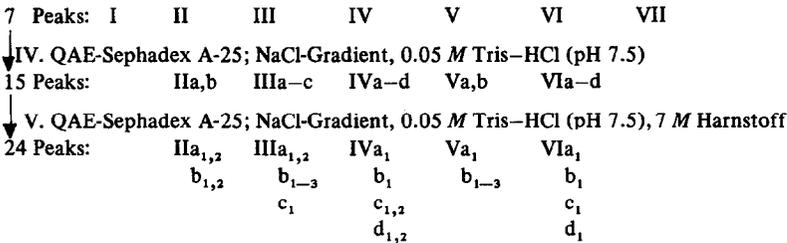
Der Abbau der DNA (1 kg) erfolgt nach der Methode von Burton²⁹, die wir in den präparativen Massstab übertragen haben²¹, mit Ameisensäure in Anwesenheit von Diphenylamin. Das anfallende Partialhydrolysat wird mit NaOH neutralisiert, von Salz und niedermolekularen Bruchstücken durch Ultrafiltration befreit und lyophilisiert. Das Lyophilisat (400 g) wird in 40 g Ansätzen säulenchromatographisch an DEAE-Cellulose in zwei Fraktionen getrennt (I. Trennschritt in Schema 1). Die zweite Fraktion, die mit 1 M NaCl die DEAE-Cellulose Säule verlässt, enthält ein komplexes Gemisch höhermolekularer Pyrimidinoligonucleotide. Dieses Gemisch (160 g) wird in 5 Läufen an QAE-Sephadex A-25 im vierstufigen NaCl-Gradienten fraktioniert²⁵ (II. Trennschritt in Schema 1), wobei vier Fraktionen erhalten werden. Nur die dritte Fraktion (24 g), die mit 0.4 M NaCl die Säule verlässt, wird in der vorliegenden Arbeit weiter aufgearbeitet.

Zur weiteren Auftrennung des Gemisches werden wiederum die pH-abhängigen Unterschiede in der Gesamtladung der Pyrimidinoligonucleotide genutzt. Aufgrund der Ladungsunterschiede, die für Pyrimidinoligonucleotide unterschiedlicher Sequenz berechnet sind¹⁷, verlassen im Sauren Pyrimidinnucleotide mit überwiegend Cytidyl- vor denen mit überwiegend Thymidylsäureresten einen Anionenaustauscher. Im Neutralen dagegen richtet sich die Adsorption von Pyrimidinoligonucleotiden an einen Anionenaustauscher vor allem nach der Anzahl der negativ geladenen Phosphatreste.

Aus diesen Gründen wird das Lyophilisat der dritten Fraktion (II. Trennschritt Schema 1) im III. Trennschritt bei pH 3.5 an QAE-Sephadex säulenchromatographisch im steigenden NaCl-Gradienten fraktioniert. Das Elutionsprofil dieser Trennung (vgl. Fig. 1), die zweimal durchgeführt wird, weist sieben Hauptpeaks auf, in denen zusammen ca. 95% der aufgetragenen Mischung die Säule verlassen. Die Er-



III. QAE-Sephadex A-25; NaCl-Gradient, 0.05 M Natriumacetat (pH 3.5)



Schema 1. Trennungsgang zur Isolierung höhermolekularer Pyrimidinoligonucleotide aus dem Partialhydrolysat chemisch depurinierter DNA.

gebnisse des III. Trennschritts sind in Tabelle II zusammengefasst. Die vereinigten Peakfraktionen werden durch Ultrafiltration entsalzt und lyophilisiert. Bei dieser Aufarbeitung gehen durchschnittlich ca. 15% der Pyrimidinoligonucleotide verloren.

Die Lyophilisate von Peak II-VI werden im IV. Trennschritt (Schema 1) an QAE-Sephadex im steigenden NaCl-Gradienten, der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist, nachgetrennt. Die Bedingungen sind in Tabelle I, die Ergebnisse in Tabelle III zusammengefasst. Bei der Nachtrennung der Lyophilisate von Peak II-VI der Fig. 1 werden mehr oder weniger gut voneinander getrennte Peaks erhalten, wie den Elutionsprofilen (Figs. 2, 4, 6, 8, 10) zu entnehmen ist. Die Peakfraktionen

TABELLE II

ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN FRAKTIONIERUNG (VGL. FIG. 1) VON 12 g (CA. 233,000 A_{260} -EINHEITEN) EINER MISCHUNG HÖHERMOLEKULARER PYRIMIDINOLIGONUCLEOTIDE AN QAE-SEPHADEX A-25 IM STEIGENDEN NaCl-GRADIENTEN BEI pH 3.5 (III. TRENNSCHRITT IM SCHEMA 1)

Peak	Eluiert bei NaCl-Konz. (mM)	Eluierte Mengen		Isolierte Mengen (Gemittelt aus zwei Trennungen)	
		(A_{260} -Einheiten)	(%)	(g)	(%)
I	250	13,700	5.9	0.59	4.9
II	255-270	26,600	11.4	1.10	9.2
III	280-300	36,800	15.8	1.70	14.2
IV	300	57,700	24.8	2.45	20.4
V	315-370	35,500	15.2	1.65	13.8
VI	370-400	20,800	8.9	1.20	10.0
VII	2000	28,800	12.4	1.82	15.1
	Zwischenfraktionen	13,100	5.6	—	—

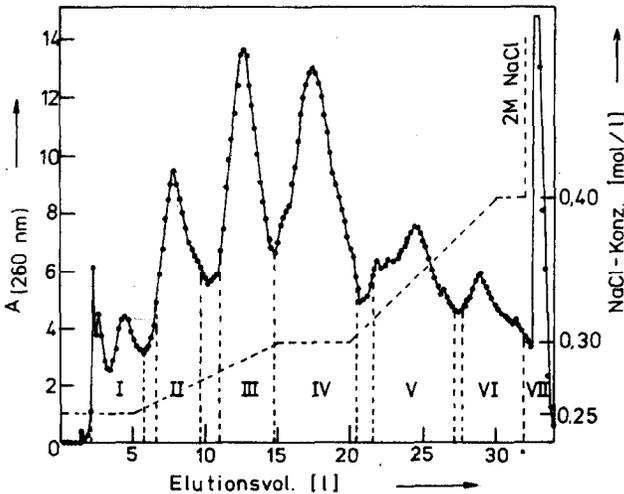


Fig. 1. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Trennung (III. Trennschritt in Schema 1) von 12 g einer Mischung höhermolekularer Pyrimidinoligonucleotide an QAE-Sephadex A-25 (60×5 cm I.D.). Die Trennung erfolgt bei Raumtemperatur im sechsstufigen NaCl-Gradienten, der mit 0.05 M Natriumacetat auf pH 3.5 gepuffert ist. Der Durchfluss beträgt ca. 800 ml/h. Peakfraktionen werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, entsalzt und lyophilisiert. Die Trennergebnisse sind in Tabelle II zusammengefasst. Die Lyophilisate von Peak II-VI werden rechromatographiert (vgl. Fig. 2, 4, 6, 8, 10).

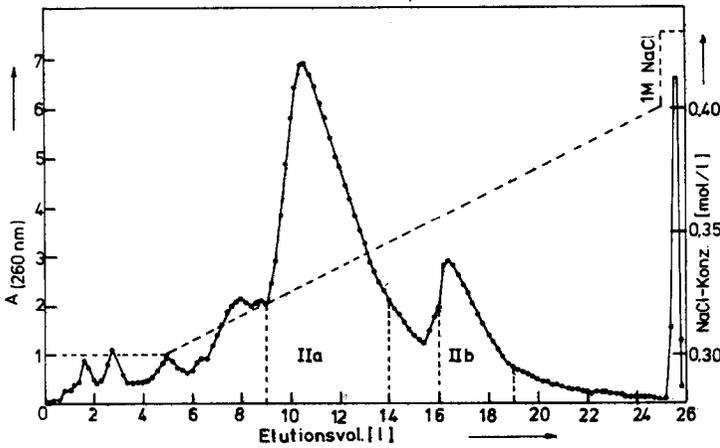


Fig. 2. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung von Peak II der Fig. 1 an QAE-Sephadex A-25 (70 × 3 cm I.D.). Die Rechromatographie erfolgt bei Raumtemperatur im NaCl-Gradienten, der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist, nach den Bedingungen der Tabelle I. Der Durchfluss beträgt ca. 500 ml/h. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefasst. Peakfraktionen werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, entsalzt und lyophilisiert. Die Lyophilisate werden anschliessend nochmals nachgetrennt (vgl. Fig. 3).

