

Zur Tritiummarkierung von Purinpolyribonucleotiden

Udo LAUSCHKE, Edgar LODEMANN und Adolf WACKER

Institut für Therapeutische Biochemie der Universität Frankfurt a. M.

Eingegangen 6. März 1971

SUMMARY

Purine polyribonucleotides were labeled with tritium in the 8-position of the purine ring by heating in tritiated water. An increase in the time of reaction raises the specific activity of the products thus obtained. However under these conditions the degree of fragmentation of the polynucleotides also rises.

ZUSAMMENFASSUNG

Purinpolyribonucleotide werden durch Erhitzen in Tritiumwasser am C₍₈₎-Atom Tritium-markiert. Mit steigender Reaktionszeit steigt die spezifische Aktivität des erhaltenen Produkts, gleichzeitig nimmt jedoch auch die Fragmentierung der Polynucleotidkette zu.

Die Tritiummarkierung von Purinderivaten durch katalytischen Isotopenaustausch mit Tritiumwasser (HTO) wurde bereits mehrfach beschrieben. So wurden z.B. Adenosin und Inosin in Essigsäure und Inosin in wässriger Lösung in Gegenwart von Platin und HTO markiert (1, 2).

Shelton und Clark haben erstmals Purinnucleoside (3) und auch DNS (4) ohne Katalysator Tritium-markiert, indem sie die Verbindungen in Tritiumwasser auf 100° erhitzen. Dabei wurde die Austauschbarkeit des Wasserstoffatoms am C₍₈₎ des Purinringes (5, 6) ausgenutzt. Die Reaktion erfolgt offenbar nach einem der von Tomasz (7) diskutierten Mechanismen, die Markierung ist relativ beständig (8). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß sich dieses Verfahren auch auf Purinpolyribonucleotide anwenden läßt.

MATERIAL UND METHODE.

5 mg Polynucleotid (K-Salze der Polyadenylsäure oder Polyinosinsäure, Boehringer Mannheim, Mannheim) werden in einem 10 ml Schliffkolben (A)

in 1 ml Tritiumwasser (5 Ci/ml, The Radiochemical Centre, Amersham) unter Erwärmen gelöst. Der Kolben wird durch eine Schliffbrücke mit einem zweiten 10 ml Kolben (B) verbunden. Die Brücke ist unmittelbar über dem Kolben A durch einen Hahn (1) verschließbar und hat in der Mitte einen ebenfalls durch einen Hahn (2) verschließbaren Absaugstutzen. Die Lösung im Kolben A wird im Kältebad eingefroren und die Apparatur evakuiert (1 mm Hg). Dann werden Hahn 1 und 2 geschlossen und der Kolben A nach vorsichtigem Erwärmen in ein siedendes Wasserbad gesetzt. Nach Ende der Reaktionszeit (s. Tab.) wird die Lösung wieder eingefroren und das HTO

TABELLE

Polynucleotid	Reaktionsdauer [Std]	Spezif. Aktivität [mCi/mMol]	Schmelzpunkt ^a T _m [°C]	K _{av} ^b	Sedimentationskonstante ^c S _{c_{20,w}}
Polyadenylsäure	—	—	62	0,11	6,8
	0,5	0,8	60,5	0,25	1,9
	2	4,0	58,5	0,37	—
	5	7,7	57,0	0,46	0,9
	17	16,5	48,5	0,70	—
Polyinosinsäure	—	—	64	0,14	—
	0,5	2,0	61	0,25	—
	2	7,3	58	0,42	—
	5	12,1	51,5	0,57	—

^a Gemessen in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,2, 0,15 M NaCl, im Gemisch mit Poly (U) bzw. Poly (C).

^b Proben der einzelnen Präparationen wurden über Sephadex G-200-Säulen (1,5 × 143 cm) filtriert. Aus den Elutionsdaten wurde $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ bestimmt.

^c Die Sedimentationskonstante wurde in 0,2 M NaCl/0,01 M Phosphatpuffer pH 7 bestimmt. Die Konzentration der angegebenen Lösungen betrug 0,13 mg/ml. Die Bestimmung wurde in einer analytischen Ultrazentrifuge (Spinco, Modell E) bei 42040 Upm (20 °C) durchgeführt. Die Aufnahmeintervalle betragen 2 Minuten.

nach Öffnen von Hahn 1 in den gut gekühlten Kolben B sublimiert. Das Tritium-markierte Polynucleotid wird mehrmals mit einigen Millilitern Wasser am Rotationsverdampfer abgedampft (ca. 30 °C). Das Polynucleotid wird in Wasser gelöst und über eine Sephadex G-100-Säule (3 × 40 cm) filtriert. Von dem auf diese Weise erhaltenen hochmolekularen Peak werden alle Röhrcchen vor und eine entsprechende Anzahl von Röhrcchen hinter der Spitzenfraktion zusammengefaßt und gefriergetrocknet. Lösungen der markierten Polynucleotide sind in gefrorenem Zustand mindestens 4 Monate haltbar.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION.

