

CHROM. 16,409

ISOLIERUNG VON OLIGONUCLEOTIDEN AUS DNA-PARTIALHYDROLYSATEN MIT HILFE DER TEMPLATE-CHROMATOGRAPHIE

HERBERT SCHOTT*, HERBERT SCHRADE und HILDEGARD WATZLAWICK

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

(Eingegangen am 14. September 1983; geänderte Fassung eingegangen am 3. November 1983)

SUMMARY

Isolation of oligonucleotides from partial hydrolysates of DNA using template chromatography

Purine oligonucleotides are adsorbed at 0°C on poly(vinyl alcohol)-p(dC)_n-DEAE-cellulose, and pyrimidine oligonucleotides on oligo(guanylic acid) gel according to the base-pairing mechanism, if their sequences contain at least three or more homologous, consecutive guanylic or cytidylic moieties. By increasing the temperature all base-paired oligonucleotides are desorbed. With this template chromatography mixtures of defined purine- or pyrimidine oligonucleotides could be isolated from fractionated partial hydrolysates of herring sperm DNA. Afterwards these mixtures are rechromatographed on QAE-Sephadex and/or Nucleosil C₁₈. Using this approach oligonucleotides up to nine monomer units can be isolated either as single substances or as mixtures with defined composition on a preparative scale, which would be not possible with the already existing separation procedures when partial hydrolysates of herring sperm DNA as starting material are used. Purity and sequence of the isolated oligonucleotides are determined by the "fingerprint" method.

EINLEITUNG

Aus Partialhydrolysaten chemisch abgebauter DNA können präparative Mengen von Purin-¹⁻³ und Pyrimidinoligonucleotiden⁴⁻¹³ chromatographisch isoliert werden. Aus den Partialhydrolysaten der Heringsspermen-DNA beispielsweise, deren präparative Auftrennung bislang am besten untersucht ist, werden Oligonucleotide mit bis zu 10 Monomereinheiten gewonnen¹⁴⁻²². Die isolierten Oligonucleotide vertreten aber nur etwa die Hälfte der Purin- und Pyrimidinnucleotidsequenzen, die theoretisch in solchen Partialhydrolysaten zu erwarten sind. Die nicht gefundenen Oligonucleotide treten entweder in den Partialhydrolysaten der Heringsspermen-DNA nicht auf oder sind darin nur in so geringen Mengen enthalten, dass sie mit den bisher verwendeten Trennmethode nicht erfasst werden.

Ein selektives Verfahren, mit dem möglicherweise weitere Oligonucleotide aus DNA-Partialhydrolysaten zugänglich sind, ist die Template-Chromatographie²³, ei-

ne spezielle Art der Affinitätschromatographie, die auf dem Basenpaarungsmechanismus nach Watson und Crick basiert ist. Die Methode wird zwar seit langem zur Isolierung von Polynucleotiden und vorallem von messenger RNA verwendet, aber bisher nur zur präparativen Isolierung von homologen Oligonucleotiden²⁴⁻²⁶ aus Partialhydrolysaten der Heringsspermen-DNA genutzt. Im folgenden wird daher untersucht, inwieweit sich die Template-Chromatographie auch zur präparativen Isolierung von Oligonucleotiden gemischter Sequenzen verwenden lässt und ob mit ihrer Hilfe bisher nicht zugängliche Oligonucleotide aus Partialhydrolysaten der Heringsspermen-DNA erhalten werden können.

EXPERIMENTELLER TEIL

Material

QAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden); Nucleosil C₁₈, 7.0 μm (Macherey, Nagel & Co., Düren, B.R.D.); Ultrafiltrationsmembranen (Amicon, Lexington, MA, U.S.A.); Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (E.C. 3.1.3.1.) (Boehringer, Mannheim, B.R.D.); Polyvinylalkohol (PVAL)-p(dC)_n-DEAE-Cellulose²⁷ sowie das Oligoguanylsäuregel²⁸ wurden in unserem Labor synthetisiert. Die 2 Purinoligonucleotidgemische²⁹ und die Mischung der Pyrimidinoligonucleotide³⁰ werden nach beschriebenen Methoden aus Partialhydrolysaten der Heringsspermen-DNA isoliert. Chemikalien werden "chemisch rein" verwendet.

Methoden

(A) *Template-Chromatographie von Purinoligonucleosidphosphaten an PVAL-p(dC)_n-DEAE-Cellulose* (vgl. Fig. 1a, b). Die Purinoligonucleotidgemische²⁹ aus Peak 3 und 5 werden vor der Template-Chromatographie enzymatisch dephosphoryliert. Hierzu werden die Lyophilisate von Peak 3 und 5 entsprechend den Angaben der Tabelle I in Wasser und 1 M Tris-HCl (pH 8.1) aufgenommen, mit alkalischer Phosphatase versetzt und 12 h bei 37°C inkubiert. Anschliessend werden die Reaktionsansätze, jeweils mit 0.5 M NaCl, 0.01 M Na₂HPO₄ (pH 7) auf 2 ml verdünnt, auf die 30°C warme PVAL-p(dC)_n-DEAE-Cellulose Säule (40 × 2 cm I.D.) aufgetragen. Die Säule ist in allen Läufen mit 0.5 M NaCl, 0.01 M Na₂HPO₄ (pH 7) äquilibriert und wird mit diesem Puffer im zweistufigen Temperaturgradienten eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 50-100 ml/h.

Nachdem die Probelösung aufgetragen ist, wird die Säule auf 0°C abgekühlt und bei dieser Temperatur in der 1. Stufe mit Puffer (ca. 1 l) so lange eluiert, bis die Absorption des Eluats nach einem steilen Anstieg (Peak I) unter 0.04 A₂₆₀-Einheiten fällt. Die Elution wird unterbrochen, die Säule auf 30°C erwärmt, bei dieser Temperatur 1 h belassen und dann in der 2. Stufe wieder mit Puffer (ca. 300 ml) so lange eluiert, bis nach einem 2. Anstieg (Peak II) die Absorption auf 0.04 A₂₆₀-Einheiten fällt. Fraktionen zu 20 ml werden gesammelt und deren Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Messwerte werden gegen das Elutionsvolumen graphisch aufgetragen und ergeben die Elutionsprofile der Fig. 1. Das Elutionsprofil, das bei der Fraktionierung der Mischung aus Peak 3 erhalten wird, ist in Fig. 1a abgebildet. Fig. 1b zeigt stellvertretend für die beiden Läufe nur das Elutionsprofil, das bei der Template-Chromatographie von 150 mg der Mischung aus Peak 5 erhalten wird. Die Fraktionen von Peak II werden vereinigt, an einer UM 05 Membran durch Ultrafiltration

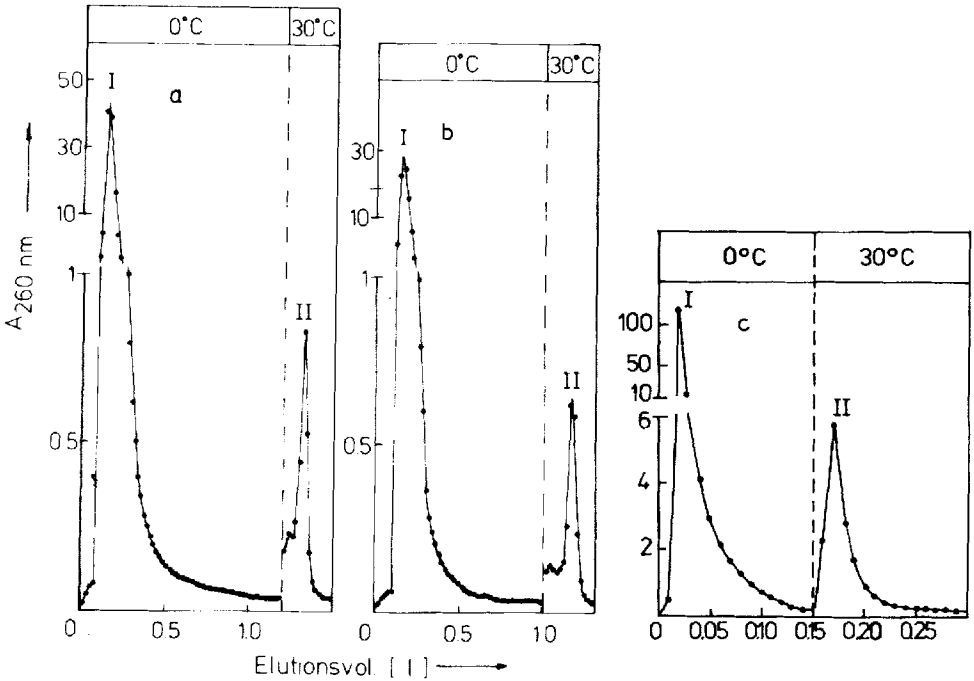


Fig. 1. Elutionsprofile, die bei der Template-Chromatographie von fraktionierten Partialhydrolysaten der Heringsperm DNA erhalten werden. Die Trennungen werden mit einem zweistufigen Temperaturgradienten (0°C, 30°C) durchgeführt. Zur Elution der Säulen, die mit 50–100 ml/h erfolgt, wird 0.5 M NaCl, 0.01 M Na_2HPO_4 (pH 7) verwendet. (a) Template-Chromatographie von 60 mg der Mischung von Purinnucleosidphosphaten aus Peak 3 an einer PVAL-p(dC)_n-DEAE-Cellulose Säule (40 × 2 cm I.D.); (b) von 150 mg der Mischung von Purinoligonucleosidphosphaten aus Peak 5 an der gleichen Säule; (c) Template-Chromatographie von 130 mg der Pyrimidinoligonucleotide aus der 0.4 M Fraktion an einer Oligoguanylsäuregel Säule (20 × 2 cm I.D.). Die Produkte, die in Peak II die Säulen bei 30°C verlassen, werden entsalzt und weiter untersucht.