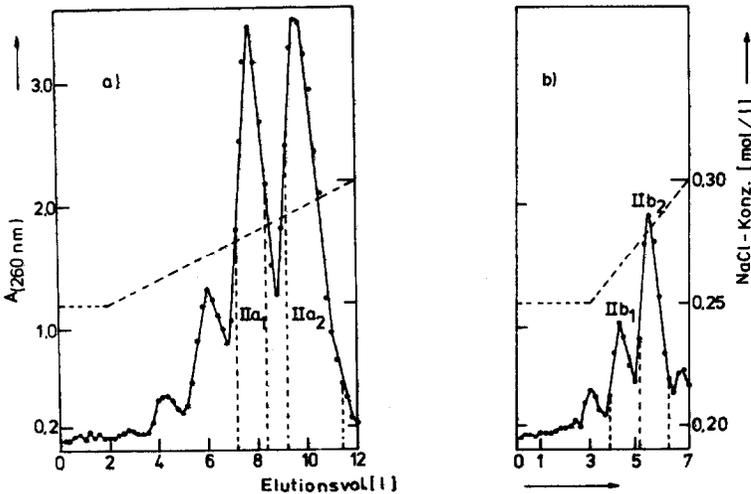


Fig. 3. Elutionsprofile der säulenchromatographischen Nachtrennungen (a) von Peak IIa; (b) von Peak IIb der Fig. 2 an QAE-Sephadex A-25. Die Rechromatographie erfolgt bei Raumtemperatur im NaCl-Gradienten, der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist, unter Zusatz von 7 M Harnstoff nach den Bedingungen der Tabelle I. Die Ergebnisse sind in Tabelle III aufgeführt. Peakfraktionen werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, entsalzt und lyophilisiert. Identifizierung und Charakterisierung der Lyophilisate sind in Tabelle IV und V zusammengefasst.

TABELLE III

ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN NACHTRENnung DER LYOPHILISATE VON PEAK II-IV (FIG. 1), PEAK IIa, b (FIG. 2), PEAK IIIa-c (FIG. 4), PEAK IVa-d (FIG. 6), PEAK Va, b (FIG. 8), PEAK VIa-d (FIG. 10).

Die Rechromatographie der Lyophilisate von Peak II-VI erfolgt im steigenden NaCl-Gradienten bei pH 7.5. Bei der Nachtrennung der übrigen Lyophilisate wird diesem Gradienten 7 M Harnstoff zugegeben.

Aufgetragene Pyrimidinucleotidmischung			Getrennte Pyrimidinoligonucleotide			Isolierte Pyrimidinoligonucleotide	
Lyophilisat	Mengen (A_{260} -Einh.)	Eluiert bei NaCl-Konz. (mM)	Peak	Fig.	Mengen (A_{260} -Einh.)	(mg)	(%)
Peak	Fig.	(g)					(%)
II	1	37,700	320-340	IIa	2	21,000	55.7
			350-370	IIb	2	4800	12.7
			Zwischenfraktionen		2	11,900	31.6
IIa	2	16,700	275-280	IIa ₁	3a	5800	34.7
		0.88	285-295	IIa ₂	3a	6300	37.7
			Zwischenfraktionen		3a	4600	25.5
IIb	2	3800	260-275	IIb ₁	3b	1300	34.2
		0.20	275-290	IIb ₂	3b	2200	57.9
			Zwischenfraktionen		3b	300	7.9
III	1	63,000	310-330	IIIa	4	21,300	33.8
		3.00	330-350	IIIb	4	23,200	36.8
			350-370	IIIc	4	7300	11.6
			Zwischenfraktionen		4	11,200	17.8
IIIa	4	18,900	275-280	IIIa ₁	5a	6200	32.8
		0.90	285-295	IIIa ₂	5a	9500	50.2
			Zwischenfraktionen		5a	3200	16.9
IIIb	4	19,300	265-270	IIIb ₁	5b	2700	14.0
		0.92	270-280	IIIb ₂	5b	7500	38.9
			290-300	IIIb ₃	5b	5200	26.9
			Zwischenfraktionen		5b	3900	20.2
IIIc	4	6900	280-300	IIIc ₁	5c	4800	69.6
		0.33	Zwischenfraktionen		5c	2100	30.4
IV	1	51,000*	310-320	IVa	6	6200*	12.2*
			320-340	IVb	6	7000*	13.7*
			340-360	IVc	6	13,300*	26.1*
			360-380	IVd	6	10,300*	20.2*
						200	60.6
						260*	10.4*
						270*	10.8*
						550*	22.0*
						410*	16.4*

IVa	6	10,600	0.53	Zwischenfraktionen 280-285	IVa ₁	6	14,200*	27,8*	-	-
IVb	6	11,100	0.54	Zwischenfraktionen 285-300	IVb ₁	7a	7200	67,9	310	58,4
IVc	6	21,600	1.10	Zwischenfraktionen 290-300	IVc ₁	7b	3400	32,1	-	-
IVd	6	16,400	0.82	Zwischenfraktionen 300	IVc ₂	7c	8400	75,6	380	70,4
V	1	56,500	2.70	Zwischenfraktionen 350	IVd ₁	7d	2700	24,3	-	-
Va	8	2900	0.14	Zwischenfraktionen 350	IVd ₂	7c	5800	26,9	270	24,5
Vb	8	33,000	1.58	Zwischenfraktionen 300-315	Va	7c	10,200	47,2	490	44,5
VI	1	44,700	2.20	Zwischenfraktionen 320-340	Vb	7c	5600	25,9	-	-
				Zwischenfraktionen 345-350	Vb	7d	3700	22,6	170	20,7
				Zwischenfraktionen 350	Va ₁	7d	5100	31,1	230	28,0
				Zwischenfraktionen 350	Vb	7d	7600	46,3	-	-
				Zwischenfraktionen 350	Va ₁	8	4600	8,1	140	5,1
				Zwischenfraktionen 350	Vb	8	35,100	62,1	1580	58,5
				Zwischenfraktionen 350	Va ₁	8	16,800	29,7	-	-
				Zwischenfraktionen 300-315	Vb ₁	9a	2100	72,4	90	64,3
				Zwischenfraktionen 320-340	Vb ₂	9a	800	27,6	-	-
				Zwischenfraktionen 345-350	Vb ₃	9b	5600	17,0	210	13,3
				Zwischenfraktionen 350	Via	9b	11,900	36,1	550	34,8
				Zwischenfraktionen 350	Vib	9b	5900	17,9	230	14,6
				Zwischenfraktionen 350	Vic	10	9600	29,0	-	-
				Zwischenfraktionen 350	Vid	10	3600	8,0	150	6,8
				Zwischenfraktionen 270-280	Via ₁	10	7700	17,2	340	15,5
				Zwischenfraktionen 290-300	Vib ₁	10	8400	18,8	360	16,4
				Zwischenfraktionen 295-300	Vic ₁	10	9100	20,4	390	17,7
				Zwischenfraktionen 300	Vid ₁	10	15,900	35,6	-	-
				Zwischenfraktionen		11a	1500	51,7	60	42,8
				Zwischenfraktionen		11a	1400	-	-	-
				Zwischenfraktionen		11b	3500	50,7	160	47,1
				Zwischenfraktionen		11b	3400	49,3	-	-
				Zwischenfraktionen		11c	3400	46,5	150	41,7
				Zwischenfraktionen		11c	3900	53,4	-	-
				Zwischenfraktionen		11d	3500	44,3	160	41,0
				Zwischenfraktionen		11d	4400	56,7	-	-

* Gemittelt aus zwei Trennungen.

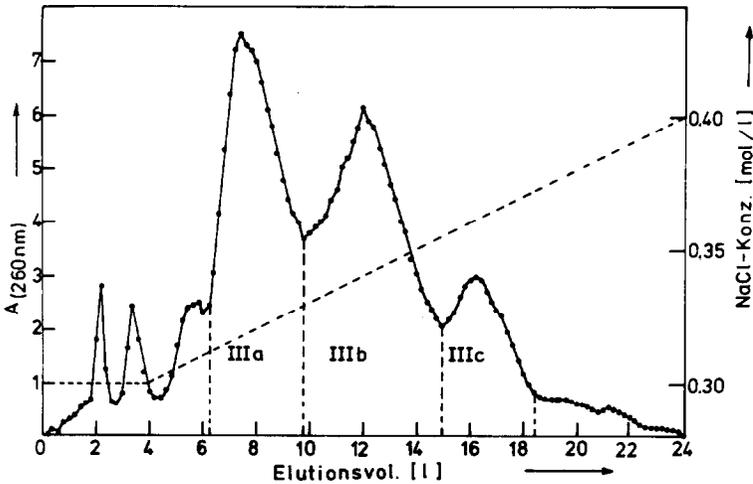


Fig. 4. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung von Peak III der Fig. 1 an QAE-Sephadex A-25, die in Analogie zu den Angaben der Fig. 2 durchgeführt wird. Die Lyophilisate von Peak IIIa-c werden anschliessend nochmals nachgetrennt (vgl. Fig. 5).

werden durch Ultrafiltration entsalzt und anschliessend lyophilisiert. Bei der papierchromatographischen Untersuchung der erhaltenen Lyophilisate zeigt sich, dass die isolierten Peakfraktionen mehrere Komponenten enthalten, die im Papierchromatogramm in unterschiedlichen Flecken wandern. Aus diesem Grund werden die Lyophilisate nochmals an QAE-Sephadex nachgetrennt.

