

Trägergebundenes Analog des Actinomycins C₁(D) und Affinitätschromatographie von Nucleinsäuren

Resin Linked Analogue of Actinomycin C₁(D) and Affinity Chromatography of Nucleic Acids

Frank Seela

Fachbereich 6 (Naturwissenschaften), Gesamthochschule Paderborn

((Z. Naturforsch. **29 c**, 521–525 [1974]; eingegangen am 30. Mai 1974)

Actinomycin, Affinity Chromatography, DNA/RNA-Separation

A biospecific adsorbent for the separation of different nucleic acids was prepared by covalent attachment of a chromophore analog of actinomycin C₁ (D) to Sepharose 4 B. The immobilized chromophore-derivative was obtained by condensation of 2-nitro-3-hydroxy-4-methylbenzoic acid with N⁶-(6-aminoethyl)-Sepharose 4 B, reduction of the nitro group and oxidative coupling with 2-amino-3-hydroxy-4-methylbenzoyl-β-(N,N-diethylamino)-ethylamide. Since the chromophore of actinomycin has a high affinity to DNA, DNA/RNA-mixtures were separated by retardation of DNA on this resin.

Einleitung

Die chromatographische Trennung von Nucleinsäuregemischen kann durch Ionenaustausch-, Verteilungs- oder Molekularsiebchromatographie erfolgen.

Die Auf trennung der Gemische wird dadurch erschwert, daß die geringen strukturellen Unterschiede der Nucleinsäuren zu weitgehend ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften führen. Erst mit Nucleinsäurekomplexbildnern, wie methyliertem Albumin oder Polylysin, die auf Kieselgur aufgezogen werden, wurden die Trennungen verbessert¹.

Besonders gute Trennungen sollten mit spezifischen Komplexbildnern möglich sein. Ein derart spezifischer Komplexbildner ist Actinomycin C₁ (**1**)^{2,3}.

Actinomycin C₁ bildet mit doppelsträngiger DNA stabile Komplexe. Eine Komplexbildung mit einsträngiger DNA, doppel- oder einsträngiger RNA- aber auch mit tRNA bleibt aus^{4,5}.

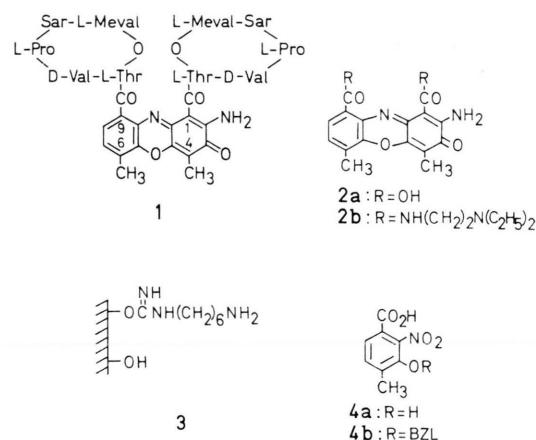
Die Stabilität des Actinomycin/DNA-Komplexes hängt von der Basenzusammensetzung der DNA ab. Während doppelsträngige GC-reiche DNA Actinomycinkomplexe hoher Stabilität bildet, zeigen GC-freie Polynukleotide keine Komplexbildungstendenz⁶.

Hydrodynamische und kinetische Messungen des Actinomycin/DNA-Komplexes führten zu einem Komplexmodell, das den Einschub des Actinomycin-

chromophors (**2a**) zwischen die DNA-Basenpaare postuliert (Intercalations-Modell)⁷. Dieses Modell steht im Einklang mit Struktur-/Aktivitätsuntersuchungen an 4,6-modifizierten Actinomycinen^{8,9} und mit der Röntgenstrukturanalyse eines 7-Bromactinomycin/Desoxyguanosinkokristallisates¹⁰.