TABELLE I

BEDINGUNGEN DER ENZYMATISCHEN DEPHOSPHORYLIERUNG VON OLIGONUCLEOTIDGEMISCHEN MIT ALKALISCHER PHOSPHATASE

Oligonucleotidgemisch Bezeichnung	Menge (mg)	Aufgenommen in		Inkubiert (12 h bei 37°C) mit Phosphatase (Einheiten)
		Wasser (μl)	1 M Tris-HCl pH 8.1 (μl)	
Purinoligonucleotide aus Peak 5	150	150	50	100
aus Peak 3	300	200	100	200
Pyrimidinoligonucleotide aus Peak II der Fig. 1c	60	100	10	50
	20	100	10	20

entsalzt und lyophilisiert. Bei der Entsalzung gehen bis zu 30% der Produkte aus Peak II verloren. Die Ergebnisse sind in Tabelle II zusammengefasst. Während die isolierten Purinoligonucleosidphosphate der Mischung aus Peak 3 direkt mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) [siehe (D)] fraktioniert werden, wird das Lyophilisat der isolierten Oligonucleosidphosphate aus der Mischung von Peak 5 zunächst an QAE-Sephadex nachgetrennt.

(B) *Template-Chromatographie von Pyrimidinoligonucleotiden am Oligoguanylsäuregel* (vgl. Fig. 1c). Das Gemisch der Pyrimidinoligonucleotide³⁰ aus der 0.4 M Fraktion wird ohne Vorbehandlung an einer Oligoguanylsäuregel Säule (20 × 2 cm I.D.) in 3 unterschiedlichen Portionen chromatographiert. Pro Lauf werden 130, 260 und 390 mg des Gemisches, jeweils in 2–3 ml 0.50 M NaCl, 0.01 M Na₂HPO₄ (pH 7) gelöst, auf die 30°C warme Säule aufgetragen. Die Template-Chromatographie wird in Analogie zu den Angaben unter (A) durchgeführt. Fraktionen zu 10 ml werden gesammelt. Stellvertretend für alle 3 Läufe ist das Elutionsprofil der Trennung von 130 mg in Fig. 1c abgebildet. Die Fraktionen von Peak II werden aus allen Läufen vereinigt und an einer UM 2 Membran durch Ultrafiltration entsalzt. Die Trennergebnisse sind in Tabelle II zusammengefasst.

TABELLE II

ERGEBNISSE DER TEMPLATE-CHROMATOGRAPHIE VON PURINOLIGONUCLEOSIDPHOSPHATEN AN PVAL_{p(dC)_n}-DEAE-CELLULOSE UND VON PYRIMIDINOLIGONUCLEOTIDEN AM OLIGOGUANYLSÄUREGEL

Aufgetragene Mischung			Eluierte Produkte in				Elutionsprofil Fig. 1
Bezeichnung	mg	A ₂₆₀ -Einh.	Peak I, 0°C		Peak II, 30°C		
			A ₂₆₀ -Einh.	%	A ₂₆₀ -Einh.	%	
Purinnucleosidphosphate aus Peak 3	60	1260	1210	96.0	50	4.0	a
Purinnucleosidphosphate aus Peak 5	150	2310	2251	97.4	63	2.7	b
Pyrimidin-nucleotide der 0.4 M Fraktion	300	5050	4954	98.1	92	1.8	—
	130	1800	1660	92.2	125	6.9	c
	260	3700	3450	93.2	245	6.6	—
	390	5500	5270	95.8	250	4.5	—

(C) *Nachtrennung der Purin- und Pyrimidinoligonucleosidphosphatmischung, die bei der Template-Chromatographie in Peak II eluiert werden.* (1) *Rechromatographie der Purinoligonucleosidphosphate aus Peak 5 an QAE-Sephadex* (vgl. Fig. 2a). 110 A₂₆₀-Einheiten des Lyophilisats der in Peak II der Fig. 1b eluierten Oligonucleosidphosphate (aus Peak 5) werden, in 2 ml 7 M Harnstoff gelöst, auf eine QAE-Sephadex A-25 Säule aufgetragen. Die Säulenfüllung beträgt 40 × 2 cm I.D. und ist mit 0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5), 7 M Harnstoff äquilibriert. Die Säule wird mit 2 l dieses Puffers eluiert, wobei der Durchfluss 200 ml/h beträgt. Fraktionen zu 20 ml werden gesammelt. Der Elutionsvorgang wird automatisch bei 254 nm verfolgt. Die Absorptionseinheiten der bei 260 nm nachgemessenen Peakfraktionen werden graphisch gegen das Elutionsvolumen aufgetragen und führen zu

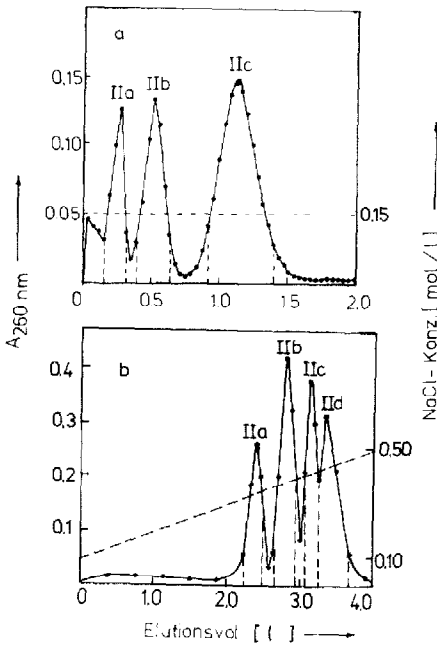


Fig. 2. Elutionsprofile der an einer QAE-Sephadex A-25 Säule ($40 \times 2 \text{ cm I.D.}$) bei Raumtemperatur nachgetrennten Oligonucleosidphosphate aus Peak II der Fig. 1. Peakfraktionen werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt und aufgearbeitet. (a) Rechromatographie von 110 A_{260} -Einheiten der in Peak II der Fig. 1b eluierten Purinoligonucleosidphosphate. Die Säule wird mit 0.15 M NaCl, 0.05 M Tris HCl (pH 7.5), 7 M Harnstoff eluiert. (b) Rechromatographie von 360 A_{260} -Einheiten der, bei der Template-Chromatographie in Peak II der Fig. 1c eluierten und anschliessend enzymatisch dephosphorylierten Pyrimidinoligonucleotide. Die Säule wird mit einem linear steigenden NaCl-Gradienten eluiert, der mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert ist.

dem Elutionsprofil der Fig. 2a. Die Fraktionen von Peak IIa–c werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, an einer UM 05 Membran entsalzt und lyophilisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefasst.

(2) Rechromatographie der Pyrimidinoligonucleosidphosphate an QAE-Sephadex (vgl. Fig. 2b). Die Pyrimidinoligonucleotide, die bei der Template-Chromatographie (B) in Peak II die Säule verlassen, werden vor der Rechromatographie an QAE-Sephadex A-25 enzymatisch dephosphoryliert. Hierzu werden *ca.* 20 mg des Lyophilisats von Peak II der Fig. 1c entsprechend den Angaben der Tabelle I behandelt und anschliessend auf eine QAE-Sephadex A-25 Säule ($40 \times 2 \text{ cm I.D.}$) aufgetragen. Die Säule ist mit 0.1 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) äquilibriert und wird mit folgendem linear steigenden NaCl-Gradienten bei Raumtemperatur eluiert: 2 l 0.1 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) im Mischgefäss; 2 l 0.5 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) im Vorratsgefäss. Der Durchfluss beträgt 200 ml/h. Das Elutionsprofil ist in Fig. 2b wiedergegeben. Fraktionen von Peak IIa–d werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, an einer UM 2 Membran entsalzt und lyophilisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefasst.

(D) Nachtrennung der Purinoligonucleosidphosphatgemische an reverser Phase (Nucleosil C_{18}) mit Hilfe der HPLC (vgl. Fig. 3). Die Purinoligonucleosidmischung aus Peak 3, die bei der Template-Chromatographie in Peak II der Fig. 1a anfällt

TABELLE III

ERGEBNISSE DER RECHROMATOGRAPHIE DER PURIN- UND PYRIMIDINOLIGONUCLEOSIDPHOSPHAT-MISCHUNGEN, DIE BEI DER TEMPLATE-CHROMATOGRAPHIE ISOLIERT (PEAK II) WERDEN, AN EINER QAE-SEPHADEX-SÄULE (40 × 2 cm I.D.)

Aufgetragene Mischung		Isolierte Oligonucleosidphosphate				
Bezeichnung	Menge (A_{260} -Einh.)	Eluiert bei NaCl-Konz.			Menge	
		M	In Peak	Fig.	A_{260} -Einh.	%
Purinoligonucleosidphosphate aus Peak II, Fig. 1b	110	0.15*	IIa	2a	15	13.6
		0.15*	IIb	2a	23	20.9
		0.15*	IIc	2a	51	46.4
		Zwischenfraktionen	2a	21	19.1	
Pyrimidinoligonucleotide aus Peak II**, Fig. 1c	360	0.33	IIa	2b	39	10.8
		0.38	IIb	2b	91	25.3
		0.41	IIc	2b	81	22.5
		0.43	IId	2b	92	25.6
		Zwischenfraktionen	2b	57	15.8	

* in 7 M Harnstoff.

