

# Eine Methode zur präparativen Herstellung markierter Trinukleotide

Von

**Gregor Högenauer**

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 11. Jänner 1967)

Für ein neues Verfahren zur Untersuchung von Codon—Anticodon-Wechselwirkungen wurden radioaktive Trinukleotide mit möglichst hohen spezif. Aktivitäten im Milligrammaßstab benötigt. Zu ihrer Gewinnung wurde aus *E. coli* und Bäckerhefe, die in  $^{32}\text{P}$ -phosphathaltigen Nährmedien gezüchtet worden waren, die Gesamt-RNA\* isoliert und enzymatisch hydrolysiert. Das dabei entstandene Oligonukleotidgemisch wurde durch Papierchromatographie und Elektrophorese aufgetrennt, wobei elf markierte Trinukleotide in reiner Form erhalten werden konnten.

For the study of codon-anticodon interactions radioactive trinucleotides with high specific activities had to be prepared in milligram quantities. Labelled RNA was obtained from *E. coli* and baker's yeast grown in a medium containing  $^{32}\text{P}$ -phosphate. The RNA was hydrolyzed with enzymes and the resulting oligonucleotide mixture separated by paper chromatography and electrophoresis. Eleven pure, labelled trinucleotides were isolated by this procedure.

Bei der Erforschung des genetischen Code wurde die grundlegende Erkenntnis gewonnen, daß die Codewörter, welche für den Einbau von Aminosäuren in Protein verantwortlich sind, aus drei Nukleotiden bestehen. Für die Ermittlung der Sequenz dieser Codewörter spielte die Bin-

---

\* Verwendete Abkürzungen: RNA = Ribonukleinsäure, s-RNA = lösliche Ribonukleinsäure. Kombinationen von U, C, A und G stellen Abkürzungen für Trinukleotide dar. Die Buchstaben stehen dabei für die Nukleoside Uridin, Cytidin, Adenosin und Guanodin. Die dazwischenliegenden Phosphodiesterbindungen werden nicht geschrieben.

dung von Oligonukleotiden und löslicher Ribonukleinsäure an Ribosomen eine Rolle. Ob es zu einer direkten Wechselwirkung zwischen Trinukleotiden und löslicher RNA kommen kann, war bisher noch nicht bekannt.

Um diese Frage zu klären wurde eine Methode entwickelt, welche es erlaubt, die Bindung radioaktiver Trinukleotide an lösliche RNA festzustellen<sup>1</sup>. Zur Durchführung dieser Experimente wurden markierte Trinukleotide benötigt, welche in ausreichender Menge und mit möglichst hoher spezifischer Aktivität verfügbar sein sollten.

*Sanger et al.*<sup>2</sup> beschrieben die elektrophoretische und papierchromatographische Auftrennung der radioaktiven Oligonukleotidgemische, wie sie nach Hydrolyse mit Ribonuklease T 1 und pankreatischer Ribonuklease erhalten wurden. Die Zielsetzung ihrer Arbeit bestand jedoch darin, die hydrolytischen Spaltprodukte der einzelnen RNA-Spezies analytisch bestimmen zu können. Die von den Autoren angewandte Methode gestattete nur die Auftrennung sehr kleiner Substanzmengen, die dann autoradiographisch nachgewiesen wurden. Wegen der geringen Kapazität war daher dieses Verfahren ungeeignet zur Trinukleotidgewinnung für die erwähnten Bindungsversuche an s-RNA.

In der vorliegenden Arbeit wird eine verbesserte Methode dargelegt, welche eine hohe Markierung der Trinukleotide und deren Gewinnung in der nötigen Menge erlaubt.

### Materialien und Methoden

*Herstellung von radioaktiver RNA aus E. coli.* *E. coli* wurde 48 Stdn. in einem Medium gezüchtet, welches aus 0,5 g Bacto-Peptone, 0,25 g NaCl, 0,05 g Glucose, 5 ml einer 1*m*-Tris—HCl-Lösung (pH 7,5), 0,5 ml einer 0,1*m*-Magnesiumsulfatlösung und 10 mc einer trägerfreien <sup>32</sup>P-Orthophosphatlösung bestand. Nach dem Zentrifugieren und Waschen mit Wasser wurden die radioaktiven Bakterien mit der vierzigfachen Menge nichtradioaktiver Zellen gemischt.