Der Bindungsanteil des Chromophors **2a** am Actinomycin/DNA-Komplex wird durch die hohe DNA-Affinität einfacher Chromophorderivate angezeigt. Besonders Actinomin¹¹, ein Analog des Actinomycins, das statt der Pentapeptidlactonringe basische N,N-Diäthyläthylendiaminreste besitzt und so den Bindungsanteil der Peptidlactonringe zur DNA durch ionische Wechselwirkungen nachahmt, zeigt eine dem Actinomycin vergleichbare Komplexstabilität⁷.

In der vorliegenden Arbeit wird diese hohe DNA-Affinität von Actinomin (**2b**) zur Chromatographie



Sonderdruckanforderungen an Dr. F. Seela, Fachbereich 6 (Naturwissenschaften), Gesamthochschule Paderborn, D-4790 Paderborn, Pohlweg 55 (Verfügungszentrum).

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

von Nucleinsäuren ausgenutzt. Ein Derivat von **2b** wird zu diesem Zweck an polymerem Trägermaterial fixiert. An diesem trägergebundenen Derivat werden Nucleinsäuregemische chromatographiert. Mit einer Auftrennung der Gemische ist zu rechnen, weil nur die Nucleinsäuren gebunden werden, die schon mit monomerem Actinomin (**2b**) zur Komplexbildung befähigt sind.

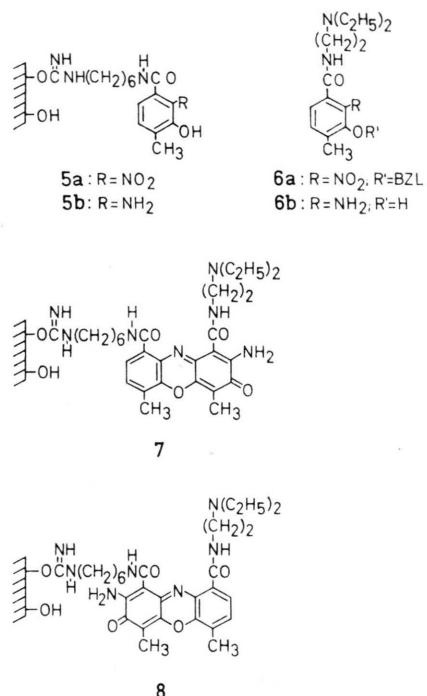
Trägermaterial und Art der Fixierung

Als Matrix für **2b** bot sich Sepharose 4B^{12, 13} an, deren weitporige Struktur eine Chromatographie von Nucleinsäuren des Molekulargewichts von mehr als 10^6 gestattet.

Die Fixierung von **2b** an den polymeren Träger erfolgte derart, daß ein Einschub des Chromophors zwischen die DNA-Basenpaare gewährleistet bleibt. Als Gruppen, die zur Fixierung geeignet schienen, boten sich die 1,9-Carboxylgruppen von **2a** an, die bei Actinomycin C₁ (**1**) mit sperrigen Pentapeptid-lactonringen verknüpft sind und somit bei der Komplexbildung von dem **2a**-Derivat mit der DNA frei zugänglich sein sollten. Um den Chromophor am polymeren Träger weitgehend beweglich zu halten, wurde nur eine der Carboxylgruppen zur Fixierung herangezogen. Die Zugänglichkeit der Nucleinsäuren während der Chromatographie wurde außerdem dadurch erleichtert, daß zwischen Chromophor und polymerem Träger eine C₆-Alkylkette (spacer) als räumliche Überbrückung eingefügt wurde.

Darstellung des Affinitätsharzes

Kondensiert man 2-Nitro-3-hydroxy-4-methylbenzoësäure (**4a**)¹⁴ mit der Aminogruppe von AH-Sepharose 4B (**3**) in Gegenwart von N-Äthyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid, so entsteht das gelbe Sepharose 4B-Derivat **5a**, das ein stabiles Ausgangsmaterial für trägergebundene Actinomycinchromophore darstellt. Bewahrt man **5a** in alkalischer Natriumdithionitlösung auf, so wird dessen Nitrogruppe zur Aminogruppe reduziert, wobei das blaßgelbe Sepharose 4B-Derivat **5b** entsteht. Als oxydationsempfindliche *o*-Aminophenoxyvorstufe der 2-Amino-phenoxyazone-(3)-Bildung muß es nach Auswaschen der Reduktionslösung sofort umgesetzt werden. Bietet man dem Sepharose 4B-Derivat **5b** im Überschuß das *o*-Aminophenolderivat **6b**, das man durch katalytische Hydrierung aus **6a** erhält, an,



