

CHROM. 20 487

## PRÄPARATIVE DARSTELLUNG VON HOMOLOGEN DER OLIGORIBO- URIDYLSÄURE DURCH SELEKTIVE PARTIALHYDROLYSE VON RNA

HERBERT SCHOTT

*Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, 7400 Tübingen (B.R.D.)*  
(Eingegangen am 10. März 1988)

---

### SUMMARY

#### *Preparative preparation of homologues of oligoribouridylic acid by selective partial hydrolysis of RNA*

The preparation of oligouridylic acids was achieved by the stepwise partial hydrolysis of RNA using enzymatical and chemical methods of degradation followed by chromatographic purification steps. After RNA is submitted first to RNase T<sub>1</sub> and after that to RNase U<sub>2</sub> it is cleaved into oligopyrimidine nucleotides carrying purine nucleotides only at their 3'-terminal. By chemical deamination the pyrimidine sequences are converted to oligouridine sequences. After enzymatical dephosphorylation of the oligouridylic acids their 3'-terminal purine nucleosides are eliminated by a periodate-lysine treatment. The phosphate groups remaining at the 3'-terminal of the resulting oligouridylic acids are enzymatically removed. As a result of the partial hydrolysis the mean recoveries of the particular homologues are U<sub>2</sub>-U<sub>7</sub> 93% and U<sub>8</sub> 86% adding up to about 0.5% of the amount of RNA used as starting material.

---

### EINLEITUNG

Die gezielte enzymatische Partialhydrolyse einer RNA wurde bisher fast ausschliesslich analytisch, wie beispielsweise zur RNA-Sequenzierung genutzt. Wir haben die Frage untersucht, ob die präparative enzymatische Partialhydrolyse einer RNA kombiniert mit chromatographischen Trennschritten, eine praktikable Alternative zur komplizierten chemischen Synthese von Oligoribonukleotiden darstellt.

Da wir in einem anderen Zusammenhang präparative Mengen von Homologen der Oligouridylsäuren benötigten, haben wir RNA schrittweise zu Oligouridylsäuregemischen abgebaut und daraus Homologe mit 2-8 Monomereinheiten in präparativen Mengen isoliert. Der gezielte schrittweise Abbau der RNA gelang durch die Kombination von basenspezifischen enzymatischen Partialhydrolysen, selektiven chemischen Abbaureaktionen und chromatographischen Trennmethode, wie im folgenden berichtet wird.

## EXPERIMENTELLES

*Reagenzien*

Methanol und Formamid "zur Synthese" wurden für die Chromatographie verwendet und vor Gebrauch destilliert. Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), p.A.; Ethylenglycol, "zur Synthese" (Merck, Darmstadt, B.R.D.); L-Lysin · HCl, p.A. (Fluka, Buchs, Schweiz); RNA (Pharma Waldhof, Mannheim, B.R.D.).

*Enzyme*

Alkalische Phosphatase, 2500 U/0,45 ml (Merck); Phosphodiesterase aus *Crotalus durissus*, 1 mg/ml Glycerin, 50% (v/v), ca. 1,5 U; Ribonuclease T<sub>1</sub>, 500 000 U/ml; Ribonuclease U<sub>2</sub>, 4000 U/vial (Boehringer, Mannheim, B.R.D.).

*Chromatographiematerial*

QAE-Sephadex A-25, Sephadex G-15 (Pharmacia, Uppsala, Schweden); Nucleosil 7 C<sub>18</sub> (Machery-Nagel, Düren, B.R.D.); LiChrosorb RP-18, 10 μm (Merck); Partisil-10 SAX (Whatman, Maidstone, England); UM-10 Membran (Amicon, Lexington, MA, U.S.).

*Methoden*

*1. Partialhydrolyse der RNA mit Ribonuclease T<sub>1</sub> und chromatographischer Trennung des Partialhydrolysats (I. Schritt in Schema 2).*

Mengen von 60,6 g (0,5 mol) Tris, 5,8 g (0,02 mol) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 60 g RNA wurden nacheinander in 9,0 l Wasser gelöst. Die Lösung wurde mit 2 M Salzsäure auf pH 7,3 gebracht, mit Wasser auf 10 l aufgefüllt und mit 0,2 ml ( $\cong$  0,83 mkat) einer Ribonuclease T<sub>1</sub> Lösung inkubiert. Der mit Parafilm verschlossene Reaktionsansatz wurde 3 Tage bei 37°C leicht gerührt. Danach wurde die Lösung an einer UM-10 Membran auf ca. 2 l konzentriert, mit 2 l 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) versetzt und auf eine QAE-Sephadex A-25 Säule (75 × 8 cm i.D.) gepumpt. Die Säule wurde bei Raumtemperatur in drei Schritten mit 1,5 l/h eluiert. Im ersten Schritt verliessen in einem linear steigenden Natriumchlorid-Gradienten: 25 l 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) im Mischgefäß und 25 l 0,3 M Natriumchlorid-25 mM Tris-HCl (pH 7,5) im Vorratsgefäß, niedermolekulare Spaltprodukte die Säule, die nicht isoliert wurden. Im zweiten Schritt wurde die Elution mit 10 l 0,3 M Natriumchlorid-25 mM Tris-HCl (pH 7,5) und im dritten Schritt mit 20 l 0,5 M Natriumchlorid-25 mM Tris-HCl (pH 7,5) fortgesetzt. Die Eluate des zweiten und dritten Schritts wurden jeweils am Rotationsverdampfer soweit konzentriert bis Salz ausfiel. Das Salz wurde abgesaugt und das Filtrat an einer UM-10 Membran durch Ultrafiltration entsalzt. Gemittelt aus drei Ansätzen ergaben das lyophilisierte Retentat der "0,3 M Fraktion" 6,6 g (11%) und das der "0,5 M Fraktion" 18 g (30%).

*2. Enzymatischer Abbau und Desaminierung der 0,3 M und 0,5 M Fraktion aus Sektion 1 und chromatographische Trennung (II. Schritt in Schema 2) der Abbau-  
produkte*

*2.1. Spaltung mit Ribonuclease U<sub>2</sub>.* Ein Volumen von 950 ml Wasser wurde mit 2,86 ml (50 mmol) Eisessig versetzt, durch Zugabe von 13 ml 2 M Natriumhydroxid

auf pH 4,5 gebracht und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. In dem erhaltenen Puffer wurden nacheinander 0,58 g (2 mmol) EDTA und 5 g der 0,3 M oder 0,5 M Fraktion aus Sektion 1 gelöst und mit 0,1 ml (= 6,7  $\mu$ kat) einer Ribonuclease U<sub>2</sub> Stammlösung inkubiert. Die Stammlösung enthielt 4000 U/ml 20 mM Natriumacetat (pH 4,5). Der mit Parafilm verschlossene Reaktionsansatz wurde 4–6 Tage bei 37°C leicht gerührt, anschliessend an einer UM-10 Membran entsalzt und lyophilisiert. Hierbei wurden von den 0,3 M Pyrimidinnucleotiden, gemittelt aus vier Ansätzen, 3,5 g (70%) und von der 0,5 M Pyrimidinnucleotiden, gemittelt aus zehn Ansätzen, 3,9 g (78%) erhalten.

2.2. *Desaminierung der enzymatisch gespaltenen 0,3 M und 0,5 M Pyrimidinnucleotide aus Sektion 2.1 (III. Schritt im Schema 2)*. In 1,67 l Wasser wurden jeweils 5 g der enzymatisch gespaltenen 0,3 M oder 0,5 M Pyrimidinnucleotide gelöst. Die Lösung wurde mit 90 g Natriumnitrit versetzt, mit 330 ml Eisessig auf pH 3,35 gebracht und dann 50 h bei Raumtemperatur belassen, wobei sie von Zeit zu Zeit aufgerührt wurde. Anschliessend wurde der Reaktionsansatz unter Kühlen mit 5 M Natriumhydroxid neutralisiert, an einer UM-10 Membran entsalzt und lyophilisiert. Von den enzymatisch abgebauten und desaminierten 0,3 M Pyrimidinnucleotiden wurden, gemittelt aus zwei Ansätzen, 3,0 g (60%) und von den entsprechend behandelten 0,5 M Pyrimidinnucleotiden wurden, gemittelt aus sechs Ansätzen, 4,1 g (82%) erhalten.

2.3. *Chromatographische Trennung der enzymatisch abgebauten und desaminierten Pyrimidinnucleotide aus Sektion 2.2 (siehe Fig. 1, Tabelle I)*. Die Lyophilisate aus Sektion 2.2 wurden jeweils in einem Puffer aus 7 M Harnstoff–25 mM Tris–HCl (pH 7,5) gelöst, wobei für 6,6 g Lyophilisat 300 ml dieses Puffers verwendet wurden. Die Lösung wurde auf eine QAE-Sephadex A-25 Säule (70 × 3 cm i.D.) aufgetragen, die mit dem gleichen Puffer äquilibriert war. Zur Trennung der Abbauprodukte der 0,3 M Pyrimidinnucleotide wurde die Säule mit einem linear steigenden Natriumchlorid-Gradienten: 25 l 25 mM Tris–HCl (pH 7,5)–7 M Harnstoff im Mischgefäss und 25 l 0,4 M Natriumchlorid–25 mM Tris–HCl (pH 7,5)–7 M Harnstoff im Vorratsgefäss, bei 55°C mit 300 ml/h eluiert (siehe Fig. 1a). Zur Fraktionierung der abgebauten 0,5 M Pyrimidinnucleotide wurde die Säule mit dem gleichen Gradienten eluiert, dem aber anschliessend 2 l 1 M Natriumchlorid folgten (siehe Fig. 1b). Die Absorption der Eluate wurde bei 254 nm automatisch gemessen und führte zu den Elutionsprofilen der Fig. 1. Fraktionen zu ca. 250 ml wurden gesammelt und innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt. Zur Entfernung von Harnstoff wurden die vereinigten Fraktionen mit Wasser auf das 2,5-fache Volumen verdünnt und auf eine QAE-Sephadex Säule (5 × 5 cm i.D.) aufgetragen. Nachdem die Säule mit Wasser chloridfrei gewaschen war, wurden die adsorbierten Oligonucleotide mit ca. 300 ml 1 M Natriumchlorid eluiert. Die eluierten Oligonucleotide wurden in Mengen bis zu 15 000 A<sub>260</sub>-Einheiten an einer Sephadex G-15 Säule (80 × 4 cm i.D.), in darüber hinausgehenden Mengen an einer UM-10 Membran entsalzt. Entsalzte Oligonucleotide aus Peaks gleicher Nummern wurden aus beiden Trennungen vereinigt und lyophilisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengefasst.