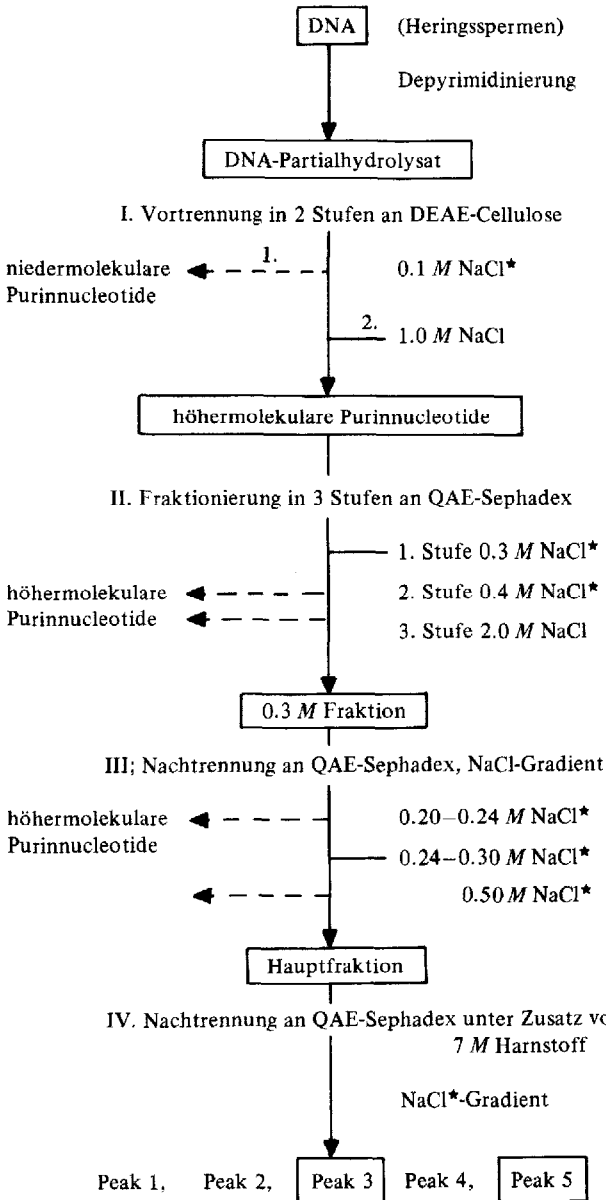
** die Oligonucleotide werden vor der Nachtrennung enzymatisch dephosphoryliert.

(siehe A) sowie die Gemische aus Peak IIa–c der Fig. 2a (siehe C1) werden mit Hilfe der HPLC an einer Nucleosil C_{18} , 7.0 μm Säule (250 × 4.6 mm I.D.) bei Raumtemperatur nachgetrennt. Von allen Gemischen werden Stammlösungen angesetzt, die ca. 200 A_{260} -Einheiten/ml aufweisen. Pro Lauf werden jeweils 25 μl dieser Stammlösungen chromatographiert. Die Säule wird mit einer Mischung aus 77% A und 23% B [A = 0.1 M Ammoniumacetat, pH 7.5; B = Methanol-Wasser (60:40)] mit 1 ml/min eluiert. Hierzu werden folgende Geräte der Firma Waters verwendet: Pumpen 6000A, Programmer M660, Injektor U6K. Die Elution wird bei 254 nm registriert (UV-Detektor: DuPont Instruments Modell 836), wobei der Papiervorschub 2 mm/min beträgt. Fraktionen werden 15 cm hinter dem UV-Detektor gesammelt, in einer Vacuumzentrifuge bei 40°C konzentriert, in 100 μl Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

ERGEBNISSE

An zwei Purinoligonucleosidphosphatgemischen²⁹ und einer Mischung von Pyrimidinoligonucleotiden³⁰ wird geprüft, inwieweit sich die Template-Chromatographie zur selektiven Isolierung von Oligonucleotiden verwenden lässt. Die Gemische werden nach beschriebenen Trennungsgängen^{29,30} aus Partialhydrolysaten einer chemisch abgebauten Heringsspermen-DNA gewonnen und erfüllen folgende, für die Template-Chromatographie notwendige Voraussetzung. Alle Komponenten der Mischungen weisen 3 und mehr Monomereinheiten auf und können somit prinzipiell mit Oligonucleotiden der stationären Phase hybridisieren. Die Hybridisierung, die eine Adsorption zur Folge hat, kommt allerdings erst dann zustande, wenn mindestens 3 benachbarte Monomereinheiten eines Oligonucleotids der Mischung zu den immobilisierten Oligonucleotiden im Sinne von Watson und Crick komplementär sind und bestimmte Hybridisierungsbedingungen eingehalten werden.

Die beiden Purinoligonucleotidgemische entstammen den Fraktionen von Peak 3 und 5, die nach dem in Schema 1 aufgeführten Trennungsgang in 4 Schritten aus dem Partialhydrolysat der chemisch depyrimidinierten Heringsspermen-DNA reproduzierbar erhalten werden.



Schema 1. Trennungsgang^{2,9} zur Isolierung von Purinoligonucleotidgemischen (Peak 3, 5) aus dem Partialhydrolysat der depyrimidinierten DNA aus Heringsspermen.* Mit 0.05 M Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert.

Aus dem Purinoligonucleosidphosphatgemisch von Peak 3, das neben Tri- vor allem Pentanucleotide enthält, können auf dem beschriebenen Weg²⁹ von den theoretisch zu erwartenden 32 verschiedenen Pentanucleosidtetraphosphaten 16 chromatographisch rein in präparativen Mengen isoliert werden (vgl. Tabelle IV). Weitere Pentanucleosidtetraphosphate sind vermutlich in Nebenpeaks enthalten, die bei der Fraktionierung der Mischung zwar auftreten, aber bisher nicht untersucht werden, da sie für eine präparative Isolierung zu wenig Material enthalten.

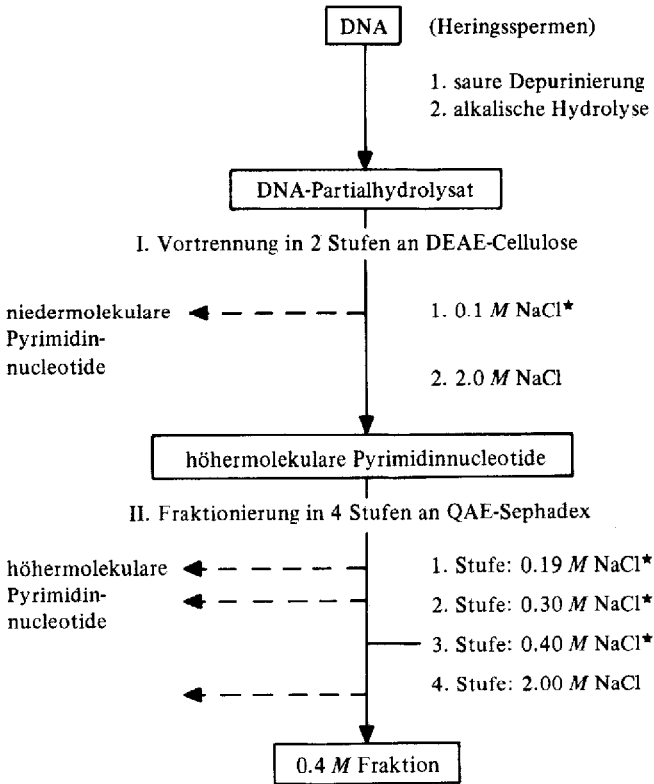
TABELLE IV

OLIGONUCLEOSIDPHOSPHATE, DIE OHNE UND MIT HILFE DER TEMPLATE-CHROMATOGRAPHIE AUS FRAKTIONIERTEN PARTIALHYDROLYSATEN DER HERINGSSPERMEN-DNA ISOLIERT WERDEN

<i>Fractionen des DNA- Partialhydrolysats Bezeichnung</i>	<i>Oligonucleosidphosphate und Gemische von sequenzisomeren Oligonucleosidphosphaten, die isoliert werden</i>	
	<i>Ohne Template- Chromatographie</i>	<i>Mit Template- Chromatographie</i>
Purinoligo- nucleosidphosphate aus Peak 3	d(A) ₃ d(A ₂ G) d(A,G) ₂ d(A) ₅ d(A-A-G-A-A) d(A-G-A-A-A) d(G-A-G-A-A) d(A-A-G-A-G) d(A-G-A-A-G) d(A-G-A-G-A) d(A-G-G-A-A) d(G-A-G-A-G) d(G-G-A-A-G) } d(G-G-A-G-A) } d(G-A-G-G-A) d(A-G-A-G-G) d(A-G-G-A-G) d(G-A-G-G-G) d(G-G-G-A-G)	d(A-G-G-G) d(G-G-G-A-A) d(A-G-G-G-A)
Purinoligo- nucleosidphosphate aus Peak 5	Eine Isolierung wurde bisher nicht versucht	d(G-G-A-G) d(G-G-G-A) d(A-G-G-G) d(A-A-G-G)
Pyrimidinoligo- nucleosidphosphate der 0.4 M Fraktion	d(C ₂ ,T ₅) d(C ₂ ,T ₆) d(C ₂ ,T ₇) d(C ₃ ,T ₄) d(C ₃ ,T ₅) d(C ₃ ,T ₆) d(C ₃ ,T ₇) d(C ₄ ,T ₄) d(C ₅ ,T ₅)	d(C ₅ ,T) d(C ₅ ,T ₂) d(C ₅ ,T ₃) d(C ₅ ,T ₄) d(C) ₆ d(C ₆ ,T) d(C ₆ ,T ₂) d(C ₆ ,T ₃) d(C) ₇ d(C ₇ ,T) d(C) ₈

Das Purinoligonucleotidgemisch aus Peak 5 ist noch nicht näher untersucht und enthält vermutlich Penta- bis Heptanucleotide.

Die Mischung der Pyrimidinoligonucleotide³⁰ entspricht der 0.4 *M* Fraktion, die nach dem in Schema 2 aufgeführten Trennungsgang aus dem Partialhydrolysat der depurinierten Heringsspermen-DNA in 2 Schritten reproduzierbar erhalten wird. Aus der 0.4 *M* Fraktion sind nach einem beschriebenen Trennungsgang³⁰ 9 definierte Gemische sequenzisomerer Pyrimidinoligonucleotide mit 7 bis 10 Monomereinheiten erhältlich, die in Tabelle IV aufgeführt sind.



Schema 2. Trennungsgang³⁰ zur Isolierung einer Mischung höhermolekularer Pyrimidinoligonucleotide (0.4 *M* Fraktion) aus dem Partialhydrolysat der depurinierten DNA aus Heringsspermen. * Mit 0.05 *M* Tris-HCl auf pH 7.5 gepuffert.