und oxydiert mit Kaliumhexacyanoferrat III, so bildet sich neben dem niedermolekularen Kondensationsprodukt **2b** ein Gemisch hochmolekularer Verbindungen vom Typ **7** bzw. **8**.

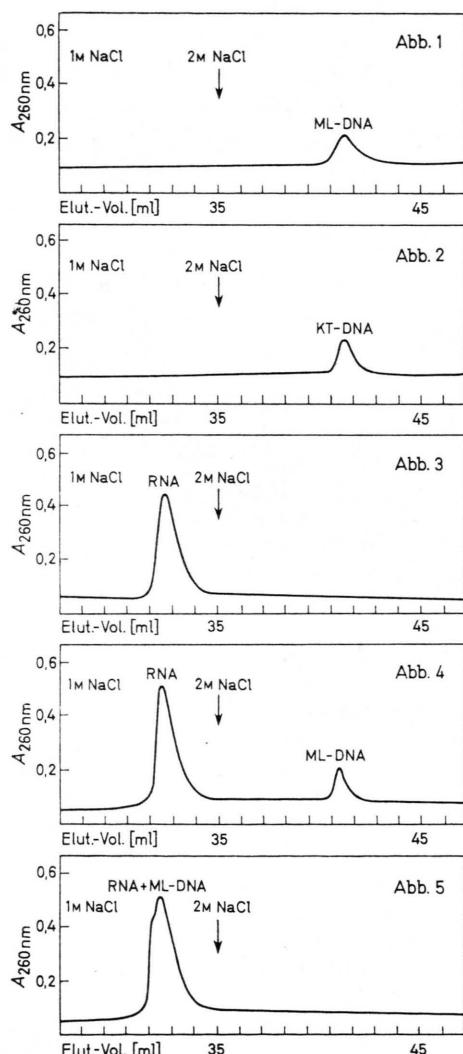
Das Gemisch an hochmolekularem Kondensationsprodukt entsteht dadurch, daß entweder die Oxydation an der niedermolekularen Vorstufe **6b** oder der polymer gebundenen Vorstufe **5b** einsetzt, was zur Folge hat, daß die 2-Aminophenoxyazone-(3)-Bildung zu zwei verschiedenen Endprodukten, nämlich **7** bzw. **8**, führt. Im Hinblick auf die Affinität zu Nucleinsäuren können sowohl von **7** als auch von **8** vergleichbare Bindungseigenschaften erwartet werden.

Affinitätschromatographie

Am Sepharose 4B-Derivat **7/8** wurden zum Nachweis seiner biospezifischen Trennwirkung folgende Nucleinsäuren bzw. deren Gemische chromatographiert: 1. doppelsträngige KT-DNA (MG $\sim 3 \cdot 10^5$, 41% GC), 2. doppelsträngige ML-DNA (MG $\sim 3 \cdot 10^5$, 72% GC) und tRNA (Gemisch aus Brauhefe, MG $\sim 2,5 \cdot 10^4$). Die Trennfähigkeit des Affinitätsharzes **7/8** wurde mit AH-Sepharose 4B verglichen, die als Liganden sowohl hydrophobe Alkylreste als auch bei pH 7 positiv geladene Aminogruppen

pen, aber nicht den Actinomycinchromophor **2a** besitzt.