3. *Enzymatische Dephosphorylierung der vereinigten Lyophilisate von Peak I–VIII der Fig. 1 und chromatographische Trennung (I. Schritt, Schema 3) der Abbauprodukte (siehe Fig. 2, Tabelle II)*

Die 3'-terminalen Phosphatgruppen der Oligonucleotide aus den Lyophilisaten

von Peak I–VIII der Fig. 1 wurden nach folgender allgemeiner Vorschrift entfernt, die der jeweiligen abzubauenen Menge entsprechend angepasst wurde. Das Lyophilisat (0.5 g) wurde in 3 ml Wasser und 2 ml 0,25 M Tris–HCl (pH 8,6) gelöst und mit 75  $\mu$ l ( $\cong \mu$ kat) einer Lösung alkalischer Phosphatase *ca.* 2 h bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde der Reaktionsansatz mit Wasser auf 30 ml verdünnt und an einer QAE-Sephadex A-25 Säule bei Raumtemperatur chromatographiert siehe Fig. 2. Für die unterschiedlich grossen Ansätze wurde die gleiche Säule (70  $\times$  3 cm i.D.) verwendet. Die Säule, die mit 50 mM Natriumchlorid–25 mM Tris–HCl (pH 7,5) äquilibriert war, wurde mit einem linear steigenden Natriumchlorid-Gradienten mit 400 ml/h eluiert. Zur Fraktionierung der dephosphorylierten Lyophilisate von Peak I–IV wurden 5 l 0,1 M Natriumchlorid–25 mM Tris–HCl (pH 7,5) im Mischgefäss und 5 l 0,4 M Natriumchlorid–25 mM Tris–HCl (pH 7,5) in Vorratsgefäss verwendet. Die Elution der dephosphorylierten Lyophilisate von Peak V–VIII erfolgte mit 10 l 0,1 M Natriumchlorid–25 mM Tris–HCl (pH 7,5) im Mischgefäss und 10 l 0,7 M Natriumchlorid–25 mM Tris–HCl (pH 7,5) im Vorratsgefäss. Nachdem die dephosphorylierten Oligonucleotide die Säule verlassen hatten, wurde die Elution abgebrochen. In Fig. 2 wurden nur die Abschnitte der automatisch registrierten Elutionsprofile abgebildet, in denen Peaks auftraten. Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung wurden vereinigt, an einer Sephadex G-15 Säule (80  $\times$  4 cm i.D.) entsalzt und lyophilisiert. Die Mengen der erhaltenen Lyophilisate sind in Tabelle II zusammengefasst.

#### 4. Entfernung der 3'-terminalen Purinnucleotide der Oligonucleotide aus Sektion 3 (II. Schritt in Schema 3)

4.1. *Oxidative Spaltung des 3'-terminalen Nucleosids mit Natriumperjodat.* Zur oxidativen Spaltung des 3'-terminalen Riboserestes und anschliessender Eliminierung des terminalen Nucleosidrestes wurden die Lyophilisate von Peak Ia, IIa, IVa, VIa, VIIa, b, VIIIa–d der Fig. 2, in einem Puffer aus 25 mM Natriumperjodat–1 M Lysin · HCl (pH 8.1) gelöst und auf 45°C erwärmt. Für 0,25 g Lyophilisat wurden 25 ml des Puffers verwendet. Zur Kontrolle des Reaktionsverlaufs wurden dem Reaktionsansatz im Abstand von 30 min 20  $\mu$ l entnommen und mit Hilfe Hochleistung-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) an einer Partisil-10 SAX Säule (250  $\times$  4,6 mm i.D.) bei Raumtemperatur mit 1 ml/min fraktioniert. Die Säule wurde zunächst 3 min mit 1 mM Ammoniumsulfat (pH 5,0) in Formamid–Wasser (3:2, v/v) eluiert. Anschliessend wurde der Anteil an Ammoniumsulfat in 25 min linear von 1 mM auf 250 mM erhöht. Die Absorption des Eluats wurde automatisch bei 280 nm aufgezeichnet. Stellvertretend für die übrigen Reaktionen wurde in Fig. 3 das Elutionsprofil aufgeführt, das beim Abbau des Lyophilisate von Peak IVa der Fig. 2d erhalten wurde. Sobald das 3'-terminale Nucleosid nach *ca.* 70 min abgespalten war, wurde der Reaktionsansatz auf 20°C gekühlt, mit 3 ml 1 M Ethylenglykol versetzt und nach 15 min an einer Sephadex G-15 Säule (80  $\times$  4 cm i.D.) von niedermolekularen Verbindungen befreit. Alle UV-absorbierenden Fraktionen, die vor den niedermolekularen Abbauprodukten die Säule verliessen, wurden vereinigt, auf 50 mM Natriumchlorid–25 mM Tris–HCl (pH 7,5) gebracht und anschliessend an einer QAE-Sephadex A-25 Säule nachgetrennt. Die Rechromatographie (siehe Fig. 4) erfolgte in Analogie zur Fraktionierung der Lyophilisate aus Sektion 3. Innerhalb der senkrechten Strichelung wurden die Fraktionen vereinigt, an einer Sephadex G-15 Säule (80  $\times$  4 cm i.D.)

entsalzt und lyophilisiert. Die Ergebnisse wurden in Tabelle III zusammengefasst.

4.2. *Enzymatische Dephosphorylierung der Uridylsäuren aus Sektion 4.1 (III. Schritt in Schema 3) und anschließende chromatographische Trennung (siehe Fig. 5, Tabelle IV).* Die aus Sektion 4.1 erhaltenen Lyophilisate wurden wie in Sektion 2 beschrieben mit alkalischer Phosphatase behandelt und anschließend an QAE-Sephadex A-25 chromatographiert. Zur Fraktionierung des dephosphorylierten Lyophilisats von Peak IVa 1 (siehe Fig. 5a) wurde die Säule mit 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit einem linear steigenden Gradienten eluiert: 10 l 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) im Mischgefäß; 10 l 0,7 M Natriumchlorid-25 mM Tris-HCl (pH 7,5) im Vorratsgefäß. Die übrigen Reaktionsgemische wurden mit 10 l 0,1 M Natriumchlorid-25 mM Tris-HCl (pH 7,5) im Mischgefäß und 10 l 0,7 M Natriumchlorid-25 mM Tris-HCl (pH 7,5) im Vorratsgefäß chromatographiert. Die Elution wurde ausser bei Fig. 5 abgebrochen, wenn der erste Hauptpeak die Säule verlassen hatte. In Fig. 5l wurden nur die Bereiche der Elutionsprofile abgebildet, in denen Peaks auftraten, deren Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, entsalzt und lyophilisiert wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengefasst.

#### 5. *Reversed-phase HPLC der Oligouridylsäuren*

Zur analytischen HPLC wurde eine Nucleosil 7 C<sub>18</sub> Säule (250 × 4,6 mm i.D.) verwendet, die präparative HPLC erfolgte an einer LiChrosorb RP-18 Säule (250 × 32 mm i.D.). Analytische Proben wurden in 20 µl und präparative in 800 µl des jeweiligen Eluens gelöst, mit dem die Elution gestartet wurde. Die Chromatographie wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei die Flussraten in analytischen Läufen 1 ml/min und in präparativen 10 ml/min betragen. Die Elutionen wurden automatisch bei 260 nm gemessen und aufgezeichnet. Der prozentuale Anteil der Peaks in den jeweiligen Elutionsprofilen der analytischen Läufe wurde durch automatische Integration der Peakflächen bestimmt.

5.1. *Analytische reversed-phase HPLC der Oligouridylsäuren.* Die HPLC (siehe Fig. 6) von Aliquots der lyophilisierten Peakfraktionen aus Fig. 5 (siehe Sektion 4.2) erfolgte mit einer Mischung aus A: 10 mM Ammoniumacetat (pH 5,6) und B: 10 mM Ammoniumacetat (pH 5,6) in Methanol-Wasser (4:1; v/v), wobei der B-Anteil von anfangs 10% in 25 min linear auf 30% erhöht wurde. In Fig. 6 wurden nur die vorderen Bereiche der Elutionsprofile abgebildet, in denen die Hauptpeaks auftraten. Die prozentualen Anteile der Peaks wurden in Tabelle IV zusammengefasst. Lyophilisate mit Hauptbestandteilen kleiner als 95% wurden mit Hilfe der präparativen HPLC rechromatographiert (siehe Sektion 5.2).

Die HPLC von Aliquots der isolierten Oligouridylsäuren (siehe Fig. 8, Tabelle V) erfolgte unter isokratischen Bedingungen mit einer Mischung aus 10 mM Ammoniumacetat (pH 5,6) und Methanol, wobei der Methanolanteil mit zunehmender Kettenlänge der Oligonucleotide erhöht wurde.