Die Rechromatographie (V. Trennschritt in Schema 1) wird wiederum an QAE-Sephadex im steigenden NaCl-Gradienten bei pH 7.5 durchgeführt, dem aber 7 M Harnstoff zugesetzt wird. Die Bedingungen des V. Trennschritt sind in Tabelle I, die Ergebnisse in Tabelle III zusammengefasst. Nach der letzten säulenchromatographischen Reinigung werden die Peakfraktionen isoliert und Aliquote der erhaltenen Lyophilisate wiederum papierchromatographisch untersucht. Die Ergebnisse der Papierchromatographie sind in Tabelle IV aufgeführt. Die Auswertung der Papierchromatogramme ergibt, dass von den 24 untersuchten Lyophilisaten nur 6 im Papier einheitlich wandern. Die Mehrzahl der Lyophilisate trennt sich im Papierchromatogramm in ein oder zwei Haupt- und einen Nebenflecken auf. Zur Bestimmung der prozentualen Zusammensetzung eines Lyophilisats, werden alle auftretenden Flecken des betreffenden Lyophilisats aus dem Papierchromatogramm ausgeschnitten und eluiert. Im Eluat der einzelnen Flecken bestimmt man spektralphotometrisch die A_{260} -Einheiten und errechnet aus diesem Wert den prozentualen Anteil am Lyophilisat. Hierbei werden allerdings nur Richtwerte ermittelt, da Unterschiede der molaren Extinktionskoeffizienten nicht berücksichtigt werden.

Anschliessend wird die Struktur der in den Hauptflecken enthaltenen Produkte ermittelt, während die Nebenflecken nicht näher untersucht werden. Da in den Hauptflecken sowohl definierte Einzelsubstanzen als auch Gemische von sequenzisomeren Pyrimidinoligonucleotiden enthalten sein können, die im Papier einheitlich wandern, ist die Ermittlung der Sequenz bzw. Bruttosequenz schwierig und mit einigem Aufwand verbunden. Die Struktur der isolierten Produkte wird aus dem säu-

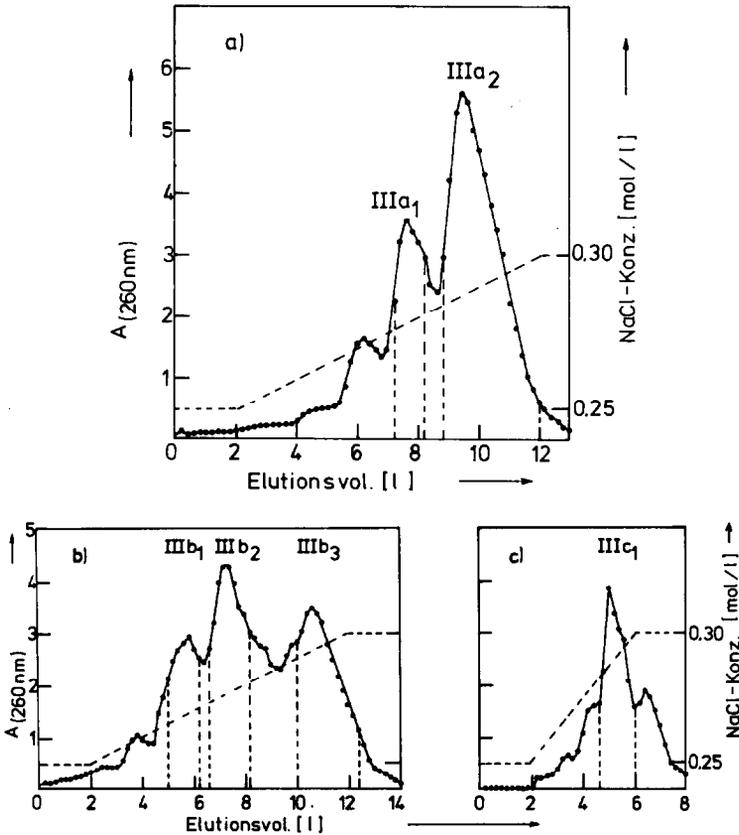


Fig. 5. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennungen (a) von Peak IIIa; (b) von Peak IIIb; (c) von Peak IIIc der Fig. 4 an QAE-Sephadex A-25, die in Analogie zu den Angaben der Fig. 3 durchgeführt werden.

lensäulenchromatographischen Verhalten, den R_F -Werten, den Absorptionsverhältnissen und Ergebnissen des enzymatischen Abbaus wie folgt bestimmt.

Das säulenchromatographische Verhalten sowie die R_F -Werte geben Auskunft über die relative Anzahl der negativ geladenen Phosphatgruppen der betreffenden Pyrimidinoligonucleotide. Mit zunehmender Phosphatladung werden die Oligonucleotide einerseits stärker an der QAE-Sephadex Säule adsorbiert und wandern andererseits auch langsamer im Papierchromatogramm.

Aus dem Vergleich des bei pH 2 gemessenen Absorptionsverhältnisses von 280/260 nm mit dem berechneten Wert, der sowohl für die Sequenz eines Pyrimidinoligonucleotids als auch für die Bruttosequenz einer Mischung von sequenzisomeren Pyrimidinoligonucleotiden errechnet werden kann, lässt sich der Anteil der Cytidyl- und Thymidylsäurereste in einer Einzelsubstanz bzw. Mischung zuverlässig bestimmen.

Die aus den chromatographischen Daten und Absorptionsverhältnissen ermittelte Struktur wird anschliessend durch enzymatischen Abbau mit alkalischer Phosphatase und Phosphodiesterase aus Schlangengift nach dem bereits früher be-

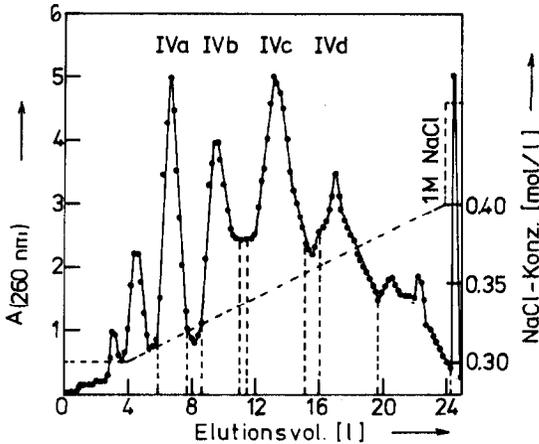


Fig. 6. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung von Peak IV der Fig. 1 an QAE-Sephadex A-25, die in Analogie zu den Angaben der Fig. 2 durchgeführt wird. Die Lyophilisate von Peak IVa-d werden anschliessend nochmals nachgetrennt (vgl. Fig. 7).