Zur Affinitätschromatographie füllt man $8,0 \times 0,9$ cm Säulen mit ca. 10 ml des Affinitätsharzes **7/8** und belädt dieses mit KT-DNA bzw. ML-DNA oder tRNA. Die Absorptionsmessung bei 260 nm im Eluat zeigt an, daß unter diesen Bedingungen alle drei Nucleinsäuren an das Affinitätsharz gebunden werden (Abb. 1–5). Erhöhung der Natriumchloridkonzentration führt zur Elution der Nucleinsäuren. Zuerst wird die RNA (1 M NaCl) eluiert



Abbn. 1–5. Elutionsprofile der am Sepharose 4B-Derivat **7/8** in BPES-Puffer chromatographierten Lösungen von ML-DNA (Abb. 1), KT-DNA (Abb. 2), tRNA (Abb. 3) und dem tRNA/ML-DNA-Gemisch (Abb. 4); Elutionsprofil des tRNA/ML-DNA-Gemisches an AH-Sepharose 4B in gleichem Puffer (Abb. 5).

(Abb. 3), die Elution der beiden DNA-Typen erfolgt später bei einer Konzentration von 2 M NaCl.

Das Affinitätsharz **7/8** trennt bei Salzelution zwar nicht doppelsträngige DNA unterschiedlichen GC-Gehaltes, jedoch erfolgt die Elution der RNA bei weit niedriger Salzkonzentration als die der DNA (Abb. 3). Damit ist eine Auftrennung von DNA und RNA am Affinitätsharz **7/8** möglich.

Chromatographiert man DNA/RNA-Gemische am Sepharose 4B-Derivat **7/8**, dann erfolgt eine quantitative Trennung der Komponenten (Abb. 4). Eine Auftrennung nach Molekulargewicht findet nicht statt, denn dann müßte die DNA ($M_G \sim 3 \cdot 10^5$) vor der RNA ($M_G \sim 2,5 \cdot 10^4$) eluiert werden.

Die starke Wechselwirkung der DNA-Moleküle mit dem Polymer **7/8** und die vergleichsweise schwache Bindung zwischen diesem und der tRNA hat seinen Grund im DNA-Einschubkomplex, der, wie schon bei den monomeren Chromophorderivaten, nur mit doppelsträngiger DNA, nicht hingegen mit doppel- oder einsträngiger RNA gebildet wird.

Daß neben der spezifischen Bindung auch unspezifische Wechselwirkungen zwischen den Phosphatresten der Nucleinsäure und der Aminogruppe des Liganden erfolgen, zeigt die wenn auch schwache Wechselwirkung der tRNA mit dem Affinitätsharz an.

Ein weiterer Nachweis der DNA-Spezifität des Affinitätsharzes **7/8** kann dadurch erbracht werden, daß man die chromatographischen Experimente statt am Affinitätsharz, an AH-Sepharose 4B vornimmt (Abb. 5). Letzteres besitzt als Liganden nur die hydrophoben C_6 -Alkylreste und basische Aminogruppen, aber kein spezifisch wirkendes Actinomycinchromophor.

An dem unspezifischen Harz vom Typ **3** werden dann auch DNA- und tRNA-Moleküle gleichzeitig eluiert, und zwar bei einer Salzkonzentration, die zur Elution der an das Sepharose 4B-Derivat **7/8** unspezifisch gebundenen tRNA notwendig ist. Das Sepharose 4B-Derivat **7/8** stellt somit ein wirksames DNA/RNA-Trennharz dar, das es gestattet, doppelsträngige DNA von allen anderen Nucleinsäuren, die in der Zelle gefunden werden, in einem Schritt chromatographisch abzutrennen. Es ergänzt damit die MAK- und PLS/Kieselgurchromatographie auf besondere Weise.

Eine Auftrennung der DNA-Moleküle nach unterschiedlichem GC-Gehalt sollte am Affinitätsharz **7/8** bei spezifischer Elution gelingen, wozu jedoch noch Elutionsverfahren ausgearbeitet werden müssen.