5.2. *Präparative reversed-phase HPLC (siehe Fig. 7) der Oligouridylsäuren aus Sektion 4.2.* Die Lyophilisate der aufgearbeiteten Fraktionen von Peak c, e, g-l der Fig. 5 wurden an einer präparativen Säule mit einem Gemisch aus A: 10 mM Ammoniumacetat (pH 5,6) und B: Methanol chromatographiert, wobei der Methanolanteil von anfangs 5% in 50 min linear auf 12% erhöht wurde. Anschliessend wurde die Elution e-i mit dem Gemisch A-B (88:12) solange fortgesetzt, bis der jeweilige Hauptpeak die

Säule verlassen hatte. Peakfraktionen der Fig. 7 wurden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt und durch mehrmaliges Lyophilisieren von Ammoniumacetat befreit. Lyophilisate, deren Aliquots an einer analytischen Säule gleiche Retentionen zeigten, wurden vereinigt. Die Ergebnisse sind in Tabelle V zusammengefasst.

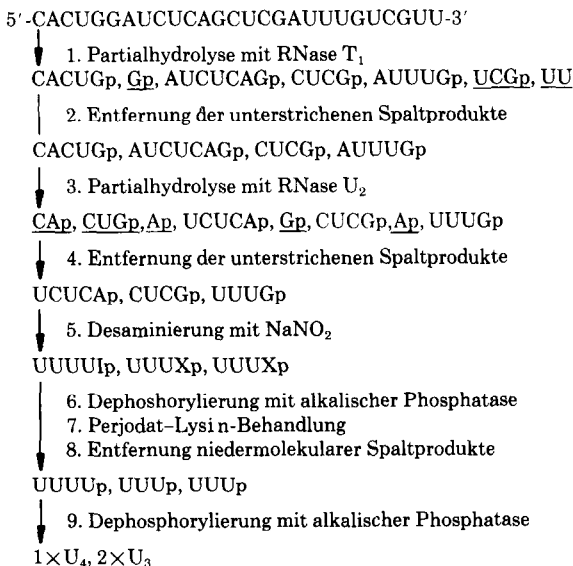
#### 6. Enzymatische Totalhydrolyse der isolierten Oligouridylsäuren

Etwa drei  $A_{260}$ -Einheiten der jeweiligen Oligouridylsäuren wurden in 30  $\mu$ l Wasser–20  $\mu$ l 150 mM Tris–HCl (pH 8,1)–10  $\mu$ l 100 mM Magnesiumchlorid gelöst und mit 10  $\mu$ l Phosphodiesterase aus Schlangengift 1–2 h bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle der enzymatischen Hydrolyse wurden 10  $\mu$ l des Reaktionsgemisches an einer analytischen Nucleosil 7 C<sub>18</sub> Säule (100 × 4,6 mm i.D.) mit 1 ml/min chromatographiert. Die HPLC erfolgte mit einer Mischung aus A: 50 mM Ammoniumacetat (pH 5,6) und B: 50 mM Ammoniumacetat (pH 5,6) in Methanol–Wasser (4:1, v/v), wobei der B-Anteil von anfangs 0% innerhalb von 15 min, auf 20% erhöht wurde.

Die restlichen 20  $\mu$ l des Reaktionsansatzes wurden mit 5  $\mu$ l alkalischer Phosphatase versetzt und weitere 30 min bei 37°C belassen. Abschliessend wurden 10  $\mu$ l des Ansatzes unter den obigen Bedingungen chromatographiert (siehe Fig. 9).

### ERGEBNISSE

Der schrittweise Abbau einer RNA zu einem Gemisch von Oligouridylsäuren basierte auf den Reaktionen, die am Beispiel eines hypothetischen Polyribonucleotids in Schema 1 zusammengefasst wurden. In der dort angegebenen Sequenz wurden zur besseren Übersicht die seltenen Nucleobasen, die in einer natürlichen RNA zusätzlich auftreten, nicht aufgeführt.



Schema 1. Schrittweiser Abbau eines hypothetischen Polyribonucleotids in ein Gemisch von Oligouridylsäuren.

Im 1. Schritt wurde die RNA mit Hilfe der guanylsäurespezifischen Endonuclease  $T_1$  partialhydrolysiert. Das Enzym spaltet Phosphorsäurediesterbindungen einer RNA zwischen den 3'-Guanylsäureeinheiten und den 5'-Hydroxylgruppen der Nachbarnucleotide<sup>1</sup>. Hierbei werden neben Guanosinmononucleotiden (Gp) vor allem RNA-Fragmente gebildet, die ein Gp-3'-Ende aufweisen. Nach der Entfernung der niedermolekularen Spaltprodukte (2. Schritt) wurden die verbliebenen RNA-Fragmente im 3. Schritt mit der Endonuclease  $U_2$  partialhydrolysiert.

Die purinspezifische RNase  $U_2$  hydrolysiert die Phosphorsäurediesterbindungen einer RNA zwischen sowohl den 3'-Guanylsäure- als auch 3'-Adenylsäureeinheiten und den 5'-Hydroxylgruppen der Nachbarnucleotide<sup>2</sup>. Nach dem Entfernen der niedermolekularen Spaltprodukte (4. Schritt) resultierten Oligopyrimidinnucleotide, die am 3'-Ende ein Purinnucleotid tragen.

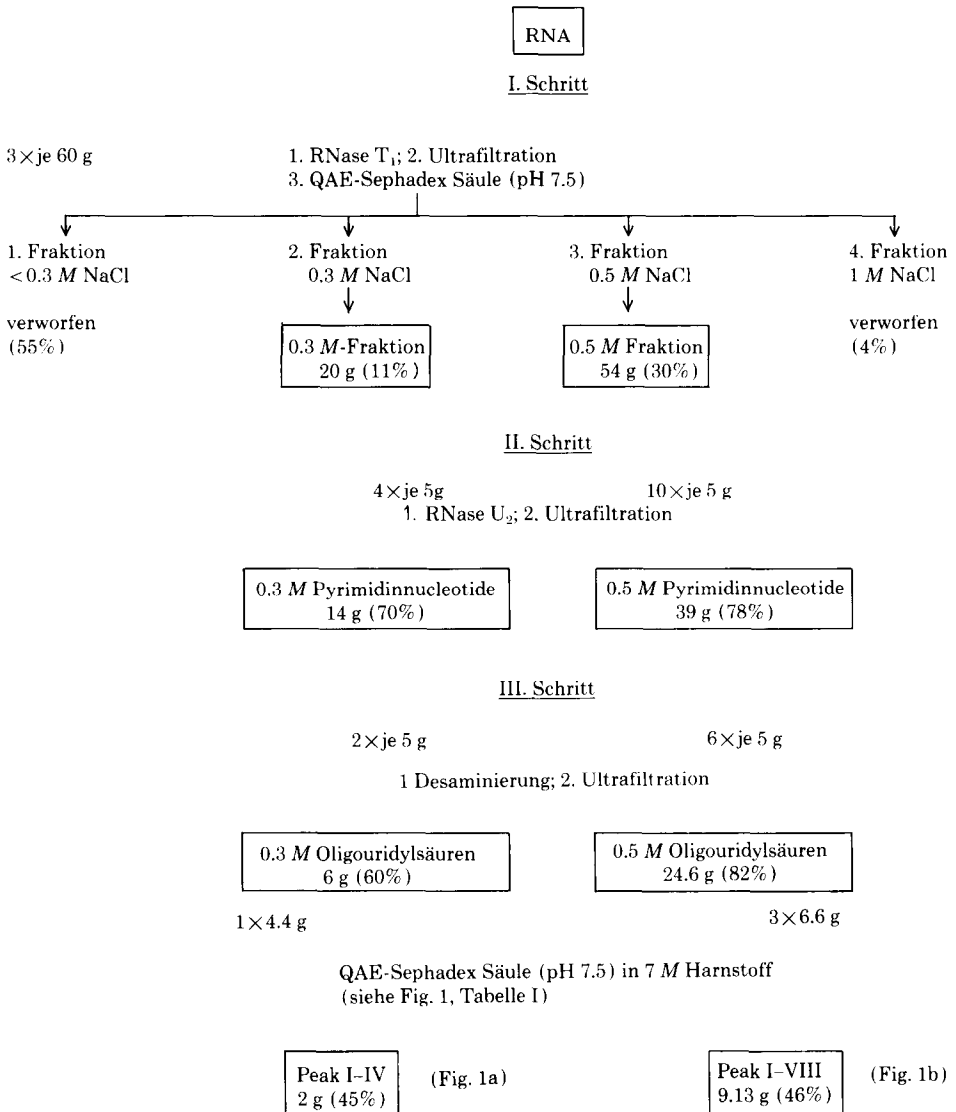
Nach den beiden enzymatischen Hydrolysen folgte im 5. Schritt eine chemische Desaminierung mit Natriumnitrit. Hierbei wurden die Nucleobasen Cytosin in Uracil, Guanin in Xanthin, Adenin in Hypoxanthin und die Oligopyrimidinnucleotide somit in Oligouridylsäuren überführt. Nach der Desaminierung wurden im 6. Schritt die 3'-terminalen Phosphatreste mit alkalischer Phosphatase abgespalten, wobei Oligouridylsäuren resultierten, die nur am 3'-Ende ein Purinnucleosid trugen. Im 7. Schritt wurden die 3'-terminalen Purinnucleoside durch Oxidation ihrer vicinalen 2',3'-Hydroxylgruppen mit Natriumperjodat<sup>3</sup> in Anwesenheit von Lysin selektiv abgespalten. Nach Entfernen der niedermolekularen Spaltprodukte (8. Schritt) wurden die 3'-Phosphatreste der erhaltenen Oligouridylsäuren mit alkalischer Phosphatase hydrolysiert (9. Schritt). Am Ende der schrittweisen Partialhydrolyse der RNA und chromatographischen Aufarbeitung resultierten Homologe der Oligouridylsäure.