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus *E. coli* konnte nach einer von *Westphal et al.*<sup>3</sup> beschriebenen Methode ausgeführt werden. Die Bakterien wurden dabei in 350 ml Wasser suspendiert und bei 65° unter Rühren mit 350 ml heißem Phenol versetzt. Nach 30 Min. wurde die Mischung auf 5° abgekühlt und zentrifugiert. Die obere Schicht wurde abgetrennt, die untere Schicht nochmals auf 65° erhitzt und mit 350 ml Wasser versetzt. Nach 20 min. Rühren bei 65° wurde abermals abgekühlt und die beiden Phasen durch Zentrifugation getrennt. Die beiden wäßrigen Schichten wurden vereinigt, mit 2% festem Kaliumacetat versetzt, die RNA durch

<sup>1</sup> G. Högenauer, Z. physiol. Chem., im Druck.

<sup>2</sup> F. Sanger, G. G. Brownlee und B. G. Barrell, J. Mol. Biol. **13**, 373 (1965).

<sup>3</sup> O. Westphal, O. Lüderitz und F. Bister, Z. Naturforsch. **7b**, 148 (1952).

Zugabe des doppelten Volumens Alkohol ausgefällt und über Nacht bei 2° stehengelassen. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und mit 75proz. Alkohol, dann mit Aceton gewaschen. Die Trocknung des Produktes erfolgte im Vakuumexsiccator über konz. Schwefelsäure. Die Ausb. betrug 123 mg.

*Herstellung radioaktiver Hefe-RNA.* Bäckerhefe wurde 24 Stdn. lang in 50 ml eines *Wickerham*-Mediums (3 g Hefe-Extrakt, 3 g Malz-Extrakt, 5 g Bacto-Peptone und 10 g Glucose in 1 l Wasser) gezüchtet, welches 5 mc einer trägerfreien  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphatlösung enthielt. Nach dem Ernten und Waschen mit Wasser wurden die Zellen einmal in 5proz. Trichloroessigsäure und dann 3mal in 5proz. Trichloroessigsäure, 0,1 *m* an Phosphorsäure, suspendiert. Dazwischen wurde jedesmal abzentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen mit Alkohol behandelt. Nach dem Trocknen im Vakuumexsiccator erfolgte eine 3malige je 1stdg. Extraktion des Niederschlags mit je 5 ml 2 *m*-NaCl, (bei 100°). Die RNA wurde bei — 20° aus den vereinigten Extraktionslösungen mit dem doppelten Volumen Alkohol gefällt, der Niederschlag in 15 ml 2 *m*-NaCl gelöst und durch Schütteln mit einem  $\text{CHCl}_3$ —Octanol-Gemisch (4:1) deproteinisiert. Die RNA fiel erneut nach der Zugabe des doppelten Volumens Alkohol zur wäßrigen Phase aus. Das Produkt wurde mit kaltem, 66proz. Alkohol, dann mit 95proz. Alkohol gewaschen und im Vakuumexsiccator getrocknet. Die Ausbeute betrug 10 mg.

*Herstellung der Trinukleotidfraktion nach Hydrolyse mit pankreatischer Ribonuklease.* 123 mg radioaktiver *E. coli*-RNA wurde in 5 ml Wasser suspendiert und bei 25° mit 6 mg pankreatischer Ribonuklease verdaut. Der pH der Lösung wurde 12 Stdn. durch Zugabe von NaOH konstant bei pH 7,5 gehalten. Die Entfernung der ungelösten braunen Bestandteile erfolgte durch Zentrifugation. Die Trinukleotidfraktion konnte durch Chromatographie an DEAE-Cellulose nach *Gilham* und *Robinson*<sup>4</sup> isoliert werden. Die Dimension der Säule betrug 23 × 3,5 cm. Die DEAE-Cellulose war mit einer 7 *m* Harnstofflösung, die *Tris*-Acetat, pH 7,5 enthielt (0,01 *m*), äquilibriert worden. Vor dem Aufbringen auf die Säule wurde das Hydrolysat mit Harnstoff auf 7 *m* gebracht. Die Oligonukleotide ließen sich mit einem linearen Gradienten von Natriumacetat eluieren. 2,5 l 7 *m*-Harnstoff mit 0,01 *m*-*Tris*-Acetat, pH 7,5, befanden sich im Mischgefäß, 2,5 l 7 *m*-Harnstoff mit 0,01 *m*-*Tris*-Acetat und 0,5 *m* Natriumacetat im Reservoir. Der vierte von der Säule kommende Extinktionsgipfel enthielt die Trinukleotide und die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt. Die Abtrennung von Harnstoff und den Salzen erfolgte durch Readsorption der Nukleotide an eine DEAE-Cellulosesäule in der

<sup>4</sup> P. T. Gilham und W. E. Robinson, J. Amer. Chem. Soc. 86, 4985 (1964).