Im folgenden wird untersucht, welche Oligonucleotide mit Hilfe der Template-Chromatographie aus den 9 Gemischen selektioniert werden. Zur Chromatographie der Purinoligonucleotidgemische wird als stationäre Phase PVAL-p(dC)_n-DEAE-Cellulose²⁷ verwendet. Bei diesem Trennmaterail handelt es sich um käufliche DEAE-Cellulose, die mit kovalent an Polyvinylalkohol gebundenen, synthetischen Oligomeren der Desoxyribocytidylsäure [p(dC)_n] über Nebervalenzkräfte "beschichtet" ist. Durch ionische Kräfte und Wasserstoffbrücken bleiben die polymergebundenen Oligonucleotide unter den Bedingungen der Template-Chromatographie irreversibel adsorbiert. Als Trägermaterial für die Template-Chromatographie der Py-

rimidinoligonucleotidmischung dient ein Oligoguanylsäuregel²⁸. Die Darstellung des Gels erfolgt so, dass geschützte Oligomere der Desoxyriboguanylsäure mit mehr als 4 Monomereinheiten über ihre 5'-Phosphatgruppen mit freien Hydroxylgruppen eines vernetzten Polyvinylalkoholgels verestert werden. Nach Abspaltung der Schutzgruppen wird ein Oligoguanylsäuregel erhalten, das zur Template-Chromatographie eingesetzt wird.

Es ist zu erwarten, dass von den 16 Purinpentanucleosidtetraphosphaten, die in Peak 3 bisher gefunden werden, nur d(G-A-G-G-G) und d(G-G-G-A-G) an immobilisierten Oligocytidylsäuren der PVAL-p(dC)_n-DEAE-Cellulose Basenpaare ausbilden und daher aus der Mischung isoliert werden können. Alle übrigen 14 Oligonucleosidphosphate (vgl. Tabelle IV) weisen keine 3 benachbarten Guanylateinheiten auf und können somit keine stabilen Basenpaare ausbilden. Zur Template-Chromatographie der Purinoligonucleotidmischung aus Peak 5 lässt sich keine Vorhersage machen, da die Sequenzen der Mischungskomponenten nicht bekannt sind. Von den 9 Gemischen sequenzisomerer Pyrimidinoligonucleotide, die bisher in der 0.4 M Fraktion gefunden werden, lassen die 6 Gemische d(C₃,T₄); d(C₃,T₅); d(C₃,T₆); d(C₃,T₇); d(C₄,T₄) und d(C₅,T₅) Komponenten vermuten, die stabile Basenpaare mit immobilisierten Oligoguanylsäuren des Oligoguanylsäuregels ausbilden. Die Purinoligonucleotidgemische werden vor der Template-Chromatographie mit alkalischer Phosphatase behandelt, um terminale Phosphatgruppen zu entfernen, die der Basenpaarung der kurzen Purinpentanucleotide entgegenwirken. Bei der Pyrimidinoligonucleotidmischung ist eine enzymatische Dephosphorylierung nicht erforderlich, da die Mischung Komponenten mit 7 bis 10 Monomereinheiten enthält, deren Basenpaarung von terminalen Phosphatgruppen nur wenig beeinflusst wird.

Die Template-Chromatographie erfolgt in einem zweistufigen Temperaturgradienten. Die Gemische werden im Elutionspuffer (0.5 M NaCl, 0.01 M Na₂HPO₄ pH 7) auf die 30°C warme Säule aufgetragen, die anschliessend auf 0°C gekühlt werden. In der 1. Stufe werden bei 0°C alle Komponenten einer aufgetragenen Mischung eluiert, die mit der stationären Phase keine Wechselwirkungen eingehen (Peak I der Fig. 1), während komplementäre Komponenten der Mischung mit den immobilisierten Oligonucleotiden der stationären Phase Basenpaare ausbilden und dadurch adsorbiert werden. Im 2. Schritt, bei dem die Säulen bei 30°C eluiert werden, wird die Basenpaarung aufgehoben und die komplementären Oligonucleotide verlassen in Peak II der Fig. 1 gemeinsam die Säulen. Die Beladbarkeit der Säulen wird so ermittelt, dass die aufgetragenen Mengen der Gemische von Lauf zu Lauf gesteigert werden. Die Elution wird photometrisch bei 260 nm verfolgt und führt zu den Elutionsprofilen der Fig. 1. Die Ergebnisse der Template-Chromatographie, die in Tabelle II zusammengefasst sind, zeigen, dass von den aufgetragenen A₂₆₀-Einheiten 93-98% die Säulen bei 0°C in Peak I verlassen und somit keine Wechselwirkung mit den stationären Phasen eingehen. Der prozentuale Anteil der adsorbierten Oligonucleotide sinkt, wenn die aufgetragenen Mengen einen oberen Grenzwert erreichen. Aus diesem Wert ergibt sich die maximale Beladbarkeit der verwendeten Säulen. Demzufolge bindet die PVAL-p(dC)_n-DEAE-Cellulose Säule (40 × 2 cm I.D.) bis zu ca. 100 A₂₆₀-Einheiten einer Purinoligonucleosidphosphatmischung, während am Oligoguanylsäuregel (20 × 2 cm I.D.) ca. 250 A₂₆₀-Einheiten adsorbiert bleiben. Alle in Peak I eluierten Produkte werden nicht untersucht, während die von Peak II zunächst durch Ultrafiltration entsalzt und dann weiter aufgetrennt werden. Da in Peak

II alle adsorbierten Produkte gemeinsam die Säule verlassen, werden nach der Template-Chromatographie Gemische erhalten, die an QAE-Sephadex und/oder mit Hilfe der HPLC an reverser Phase nachgetrennt werden.

Die Purinoligonucleosidphosphate der Mischung aus Peak 3, die bei der Template-Chromatographie die Säule in Peak II der Fig. 1a verlassen, werden an einer Nucleosil C₁₈-Säule mit Hilfe der HPLC (vgl. Fig. 3a) nachgetrennt. Die Eluate von Peak 1-7 werden lyophilisiert und nach den in der Nucleinsäurechemie üblichen Standardmethoden³¹⁻³⁴ wie folgt charakterisiert. Zunächst wird die Kettenlänge der im Lyophilisat enthaltenen Oligonucleosidphosphate ermittelt. Hierzu werden Aliquote der Lyophilisate mit [³²P]ATP und der Polynucleotidkinase inkubiert, wobei die 5'-Enden der Oligonucleosidphosphate mit ³²P markiert werden. Die markierten Produkte werden zusammen mit einem Kettenlängenmarker auf DEAE-Cellulose-Folien homochromatographiert. Aus der Strecke, die die Oligonucleotide im Vergleich zum Kettenlängenmarker auf der DEAE-Cellulose-Folie wandern, ergibt sich ihre Kettenlänge. Hierbei zeigt sich, dass Peak 1-4 Oligonucleotide mit weniger als 4 Monomereinheiten enthalten, während in Peak 5-7 Tetra- und Pentamere gefunden werden, deren Sequenz anschliessend mit der "Fingerprint"-Methode ermittelt wird.

Die Sequenzierung nach der "Fingerprint"-Methode wird in folgenden Schritten durchgeführt, die an anderer Stelle ausführlich beschrieben sind³¹⁻³⁴. Zunächst werden die markierten Oligonucleotide mit Phosphodiesterase aus Schlangengift vom 3'- zum 5'-Ende partialhydrolysiert. Das Partialhydrolysat wird anschliessend zweidimensional chromatographiert. In der 1. Dimension erfolgt die Auftrennung des Partialhydrolysats auf Celluloseacetatstreifen bei pH 3.5 durch Elektrophorese, in der 2. Dimension auf DEAE-Cellulose-Folien durch Homochromatographie. Das Ergebnis der zweidimensionalen Chromatographie wird durch Autoradiographie sichtbar gemacht und ergibt den sogenannten "Fingerprint" aus dem die Sequenz des ursprünglichen Oligonucleotids hervorgeht.

Die "Fingerprints" der Oligonucleotide aus Peak 5-7 der Fig. 3a sind in Fig. 4a-c abgebildet. Die daraus abgelesenen Sequenzen sind in Tabelle V aufgeführt. Peak 5 enthält das Tetranucleosidtriphosphat d(A-G-G-G), während in Peak 6 und 7 die Pentanucleosidtetraphosphate d(G-G-G-A-A) und d(A-G-G-G-A) gefunden werden. Alle 3, mit Hilfe der Template-Chromatographie isolierten Purinoligonucleosidphosphate weisen 3 benachbarte Guanylatreste in ihrer Sequenz auf, über die ihre Adsorption an der PVAL-p(dC)_n-DEAE-Cellulose erfolgt. Mit den herkömmlichen Methoden werden diese Oligonucleosidphosphate nicht aus der untersuchten Fraktion (Peak 3) des Partialhydrolysates der Heringsspermen-DNA isoliert. Das Tetramere d(A-G-G-G) wird zwar im Partialhydrolysat der Heringsspermen-DNA gefunden, ist aber nicht im Gemisch von Peak 3 enthalten. Vermutlich ist d(A-G-G-G) bei der Aufarbeitung (Ultrafiltration) aus d(G-A-G-G-G), das im Gemisch von Peak 3 auftritt (vgl. Tabelle IV) durch teilweisen Abbau entstanden. Der Abbau der Oligonucleotide bei der Aufarbeitung der Peakfraktionen wird auch dadurch belegt, dass einerseits bis zu 30% des Materials verloren gehen und andererseits Oligomere mit 3 und weniger Monomereinheiten gefunden werden. Solche Oligonucleotide bilden keine stabilen Basenpaare aus und sollten somit bei der Template-Chromatographie nicht in Peak II gelangen können. Die isolierten Pentamere machen weniger als 1% der untersuchten Mischung aus. Ihre Isolierung beweist die hohe Selektivität der Methode.