Im folgenden Teil der Arbeit wird die schrittweise Partialhydrolyse am Beispiel des Abbaus von 180 g RNA quantitativ beschrieben, Bedingungen und Ergebnisse wurden in Schema 2 und 3 zusammengefasst. Zum Abbau von 180 g RNA wurden im I. Schritt (Schema 2) drei Ansätze zu je 60 g mit RNase  $T_1$  inkubiert. Der Verlauf der enzymatischen Spaltung der RNA konnte mit Hilfe der freigesetzten Mononucleotide (Gp) indirekt verfolgt werden. Zu diesem Zweck wurden im Abstand von *ca.* 24 h dem Reaktionsansatz Aliquots entnommen und an einer Sephadex G-15 Säule gelchromatographisch in Mono- und Oligonucleotide fraktioniert. Aus den  $A_{260}$ -Einheiten der beiden Hauptpeaks wurde der prozentuale Anteil der Monomeren, die jeweils im zweiten Hauptpeak die Säule verliessen, grob ermittelt. Im Verlauf von 3 Tagen stieg der prozentuale Anteil der Monomeren im Partialhydrolysat an und blieb etwa nach 4 Tagen konstant. Dann wurde das Hydrolysat an einer UM-10 Membran auf etwa 1/5 seines ursprünglichen Volumens konzentriert. Hierbei wurden teilweise niedermolekulare Spaltprodukte entfernt.

Zur weiteren Entfernung vorallem der Mono- und Dimeren wurde das konzentrierte Partialhydrolysat an einer Anionenaustauschersäule (QAE-Sephadex) im steigenden Natriumchlorid-Gradienten, der auf pH 7,5 gepuffert war, in vier Fraktionsbereiche getrennt, die Oligonucleotide zunehmender Ladung enthielten. Die erste Fraktion, die mit  $<0.3 M$  Natriumchlorid eluiert wurde, machte 55% des Partialhydrolyсата aus und enthielt fast ausschliesslich Mono- und Dinucleotide, die verworfen wurden. RNA-Fragmente, die in der zweiten und dritten Fraktion die Säule mit  $0.3 M$  und  $0.5 M$  Natriumchlorid verliessen, wurden isoliert. 4% des Partialhydrolyсата, die erst mit  $1 M$  Natriumchlorid eluiert wurden, bildeten die vierte

Fraktion, die aber aufgrund der starken Verunreinigungen verworfen wurde. Die Gesamtmenge der isolierten 0.3 M Fraktion aus den drei Ansätzen betrug 20 g (11%), während von der 0.5 M Fraktion 54 g (30%) isoliert wurden. Nach der Partialhydrolyse von 180 g RNA mit RNase T<sub>1</sub> blieben nur noch 74 g (41%) RNA-Fragmente übrig, die im II. Schritt (Schema 2) mit RNase U<sub>2</sub> weiter abgebaut wurden.

Die 0.3 M Fraktion wurde in vier Ansätzen, die 0.5 M Fraktion in zehn Ansätzen zu je 5 g mit RNase U<sub>2</sub> inkubiert. Nach 4–6 Tagen wurde das Partialhydrolysat, sobald



Schema 2. Schrittweiser Abbau einer RNA zu Oligouridylsäuren, die 3'-terminale Purinnucleotidreste tragen.



der prozentuale Anteil der freigesetzten Monomeren konstant blieb, an einer UM-10 Membran entsalzt und dabei auch weitgehend von den niedermolekularen Spaltprodukten befreit. Nach dem Lyophilisieren der vereinigten Retentate blieben von der 0.3 M Fraktion insgesamt 14 g (70%) und von der 0.5 M Fraktion 39 g (78%) an 0.3 M beziehungsweise 0.5 M Pyrimidinnucleotiden übrig, die an ihren 3'-Enden Purinmononucleotide trugen.

Nach der enzymatischen Spaltung wurden die Lyophilisate im III. Schritt (Schema 2) jeweils in 5 g Ansätzen mit Natriumnitrit bei pH 3.3 chemisch desaminiert, anschliessend mit Natriumhydroxid neutralisiert und wieder an einer UM-10 Membran entsalzt. Nach der Desaminierung und Aufarbeitung der 0.3 M Pyrimidinnucleotide wurden insgesamt 6 g (60%) Oligouridylsäuren erhalten, während von den 0.5 M Pyrimidinnucleotiden 24.6 g (82%) übrigblieben. Der verhältnismässig hohe Verlust, der vor allem bei der Desaminierung der 0.3 M Fraktion auftrat, war sicherlich dadurch bedingt, dass bei der ersten Ultrafiltration nach der RNase U<sub>2</sub>-Behandlung die niedermolekularen Spaltprodukte nur unvollständig entfernt wurden. Es ist allerdings nicht auszuschliessen, dass während der Desaminierung Kettenbrüche auftraten, wodurch erneut kurze RNA-Fragmente gebildet und bei der weiteren Ultrafiltration entfernt wurden.

Die Lyophilisate wurden anschliessend an einer Anionenaustauschersäule (QAE-Sephadex) bei pH 7.5 unter Zusatz von 7 M Harnstoff im steigenden Natriumchlorid-Gradienten in Komponenten zunehmender Ladung fraktioniert (siehe Fig. 1). Beide Lyophilisate enthielten etwa 55% Mono- und Dimere, die in den

11.13 g Oligouridylsäuren mit terminalen Purinnucleotidresten (Fig. 1, Tabelle I)  
Peak: I-VIII

I. Schritt

1. Dephosphorylierung; 2. QAE-Sephadex Säule (pH 7.5)

4.32 g (38.8%) Oligouridylsäuren mit 3'-terminalen Purinnucleosidresten (Fig. 2, Tabelle II)

2.82 g Peak: Ia, IIa, IVa, VIa; VIIa,b; VIIIa-d

II. Schritt

1.25 mM NaJO<sub>4</sub>-1 M Lysin (pH 8.1), 45°C; 2. Sephadex G-15 Säule (pH 7.5); 3. QAE-Sephadex Säule (pH 7.5); 4. Sephadex G-15 Säule

1.45 g (51.2%) Oligouridylsäuren mit 3'-terminalen Phosphatresten (Fig. 4, Tabelle III)

Peak: IIa1; IVa1; VIa1; VIIa1,b1; VIIIa1,b1,c1,d1  
a2 a2 d2

III. Schritt

1. Dephosphorylierung; 2. QAE-Sephadex Säule (pH 7.5)

740 mg (51%) Oligouridylsäuren U<sub>2</sub>-U<sub>3</sub> (Fig. 5, Tabelle IV)

Präparative HPLC an reverser-Phase (Fig. 7)

545 mg (73.6%) chromatographisch reine Homologe U<sub>2</sub>-U<sub>3</sub> (Fig. 8, Tabelle V)

Schema 3. Schrittweise Entfernung von 3'-terminalen Purinnucleotidresten der Oligouridylsäuren (Peak I-VIII) aus Schema 2.

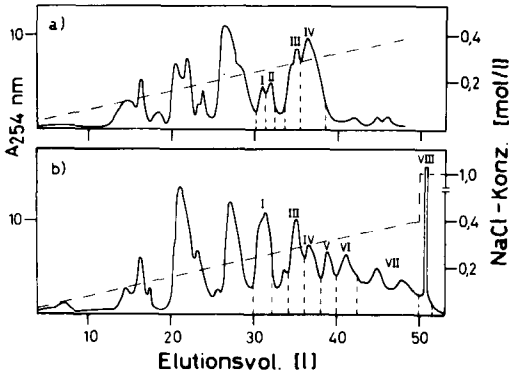


Fig. 1. Präparative Trennungen der enzymatisch abgebauten und desaminierten 0,3 *M* und 0,5 *M* Pyrimidinnucleotide an eine QAE-Sephadex A-25 Säule (70 × 3 cm i.D.). Die abgebildeten Ausschnitte der Elutionsprofile zeigen in (a) die Fraktionierung von 4,4 g der 0,3 *M* Oligouridyssäuren; (b) die Trennung von 6,6 g der 0,5 *M* Oligouridyssäuren. Die Elution erfolgte mit 300 ml/h bei 55°C in einem linear steigenden Natriumchlorid-Gradienten, der mit 25 mM Tris-HCl auf pH 7,5 gepuffert und mit 7 *M* Harnstoff versetzt war. In (b) wurde die Elution nach dem Gradienten mit 1 *M* Natriumchlorid fortgesetzt. Peakfraktionen wurden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, entsalzt und lyophilisiert. Die Lyophilisate der Peaks gleicher Nummern wurden aus beiden Trennungen vereinigt. Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengefasst.

Peaks vor Peak I eluiert und verworfen wurden. Die in Peak I–VIII eluierten Oligouridyssäuren wurden isoliert (siehe Tabelle I). Zum weiteren Abbau wurden die Lyophilisate der Peaks gleicher Nummern aus allen Läufen vereinigt.

Die selektive Eliminierung der 3'-terminalen Purinnucleotide erforderte drei Reaktionsschritte, die in Schema 3 zusammengefasst wurden. Im I. Schritt wurden mit alkalischer Phosphatase terminale Phosphatgruppen der Oligouridyssäuren entfernt und die Lyophilisate anschließend an einer QAE-Sephadex Säule rechromato-

#### TABELLE I

ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNGEN VON (a) 4,4 g DER DESAMINIERTEN 0,3 *M* PYRIMIDINNUCLEOTIDE (FIG. 1a) UND (b) 3 × 6,6 g DER DESAMINIERTEN 0,5 *M* PYRIMIDINNUCLEOTIDE (FIG. 1b)

Aufgearbeitete Fraktionen von Fig. 1.