Carbonatform. Nach dem Waschen der Säule mit 500 ml einer 0,05 *m*-Triäthylammoniumbicarbonatlösung<sup>5</sup> vom pH 7,5 wurden die Nukleotide mit 0,5 *m*-Triäthylammoniumbicarbonat eluiert und die Lösung bei 30° im Vak. zur Trockene gebracht.

*Auftrennung des nach pankreatischer Hydrolyse erhaltenen Trinukleotidgemisches.* 2 mg des Gemisches wurden in 0,2 ml Wasser gelöst und auf einen Bogen trockenes Whatman 3 MM-Papier aufgetragen. Nach Befechten des Papiers mit 0,1 *m* Ammonformiatpuffer, pH 2,7, wurde in einer Richtung elektrophoretisch aufgetrennt. Das Spannungsgefälle betrug 40 V/cm. Die weitere Trennung erfolgte durch aufsteigende Chromatographie mit Isopropylalkohol—Ammoniak—Wasser (55:10:35). Die Elution der Trinukleotide vom Papier erfolgte mit Wasser nach der Methode von *Sanger* und *Tuppy*<sup>6</sup>.

*Isolierung von Trinukleotiden mit terminalem Guanosin.* 3,5 mg der radioaktiven Hefe-RNA wurde mit 250 Einheiten Ribonuklease T 1 (Calbiochem Corp.) in 0,1 ml einer 0,02 *m* Tris-HCl-Lösung, pH 7,5, verdaut. Die Reaktionszeit betrug 1 Stde., die Temperatur 37°. Das Gemisch wurde direkt auf einen Bogen trockenes Whatman 3 MM-Papier aufgetragen. Die Oligonukleotide ließen sich durch zweidimensionale Elektrophorese-Chromatographie auftrennen. Der zur Elektrophorese verwendete Puffer war Ameisensäure vom pH 2,35. Das Spannungsgefälle betrug 40 V/cm. Die Chromatographie wurde mit tert. Butylalkohol — 0,02 *m*-Ammonformiat, pH 3,7, (55:45) als Verteilungsmittel ausgeführt<sup>7</sup>. Die Flecke, welche die Trinukleotide enthielten, wurden mit Wasser eluiert und die Lösung auf einen Streifen trockenes DEAE-Papier (Whatman DE 81) aufgebracht. Durch Elektrophorese in Ameisensäure, pH 1,9, ließen sich die Komponenten weiter auftrennen. Das Spannungsgefälle betrug 40 V/cm, die Dauer der Elektrophorese 3 ½ bis 5 ½ Stdn. Phenolrot, auf demselben Papierstreifen aufgetragen, diente als Bezugspunkt für die von den Nukleotiden gewanderte Strecke. Die Elution der Nukleotide erfolgte mit 0,5 *m*-Triäthylammoniumbicarbonat, pH 7,5. Nach dem Eintrocknen des Eluats im Vakuumexsiccator über konz. Schwefelsäure blieben die Trinukleotide in reiner Form zurück.

### Ergebnisse

Trinukleotide, welche mit <sup>32</sup>Phosphor markiert waren, konnten durch Hydrolyse von radioaktiver RNA mit pankreatischer Ribonuklease einerseits und Ribonuklease T 1 andererseits hergestellt werden.

<sup>5</sup> *M. Smith, D. H. Rammner, I. H. Goldberg* und *H. G. Khorana*, *ibid.* **84**, 430 (1962).

<sup>6</sup> *F. Sanger* und *H. Tuppy*, *Biochem. J.* **49**, 463 (1951).

<sup>7</sup> *G. W. Rushitzky* und *H. A. Sober*, *J. Biol. Chem.* **237**, 834 (1962).

Dabei entstanden im ersteren Fall diejenigen Trinukleotide, welche in der 3'-Stellung ein Pyrimidinnukleotid trugen, im zweiten Fall wurden Trinukleotide mit einem terminalen Guanosinrest isoliert.