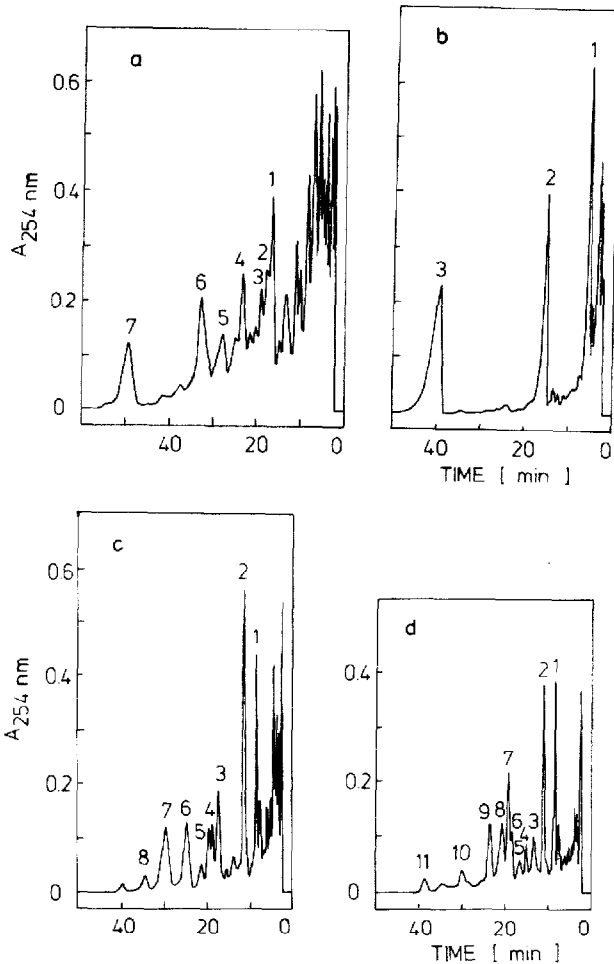


Fig. 3. Elutionsprofile der Nachtrennung von *ca.* 5 A_{260} -Einheiten von Mischungen aus Purinoligonucleosidphosphaten mit Hilfe der HPLC an einer Nucleosil C_{18} -Säule, $7.0 \mu\text{m}$ ($250 \times 4.6 \text{ mm I.D.}$). Die Säule wird mit einem Gemisch aus 77% A und 23% B bei Raumtemperatur eluiert. A = 0.1 M Ammoniumacetat pH 7.5; B = Methanol-Wasser (60:40). Die Elution wird mit 1 ml/min durchgeführt und bei 254 nm verfolgt. Fraktionen bezifferter Peaks werden aufgearbeitet und näher untersucht. (a) Rechromatographie der aus Peak II der Fig. 1a isolierten Mischung; (b) der Mischung aus Peak IIa; (c) der Mischung aus Peak IIb; (d) der Mischung aus Peak IIc der Fig. 2a.

Die Purinoligonucleosidphosphate des Gemisches aus Peak 5, die die PVAL-p(dC) $_n$ -DEAE-Cellulose Säule in Peak II der Fig. 1b verlassen, werden nach der Ultrafiltration nicht direkt mit Hilfe der HPLC nachgetrennt, sondern zunächst an QAE-Sephadex fraktioniert. Durch diesen zusätzlichen Trennschritt, bei dem die Mischung in Komponenten gleicher Kettenlänge getrennt wird, soll die nachfolgende Fraktionierung an Nucleosil- C_{18} vereinfacht werden. Die Trennung an QAE-Sephadex A-25 wird unter isokratischen Elutionsbedingungen mit 0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5), 7 M Harnstoff durchgeführt. Hierbei werden Peak IIa-c der Fig. 2a erhalten, die zusammen 81% der aufgetragenen Mischung enthalten (vgl.

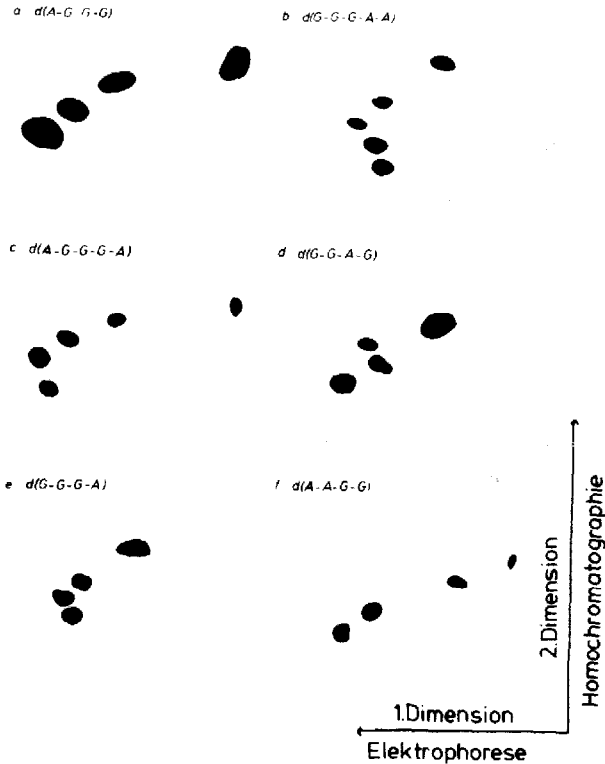


Fig. 4. Autoradiogramme der mit ^{32}P radioaktiv markierten Purinoligonucleotide, die nach der HPLC (vgl. Fig. 3) isoliert, anschliessend enzymatisch partialhydrolysiert und zweidimensional chromatographiert werden. In der 1. Dimension erfolgt die Trennung durch Elektrophorese auf Celluloseacetatstreifen bei pH 3.5; in der 2. Dimension durch Homochromatographie auf DEAE-Cellulose Fertigplatten. "Fingerprint" der Tetranucleotide (a) aus Peak 5 der Fig. 3a und Peak 7 der Fig. 3c; Pentanucleotide (b) aus Peak 6, (c) aus Peak 7 der Fig. 3a; der Tetranucleotide (d) aus Peak 3 der Fig. 3c und Peak 5 der Fig. 3d; (e) aus Peak 6 der Fig. 3c und Peak 9 der Fig. 3d; (f) aus Peak 8 der Fig. 3c. Die aus den "Fingerprints" ersichtlichen Oligonucleotidsequenzen sind in Tabelle V aufgeführt.

Tabelle III). Peakfraktionen werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, ultrafiltriert und anschliessend mit Hilfe der HPLC an reverser Phase (Nucleosil C_{18}) unter isokratischen Elutionsbedingungen rechromatographiert. Die erhaltenen Elutionsprofile (vgl. Fig. 3b-d) zeigen, dass die komplex zusammengesetzten Gemische aus Peak IIa-c an Nucleosil C_{18} in mehr oder weniger gut voneinander getrennte Peaks fraktioniert werden. Überraschend hierbei ist, dass bei der Rechromatographie unterschiedlicher Gemische einige Peaks die gleichen Retentionszeiten aufweisen (vgl. Tabelle V). Beispielsweise werden bei der Nachtrennung von Peak IIb jeweils 2 Peaks erhalten (Peak 3, 6 der Fig. 3c), die in ihren Retentionszeiten (17, 24 min) mit Peak 5, 9 der Fig. 3d übereinstimmen, die bei der Nachtrennung von Peak IIc auftreten. Fraktionen bezifferter Peaks werden lyophilisiert. Die darin enthaltenen Oligonucleotide werden nach dem oben beschriebenen Weg identifiziert. Hierzu werden zunächst Aliquote der Lyophilisate mit ^{32}P radioaktiv markiert. Hierbei zeigt sich, dass die Lyophilisate von Peak 1-3, die bei der Nachtrennung von Peak IIa der Fig. 2a

TABELLE V

ERGEBNISSE DER IDENTIFIZIERUNG VON OLIGONUCLEOTIDEN, DIE DURCH TEMPLATE-CHROMATOGRAPHIE ISOLIERT UND ANSCHLIESSEND AN QAE-SEPHADEX ODER NUCLEOSIL C₁₈ ODER AN BEIDEN SÄULEN NACHGETRENNT WERDEN

Bezeichnung	Von QAE-Sephadex eluiert in		Von Nucleosid C ₁₈ eluiert in			"Fingerprint" der isolierten Peakprodukte	
	Peak	Fig.	Peak	Retention time (min)	Fig.	Nucleotidsequenz	Fig.
Purinoligonucleosidphosphate aus Peak II, Fig. 1a	—	—	5	28	3a	4a	d(A-G-G-G)
	—	—	6	33	3a	4b	d(G-G-G-A-A)
	—	—	7	49	3a	4c	d(A-G-G-G-A)
Purinoligonucleosidphosphate aus Peak II, Fig. 1b	IIb	2a	3	17	3c	4d	d(G-G-A-G)
			6	24	3c	4e	d(G-G-G-A)
			7	28	3c	4a	d(A-G-G-G)
	IIc	2a	8	34	3c	4f	d(A-A-G-G)
			5	17	3d	4d	d(G-G-A-G)
		9	24	3d	4e	d(G-G-G-A)	
Pyrimidinoligonucleosidphosphate aus Peak II, Fig. 1c	IIa	2b	—	—	—	5a	d(C) ₆ ; d(C ₅ ,T)
	IIb	2b	—	—	—	5b	d(C) ₇ ; d(C ₆ ,T); d(C ₅ ,T ₂)
	IIc	2b	—	—	—	5c	d(C) ₈ ; d(C ₇ ,T); d(C ₆ ,T ₂); d(C ₅ ,T ₃)
	IIId	2b	—	—	—	5d	d(C) ₈ ; d(C ₇ ,T); d(C ₆ ,T ₂); d(C ₆ ,T ₃); d(C ₅ ,T ₄)

im Elutionsprofil der Fig. 3b auftreten, nicht markiert werden und somit Verunreinigungen enthalten. Die Kettenlänge der markierten Oligonucleotide wird durch Homochromatographie ermittelt. Von den 19 untersuchten Peaks weisen 13 Di- und Trinucleotide auf, während in den restlichen 6 Peaks nur Tetranucleotide gefunden werden. Da die ursprüngliche Mischung aus Peak 5 vor der Template-Chromatographie Pentamere bis Heptamere enthält, müssen alle isolierten Oligonucleotide nach der Template-Chromatographie aus länger-kettigen Fragmenten entstanden sein, die vermutlich bei der Ultrafiltration teilweise abgebaut werden.