Wie die in der Tabelle dargestellten Daten zeigen, eignet sich das hier beschriebene Verfahren gut zur Tritiummarkierung von Purinpolyribonucleotiden. Die erhaltenen spezifischen Aktivitäten steigen mit steigender Reaktionsdauer. Die längeren Reaktionszeiten bewirken jedoch neben der verstärkten Markierung auch eine verstärkte Fragmentierung der Polynucleotidketten, die am Sinken der Schmelzpunkte der Mischungen der markierten Polynucleotide mit den komplementären nichtmarkierten Pyrimidinpolyribonucleotiden, an der Zunahme der K_{av} -Werte an Sephadex G-200 und dem Sinken der Sedimentationskonstanten erkennbar ist. Eine derartige Fragmentierung, die auch bei analoger Behandlung von Polynucleotiden mit inaktivem Wasser auftritt⁽⁹⁾, wurde auch von Searcy⁽¹⁰⁾ bei der Markierung von DNS in HTO bei 90° beobachtet. Eine Desaminierung von Poly (A) erfolgt auch bei den längsten Reaktionszeiten nicht, was durch Papierchromatographie der Alkalihydrolysate von behandeltem Poly (A) nachgewiesen wurde. Das Verfahren ermöglicht eine fast quantitative Rückgewinnung des eingesetzten HTO, so daß ein Milliliter für eine größere Zahl von Ansätzen ausreicht. Der Austausch erfolgt relativ stabil am $C_{(8)}$ des Purinringes, labil jedoch auch an den OH- und NH_2 -Gruppen der Polynucleotide. Durch mehrmaliges Abdampfen mit Wasser bis zur Konstanz der spezifischen Aktivität lassen sich die labil gebundenen Titiumatome entfernen; Fraktionierung an Sephadex G-100 ermöglicht die Abtrennung restlicher Spuren von HTO, niedermolekularer Spaltstücke und der niedermolekularen Anteile der Oligonucleotide. Die Gelfiltration von Proben der einzelnen Präparationen an Sephadex G-200 ergab symmetrische Peaks, aus deren Lage die in der Tabelle angegebenen K_{av} -Werte berechnet werden. Über die Anwendung der markierten Polynucleotide im Rahmen von Untersuchungen über die Interferoninduktion wird an anderer Stelle berichtet⁽¹¹⁾.

Wir danken Herrn Priv.-Dozent Dr. L. Träger für Ratschläge bei der Tritiummarkierung, Herrn Prof. Dr. J. Jänicke für seine Unterstützung bei der Bestimmung der Sedimentationskonstanten und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für eine Sachbeihilfe.

LITERATUR

1. EIDINOFF, M. L. und KNOLL, J. E. — *J. Am. Chem. Soc.*, **75** : 1992 (1965).
2. EVANS, E. A. — Tritium and its Compounds, S. 129. London, Butterworths (1966).
3. SHELTON, K. R. und CLARK, J. M. — *Biochemistry*, **6** : 2735 (1967).
4. SHELTON, K. R. und CLARK, J. M. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33** : 850 (1968).
5. FRITZSCHE, H. — *Biochim. Biophys. Acta*, **149** : 173 (1967).

6. SCHWEIZER, M. P., CHAN, S. I., HELMKAMP, G. K. und Ts'O, P. O. P. — *J. Am. Chem. Soc.*, **86** : 696 (1964).
7. TOMASZ, M. — *Biochim. Biophys. Acta*, **199** : 18 (1970).
8. EVANS, E. A., SHEPPARD, H. C. und TURNER, J. C. — *J. Labelled Compounds*, **6** : 127 (1970).
9. LAUSCHKE, U. — Unveröffentlicht.
10. SEARCY, G. D. — *Biochim. Biophys. Acta*, **166** : 360 (1968).
11. WACKER, A., LODEMANN, E., DIEDERICH, J., MOHRBUTTER, K. P. und LAUSCHKE, U. — *Arch. ges. Virusforsch.* (1971), im Druck.