Die Herstellung der  $^{32}\text{P}$ -markierten RNA erfolgte aus Mikroorganismen, die in  $^{32}\text{PO}_4$ -hältigen Nährmedien wuchsen. Als Quellen für die RNA-Gewinnung dienten *E. coli* und Bäckerhefe. Um hohe Ausbeuten zu erhalten, wurde nicht wie bei *Sanger et al.*<sup>2</sup> entweder nur s-RNA oder ribosomale RNA, sondern die Gesamt-RNA isoliert. Aus *E. coli* wurde die RNA nach

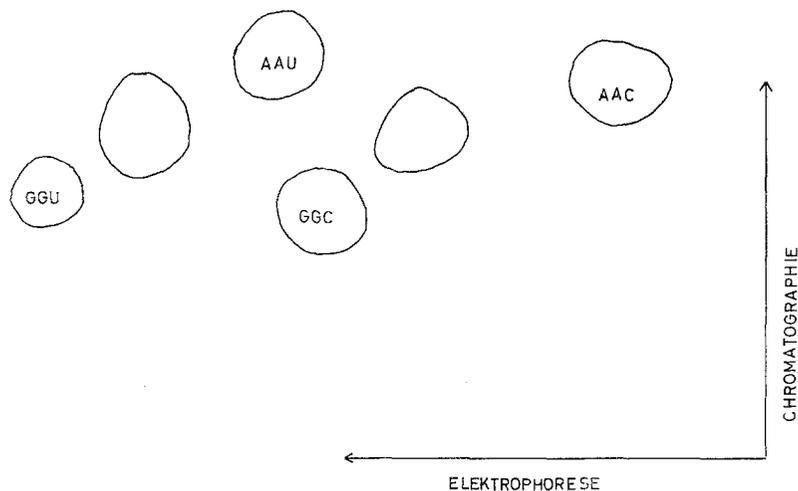


Abb. 1. Zweidimensionale Verteilung eines Trinukleotidgemisches nach pankreatischer Verdauung. Zuerst erfolgte Elektrophorese bei pH 2,7 und 40 V/cm. Die chromatographische Auftrennung wurde mit Isopropylalkohol—Ammoniak—Wasser (55:10:35) durchgeführt

einer von *Westphal et al.*<sup>3</sup> angegebenen Methode, wobei die Polysaccharide nicht abgetrennt werden mußten, präpariert. Wesentlich höhere spezifische Aktivitäten konnten erreicht werden, wenn radioaktive RNA aus Hefe gewonnen wurde. Ein zur Isolierung nichtradioaktiver RNA beschriebenes Verfahren von *Shortman* und *Fukuhara*<sup>8</sup> wurde für diesen Zweck adaptiert.

Solchermaßen isolierte radioaktive Ribonukleinsäuren wurden durch Einwirkung von Ribonukleasen abgebaut. Die auf diese Weise erhaltenen Oligonukleotidgemische konnten durch Kombination von elektrophoretischen und chromatographischen Methoden weiter aufgetrennt werden.

Die nach pankreatischer Hydrolyse entstandenen Oligonukleotide wurden auf einer DEAE-Cellulosesäule vorgereinigt, wobei die Trinukleotide von den übrigen bei der Hydrolyse entstandenen Oligonukleotiden getrennt erhalten werden konnten. Diese Fraktion ließ sich weiter in ihre Komponenten zerlegen. Elektrophorese bei pH 2,7 auf Whatman 3 MM-

<sup>8</sup> *K. Shortman* und *H. Fukuhara*, *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 501 (1963).

Papier, gefolgt von Chromatographie in der zweiten Richtung des Papiers, führte zu einer weitgehenden Auftrennung der Nukleotide. Abb. 1 zeigt die Positionen der Flecke, wie sie im ultravioletten Licht erscheinen. GGU, AAU, GGC und AAC wurden rein erhalten, während die Isomerenpaare AGU, GAU und AGC, GAC nicht weiter aufgetrennt werden konnten.