schriebenen Weg^{21,22} überprüft. Der Verlust terminaler Phosphatgruppen, die mit alkalischer Phosphatase entfernt werden, hat zur Folge, dass der R_F -Wert einer Substanz bzw. einer einheitlich wandernden Mischung von Sequenzisomeren deutlich ansteigt. Der Vergleich der R_F -Werte vor und nach der Behandlung mit alkalischer Phosphatase zeigt, ob eine, zwei oder keine terminalen Phosphatgruppen entfernt werden. Nach der Behandlung mit Phosphatase wird einerseits die Vollständigkeit des Abbaus und andererseits nochmals die Einheitlichkeit der Produkte papierchromatographisch untersucht. Hierbei zeigt sich, dass alle dephosphorylierten Produkte einheitlich wandern. Die dephosphorylierten Pyrimidinoligonucleotide bzw. Gemische von Sequenzisomeren werden vom Papier eluiert und anschliessend mit Phosphodiesterase aus Schlangengift hydrolysiert. Das erhaltene Hydrolysat wird mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie an reverser Phase nach dem bereits früher beschriebenen Weg^{24,26,30} in Nucleoside und Mononucleotide getrennt. Aus der Anzahl und Art der auftretenden Nucleoside und Mononucleotide lässt sich eindeutig feststellen, ob eine einheitliche Verbindung oder eine Mischung von Sequenzisomeren hydrolysiert wurde. Treten nämlich neben den Mononucleotiden die Nucleoside dT und dC gemeinsam im Hydrolysat auf, so liegt eine Mischung von sequenzisomeren Pyrimidinnucleotiden vor. Aus dem Verhältnis von Nucleosid zu Mononucleotiden lässt sich die Kettenlänge der Einzelsubstanz ermitteln, aus dem Verhältnis von (dC + pdC):(dT + pdT) lässt sich die Bruttosequenz der Mischung der Sequenzisomeren bestimmen. Die UV-Absorptionsverhältnisse und Ergebnisse des enzymatischen Abbaus sind in Tabelle V zusammengefasst. Die Kettenlänge der sequenzisomeren Pyrimidinoligonucleotide wird in Analogie zu dem früher beschriebenen Weg^{31,32} wie folgt ermittelt. Die Komponenten der im Papierchromatogramm einheitlich wandernden Mischungen der dephosphorylierten Sequenzisomeren werden vom Papier eluiert und anschliessend mit Polynucleotidkinase und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ enzymatisch in den 5'-Hydroxylendgruppen radioaktiv markiert. Die markierten Gemische werden in der Homochromatographie vom Überschuss an $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ be-

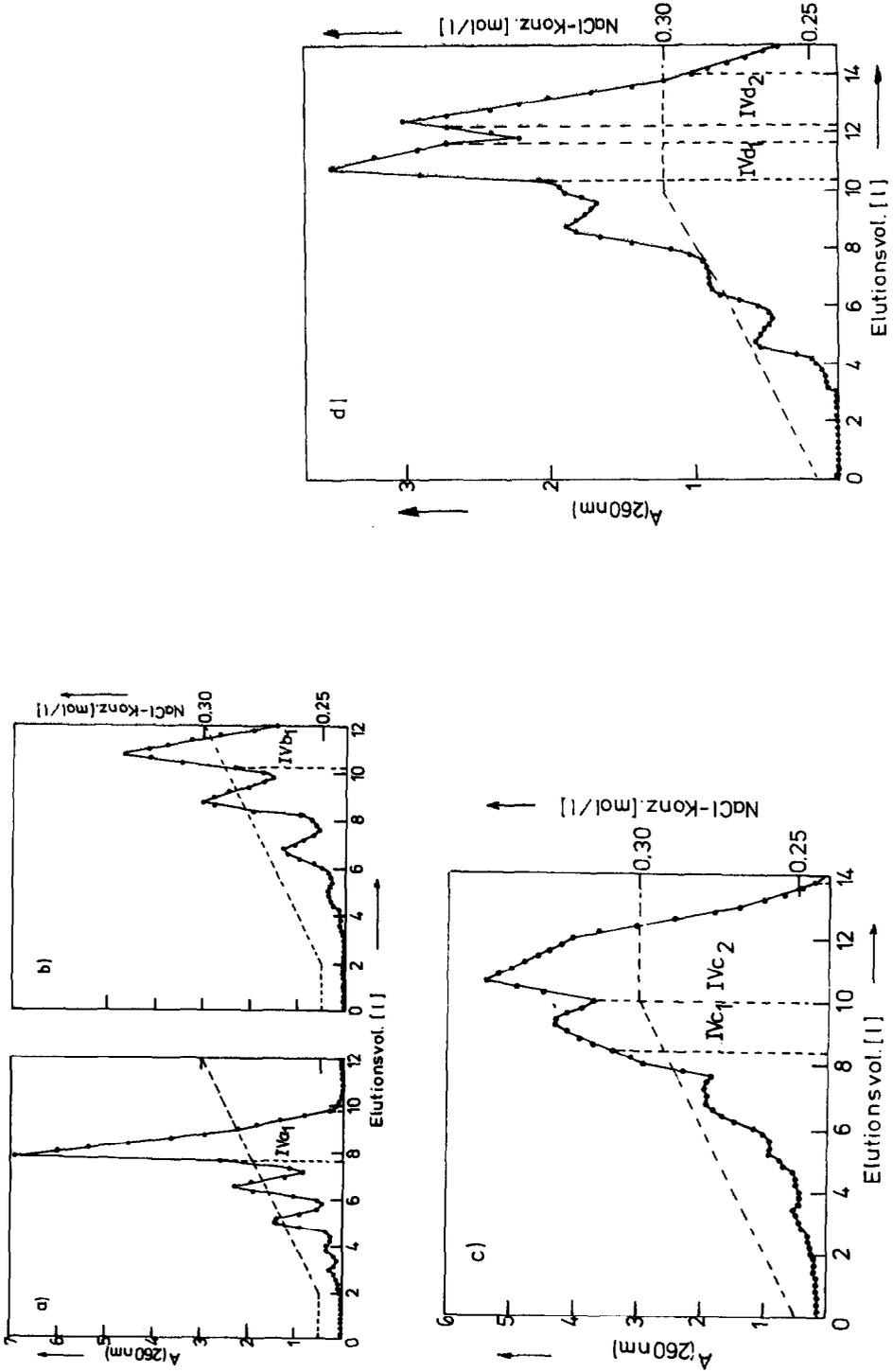


Fig. 7. Elutionsprofile der säulenchromatographischen Nachtrennungen (a) von Peak IVa; (b) von Peak IVb; (c) von Peak IVc; (d) von Peak IVd der Fig. 6 an QA-E-Sephadex A-25, die in Analogie zu den Angaben der Fig. 3 durchgeführt werden.

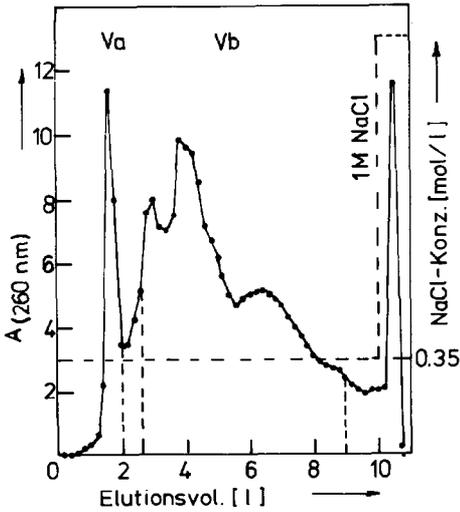


Fig. 8. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung von Peak V der Fig. 1 an QAE-Sephadex A-25, die in Analogie zu den Angaben der Fig. 2 durchgeführt wird. Die Lyophilisate von Peak Va, b werden anschliessend nochmals nachgetrennt (vgl. Fig. 9).

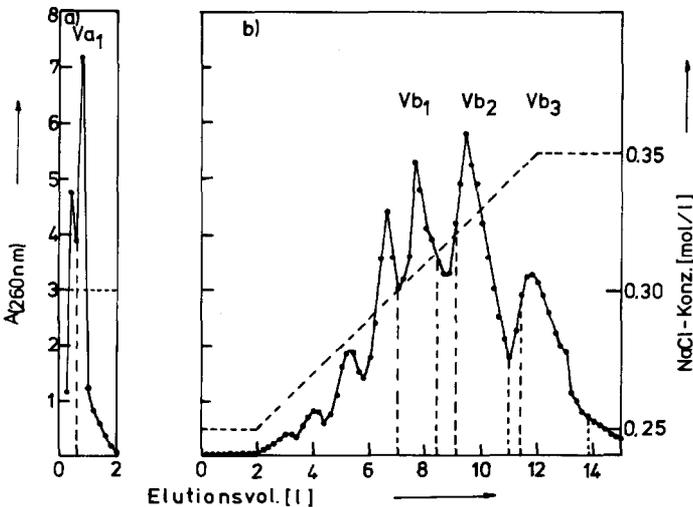


Fig. 9. Elutionsprofile der säulenchromatographischen Nachtrennungen (a) von Peak Va; (b) von Peak Vb der Fig. 8 an QAE-Sephadex A-25, die in Analogie zu den Angaben der Fig. 3 durchgeführt werden.