Beschreibung der Versuche

AH-Sepharose 4B war das Handelspräparat der Fa. Pharmacia, Fine Chemicals, Uppsala; N-Äthyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid stammte von der Fa. Merck, Darmstadt; Kalbsthymus-DNA und *Micrococcus lysodeikticus*-DNA der angegebenen Molekulargewichte wurde durch Scherabbau gewonnen und von Dr. W. Müller, Stöckheim, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. tRNA aus Brauhefe (15357) war das Handelspräparat der Fa. Boehringer, Mannheim. Der BPES-Puffer enthielt 0,01 M EDTA (Natrium-Salz), 0,179 M NaCl, 0,006 M Na₂HPO₄ und 0,002 M NaH₂PO₄ und wurde auf pH 7,0 eingestellt.

2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl-Derivat von AH-Sepharose 4B (5a): 197 mg (1 mmol) 2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoësäure (**4a**)¹⁴ in 10 ml Dimethylformamid (DMF) werden erst mit 20 ml Wasser, dann mit 10 ml gequollener AH-Sepharose 4B (aus 3 g gefriergetrockneter AH-Sepharose 4B durch Quellen und Waschen mit 1 M Natriumchlorid hergestellt) versetzt. In diese Suspension vom pH-Wert 4,0 werden 0,5 g in wenig Wasser gelöstes N-Äthyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid eingetragen, wobei sich die gelbe Suspension rot färbt und nach kurzer Zeit trübt.

Man schüttelt über Nacht, saugt auf der Glasfritte ab, wäscht erst mit 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Puffer pH 8,6/DMF (1:1), dann alternierend mit 0,1 M Ammoniumacetatpuffer pH 4,8/DMF (1:1) und 0,1 M Natriumhydrogencarbonatpuffer/DMF (1:1). Beide Puffer enthalten 1 M Natriumchlorid. Sobald das Filtrat farblos geworden ist, wäscht man mit den entsprechenden dimethylformamidfreien Puffern und Wasser. Man erhält 12 ml braungelbes Sepharose 4B-Derivat **5a**, dessen braungelbe Färbung im sauren Medium verblaßt und im alkalischen intensiver wird.

2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl-Derivat von AH-Sepharose 4B (5b): 10 ml AH-Sepharose-Derivat **5a** werden in 50 ml Reduktionslösung (0,1 M Natriumdithionit und 0,5 M Natriumhydrogencarbonat) suspendiert und 30 min bei 40 °C im Wasserbad aufbewahrt, wobei sich das braungelbe Sepharose 4B-Derivat fast vollständig entfärbt. Nach Waschen mit 100 ml Wasser erhält man 10 ml schwach gelbes Sepharose 4B-Derivat **5b**, das oxidationsempfindlich ist und deshalb sofort in die nächste Reaktionsstufe eingesetzt wird.

Sepharose 4B-Derivat 7/8: 350 mg 2-Nitro-3-benzylxy-4-methyl-benzoësäure (**4b**) werden in 2 ml Thionylchlorid suspendiert, 10 min unter Rückfluß gekocht, überschüssiges Thionylchlorid in Va-

kuum abdestilliert und das kristallisierende Säurechlorid über Kaliumhydroxid getrocknet. Das in 10 ml wasserfreiem Dioxan gelöste Säurechlorid versetzt man mit einer Lösung von 600 mg N,N-Diäthyläthyldiamin in 10 ml Dioxan, gießt nach 10 min in 75 ml Eiswasser und extrahiert **6a** nach Zusatz von wäßrigem Natriumhydrogencarbonat mit Äthylacetat. Der in 10 ml Methanol gelöste Abdampfrückstand **6a** wird in Gegenwart von Pd/Aktivkohle (10% Pd) bei Normaldruck aushydriert, wobei **6b** entsteht. Der Katalysator wird abfiltriert und das Lösungsmittel abgedampft. Das in 10 ml DMF gelöste **6b** wird mit 20 ml Sörensen-Phosphatpuffer pH 7,2 versetzt und 5 ml Sepharose 4B-Derivat **5b** in die Lösung eingetragen. Unter Rühren und Konstanthaltung des pH-Wertes durch Zusatz von 1 M Natriumhydrogencarbonat (pH-Meter) versetzt man mit 1,25 g Kaliumhexacyanoferrat III in wenig Phosphatpuffer. Die schwach gelbe Lösung färbt sich sofort dunkelrot. Nach 20 min Rühren saugt man ab (Glasfritte), wäscht den Rückstand ausgiebig mit Ammoniumacetatpuffer pH 4,8/DMF (2:1), dann mit Natriumhydrogencarbonatpuffer pH 8,6/DMF (2:1), die beide 1 M Natriumchlorid enthalten. Sobald das Filtrat farblos geworden ist, wäscht man mit den dimethylformamidfreien Puffern und Wasser. Man erhält 5 ml rotbraunes Sepharose 4B-Derivat **7/8**, das unbegrenzt in BPES-Puffer aufbewahrt werden kann.