Die Sequenz der isolierten Tetranucleotide wird mit der "Fingerprint"-Methode ermittelt. Die erhaltenen "Fingerprints" sind in Fig. 4d-f abgebildet, die hieraus ersichtlichen Sequenzen sind in Tabelle V aufgeführt. Hierbei zeigt sich, dass Peaks, die die gleichen Retentionszeiten aufweisen auch die gleichen Tetranucleotide enthalten. Beispielsweise enthalten Peak 3 der Fig. 3c und Peak 5 der Fig. 3d, die beide nach 17 min eluiert werden, jeweils d(G-G-A-G). Da das Tetranucleosidtriphosphat beider Peaks aus unterschiedlichen Mischungen stammt, die an QAE-Sephadex deutlich voneinander getrennt werden, kann es erst nachträglich entstanden sein. Für diese Annahme spricht ausserdem, dass dieses Tetranucleosidtriphosphat an der PVAL-p(dC)_n-DEAE-Cellulose nicht adsorbiert werden konnte, da ihm die hierzu erforderlichen 3 benachbarten Guanylatreste fehlen. Das Gleiche gilt auch für das Tetramere d(A-A-G-G), das in Peak 8 der Fig. 3c eluiert wird.

Die Pyrimidinnucleotide der "0.4 M Fraktion", die in Peak II der Fig. 1c das Oliguanylsäuregel verlassen, werden durch Ultrafiltration entsalzt, anschliessend enzymatisch dephosphoryliert und an einer QAE-Sephadex A-25 Säule im steigenden NaCl-Gradienten in Komponenten gleicher Kettenlänge fraktioniert (vgl. Fig. 2b). Die Fraktionen von Peak IIa-d werden innerhalb der senkrechten Strichelung verci-

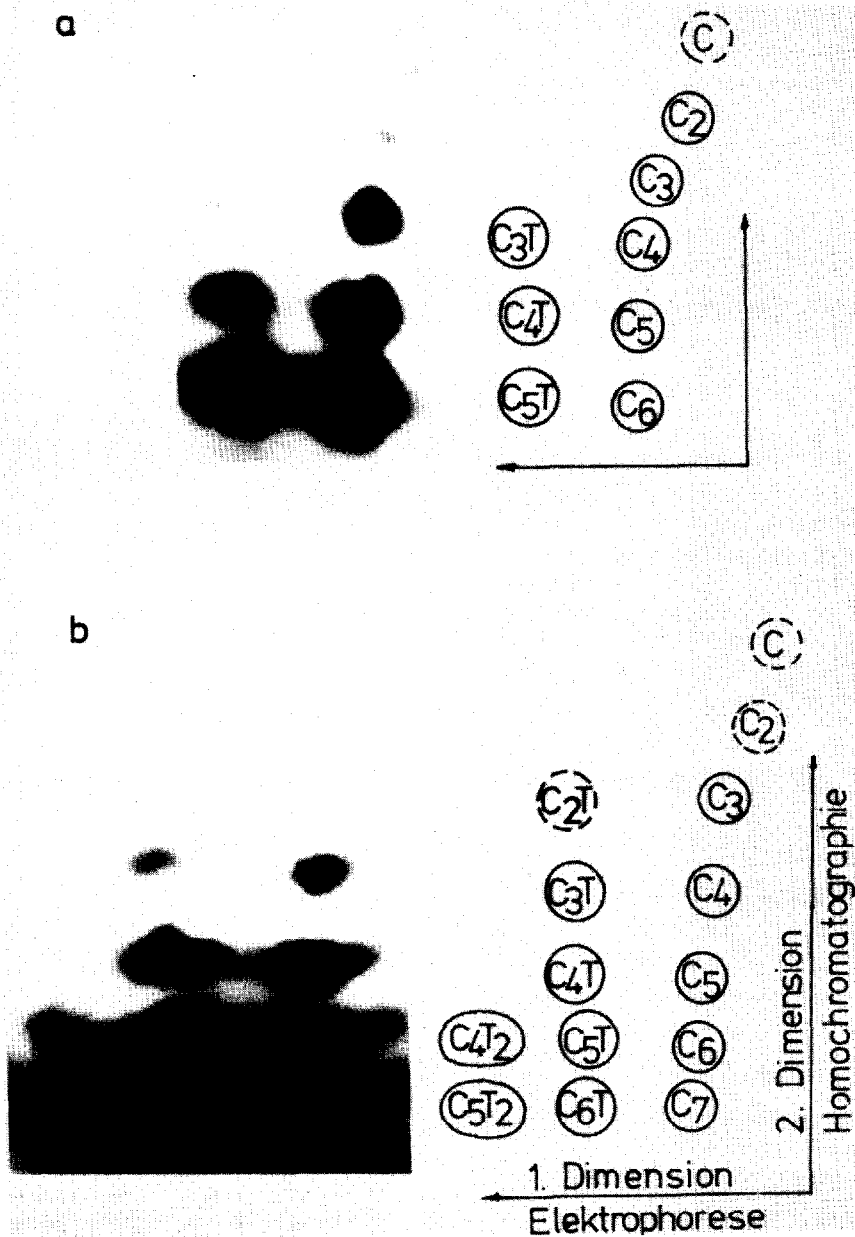


Fig. 5.

(Fortsetzung S. 358)

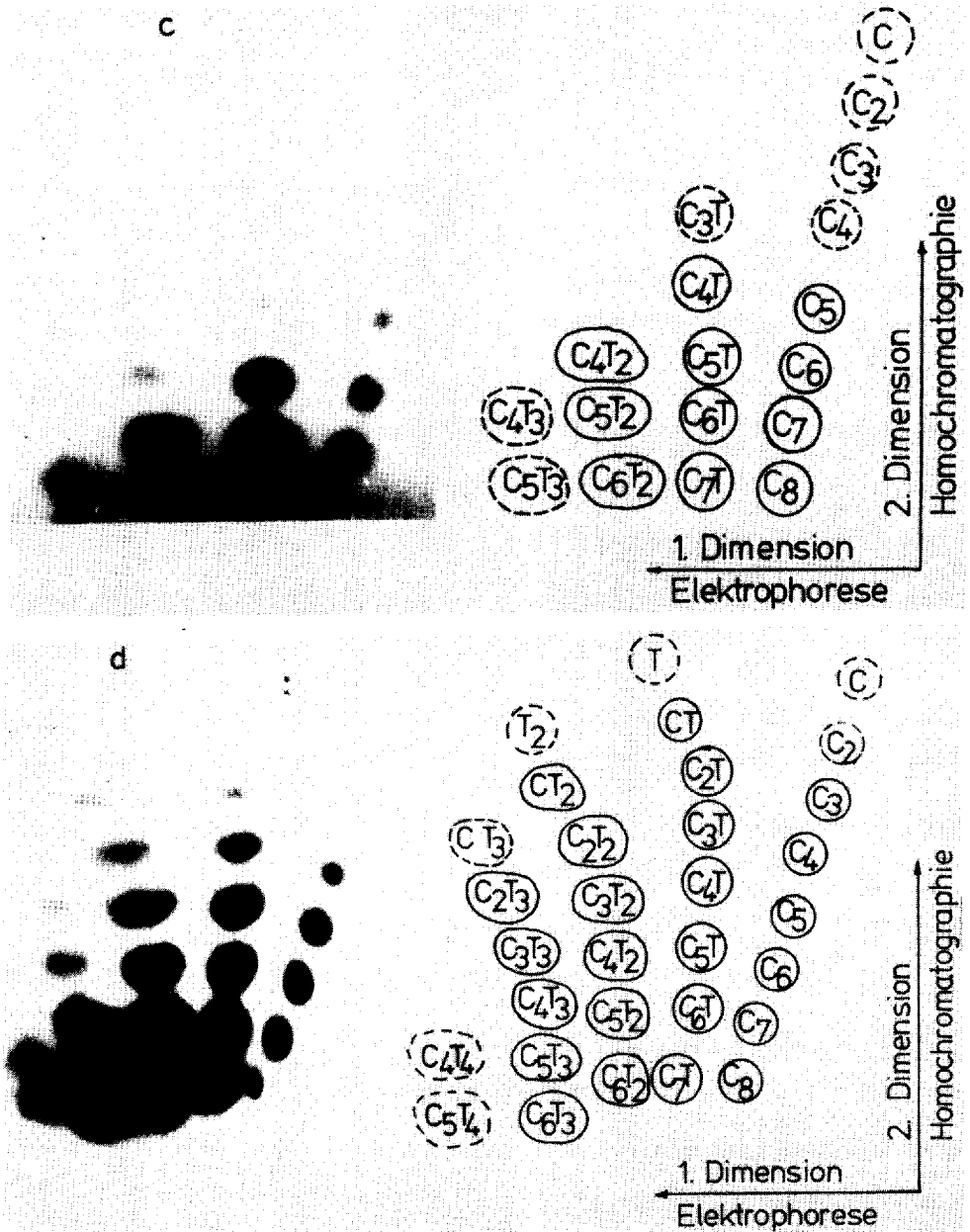


Fig. 5. Autoradiogramme der mit ^{32}P radioaktiv markierten Pyrimidinoligonucleotide, die nach der Rechromatographie an QAE-Sephadex (vgl. Fig. 2b) isoliert, anschliessend enzymatisch partialhydrolysiert und zweidimensional chromatographiert werden. Die zweidimensionale Chromatographie erfolgt nach den Angaben der Fig. 4. "Fingerprint" der Mischung (a) von Hexanucleotiden aus Peak IIa; (b) von Heptanucleotiden aus Peak IIb; (c) von Oktanucleotiden aus Peak IIc; (d) von Okta- und Nonanucleotiden aus Peak IId. Die Bezeichnung der Oligonucleotide und Mischungen von Sequenzisomeren ist vereinfacht wiedergegeben. Zum Beispiel wird das Hexanucleotid $^{32}\text{P}d(\text{C})_6$ durch C_6 abgekürzt, während die Mischung der Sequenzisomeren $^{32}\text{P}d(\text{C}_5, \text{T})$ durch C_5T symbolisiert wird. Der rechte Gang entspricht der Wanderungsstrecke der partialhydrolysierten homologen Cytidylsäuren. In den Gängen links daneben wandern die partialhydrolysierten Gemische der Sequenzisomeren. Der Verlust einer Cytidylateinheit verschiebt den Flecken um $< 90^\circ$ innerhalb eines Ganges nach oben. Der Verlust einer Thymidylateinheit verschiebt den Flecken um ca. 45° in einen benachbarten rechten Gang. Im "Fingerprint" schwach auftretende Flecken der Homologen sind in gestrichelten Kreisen eingetragen.

nigt, durch Ultrafiltration entsalzt und lyophilisiert. Aliquote der Lyophilisate werden radioaktiv markiert und anschliessend homochromatographiert. Aus der Wanderungsstrecke der Pyrimidinoligonucleotide folgt, dass Peak IIa Hexamere, IIb Heptamere, IIc Oktamere und Peak IId Oktamere und Nonamere enthalten. Die zweidimensionale Auftrennung der partialhydrolysierten Pyrimidinoligonucleotide führt zu den in Fig. 5 abgebildeten "Fingerprints", die eher "Handprints" gleichen. Da in allen "Fingerprints" jeweils mehrere Gänge auftreten, enthalten Peak IIa-d keine Einzelsubstanzen, sondern komplex zusammengesetzte Gemische (vgl. Tabelle V).