Peak	Isolierte Mengen aus (a)		Isolierte Mengen aus (b)	
	g	%	g	%
I	0,30	6,8	2,01	10,2
II	0,35	7,9	—	—
III	0,66	15,0	1,21	6,1
IV	0,69	15,7	1,08	5,5
V	—	—	0,47	2,4
VI	—	—	0,66	3,3
VII	—	—	1,16	5,9
VIII	—	—	2,54	12,8

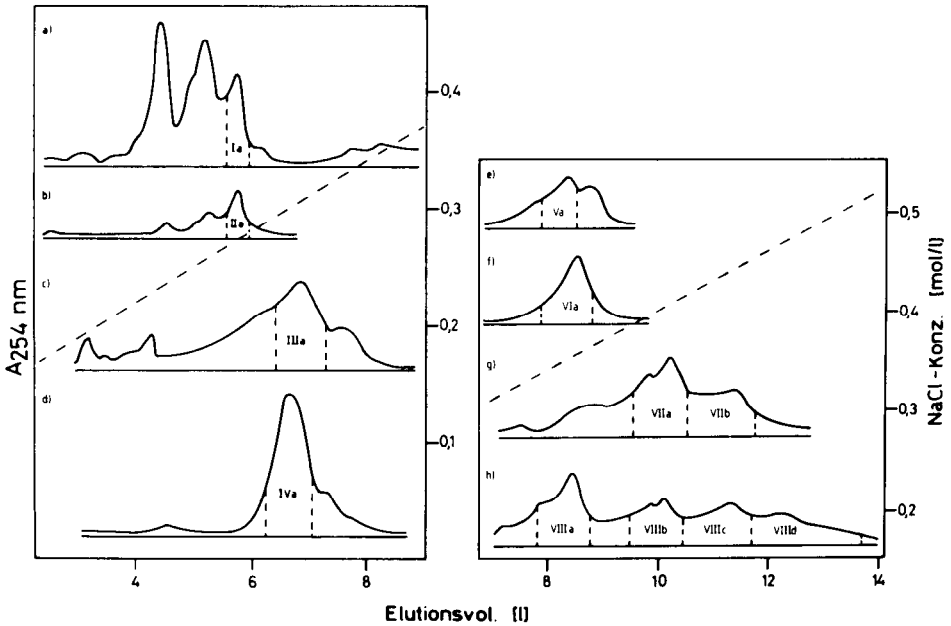


Fig. 2. Präparative Trennung der enzymatisch desphosphorylierten Lyophilisate von Peak I-VIII der Fig. 1 an einer QAE-Sephadex A-25 Säule (70 × 3 cm i.D.), Vorsäule (6 × 1,5 cm i.D.). Von den jeweiligen Lyophilisaten wurden zwischen 0,35 g und 2,5 g desphosphoryliert und bei Raumtemperatur mit einem linear steigenden Natriumchlorid-Gradienten, der mit 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) gepuffert war, mit 400 ml/h fraktioniert. Die abgebildeten Ausschnitte der Elutionsprofile (a) bis (h) zeigen die Trennungen der desphosphorylierten Oligouridylsäuren aus Peak I-VIII. Peakfraktionen wurden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, entsalzt und lyophilisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle II zusammengefasst.

TABELLE II

ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNGEN (FIG. 2) DER DESPHOSPHORYLIERTEN LYOPHILISATE VON PEAK I-VIII DER FIG. 1

Dephosphoryliertes Lyophilisat			Aufgearbeitete Fraktionen			
Peak	Fig. 1	Menge (g)	Peak	Fig. 2	Isolierte Menge	
					mg	%
I	a, b	2,31	Ia	a	320	13,9
II	a	0,35	IIa	b	100	28,6
III	a, b	1,87	IIIa	c	470	25,1
IV	a, b	1,77	IVa	d	950	53,7
V	b	0,47	Va	e	230	48,9
VI	b	0,66	VIa	f	480	72,7
VII	b	1,16	VIIa	g	260	22,4
			VIIb	g	230	19,8
VIII	b	2,54	VIIIa	h	360	14,2
			VIIIb	h	320	12,6
			VIIIc	h	290	11,4
			VIII d	h	310	12,2

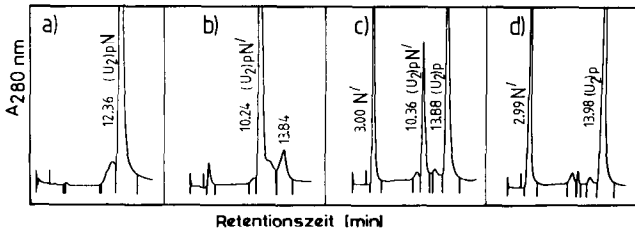


Fig. 3. Analytische Trennungen von Reaktionsprodukten, die bei der Perjodatoxidation eines Aliquots von  $(U_2)pN$  (Peak IVa, Fig. 2d) gebildet wurden. Die HPLC erfolgte an einer Partisil-10 SAX Säule ( $250 \times 4,6$  mm i.D.) mit 1 ml/min bei Raumtemperatur. Die Säule wurde zunächst 3 min mit 1 mM Ammoniumsulfat (pH 5,0) in Formamid-Wasser (3:2; v/v) eluiert. Dann wurde der Anteil an Ammoniumsulfat in 25 min linear von 1 mM auf 250 mM erhöht. Die Ausschnitte der Elutionsprofile zeigen in (a)  $(U_2)pN$  vor der Perjodatoxidation. Nach der Zugabe von 25 mM Natriumperjodat in 1 M Lysin · HCl (pH 8,1) wurden nach 3 min, 35 min und 70 min die Elutionsprofile (b), (c) und (d) erhalten. Der Riboserest (N) des Trinucleotids  $(U_2)pN$  wurde innerhalb von 3 min zum Aldehyd (N') oxidiert und im Verlauf von 70 min eliminiert, wobei  $(U_2)p$  als Endprodukt gebildet wurde.

graphiert (siehe Fig. 2). Nach dem Verlust der Phosphatgruppen verließen die Oligonucleotide bei niedrigeren Salzkonzentrationen die Säule als vor der Dephosphorylierung, so dass die nicht abgebauten Verbindungen gut abgetrennt werden konnten. Die UV-Absorptionsverhältnisse: 250/260, 280/260, 290/260 nm der gesammelten Fraktionen wurden bei pH 7 und pH 2 bestimmt. Fraktionen, die den Verhältnissen für Uridinmonophosphat: 0,76, 0,36, 0,04 am nächsten kamen, wurden vereinigt und aufgearbeitet (siehe Tabelle II). Für die folgenden Reaktionen wurden die Lyophilisate von Peak Ia und IIa vereinigt; die von Peak IIIa und Va wurden aufgrund zu schlechter UV-Absorptionsverhältnisse nicht weiter verwertet. Für den weiteren Abbau mit Natriumperjodat standen somit insgesamt nur noch 3,62 g (32,5%) zur Verfügung, da 67,5% der eingesetzten 11,13 g entweder nicht dephosphoryliert oder aufgrund zu schlechter UV-Absorptionsverhältnisse verworfen wurden.

In Vorversuchen wurden mit Hilfe von 0,8 g die optimalen Reaktionsbedingungen ermittelt, so dass dann für den eigentlichen Perjodabbau (II. Schritt, Schema 3) nur noch 2,82 g verfügbar waren). Die selektive Abspaltung der 3'-terminalen Purinnucleoside mit Hilfe von Natriumperjodat-Lysin wurde an Aliquots verfolgt, die nach der Perjodatzugabe den Reaktionsansätze der jeweiligen Lyophilisate von Zeit zu Zeit entnommen wurden. Die Proben wurden an einer analytischen Anionenaustauschersäule (Partisil-10 SAX) mit Hilfe der HPLC fraktioniert. Stellvertretend für die übrigen Reaktionen wurden in Fig. 3 die Elutionsprofile abgebildet, die beim Perjodatabbau von  $(U_2)pN$  (Peak IVa, Fig. 2d) erhalten wurden. Aus den auftretenden Reaktionsprodukten folgte, dass bereits nach 3 min der Riboserest (N) fast vollständig um Dialdehyd (N') oxidiert war. Im Verlauf von 70 min wurde der Dialdehyd zusammen mit der Nucleobase eliminiert, wobei Oligouridylsäuren mit 3'-terminalen Phosphatresten als Endprodukte der Perjodatspaltung gebildet wurden. Sobald das terminale Nucleosid eliminiert war, wurde der Reaktionsansatz durch Zugabe von Ethylenglykol gestoppt und an einer Sephadex G-15 Säule von niedermolekularen Spaltprodukten befreit. Die im Ausschlussvolumen eluierten Komponenten wurden isoliert und anschließend an einer QAE-Sephadex