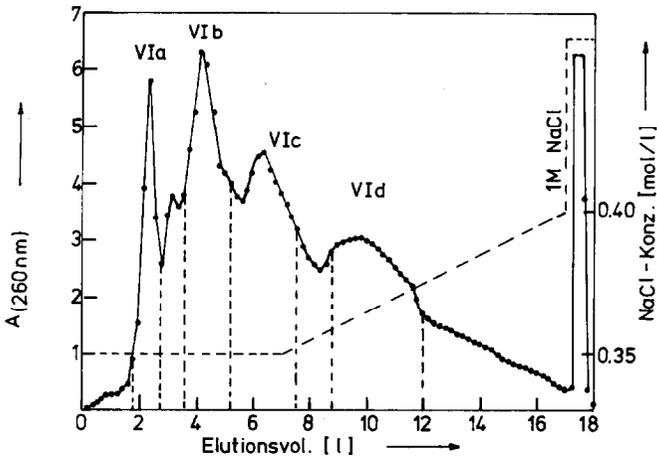


Fig. 10. Elutionsprofil der säulenchromatographischen Nachtrennung von Peak VI der Fig. 1 an QAE-Sephadex A-25, die in Analogie zu den Angaben der Fig. 2 durchgeführt wird. Die Lyophilisate von Peak VIa-d werden anschliessend nochmals nachgetrennt (vgl. Fig. 11).

freit. Da die Gemische von gleich langen sequenzisomeren Pyrimidinnucleotiden in der Homochromatographie einheitlich wandern, lässt sich mit Hilfe einer Vergleichssubstanz bereits die Kettenlänge der Sequenzisomeren abschätzen. Zur exakten Bestimmung der Kettenlänge wird die markierte Mischung aus dem Homochromatogramm eluiert und mit Phosphodiesterase partialhydrolysiert. Das Partialhydrolysat wird erneut homochromatographiert. Die Anzahl der im Autoradiogramm auftretenden Banden ergibt direkt die Kettenlänge der Ausgangsverbindungen. Auf diesem Weg lässt sich die Kettenlänge der sequenzisomeren Pyrimidinoligonucleotide exakt bestimmen, ohne dass die Gemische in ihre Einzelsubstanzen getrennt werden müssen.

Aufgrund der Daten, die bei der Untersuchung der Lyophilisate erhalten werden, führt die Auftrennung der Mischung höhermolekularer Pyrimidinnucleotide nach dem beschriebenen Trennungsgang zu folgenden Ergebnissen. Von den 24

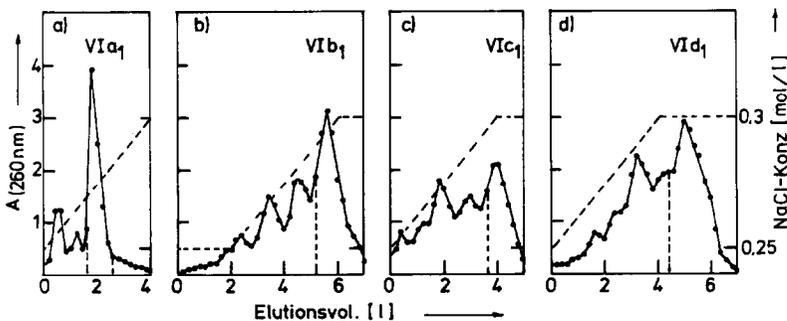


Fig. 11. Elutionsprofile der säulenchromatographischen Nachtrennungen (a) von Peak VIa; (b) von Peak VIb; (c) von Peak VIc; (d) von Peak VIId der Fig. 10 an QAE-Sephadex A-25, die in Analogie zu den Angaben der Fig. 3 durchgeführt werden.

TABELLE IV

ERGEBNISSE DER PAPIERCHROMATOGRAPHISCHEN NACHTRENNUNG DER LYOPHILISIERTEN PEAKFRAKTIONEN

Lyophilisat von		Aufretende Flecken		R _F -Werte* relativ zu pdT		Zusammensetzung der Pyrimidinnucleotidmischung, Bezeichnung
Peak	Fig.	Nr.	Anteil der A ₂₆₀ -Einh. (%)	I**	II***	
IIa ₁	3a	1	11	0.47	—	p(dC ₄ , dT ₄)
		2	89	0.27	0.52	
IIa ₂	3a	1	100	0.19	0.66	p(dC ₄ , dT ₃)p
IIb ₁	3b	1	15	0.46	—	(dC ₅ , dT ₅)
		2	85	0.32	0.32	
IIb ₂	3b	1	49	0.32	0.32	(dC ₅ , dT ₅)
		2	51	0.17	0.32	p(dC ₅ , dT ₅)
IIIa ₁	5a	1	11	0.30	—	—
		2	89	0.27	0.52	
IIIa ₂	5a	1	100	0.19	0.66	p(dC ₃ , dT ₅)
IIIb ₁	5b	1	10	0.38	—	—
		2	90	0.27	0.52	
IIIb ₂	5b	1	100	0.22	0.42	p(dC ₄ , dT ₅)
IIIb ₃	5b	1	100	0.15	0.52	p(dC ₄ , dT ₄)p
IIIc ₁	5c	1	52	0.17	0.32	p(dC ₅ , dT ₅)
		2	48	0.08	0.32	p(dC ₅ , dT ₅)p
IVa ₁	7a	1	100	0.29	0.75	p(dC, dT ₅)p
IVb ₁	7b	1	14	0.43	—	—
		2	86	0.21	0.70	
IVc ₁	7c	1	33	0.38	—	—
		2	67	0.22	0.42	
IVc ₂	7c	1	26	0.43	—	—
		2	71	0.17	0.35	
IVd ₁	7d	1	24	0.27	—	—
		2	76	0.17	0.35	
IVd ₂	7d	1	4	0.27	—	—
		2	96	0.10	0.42	
Va ₁	9a	1	7	0.85	0.85	p(dC ₄ , dT ₅)p
		2	47	0.64	0.85	(dT) ₅
		3	46	0.44	0.85	p(dT) ₅
Vb ₁	9b	1	100	0.26	0.61	p(dC ₂ , dT ₆)
		2	2	0.33	—	—
Vb ₂	9b	1	98	0.19	0.53	p(dC ₃ , dT ₅)p
		2	13	0.24	—	—
VIa ₁	11a	1	5	0.77	0.77	p(dC ₃ , dT ₆)p
		2	34	0.50	0.77	(dT) ₆
		3	61	0.27	0.77	p(dT) ₆
VIb ₁	11b	1	12	0.33	—	p(dT) ₆ p
		2	88	0.17	0.61	—
VIC ₁	11c	1	21	0.24	0.45	p(dC ₂ , dT ₇)
		2	79	0.12	0.45	p(dC ₂ , dT ₇)p
VID ₁	11d	1	12	0.35	—	—
		2	49	0.19	0.41	p(dC ₃ , dT ₇)
		3	39	0.10	0.41	p(dC ₃ , dT ₇)p

* Papier: Schleicher & Schüll Chromatographiepapier 2316, absteigend. Laufmittel: 1-Propanol-konz. Ammoniak-Wasser (55:10:35).

** Vor dem Abbau mit alkalischer Phosphatase.

*** Nach dem Abbau mit alkalischer Phosphatase.

TABELLE V

UV-ABSORPTIONSVERHÄLTNISSE UND ERGEBNISSE DER ENZYMATISCHEN SPALTUNG DER DEPHOSPHORYLIERTEN PYRIMIDINOLIGONUCLEOTIDGEMISCHE MIT PHOSPHODIESTERASE AUS SCHLANGENGIFT