Jeweils der rechte Gang eines "Fingerprints" stammt von der Reihe homologer Cytidylsäuren. Alle Gänge links daneben resultieren von Mischungen sequenzisomerer Pyrimidinoligonucleotide. Im 1. Gang neben dem der homologen Cytidylsäuren wandern die Sequenzisomeren der Mischung $pd(C_n, T_1)$; links davon die Sequenzisomeren der Mischung $pd(C_n, T_2)$ usw. Mit zunehmendem Anteil an Thymidylateinheiten verschiebt sich der Gang einer Pyrimidinoligonucleotidmischung weiter nach links. Die Anzahl der auftretenden Flecken im Gang der Homologen entspricht der Anzahl der Monomereinheiten der darin wandernden Oligonucleotide. Fehlen in einer Mischung der Sequenzisomeren einige Komponenten dann resultiert ein unvollständiger Gang, wie dies in allen "Fingerprints" der Mischungen aus Peak IIa-d beobachtet wird (vgl. Fig. 5). Dieser Befund entspricht der Erwartung, da alle Sequenzisomeren einer Mischung, denen 3 benachbarte Cytidylsäureeinheiten fehlen, bei der Template-Chromatographie nicht isoliert werden und somit im "Fingerprint" fehlen. Aus technischen Gründen tritt häufig der obere Fleck des rechten Ganges im "Fingerprint" nicht auf. Dieser Schönheitsfehler ist für die Interpretation der "Fingerprints" unerheblich, da die Kettenlänge der Komponenten einer Mischung zusätzlich durch eindimensionale Homochromatographie ermittelt wird.

Die Interpretation der "Fingerprints", die von den Pyrimidinoligonucleotiden aus Peak IIa-d der Fig. 2b erhalten werden, führen zu folgenden Ergebnissen. Im "Fingerprint" von Peak IIa treten 2 Gänge auf. Der rechte Gang, in dem der oberste Fleck pdC fehlt, entspricht dem Partialhydrolysat des Hexanucleotids $pd(C)_6$. Der Gang daneben, in dem die partialhydrolysierten Sequenzisomeren der Mischung $pd(C_5, T)$ wandern, weist nur 3 der zu erwartenden 5 Flecken auf. Demnach fehlen in der Mischung $pd(C_5, T)$ einige der möglichen Sequenzisomeren. Von den 6 denkbaren Sequenzisomeren sind dem "Fingerprint" zufolge allenfalls $pd(C-C-C-C-C-T)$, $pd(C-C-C-C-T-C)$ und $pd(C-C-C-T-C-C)$ in Peak IIa enthalten. Der "Fingerprint" von Peak IIb zeigt 3 Gänge. Der rechte Gang, in dem der obere Fleck pdC wieder fehlt, stammt von dem Partialhydrolysat des Heptanucleotids $pd(C)_7$. Die beiden mehr oder weniger unvollständigen Gänge daneben, in denen die partialhydrolysierten Sequenzisomeren der Mischung $pd(C_6, T)$ und $pd(C_5, T_2)$ wandern, zeigen, dass fast alle Sequenzisomeren der Mischung $pd(C_6, T)$, aber nur wenige der Mischung $pd(C_5, T_2)$ in Peak IIb enthalten sind. Die "Fingerprints" von Peak IIc und IId zeigen 4 und 5 Gänge, wobei im rechten Gang von Peak IIc die oberen 3 pdC , $p(dC)_2$ und $p(dC)_3$; in dem von Peak IId nur der oberste Fleck fehlen. Die 4 Gänge sind dem partialhydrolysierten Oktanucleotid $pd(C)_8$ sowie den Sequenzisomeren aus den Mischungen $pd(C_7, T)$, $pd(C_6, T_2)$ und $pd(C_5, T_3)$ zuzuordnen, von denen aber nicht alle denkbaren Sequenzisomeren in Peak IIc enthalten sind, da besonders die linken Gänge unvollständig sind. In Peak IId sind aufgrund des "Fingerprints" ebenfalls

das partialhydrolysierte Oligonucleotid $pd(C)_8$ (rechter Gang) sowie fast alle Sequenzisomeren der Mischungen $pd(C_7, T)$ und $pd(C_6, T_2)$ enthalten. In dem 4. und 5. Gang wandern einige partialhydrolysierte Sequenzisomere der Mischungen $pd(C_6, T_3)$ und $pd(C_5, T_4)$. Die gleichzeitige Anwesenheit von $pd(C)_8$ sowie der Sequenzisomeren $pd(C_7, T)$ und $pd(C_6, T_2)$ in Peak IIc und IId beruht darauf, dass beide Peaks nur unvollständig getrennt sind (vgl. Fig. 2b).

Die Interpretation der "Fingerprints" steht im Einklang mit der Auslegung analoger "Fingerprints"³⁵, die bei der Sequenzierung von Pyrimidinoligonucleotidgemischen erhalten werden, die zu analytischen Zwecken aus dem Partialhydrolysat der DNA des Lambda Bakteriophagen isoliert werden. Die richtige Auslegung der "Fingerprints" zeigt sich auch darin, dass der steigende, prozentuale Anteil an Thymidylsäuren, der in Peak IIA-d aufgrund der darin enthaltenen Pyrimidinoligonucleotidgemische zu erwarten ist, auf zwei unabhängigen Wegen gefunden wird. Sowohl die sich ändernden Absorptionsverhältnisse als auch die Ergebnisse der enzymatischen Totalhydrolyse belegen, dass der Gehalt an Thymidylsäuren von Peak IIA nach IId zunimmt. Die Absorptionsverhältnisse von 250/260 nm und 280/260 nm betragen bei pH 7 für die Mischung aus Peak IIA 0.82 und 0.92, während das Gemisch von Peak IId Werte von 0.74 und 0.79 aufweist. Im Vergleich hierzu betragen die Werte für Homologe der Cytidylsäure 0.82 und 0.98, für Homologe der Thymidylsäure 0.65 und 0.73. Beim Totalabbau mit Phosphodiesterase aus Schlangengift, der auf einem früher beschriebenen Weg³⁶ durchgeführt wird, werden bei allen Gemischen pdC , pdT , dC und dT gefunden. Auch hierbei ist der prozentuale Anteil von pdT und dT in Peak IId am höchsten.

Die cytidylatreichen Pyrimidinoligonucleotidgemische werden erstmals mit Hilfe der Template-Chromatographie aus dem Partialhydrolysat der Heringsspermen-DNA isoliert und mit den bisher verwendeten chromatographischen Methoden nicht gefunden. Es ist nicht auszuschließen, dass auch die isolierten Pyrimidinoligonucleotide aus längerkettigen Fragmenten hervorgehen, die nach der Template-Chromatographie bei der Aufarbeitung der Peakfraktionen teilweise abgebaut werden, wie dies bei den Purinoligonucleotiden beobachtet wird. Für diese Annahme spricht, dass im ursprünglichen Gemisch Pyrimidinoligonucleotide mit 7 bis 10 Monomereinheiten enthalten sind, während nach zwei Trennschritten nur noch Komponenten mit 6 bis 9 Monomereinheiten gefunden werden.

Bemerkenswert ist, dass Komponenten der Gemische $d(C_3, T_4)$ und $d(C_4, T_3)$ mit Hilfe der Template-Chromatographie nicht aus dem Partialhydrolysat der Heringsspermen-DNA isoliert werden, obwohl solche Gemische mit dem bisher verwendeten Trennungsgang aus diesem Partialhydrolysat in präparativen Mengen erhalten werden. Vermutlich sind in den beiden Mischungen keine Komponenten, die in ihren Sequenzen 3 benachbarte Cytidylsäurereste aufweisen oder sie sind nur in so geringen Mengen vorhanden, dass sie selbst mit der selektiven Template-Chromatographie nicht erfasst werden. Homologe der Cytidylsäuren mit 9 und mehr Monomereinheiten werden in der 0.4 M Fraktion nicht gefunden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Befund, dass aus dem Partialhydrolysat der depyrimidierten Heringsspermen-DNA mit Hilfe der Template-Chromatographie an PVAL-p(dC)_n-DEAE-Cellulose auch keine Homologen der Guanylsäure mit mehr als 8 Monomereinheiten isoliert werden²⁶.

Eine weitere Auftrennung der isolierten Pyrimidinoligonucleotidmischung mit

Hilfe der HPLC an reverser Phase wird in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Der Anteil der Gemische ist im Partialhydrolysat der Heringsspermen-DNA so gering, dass die präparative Isolierung einzelner Komponenten aus diesen Gemischen nicht lohnend erscheint. Zur präparativen Gewinnung von cytidylatreichen Pyrimidinoligonucleotiden ist es zweckmässiger eine "G · C"-reiche DNA anstelle der "A · T"-reichen Heringsspermen-DNA als Ausgangsmaterial zu verwenden.