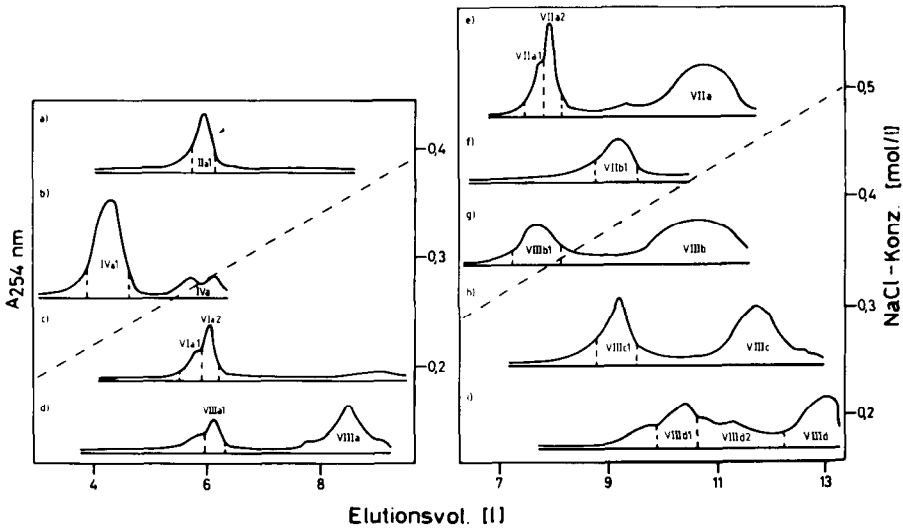


Fig. 4. Präparative Trennungen der mit Natriumperjodat abgebauten Oligouridyli-säuren aus den aufgearbeiteten Peakfraktionen der Fig. 2. Die Trennungen erfolgten an einer QAE-Sephadex A-25 Säule nach den in Fig. 2 angegebenen Bedingungen. Von den Lyophilisaten wurden zwischen 230 und 380 mg oxidiert. Die abgebildeten Ausschnitte der Elutionsprofile wurden bei der Chromatographie folgender abgebauter Lyophilisate erhalten: (a) Gemisch aus Ia und IIa; (b) IVa; (c) VIa; (d) VIIIa; (e) VIIa; (f) VIIb; (g) VIIb; (h) VIIIc; (i) VIIIc. Peakfraktionen wurden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt und aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefasst.

TABELLE III

ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNGEN (FIG. 4) DER MIT NATRIUMPERJODAT ABGEBAUTEN LYOPHILISATE PEAKS Ia-VIII d DER FIG. 2

Abgebautes Lyophilisat			Aufgearbeitete Peakfraktionen			
Peak	Fig. 2	Menge (mg)	Peak	Fig. 4	Isolierte Menge	
					mg	%
Ia	a	} 320	IIa 1	a	200	62,5
+ IIa	b					
IIIa*	c	470	—	—	—	—
IVa	d	350	IVa 1	b	270	77,1
Va*	e	230	—	—	—	—
VIa	f	380	VIa 1	c	100	26,3
			VIa 2	c	140	36,8
VIIa	g	260	VIIa 1	e	50	19,2
			VIIa 2	e	70	26,9
VIIb	g	230	VIIb 1	f	125	54,3
VIIIa	h	360	VIIIa 1	d	120	33,3
VIIIb	h	320	VIIIb 1	g	100	31,3
VIIIc	h	290	VIIIc 1	h	115	39,7
VIII d	h	310	VIII d 1	i	80	25,8
			VIII d 2	i	75	24,2

\* Kein Abbau mit Periodat

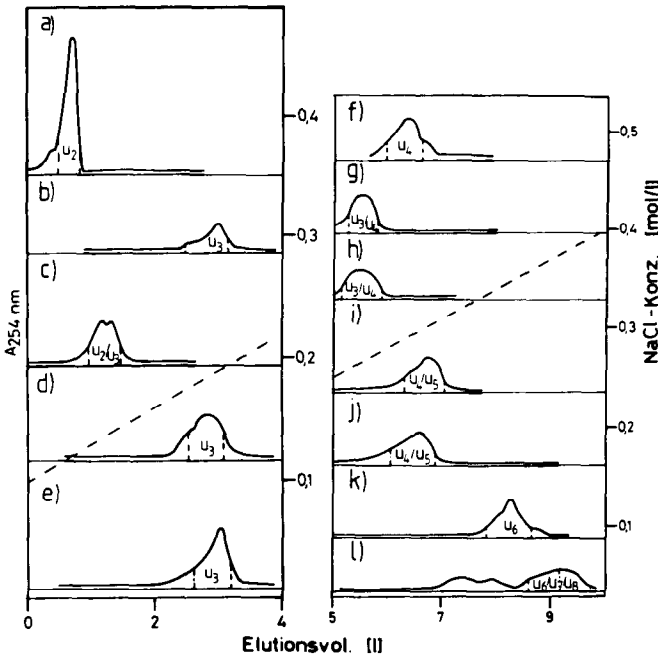


Fig. 5. Präparative Trennungen der enzymatisch dephosphorylierten Oligouridylsäuren aus den Peakfraktionen der Fig. 4. Von den jeweiligen Lyophilisaten wurden zwischen 50 und 270 mg dephosphoryliert und nach den in Fig. 2 angegebenen Bedingungen an eine QAE-Sephadex A-25 Säule chromatographiert. Die abgebildeten Bereiche der Elutionsprofile wurden bei der Chromatographie folgender dephosphorylierter Lyophilisate erhalten: (a) IVa 1; (b) IIa 1; (c) VIa 1; (d) VIa 2; (e) VIIIa 1; (f) VIIa 2; (g) VIIa 1; (h) VIIIb 1; (i) VIIb 1; (j) VIIIc 1; (k) VIIIId 1; (l) VIIIId 2. Peakfraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung wurden aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengefasst.

Säule im steigenden Natriumchlorid-Gradienten jeweils in zwei Hauptpeaks getrennt (siehe Fig. 4). Im ersten Peak wurden bei niedriger Salzkonzentration die gewünschten abgebauten Oligouridylsäuren eluiert, deren Fraktionen vereinigt, entsalzt und lyophilisiert wurden (siehe Tabelle III). Nicht abgebaute Verbindungen, die ca. 50% der Reaktionsgemische ausmachten, verließen jeweils im zweiten Hauptpeak bei höheren Salzkonzentrationen die Säule. Diese Reihenfolge war überraschend, da die Oligouridylsäuren nach dem Abbau mit Perjodat eine 3'-terminale Phosphatgruppe und somit formal eine zusätzlich negative Ladung aufwiesen. Aufgrund der höheren negativen Ladung sollten die abgebauten Oligouridylsäuren am Anionenaustauscher stärker retardiert werden als die Ausgangsverbindungen. Die unerwartet starke Retardierung der nicht abgebauten Oligonucleotide wurde vermutlich durch zusätzliche Wechselwirkungen unbekannter Reste verursacht. Für die Anwesenheit solcher Reste oder auch von "Fremdbasen" in den nicht abgebauten Verbindungen sprach, dass die Fraktionen des zweiten Hauptpeaks in der Regel deutlich schlechtere UV-Absorptionsverhältnisse als die abgebauten Oligonucleotide aufwiesen. Die Produkte aus den zweiten Peaks zeigten ausserdem auch bei einer erneuten Perjodat-zugabe keine Abbaureaktionen, so dass sie verworfen wurden. Nach dem Perjodatabbau verblieben für die weiteren Reaktionen insgesamt noch 1.45 g (51.2%) der eingesetzten 2.82 g Oligouridylsäuren.

TABELLE IV

ERGEBNISSE DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNGEN (FIG. 5) DER DEPHOSPHORYLIERTEN OLIGOURIDYLSÄUREN AUS PEAKS DER FIG. 4

<i>Dephosphoryliertes Lyophilisat</i>			<i>Aufgearbeitete Peakfraktionen aus Fig. 5 Isolierte Oligonucleotide</i>				
<i>Peak</i>	<i>Fig. 4</i>	<i>Menge (mg)</i>		<i>Menge</i>		<i>Bezeichn.</i>	<i>Anteil* (%)</i>
				<i>mg</i>	<i>%</i>		
IVa 1	b	270	a	80	29,6	U <sub>2</sub>	98
IIa 1	a	200	b	110	55,0	U <sub>3</sub>	98
VIa 1	c	100	c	60	60,0	U <sub>2</sub> /U <sub>3</sub>	17/62
VIa 2	c	140	d	90	64,3	U <sub>3</sub>	97
VIIIa 1	d	120	e	70	58,3	U <sub>3</sub>	78
VIIa 2	e	50	f	40	80,0	U <sub>4</sub>	98
VIIa 1	e	70	g	60	85,7	U <sub>3</sub> /U <sub>4</sub>	62/16
VIIIb 1	g	100	h	50	50,0	U <sub>3</sub> /U <sub>4</sub>	14/83
VIIIb 1	f	125	i	50	40,0	U <sub>4</sub> /U <sub>5</sub>	17/80
VIIIc 1	h	115	j	60	52,2	U <sub>4</sub> /U <sub>5</sub>	11/80
VIII d 1	i	80	k	50	62,5	U <sub>6</sub>	86
VIII d 2	i	75	l	10	13,3	U <sub>6</sub> /U <sub>7</sub>	?/64
				10	13,3	U <sub>7</sub> /U <sub>8</sub>	?/16

\* Bestimmt durch analytische reverse-Phase HPLC (siehe Fig. 6).

Im III. Schritt (Schema 3) wurden die Lyophilisate enzymatisch dephosphoryliert und anschliessend an einer QAE-Sephadex Säule im steigenden Natriumchlorid-Gradienten fraktioniert (siehe Fig. 5). Die UV-Absorptionsverhältnisse im An- und Abstieg der jeweiligen Peaks wiesen deutlich schlechtere Werte auf, als die der Gipelfraktionen, so dass nur die Gipelfraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt wurden. Nach deren Aufarbeitung wurden insgesamt nur noch ca. 51% der eingesetzten Menge erhalten (siehe Tabelle IV). Aliquots der isolierten Oligouridylsäuren wurden an einer analytischen reverse-Phase Säule mit Hilfe der HPLC untersucht (siehe Fig. 6). Hierbei zeigte sich, dass in den verschiedenen Lyophilisaten der Peaks der Fig. 5 bereits sehr reine neben verunreinigten Einzelsubstanzen, aber auch noch Gemische von Homologen der Oligouridylsäuren enthalten waren.