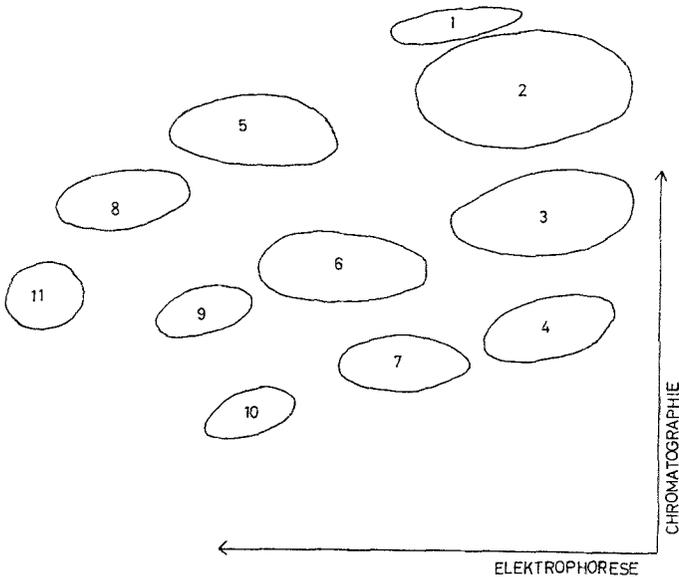


Abb. 2. Zweidimensionale Verteilung eines Oligonukleotidgemisches nach Verdauung mit Ribonuklease T 1. Elektrophorese erfolgte bei pH 2,35 und 40 V/cm, für die Chromatographie wurde tert. Butylalkohol-0,02m-Ammonformiat, pH 3,7 (55:45) als Verteilungsmittel verwendet

Wurde die radioaktive RNA mit Ribonuklease T 1 hydrolysiert, dann war zur Isolierung der einzelnen Trinukleotide keine Vorreinigung erforderlich. Das Oligonukleotidgemisch wurde direkt auf Whatman 3 MM-Papier in einer Dimension durch Elektrophorese bei pH 2,35, in der anderen durch Chromatographie mit tert. Butylalkohol—Ammonformiatpuffer getrennt. Die Flecke 2, 4 und 6 (Abb. 2) wurden ausgeschnitten und mit Wasser eluiert. Die Substanzen aus Fleck 2 und 4 ließen sich durch Elektrophorese auf DEAE-Papier weiter trennen (Abb. 3 a und b). Fleck Nr. 6 bedurfte keiner weiteren Reinigung, da er nur aus einer Komponente bestand, wie die Elektrophorese auf DEAE-Papier zeigt (Abb. 3 c). Aus den Abbildungen ist ersichtlich, daß die Trinukleotide UAG, AUG, ACG, CAG, AAG, CCG und UUG vollständig abgetrennt werden konnten.

Die papierchromatographisch und elektrophoretisch getrennten Trinukleotide wurden mittels Kapillaren eluiert, im Vakuumexsiccator getrocknet und konnten dann für die Versuche, eine Bindung zwischen

Trinukleotiden und s-RNA nachzuweisen, eingesetzt werden. Die von einem Chromatogramm isolierten Mengen eines Trinukleotids betragen zwischen 0,3 und 1,0  $\mu\text{c}$ , bei einer spezif. Aktivität von 50  $\text{mc}/\text{mMol}$ .

Zur Charakterisierung der Trinukleotide wurden sie mit KOH, pankreatischer Ribonuklease und Ribonuklease T 1 hydrolysiert und die entstandenen Spaltungsprodukte durch Hochspannungselektrophorese iden-

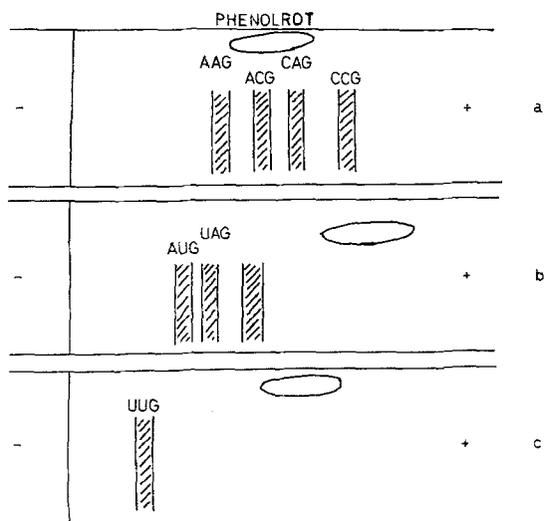


Abb. 3. Elektrophorese von Trinukleotiden auf DEAE-Papier. Verwendeter Puffer: Ameisensäure, pH 1,9. Spannungsgefälle; 40 V/cm. a: Auftrennung des Flecks Nr. 4 aus Abb. 2. b: Fleck Nr. 6 und c: Fleck Nr. 8.

tifiziert. Auf diese Weise ließen sich die in den Trinukleotiden enthaltenen Mononukleotide und deren Sequenz bestimmen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. *Hans Tuppy* für seine Anregungen bei der Abfassung des Manuskripts.