Affinitätschromatographie von Kalbsthymus (KT)-DNA, *Micrococcus lysodeikticus* (ML)-DNA und tRNA-Gemisch am Sepharose 4B-Derivat **7/8 bzw. an AH-Sepharose 4B:** Chromatographiesäulen (8,0 × 0,9 cm) werden entweder mit dem Sepharose 4B-Derivat **7/8** oder mit AH-Sepharose gefüllt und mit BPES-Puffer äquilibriert. Nach Auftragen von 100 µl Lösung, die entweder 0,074 mg KT-DNA, 0,065 mg ML-DNA oder 0,17 mg tRNA-Gemisch enthielten, wird mit BPES-Puffer gewaschen (Elutionsgeschwindigkeit 15 ml/h) und im Eluat die Absorption bei 260 nm registriert. Erhöhung der Natriumchloridkonzentration auf zuerst 1 M eluiert die tRNA vom Affinitätsharz **7/8** (Abb. 3 und 4) und ein Gemisch von tRNA/ML-DNA von AH-Sepharose 4B (Abb. 5). Erhöhung der Natriumchloridkonzentration auf 2 M löst ML- und KT-DNA vom Affinitätsharz ab (Abbn. 1 und 2) und führt zur Auf trennung des DNA/RNA-Gemisches (Abb. 4); an AH-Sepharose 4B wird keine weitere Substanz eluiert (Abb. 5).

Ein Teil der Arbeit wurde im Institut der Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung mbH, Stöckheim, durchgeführt. Herrn Dr. W. Müller danke ich für die großzügige Überlassung des Laboratoriums.

- ¹ S. R. Ayad, Techniques of Nucleic Acid Fractionation, Wiley-Interscience, London 1972.
- ² H. Brockmann, Fortschr. d. Chemie organ. Naturstoffe **XVIII**, 1, Springer-Verlag, Wien 1960.
- ³ H. Brockmann, Cancer Chemotherapy Reports **58**, 9 [1974].
- ⁴ W. Kersten, H. Kersten u. M. Rauen, Nature **187**, 60 [1960].
- ⁵ E. Reich u. I. H. Goldberg, Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 183, Academic Press Inc., New York 1964.
- ⁶ R. D. Wells u. J. E. Larson, J. Mol. Biol. **49**, 319 [1970].
- ⁷ W. Müller u. D. M. Crothers, J. Mol. Biol. **35**, 251 [1968].
- ⁸ H. Brockmann u. F. Seela, Chem. Ber. **104**, 2751 [1971].
- ⁹ F. Seela, J. Med. Chem. **15**, 684 [1972].
- ¹⁰ S. C. Jain u. H. M. Sobell, J. Mol. Biol. **68**, 1 [1972].
- ¹¹ F. Seela, Z. Naturforsch. **26 b**, 875 [1971].
- ¹² R. Axen, J. Porath u. S. Ernbaeck, Nature **214**, 1302 [1967].
- ¹³ H. Guilford, Chem. Soc. Rev. **2**, 249 [1973].
- ¹⁴ H. Brockmann u. H. Muxfeld, Chem. Ber. **91**, 1242 [1958].