Lyophilisate, deren Hauptprodukte in der analytischen HPLC weniger als 95% ausmachten, wurden an einer präparativen reverse-Phase Säule (LiChrosorb) rechromatographiert (siehe Fig. 7). Hierbei wurden nicht nur die Gemische in die einzelnen Komponenten getrennt, sondern auch die Einzelsubstanzen von Verunreinigungen befreit, die durch die Chromatographie an Anionenaustauschern nicht entfernt werden konnten. Aufgrund der UV-Absorptionsverhältnisse wurden nur die Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung isoliert und lyophilisiert. Zur Überprüfung der Reinheit wurden Aliquots aller Lyophilisate abschliessend an einer analytischen reverse-Phase Säule unter isokratischen Bedingungen rechromatographiert (siehe Fig. 8). Lyophilisate, deren Komponenten im analytischen Lauf die gleichen Retentionszeiten aufwiesen, wurden vereinigt. Nach dem letzten präparativen

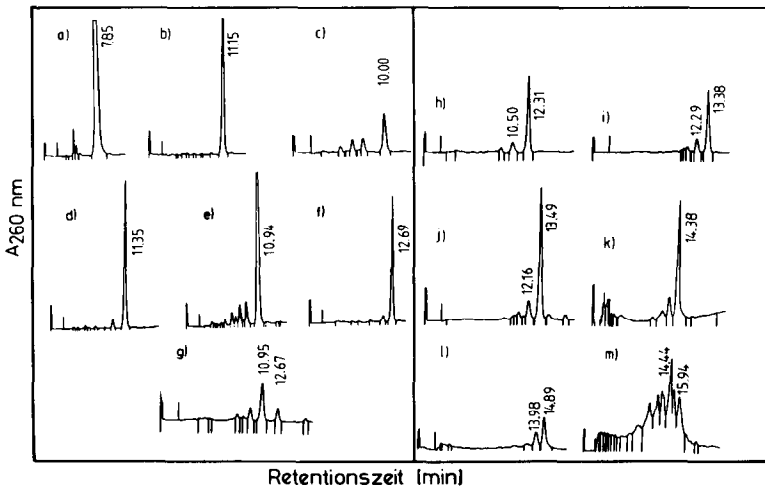


Fig. 6. Analytische Trennungen von Aliquots der aufbereiteten Peakfraktionen aus Fig. 5 an einer Nucleosil C<sub>18</sub> Säule (250 × 4,6 mm i.D.). Die HPLC erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Mischung aus A: 10 mM Ammoniumacetat (pH 5,6) und B: 10 mM Ammoniumacetat (pH 5,6) in Methanol-Wasser (4:1; v/v), wobei der B-Anteil von anfangs 10% in 25 min linear auf 30% erhöht wurde. Die Oligonucleotide verließen die Säule mit 1 ml/min im Bereich folgender Retentionszeiten: U<sub>2</sub>, 7,85 min; U<sub>3</sub>, 10,00–11,35 min; U<sub>4</sub>, 12,16–12,69 min; U<sub>5</sub>, 13,38–13,49 min; U<sub>6</sub>, 13,98–14,38 min; U<sub>7</sub>, 14,44–14,89 min; U<sub>8</sub>, 15,94 min. Bei der Chromatographie von Peak a–k (Fig. 5) wurden die Ausschnitte der Elutionsprofile (a)–(k) erhalten. Das Elutionsprofil der Mischung U<sub>6</sub>/U<sub>7</sub> (Fig. 51) wurde in (l); das der Mischung U<sub>7</sub>/U<sub>8</sub> (Fig. 51) in (m) abgebildet. Die prozentualen Anteile der Hauptpeaks wurden in Tabelle IV aufgeführt.

Reinigungsschritt blieben von den eingesetzten 740 mg insgesamt noch 545 mg (73,6%) an chromatographisch reinen Homologen der Oligouridylsäure übrig, die in Tabelle V aufgeführt wurden.

Die Sequenz der isolierten Oligouridylsäuren wurde mit bekannten Methoden in Analogie zur Sequenzierung von Oligodesoxyribothymidylsäuren<sup>4</sup> indirekt aus den Ergebnissen bestimmt, die bei der enzymatischen Totalhydrolyse von Aliquots der isolierten Oligouridylsäuren erhalten wurden. Mit Phosphodiesterase aus Schlangengift wurden die Oligonucleotide zunächst schrittweise vom 3'- zum 5'-Ende zu Uridin-5'-monophosphat (pU) und Uridin (U) abgebaut. Die jeweiligen Totalhydrolysate wurden an einer Nucleosil C<sub>18</sub>-Säule getrennt. Aus den Verhältnissen der automatisch integrierten Peakflächen von U zu pU ergab sich die Kettenlänge der abgebauten Oligouridylsäuren. Die Verhältnisse von U:pU stiegen von 1:1 für U<sub>2</sub> auf 1:6 für U<sub>7</sub>. Die Werte für U<sub>8</sub> waren dagegen nicht eindeutig. Zur Identifizierung der Monomereinheiten wurden das Totalhydrolysat anschliessend noch mit alkalischer Phosphatase inkubiert. Hierdurch wurden alle Mononucleotide in Nucleoside überführt. Die dephosphorylierten Totalhydrolysate wurden erneut an einer Nucleosil Säule chromatographiert (siehe Fig. 9). Hierbei zeigte sich, dass nur im Totalhydrolysat von U<sub>5</sub>, U<sub>7</sub> und U<sub>8</sub> Spuren von Inosin und Xanthosin auftraten, so dass die isolierten Homologen der Oligouridylsäure praktisch keine "falschen" Monomereinheiten in ihren Sequenzen trugen.



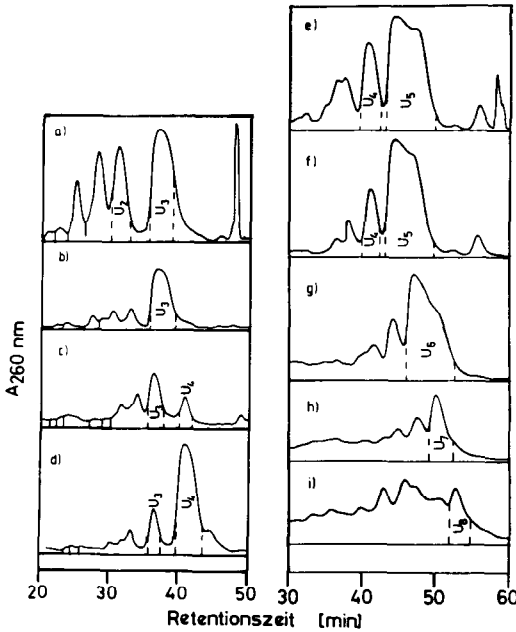


Fig. 7. Präparative Rechromatographie der Oligouridylsäuren aus Fig. 5 an einer LiChrosorb 10 RP-18 Säule (250 × 32 mm i.D.). Die HPLC erfolgte mit 10 ml/min bei Raumtemperatur mit einer Mischung aus A: 10 mM Ammoniumacetat (pH 5,6) und B: Methanol. Der Methanolanteil von anfangs 5% wurde in 50 min linear auf 12% erhöht. In (e) bis (i) wurde die Elution anschließend weitere 10 min mit einem Gemisch aus 88% A und 12% B fortgesetzt. Die abgebildeten Ausschnitte der Elutionsprofile zeigen in (a) bis (g) die Hauptpeaks, die bei der Rechromatographie der Lyophilisate aus (c), (e), (g)–(k) der Fig. 5 auftraten. Die Elutionsprofile der Gemische U<sub>6</sub>/U<sub>7</sub> und U<sub>7</sub>/U<sub>8</sub> (Fig. 5f) sind in (h) und (i) abgebildet. Die innerhalb der senkrechten Strichelung gereinigten Eluate wurden lyophilisiert.

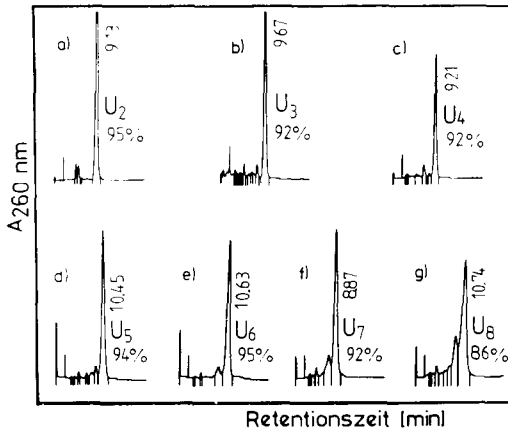


Fig. 8. Analytische Trennungen von Aliquots der isolierten Oligouridylsäuren (siehe Tabelle V) an einer Nucleosil C<sub>18</sub> Säule (250 × 4,6 mm i.D.). In (a) bis (g) sind die Anfangsbereiche der Elutionsprofile abgebildet, die bei der HPLC von U<sub>2</sub> bis U<sub>8</sub> erhalten wurden. Die Säule wurde bei Raumtemperatur unter isokratischen Bedingungen mit einer Mischung aus 10 mM Ammoniumacetat (pH 5,6) und Methanol eluiert (1 ml/min). Der Methanolanteil betrug in den Läufen (a) bis (g) jeweils: 8,7%; 9,5%; 10,2%; 10,7%; 11,1%; 11,5% beziehungsweise 11,7%. Die Prozentangaben 86–95% entsprechen den Anteilen der integrierten Peakflächen.