Pyrimidinoligonucleotidmischung, isoliert* aus			Absorptionsverhältnisse 280/260 nm (pH 2)		Verhältnisse der Spaltprodukte (pdC + dC):(pdT + dT)	
Peak	Fig.	Bezeichnung	Berech.	Beob.	Erwartet	Gefunden
IIa ₁	3a	(dC ₄ , dT ₄)	1.27	1.24	1.00	0.99
IIa ₂	3a	(dC ₄ , dT ₃)	1.37	1.38	1.33	1.31
IIb ₁	3b	(dC ₃ , dT ₃)	1.27	1.25	1.00	0.98
IIb ₂	3b	(dC ₃ , dT ₂)	1.27	1.29	1.00	0.98
IIIa ₁	5a	(dC ₃ , dT ₃)	1.11	1.11	0.60	0.58
IIIa ₂	5a	(dC ₃ , dT ₄)	1.18	1.20	0.75	0.76
IIIb ₁	5b	(dC ₄ , dT ₄)	1.27	1.28	1.00	0.93
IIIb ₂	5b	(dC ₄ , dT ₃)	1.20	1.22	0.80	0.77
IIIb ₃	5b	(dC ₄ , dT ₄)	1.27	1.30	1.00	0.96
IIIc ₁	5c	(dC ₅ , dT ₅)	1.27	1.26	1.00	1.00
IVa ₁	7a	(dC, dT ₃)	0.84	0.88	0.20	0.20
IVb ₁	7b	(dC ₂ , dT ₃)	1.00	1.03	0.40	0.45
IVc ₁	7c	(dC ₄ , dT ₅)	1.20	1.18	0.80	0.81
IVc ₂	7c	(dC ₄ , dT ₆)	1.15	1.15	0.67	0.67
IVd ₁	7d	(dC ₄ , dT ₆)	1.15	1.16	0.67	0.68
IVd ₂	7d	(dC ₄ , dT ₅)	1.20	1.27	0.80	0.83
Va ₁	9a	(dT) ₅	0.70	0.70	—	—
Vb ₁	9b	(dC ₂ , dT ₆)	0.96	0.95	0.33	0.35
Vb ₂	9b	(dC ₃ , dT ₃)	1.11	1.06	0.60	0.63
Vb ₃	9b	(dC ₃ , dT ₆)	1.14	1.14	0.50	0.46
VIa ₁	11a	(dT) ₆	0.70	0.69	—	—
VIIb ₁	11b	(dC ₂ , dT ₆)	0.96	0.94	0.33	0.32
VIIIc ₁	11c	(dC ₂ , dT ₇)	0.93	0.98	0.29	0.33
VIII d ₁	11d	(dC ₃ , dT ₇)	1.02	1.10	0.43	0.50

* Nach der papierchromatographischen Nachtrennung der lyophilisierten Peakfraktionen.

Peaks, die nach dem V. Trennschritt aufgearbeitet werden, enthalten nur 2 Einzelsubstanzen, während in den übrigen 22 Peaks definierte Gemische von sequenzisomeren Pyrimidinoligonucleotiden die Säule verlassen (vgl. Tabelle IV). Die Mehrzahl der Sequenzisomeren tritt mit einer unterschiedlichen Anzahl terminaler Phosphatgruppen auf, so dass gleiche Gemische von Sequenzisomeren in unterschiedlichen Peaks gefunden werden. In einigen Fällen enthalten auch einzelne Peaks Sequenzisomere mit einer unterschiedlichen Anzahl terminaler Phosphatgruppen. Vermutlich gehen hier bei der Aufarbeitung der Peakfraktionen terminale Phosphatgruppen teilweise verloren. In den 22 Peaks werden insgesamt nur 13 definierte Gemische von sequenzisomeren Pyrimidinoligonucleotiden mit 6 bis 10 Monomereinheiten nachgewiesen, die sich auf die verschiedenen Peaks wie folgt verteilen.

Peak IIa₁ enthält zu 89% eine Mischung der sequenzisomeren Oktanucleotide p(dC₄, dT₄), die mit den Oktanucleotiden aus Peak IIIb₁, die 90% des Lyophilisats ausmachen, identisch sind. Die gleichen Pyrimidinoligonucleotide mit aber zwei terminalen Phosphatgruppen machen 100% des Lyophilisats von Peak IIIb₃ aus. Die Sequenzisomeren werden im III. Trennschritt (vgl. Fig. 1) vermutlich im Abstieg von

Peak II und im Anstieg von Peak III eluiert. Die Absorptionsverhältnisse der Sequenzisomerenmischungen entsprechen mit 1.24 (IIa₁); 1.28 (IIIb₁) und 1.30 (IIIb₃) dem für (dC₄, dT₄) berechneten Wert von 1.27. Nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase wandern die Gemische im Papierchromatogramm als einheitliche Flecken mit gleichem R_F-Wert, der deutlich über dem der nicht dephosphorylierten Mischungen liegt. Der Unterschied im Anstieg des R_F-Wertes legt bei den Verbindungen aus Peak IIa₁ und IIIb₁ die Anwesenheit nur einer terminalen Phosphatgruppe nahe, wobei die Pyrimidinoligonucleotide aus Peak IIIb₃ bei der Dephosphorylierung zwei terminale Phosphatgruppen verlieren. Alle drei dephosphorylierten Mischungen werden mit Phosphodiesterase aus Schlangengift so abgebaut, dass das molare Verhältnis von (dC + pdC):(dT + pdT) mit 0.99 (IIa₁); 0.93 (IIIb₁) und 0.96 (IIIb₃) den erwarteten Wert von 1.00 bestätigt. In der Homochromatographie bilden die partialhydrolysierten Gemische jeweils 8 Banden, die beim Abbau von Oktanucleotiden zu erwarten sind.

Peak IIa₂ enthält zu 100% eine Mischung der sequenzisomeren Heptanucleotide p(dC₄, dT₃)p. Das gefundene Absorptionsverhältnis entspricht mit 1.38 sehr gut dem berechneten Wert von 1.37. Die Anwesenheit von zwei terminalen Phosphatgruppen ergibt sich aus dem starken Anstieg des R_F-Wertes, den die dephosphorylierte Mischung gegenüber der Ausgangsmischung aufweist. Die dephosphorylierte Mischung wird von Phosphodiesterase zu dC, pdC, dT, pdT abgebaut, wobei das molare Verhältnis (dC + pdC):(pT + pdT) = 1.31 dem erwarteten Wert von 1.33 entspricht.

Peak IIb₁ besteht zu 85% aus der Mischung der sequenzisomeren Decapyrimidinnucleotide (dC₅, dT₅). Die Komponenten der Mischung tragen keine terminalen Phosphatgruppen, da die Mischung vor und nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase den gleichen R_F-Wert aufweist. Die gleiche Mischung macht 100% von Peak IIb₂ aus, wobei aber ca. 50% der Decapyrimidinnucleotide eine terminale Phosphatgruppe tragen. In Peak IIIc₁ tritt die Mischung nochmals auf, wobei hier aber ca. 50% der Pyrimidinnucleotide zwei, die andere Hälfte dagegen eine terminale Phosphatgruppe tragen. Der Verlust der terminalen Phosphatgruppe ist vermutlich bei der Aufarbeitung der Peakfraktionen von Peak IIb₂ und IIIc₁ entstanden. Die unterschiedliche Anzahl der terminalen Phosphatgruppen ergibt sich wiederum aus dem Vergleich der R_F-Werte, die die Gemische vor und nach Behandlung mit Phosphatase aufweisen. Die beobachteten Absorptionsverhältnisse von 1.25 (IIb₁), 1.29 (IIb₂) und 1.26 (IIIc₁) stimmen gut mit dem berechneten Wert von 1.27 überein. Das molare Verhältnis der Abbauprodukte (dC + pdC):(dT + pdT), das nach der Phosphodiesterase-Behandlung der dephosphorylierten Gemische gefunden wird, liegt mit 0.98 (IIb₁); 0.98 (IIb₂) und 1.00 (IIIc₁) in sehr guter Übereinstimmung mit dem erwarteten Wert von 1.00. Durch Partialhydrolyse mit Phosphodiesterase und anschließender Homochromatographie des Partialhydrolysats wird für die Komponenten der Mischung eine Kettenlänge von 10 Monomereinheiten ermittelt.

Peak IIIa₁ enthält zu 89% die Mischung der sequenzisomeren Oktanucleotide p(dC₃, dT₅). Das gefundene Absorptionsverhältnis stimmt mit dem beobachteten vollständig überein. Phosphodiesterase baut das dephosphorylierte Gemisch zu dC, pdC, dT, pdT ab, wobei das molare Verhältnis von (dC + pdC):(dT + pdT) = 0.58 dem erwarteten Wert von 0.60 entspricht. Das Partialhydrolysats der mit Phosphodiesterase behandelten Mischung trennt sich in der Homochromatographie in 8 Ban-

den, so dass die Ausgangsmischung Komponenten mit 8 Monomereinheiten enthält.

Das Lyophilisat von Peak IIIa₂ enthält zu 100% die Mischung der sequenzisomeren Heptanucleotide p(dC₃, dT₄)p. Die Anwesenheit von zwei terminalen Phosphatgruppen zeigt der starke Anstieg des R_F-Wertes nach der Behandlung des Gemisches mit Phosphatase. Das Absorptionsverhältnis von 1.20 stimmt mit dem berechneten Wert von 1.18 gut überein. Phosphodiesterase baut das Gemisch so ab, dass das molare Verhältnis von (dC + pdC):(dT + pdT) = 0.76 ist und dem berechneten Wert von 0.75 entspricht. Die Kettenlänge von 7 bestätigt sich bei der Homochromatographie des partialhydrolysierten Gemisches.