DISKUSSION

Die Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe der Template-Chromatographie erstmals Purin- und Pyrimidinoligonucleotide gemischter Sequenzen aus teilweise aufgetrennten Partialhydrolysaten einer chemisch abgebauten DNA in präparativen Mengen isoliert werden können. Voraussetzung hierzu ist, dass die gesuchten Oligonucleotide Sequenzen aufweisen, die mindestens 3 benachbarte, homologe Monomereinheiten enthalten, die zu den immobilisierten Oligonucleotiden der stationären Phase komplementär sind. Solche Oligonucleotide werden bei 0°C über den Basenpaarungsmechanismus adsorbiert und bei Temperaturerhöhung desorbiert. Zweckmässigerweise wird zur Desorption die Temperatur so hoch gewählt, dass alle adsorbierten Oligonucleotide auf einmal eluiert werden. In den untersuchten Beispielen reicht zur vollständigen Desorption 30°C, da die komplementären Segmente der Oligonucleotide nur 8 und weniger Monomereinheiten aufweisen, die bei 30°C keine Basenpaare mehr ausbilden^{37,38}. Das Gemisch der desorbierten Oligonucleotide kann anschliessend entweder direkt an einer reversen Phase mit Hilfe der HPLC oder zunächst an QAE-Sephadex und danach an einer reversen Phase in definierte Gemische und/oder Einzelsubstanzen fraktioniert werden. Der zweite Weg ist zwar aufwendiger, führt aber zur besseren Auftrennung der Gemische. Ein Nachteil der Template-Chromatographie liegt bislang darin, dass während der sich anschliessenden Entsalzung der isolierten Produkte einige teilweise zu kürzeren Fragmenten abgebaut werden. Hier von besonders betroffen sind Purinoligonucleotide. Dieser Nachteil liesse sich vermutlich dadurch vermeiden, dass man die Entsalzung nicht mit der Ultrafiltration sondern mit der Gelchromatographie (Sephadex, Biogel) durchführt. Diese Alternative ist allerdings nur für kleine Salzmengen praktikabel.

Die Template-Chromatographie ist in ihrer Selektivität den bisher in den Trennungsgängen verwendeten Verfahren deutlich überlegen. Verschiedene, definierte Gemische sequenzisomerer, cytidylatreicher Pyrimidinoligonucleotide sowie lange Purinoligonucleotide, die bislang in den Partialhydrolysaten der Heringsspermen-DNA nicht gefunden werden, sind mit Hilfe der Template-Chromatographie in präparativen Mengen zugänglich, obwohl ihr Anteil nur 5% oder weitaus weniger der Ausgangsmischung ausmacht. Die "Fingerprints" der isolierten Oligonucleotide beweisen eindeutig, dass die Produkte in ihrer Reinheit synthetischen Oligonucleotiden entsprechen oder diese gar übertreffen. Dieses Ergebnis ist beachtlich, wenn man bedenkt, dass die Einzelsubstanzen aus Gemischen isoliert werden, die einige hundert sehr ähnlicher Substanzen aufweisen.

Die Template-Chromatographie bietet sich vorallem zur Isolierung von länger-kettigen Oligonucleotiden an, die mit den herkömmlichen Trennmethode nicht oder nur mit grossem Aufwand gelingt. Die hohe Selektivität der Methode ermöglicht einerseits Oligonucleotide, die in ihren Sequenzen 3 benachbarte, homologe Mono-

mereinheiten aufweisen, in wenigen Schritten aus komplex zusammengesetzten Gemischen zu isolieren. Andererseits lässt sich mit Hilfe der Template-Chromatographie eine Vielzahl von Oligonucleotiden aus einem komplexen Gemisch aussondern, wodurch die Auftrennung der verbleibenden Mischung mit den herkömmlichen Methoden erheblich vereinfacht wird. Die Anzahl der definierten Oligonucleotide und Gemische von Sequenzisomeren, die aus Partialhydrolysaten einer DNA isoliert werden können, lässt sich mit Hilfe der Template-Chromatographie wesentlich erweitern, zumal ausser der hier verwendeten PVAL-p(dC)_n-DEAE-Cellulose und dem Oligoguanylsäuregel auch PVAL-p(dT)_n³⁹ und PVAL-p(dA)_n-DEAE-Cellulose⁴⁰ zur Verfügung stehen. Die Template-Chromatographie stellt somit eine wertvolle Ergänzung der bisherigen chromatographischen Methoden dar.

DANK

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für die finanzielle Unterstützung. H. W. dankt dem Cusanuswerk für die Gewährung eines Stipendiums.

ZUSAMMENFASSUNG

Purinoligonucleotide werden an Polyvinylalkohol-p(dC)_n-DEAE-Cellulose, Pyrimidinoligonucleotide am Oligoguanylsäuregel bei 0°C über den Basenpaarungsmechanismus adsorbiert, wenn ihre Sequenzen 3 oder mehr benachbarte, homologe Guanilat- oder Cytidylateinheiten aufweisen. Durch Temperaturerhöhung werden alle basengepaarten Oligonucleotide desorbiert. Mit Hilfe dieser Template-Chromatographie werden definierte Purin- oder Pyrimidinoligonucleotidgemische aus fraktionierten Partialhydrolysaten der Heringsspermen DNA säulenchromatographisch isoliert und anschliessend an QAE-Sephadex und/oder Nucleosil C₁₈ nachgetrennt. Auf diesem Weg sind Oligonucleotide mit bis zu 9 Monomereinheiten entweder als Einzelsubstanzen oder als definierte Gemische von Sequenzisomeren in präparativen Mengen zugänglich, die mit den bisher verwendeten Trennungsgängen nicht aus dem Partialhydrolysat der Heringsspermen DNA isoliert werden können. Reinheit und Sequenz der isolierten Oligonucleotide werden mit der "Fingerprint"-Methode bestimmt.

LITERATUR

- 1 V. Habermann, *Collect. Czech. Chem. Comm.*, 28 (1963) 510.
- 2 H. Türler, J. Buchowicz und E. Chargaff, *Biochim. Biophys. Acta*, 195 (1969) 456.
- 3 B. F. Vanyushin und Ya. I. Bur'yanov, *Biokhimiya*, 34 (1969) 546, 718.
- 4 W. E. Cohn und E. Volkin, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 359.
- 5 K. Burton und G. B. Petersen, *Biochem. J.*, 75 (1960) 17.
- 6 G. W. Rushizky und H. A. Sorber, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 14 (1964) 276.
- 7 B. B. Petersen und J. M. Reeves, *Biochim. Biophys. Acta*, 129 (1966) 438.
- 8 H. S. Shapiro, *Methods Enzymol.*, 12A (1967) 205.
- 9 A. L. Mazin und B. F. Vanyushin, *Biokhimiya*, 32 (1967) 377.
- 10 W. D. Sutton und G. B. Petersen, *Biochim. Biophys. Acta*, 174 (1969) 155.
- 11 G. B. Peterson und J. M. Reeves, *Biochim. Biophys. Acta*, 179 (1969) 510.
- 12 M. D. Kirnos, V. K. Vasilyev und B. F. Vanyushin, *J. Chromatogr.*, 104 (1975) 113.

- 13 R. H. Hayashikawa und J. Nagyvary, *Prep. Biochem.*, 8 (1978) 321.
- 14 H. Schott und M. Schwarz, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 358 (1977) 949.
- 15 H. Schott und M. Schwarz, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 359 (1978) 617.
- 16 H. Schott und M. Schwarz, *J. Chromatogr.*, 157 (1978) 197.
- 17 H. Schott, *J. Chromatogr.*, 172 (1979) 179.
- 18 H. Schott, *J. Chromatogr.*, 187 (1980) 119.
- 19 H. Schott und H. Watzlawick, *J. Chromatogr.*, 196 (1980) 435.
- 20 H. Schott, *Makromol. Chem.*, 182 (1981) 2015.
- 21 H. Schott, in H. G. Gassen und A. Lang (Herausgeber), *Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments*, Verlag Chemie, Weinheim, 1982, S. 104.
- 22 H. Schott und H. Schrade, *J. Chromatogr.*, 265 (1983) 257.
- 23 H. Schott und E. Bayer, *Advan. Chromatogr.*, 17 (1979) 187.
- 24 H. Schott, *J. Chromatogr.*, 187 (1980) 119.
- 25 H. Schott, *J. Chromatogr.*, 237 (1982) 429.
- 26 H. Schott und H. Watzlawick, *J. Chromatogr.*, 243 (1982) 57.
- 27 H. Schott und H. Watzlawick, *Makromol. Chem.*, 182 (1981) 119.
- 28 H. Schott und H. Watzlawick, *Makromol. Chem.*, 182 (1981) 825.
- 29 H. Schott und H. Schrade, *J. Chromatogr.*, 284 (1984) 381.
- 30 H. Schott, *J. Chromatogr.*, 284 (1984) 409.
- 31 G. G. Brownlee und F. Sanger, *Eur. J. Biochem.*, 11 (1969) 395.
- 32 E. Jay, R. Bambara, R. Padmanabhan und R. Wu, *Nucleic Acids Res.*, 1 (1974) 331.
- 33 C.-P. D. Tu, E. Jay, C. P. Bahl und R. Wu, *Anal. Biochem.*, 74 (1976) 73.
- 34 R. Frank und H. Blöcker, in H. G. Gassen und A. Lang (Herausgeber), *Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments*, Verlag Chemie, Weinheim, 1982, S. 225.
- 35 D. R. Hewish, K. K. Smith und J. H. Spencer, *Virology*, 74 (1976) 363.
- 36 M. Dizdaroglu, W. Hermes, C. von Sonntag und H. Schott, *J. Chromatogr.*, 169 (1979) 429.
- 37 C. R. Astell, M. T. Doel, P. A. Jahnke und M. Smith, *Biochemistry*, 12 (1973) 5068.
- 38 S. Gillam, K. Waterman und M. Smith, *Nucleic Acids Res.*, 2 (1975) 625.
- 39 H. Schott, *J. Chromatogr.*, 96 (1974) 79.
- 40 H. Schott, *J. Chromatogr.*, 115 (1975) 461.