TABELLE V

OLIGOURIDYLSÄUREN, DIE DIREKT UND NACH DER PRÄPARATIVEN HPLC (FIG. 7) AUS DEN PEAKFRAKTIONEN DER FIG. 5 ISOLIERT WURDEN

Uridylsäure	Isolierte Menge		Reinheit* (%)	Absorptionsverhältnisse (pH 7)		
	A <sub>260</sub> -Einh.	mg		250/260 nm	280/260 nm	290/260 nm
U <sub>2</sub>	2200	76	95	0,79	0,36	0,05
U <sub>3</sub>	6050	275	92	0,78	0,34	0,03
U <sub>4</sub>	3300	151	92	0,79	0,34	0,04
U <sub>5</sub>	850	30	94	0,78	0,35	0,04
U <sub>6</sub>	270	10	95	0,80	0,34	0,03
U <sub>7</sub>	55	2	92	0,81	0,33	0,04
U <sub>8</sub>	15	1	86	0,84	0,34	0,04

\* Bestimmt durch analytische reverse-Phase HPLC (siehe Fig. 8).

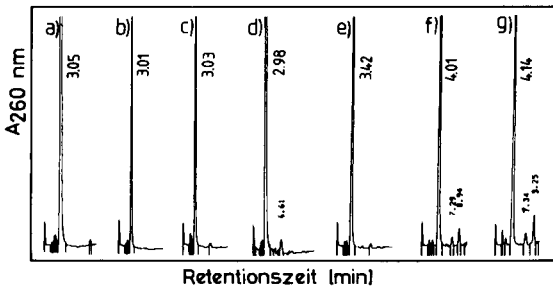


Fig. 9. Analytische Trennungen von Nucleosiden, die bei der enzymatischen Totalhydrolyse von ca. 1,0 A<sub>260</sub>-Einheiten der isolierten Oligouridylsäuren (U<sub>2</sub>-U<sub>8</sub>, siehe Tabelle V) gebildet wurden. Die HPLC erfolgte an einer Nucleosil C<sub>18</sub> Säule (100 × 4,6 mm i.D.) bei Raumtemperatur mit 1 ml/min. Die Säule wurde mit einer Mischung aus A: 50 mM Ammoniumacetat (pH 5,6) und B: 50 mM Ammoniumacetat (pH 5,6) in Methanol-Wasser (4:1, v/v) eluiert, wobei der B-Anteil von anfangs 0% innerhalb von 15 min linear auf 20% erhöht wurde. In (a) bis (g) sind die Anfangsbereiche der Elutionsprofile abgebildet, die bei der HPLC der Totalhydrolysate von U<sub>2</sub> bis U<sub>8</sub> erhalten wurden. Die Retentionszeiten der Nucleoside betragen: Uridin 2,98-4,14 min; Inosin 6,61-7,34 min und Xanthosin 8,94-9,25 min.

## DISKUSSION

RNA, die als biotechnisches Produkt leicht zugänglich ist, kann nach dem hier beschriebenen Konzept mit einfach zu praktizierenden Methoden zu "HPLC reine" Homologen der Oligouridylsäure abgebaut werden. Dieser Weg bietet sich besonders dann an, wenn komplizierte chemische Syntheseverfahren nicht praktiziert werden können und präparative Mengen an definierten Oligoribonucleotiden benötigt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die zahlreichen seltenen Nucleobasen, die bekanntlich in RNA-Sequenzen vertreten sind, im Verlauf der schrittweisen Partialhydrolyse eliminiert werden. Dieses Resultat ist erfreulich, da die verwendeten Abbaureaktionen bezüglich der seltenen Nucleobasen verhältnismässig unspezifisch sind. Es liegt daher

nahe, dass vorallem die multidimensionale präparative Chromatographie wesentlich dazu beiträgt, dass "falsche RNA-Fragmente" nach und nach abgetrennt und dabei die gewünschten Oligouridylsäuren entsprechend angereichert werden. Aus diesem Grund sind sorgfältige chromatographische Reinigungen nach jedem Abbauschritt sowie die Verwendung unterschiedlicher chromatographischer Systeme (Anionenaustausch; reversed-Phase) unentbehrlich, wenn "HPLC-reine" Endprodukte angestrebt werden. Der mögliche Verzicht auf Reinigungsschritte im Verlauf der schrittweisen Partialhydrolyse verkürzt das Verfahren zwar erheblich, führt aber nur zu verunreinigten Endprodukten.

Mit der präparativen Isolierung des Oktameren ist die Grenze der Methode erreicht. Ausserdem sind längere Pyrimidinnucleotidsequenzen in der "technischen RNA" allenfalls in so geringen Anteilen vertreten, dass eine präparative Isolierung den hierzu erforderlichen Aufwand nicht rechtfertigen würde. Die Ausbeuten und Mengen der Oligouridylsäuren, die in der vorliegenden Arbeit am Ende der Partialhydrolyse erhalten werden, sind untere Richtwerte, die sicherlich wesentlich optimiert werden könnten. Da verschiedene Abbaureaktionen erst für präparative Mengen angepasst werden mussten, ging ein Teil der Hydrolysate in Vorversuchen verloren. Die dann ausgearbeiteten Bedingungen wurden in verschiedenen kleinen Ansätzen erprobt und mehrmals reproduziert. Die Mengenangaben im experimentellen Teil stellen somit keine Obergrenzen dar, so dass die Abbaureaktionen ohne weiteres in grösseren Ansätzen durchgeführt werden können.

Die enzymatische Partialhydrolyse wird mit RNase T<sub>1</sub> gestartet, da dieses Enzym im Handel wesentlich billiger als RNase U<sub>2</sub> angeboten wird, die wir somit aus Kostengründen erst im zweiten Hydrolyseschritt einsetzen. Da nach der ersten Spaltung bereits über die Hälfte der RNA als Mono und Dimere anfällt, die verworfen werden, reduzieren sich die Kosten für die nachfolgenden enzymatischen Schritte erheblich. Ausserdem spaltet RNase U<sub>2</sub> kurze RNA-Fragmente besser als lange RNA-Ketten, die teilweise basengepaart sind, so dass sich auch aus diesem Grund für den zweiten Schritt RNase U<sub>2</sub> anbietet. Die Dauer der enzymatischen Partialhydrolyse liesse sich vermutlich durch die Verwendung höherer Enzymkonzentrationen verkürzen. Eine weitere Vereinfachung des Konzepts ist auch dadurch denkbar, dass man anstelle der getrennten Aufarbeitung von zwei Fraktionen: 0.3 M und 0.5 M nur einen Bereich: 0.4–0.7 M isoliert. Die 0.3 M Fraktion enthält nämlich nur einen kleinen Anteil der verwertbaren länger-kettigen Fragmente, die auch noch in der 0.5 M Fraktion enthalten sind. In einer 0.4 M Fraktion werden gerade diese Fragmente noch enthalten sein, während die kurzen Spaltprodukte bei niedrigerem Salz eluiert werden. Längere RNA-Fragmente, die mit 0.5 M Salz noch nicht eluiert und im bisherigen Konzept nicht erfasst werden, wären im Bereich 0.5–0.7 M enthalten. Die Ausbeute an höhermolekularen RNA-Fragmenten könnte somit erhöht werden ohne dass bereits zuviele Verunreinigungen von der Säule eluiert werden, die eine Aufarbeitung der bisher vorgesehenen 1 M Fraktion verhindern.

Da eine breite Palette von spezifischen RNasen verfügbar ist, sollten über die selektive Partialhydrolyse einer RNA prinzipiell auch andere definierte Oligoribonucleotide auf analogen Wegen zugänglich sein. Mit selektiven chemischen Abbauethoden, die zur RNA-Sequenzierung verwendet werden, konnte trotz zahlreicher Versuche<sup>5</sup>, RNA nicht zu definierten Oligonucleotiden hydrolysiert werden, so dass diese Alternative zur enzymatischen Partialhydrolyse bisher nicht genutzt werden kann.

## ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe von enzymatischen und chemischen Abbauschritten, denen jeweils chromatographische Trennungen folgen, gelingt die präparative Darstellung von Oligouridylsäuren aus RNA. Zunächst wird die RNA mit RNase T<sub>1</sub>, dann mit RNase U<sub>2</sub> schrittweise in Oligopyrimidinnucleotiden partialhydrolysiert, die nur an ihrem 3'-Ende Purinnucleotideinheiten aufweisen. Durch chemische Desaminierung werden die Pyrimidin- in Oligouridinsequenzen überführt. Nach der enzymatischen Dephosphorylierung der Oligouridylsäuren werden deren 3'-terminale Purinnucleoside mit Perjodat-Lysin abgespalten. Die hierbei verbleibenden Phosphatgruppen am 3'-Ende der resultierenden Oligouridylsäuren werden enzymatisch entfernt. Am Ende der schrittweisen Partialhydrolyse werden unterschiedliche Mengen der einzelnen Homologen U<sub>2</sub>–U<sub>7</sub> in durchschnittlich 93% und U<sub>8</sub> in 86% Reinheit erhalten, die zusammen ca. 0.5% der eingesetzten RNA ausmachen.

## LITERATUR

- 1 F. Egami, K. Takahashi und T. Uchida, *Prog. Nucleid Acid Res. Mol. Biol.*, 3 (1964) 59.
- 2 T. Uchida, T. Arima und F. Egami, *J. Biochem.*, 67 (1970) 91.
- 3 H. Neu und L. A. Heppel, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 2927.
- 4 H. Schott, *J. Chromatogr.*, 237 (1982) 429.
- 5 H. v. Biedersee, *Dissertation*, Universität Tübingen, 1987.