Das Lyophilisat von Peak IIIb₂ besteht zu 100% aus der Mischung der sequenzisomeren Nonanucleotide p(dC₄, dT₅). Mit 67% ist die Mischung auch in Peak IVc₁ enthalten. Die Mischung tritt mit zwei terminalen Phosphatgruppen in Peak IVd₂ auf und macht 96% der isolierten Peakfraktionen aus. Die unterschiedliche Anzahl der terminalen Phosphatgruppen ergibt sich aus dem Vergleich der R_F-Werte, die die Gemische vor und nach Behandlung mit Phosphatase aufweisen. Die Absorptionsverhältnisse 1.22 (IIIb₂); 1.18 (IVc₁); 1.27 (IVd₂) entsprechen dem berechneten Wert von 1.20, obwohl der Wert von 1.27 (IVd₂) etwas hochliegt. Das molare Verhältnis der Spaltprodukte (dC + pdC):(dT + pdT), das nach der Hydrolyse der dephosphorylierten Gemische mit Phosphodiesterase gefunden wird, entspricht mit 0.77 (IIIb₂); 0.81 (IVc₁); 0.83 (IVd₂) dem erwarteten Wert von 0.80. Die Partialhydrolyse der Gemische und anschließende Auftrennung der Produkte in der Homochromatographie zeigt, dass die Komponenten der Gemische 9 Monomereinheiten aufweisen.

Das Lyophilisat von Peak IVa₁ enthält zu 100% die Mischung der sequenzisomeren Hexanucleotide p(dC, dT₅)p. Aus dem starken Anstieg des R_F-Wertes, der nach der Dephosphorylierung der Mischung gefunden wird, folgt, dass die Komponenten der Mischung zwei terminale Phosphatgruppen tragen. Das Absorptionsverhältnis von 0.88 entspricht dem berechneten Wert von 0.84. Beim Abbau mit Phosphodiesterase treten die Monomereinheiten dC, pdC, dT, pdT im erwarteten molaren Verhältnis auf. Aus der Homochromatographie der partialhydrolysierten Mischung folgt, dass die Mischung aus Hexanucleotiden besteht.

Peak IVb₁ enthält zu 86% die sequenzisomeren Heptanucleotide p(dC₂, dT₅)p. Die Anwesenheit von zwei terminalen Phosphatgruppen folgt aus dem Unterschied im R_F-Wert, den die Mischung vor und nach der Phosphatasebehandlung aufweist. Das gefundene Absorptionsverhältnis stimmt mit dem berechneten gut überein. Phosphodiesterase setzt aus der Mischung die Monomereinheiten im erwarteten molaren Verhältnis frei. Die Homochromatographie der partialhydrolysierten Mischung zeigt, dass sich die Mischung aus Heptanucleotiden zusammensetzt.

Peak IVc₂ und IVd₁ enthalten jeweils zu ca. 75% eine Mischung der sequenzisomeren Decanucleotide p(dC₄, dT₆). Der geringe Unterschied im R_F-Wert, den die Mischungen vor und nach Behandlung mit Phosphatase aufweisen, zeigt, dass die Decanucleotide nur eine terminale Phosphatgruppe tragen. Bei beiden Mischungen stimmen die beobachteten Absorptionsverhältnisse 1.15 (IVc₂); 1.16 (IVd₁) mit dem berechneten Wert von 1.15 überein. Nach dem Abbau mit Phosphodiesterase findet man im Hydrolysat beider Mischungen die Monomereinheiten im erwarteten Verhältnis. Die Homochromatographie der partialhydrolysierten Gemische beweist, dass die Mischungen Decanucleotide enthalten.

Peak Va₁ enthält das Pentamere der Thymidylsäure, das im Papierchromatogramm mit zwei, einer und ohne terminale Phosphatgruppen auftritt. Vermutlich ist der partielle und vollständige Verlust der terminalen Phosphatgruppen bei der Aufarbeitung der Peakfraktionen entstanden. Nach der Behandlung der einzelnen Flecken mit Phosphatase erhält man einen einheitlich wandernden Flecken, der mit Phosphodiesterase zu dT und pdT im Verhältnis 1:4 abgebaut wird. In der Homochromatographie bildet das Partialhydrolysat fünf Banden, was die Anwesenheit eines Pentanucleotids zusätzlich beweist.

Peak VIa₁ enthält das Hexamere der Thymidylsäure, das im Papierchromatogramm ebenfalls mit zwei, einer und ohne terminale Phosphatgruppen auftritt. Vermutlich gehen auch hier bei der Aufarbeitung der Peakfraktionen terminale Phosphatgruppen verloren. Das Absorptionsverhältnis sowie die Ergebnisse des enzymatischen Abbaus und der Homochromatographie sprechen eindeutig für die Anwesenheit des Hexameren der Thymidylsäure.

Peak Vb₁ enthält zu 100% die Mischung der sequenzisomeren Oktanucleotide p(dC₂, dT₆), die mit zwei terminalen Phosphatgruppen auch in Peak VIb₁ auftreten und dort 88% des Lyophilisats ausmachen. Bei beiden Mischungen stimmen die beobachteten Absorptionsverhältnisse 0.95 (Vb₁); 0.94 (VIb₁) mit dem berechneten Wert von 0.96 gut überein. Die unterschiedliche Anzahl terminaler Phosphatgruppen ergibt sich aus dem Vergleich der R_F-Werte, die die Gemische vor und nach Behandlung mit Phosphatase aufweisen. Der Unterschied ist bei der Mischung aus Peak VIb₁ deutlich grösser. Nach der Dephosphorylierung weisen beide Gemische den gleichen R_F-Wert auf. Das molare Verhältnis der Spaltprodukte (dC + dC):(dT + pdT), das nach der Hydrolyse der dephosphorylierten Gemische mit Phosphodiesterase gefunden wird, entspricht mit 0.35 (Vb₁) und 0.32 (VIb₁) sehr gut dem erwarteten Wert von 0.33. Die Anwesenheit von Oktanucleotiden beweist die Homochromatographie der partialhydrolysierten Gemische.

Peak Vb₃ enthält zu 87% eine Mischung der sequenzisomeren Nonanucleotide p(dC₃, dT₆)p. Die Anwesenheit von zwei terminalen Phosphatgruppen folgt aus dem starken Anstieg des R_F-Wertes nach der Dephosphorylierung der Mischung. Das Absorptionsverhältnis der Mischung entspricht genau dem berechneten Wert von 1.14. Phosphodiesterase spaltet die dephosphorylierte Mischung in dC, pdC, dT, pdT. Die Monomereinheiten treten im erwarteten molaren Verhältnis auf. Die Homochromatographie der partialhydrolysierten Mischung zeigt, dass die Mischung aus Nonanucleotiden besteht.

Peak VIc₁ enthält zu 100% ein Gemisch der sequenzisomeren Nonanucleotide (dC₂, dT₇). 79% der Mischungskomponenten tragen zwei, 21% nur eine terminale Phosphatgruppe, wie die papierchromatographische Untersuchung vor und nach Behandlung des Gemisches mit Phosphatase zeigt. Sowohl das Absorptionsverhältnis als auch das molare Verhältnis, in dem die Monomereinheiten nach der Spaltung der Mischung mit Phosphodiesterase auftreten, liegen etwas über dem berechneten bzw. erwarteten Wert. In der Homochromatographie wandert das Partialhydrolysat der dephosphorylierten Mischung in 9 Banden, was die Anwesenheit von Nonanucleotiden beweist.

Peak VI d₁ enthält zu 88% ein Gemisch der sequenzisomeren Decanucleotide (dC₃, dT₇), wobei 39% der Pyrimidinnucleotide zwei, 41% nur eine terminale Phosphatgruppe tragen. Die Anwesenheit unterschiedlich phosphorylierter Decanucleoti-

de folgt aus der Veränderung des R_F -Wertes nach Behandlung mit Phosphatase. Das Absorptionsverhältnis sowie das molare Verhältnis, in dem die Monomereinheiten nach der Hydrolyse der Mischung mit Phosphodiesterase auftreten, übersteigen etwas den berechneten bzw. erwarteten Wert. Die Homochromatographie der partialhydrolysierten Mischung zeigt eindeutig, dass das Gemisch aus Decanucleotiden zusammengesetzt ist.

DISKUSSION

Nach dem beschriebenen Trennungsgang sind 13 definierte Gemische von länger-kettigen, sequenzisomeren Pyrimidinoligonucleotiden in präparativen Mengen zugänglich, die bisher nur analytisch im Partialhydrolysat verschiedener DNAs nachgewiesen wurden. Da länger-kettige Pyrimidinnucleotide nur einen sehr kleinen Anteil (10%) des Partialhydrolysats einer DNA ausmachen, setzt die Isolierung solcher Fragmente im Milligramm Massstab voraus, dass DNA in Kilogramm Mengen zur Spaltung eingesetzt werden kann. Bei zahlreichen biotechnischen Verfahren fällt DNA als Nebenprodukt an, so dass die geforderten Mengen ohne weiteres zugänglich sind.

Die Ausbeuten, in denen die verschiedenen Gemische isoliert werden, sind Richtwerte. Einerseits werden die Unterschiede im molaren Extinktionskoeffizienten von pdT und pdC bei der Ausbeuteberechnung nicht berücksichtigt und andererseits hängt die Ausbeute sehr von dem Ergebnis der Ultrafiltration ab. Sowohl die schwankende Güte der Membranen als auch die unterschiedliche Dauer der Ultrafiltration bestimmen massgeblich die Höhe der Ausbeute.

Die Zusammensetzung der isolierten Gemische lässt sich mit den vier unabhängigen Untersuchungsmethoden (Verhalten bei der Säulenchromatographie, Absorptionsverhältnis, enzymatische Hydrolyse, Homochromatographie des Partialhydrolysats) zuverlässig ermitteln.

Die Aufarbeitung des Partialhydrolysats wird dadurch wesentlich erschwert, dass gleiche Sequenzisomere mit einer unterschiedlichen Anzahl von terminalen Phosphatgruppen auftreten. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Befunde früherer Arbeiten, dass bei der chemischen Depurinierung und Partialhydrolyse einer DNA zunächst vermutlich Pyrimidinnucleotide mit zwei terminalen Phosphatgruppen freigesetzt werden, die aber im Laufe der Aufarbeitung teilweise abhydrolysieren, wobei die 3'-Phosphatgruppe leichter als die 5'-Phosphatgruppe verloren geht. In den Gemischen, deren Komponenten nur eine terminale Phosphatgruppe tragen, werden in der Regel 90–95% der Produkte als 5'-Oligonucleotide identifiziert, während nur 5–10% der Mischung auf 3'-Oligonucleotide entfallen. Es ist daher zu vermuten, dass bei der letzten säulenchromatographischen Nachtrennung die nicht isolierten Nebenpeaks, die gleichen Sequenzisomeren enthalten wie die Hauptpeaks, jedoch mit weniger terminalen Phosphatgruppen. Es ist aber auch denkbar, dass in den Nebenpeaks andere Gemische von Sequenzisomeren die Säule verlassen.

Überraschend ist, dass Homologe der Cytidylsäure mit 4 und mehr Monomereinheiten aus dem Partialhydrolysat der Heringsspermen DNA nicht isoliert werden. Diese Beobachtung wird auch bei der Aufarbeitung des Partialhydrolysats von DNA aus Hühner-Erythrocyten gemacht²³. In den Mischungen der Sequenzisomeren treten Sequenzisomere mit 6 und mehr Cytidylsäureeinheiten nicht auf, während die

Sequenzisomeren mit 6 und 7 Thymidylsäureeinheiten gefunden werden. Pyrimidinoligonucleotide mit mehr als 10 Monomereinheiten werden nicht isoliert. Diese Fragmente sind vermutlich in der 2 M Fraktion des II. Trennschritts in Schema 1 enthalten, die bisher noch nicht untersucht wurde.

Die isolierten Gemische dienen als Modellsubstanzen in enzymatischen Untersuchungen, als Primer bei der DNA- und RNA-Sequenzierung und werden ausserdem zur Untersuchung von Wechselwirkungen verwendet, wie in späteren Arbeiten gezeigt werden soll.

DANK

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie grosszügig unterstützt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Pyrimidinoligonucleotide (dT)₅; (dT)₆ und die Mischungen der Sequenzisomeren (dC, dT₅); (dC₂, dT₅); (dC₃, dT₄); (dC₄, dT₃); (dC₄, dT₄); (dC₃, dT₅); (dC₂, dT₆); (dC₄, dT₅); (dC₃, dT₆); (dC₂, dT₇); (dC₅, dT₅); (dC₄, dT₆) und (dC₃, dT₇) werden mit oder ohne terminale Phosphatgruppen aus Hydrolysaten depurinerter Heringsspermen DNA im präparativen Massstab nach folgendem Verfahren isoliert. Heringsspermen DNA (1 kg) wird chemisch depuriniert und zu einer Mischung von Pyrimidinnucleotiden partialhydrolysiert. Das Partialhydrolysat wird zuerst an DEAE-Cellulose in ein Gemisch nieder- und hochmolekularer Pyrimidin-nucleotide säulenchromatographisch getrennt. Die Mischung der hochmolekularen Pyrimidinoligonucleotide wird anschliessend an QAE-Sephadex nach einem Trennungsgang schrittweise fraktioniert. Verunreinigungen, die säulenchromatographisch nicht vollständig entfernt werden, werden papierchromatographisch abgetrennt. Die Zusammensetzung der Mischungen der Sequenzisomeren wird aus den Werten der Säulen-, Papier- und Homochromatographie, aus Absorptionsverhältnissen und durch enzymatischen Abbau ermittelt.

LITERATUR

- 1 K. Burton, *Biochem. J.*, 77 (1960) 547.
- 2 G. B. Petersen, *Biochem. J.*, 87 (1963) 495.
- 3 J. H. Spencer und E. Chargaff, *Biochim. Biophys. Acta*, 68 (1963) 18.
- 4 H. S. Shapiro und E. Chargaff, *Biochim. Biophys. Acta*, 76 (1963) 1.
- 5 H. S. Shapiro und E. Chargaff, *Biochim. Biophys. Acta*, 91 (1964) 262.
- 6 G. B. Petersen und K. Burton, *Biochem. J.*, 92 (1964) 666.
- 7 G. B. Petersen und J. M. Reeves, *Biochim. Biophys. Acta*, 129 (1966) 438.
- 8 R. Salomon, A. M. Kaye und M. Herzberg, *J. Mol. Biol.*, 43 (1969) 581.
- 9 E. M. Southern, *Nature (London)*, 227 (1970) 794.
- 10 T. W. Sneider, *J. Biol. Chem.*, 246 (1971) 4774.
- 11 V. Ling, *J. Mol. Biol.*, 64 (1972) 87.
- 12 H. C. Birnboim, R. E. J. Mitchel und N. A. Straus, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 70 (1973) 2189.
- 13 K. Harbers und J. H. Spencer, *Biochemistry*, 13 (1974) 1094.
- 14 D. R. Hewish, K. K. Smith und J. H. Spencer, *Virology*, 74 (1976) 363.
- 15 K. Burton und G. B. Petersen, *Biochem. J.*, 75 (1960) 17.
- 16 W. D. Sutton und G. B. Petersen, *Biochim. Biophys. Acta*, 174 (1969) 155.

- 17 A. L. Mazin und B. F. Vanyushin, *Biokhimiya*, 32 (1967) 377.
- 18 G. B. Petersen und J. M. Reeves, *Biochim. Biophys. Acta*, 179 (1969) 510.
- 19 J. H. Spencer und L. Boshkov, *Can. J. Biochem.*, 51 (1973) 1206.
- 20 M. D. Kirnos, V. K. Vasileyev und B. F. Vanyushin, *J. Chromatogr.*, 104 (1975) 113.
- 21 H. Schott und M. Schwarz, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 358 (1977) 949.
- 22 H. Schott und M. Schwarz, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 359 (1978) 617.
- 23 R. H. Hayashikawa und J. Nagyvary, *Prep. Biochem.*, 8 (1978) 321.
- 24 M. Dizdaroglu, W. Hermes, C. von Sonntag und H. Schott, *J. Chromatogr.*, 169 (1979) 429.
- 25 H. Schott, *J. Chromatogr.*, 172 (1979) 179.
- 26 M. Dizdaroglu, M. G. Simic und H. Schott, *J. Chromatogr.*, 188 (1980) 273.
- 27 H. Schott, *Makromol. Chem.*, 182 (1981) 2015.
- 28 H. Schott, *J. Chromatogr.*, 237 (1982) 429.
- 29 K. Burton, *Methods Enzymol.*, 12a (1967) 222.
- 30 M. Dizdaroglu und W. Hermes, *J. Chromatogr.*, 171 (1979) 321.
- 31 E. Jay, R. Bambara, R. Padmanbhan und R. Wu, *Nucleic Acids Res.*, 1 (1974) 331.
- 32 H. Schott und H. Watzlawick, *J. Chromatogr.*, 243 (1982) 57.