

Affinitätschromatographie mit ^{125}J -markierter RNA

Affinity Chromatography with ^{125}J -labeled RNA

Hartmut Kern

Institut für Botanik und Mikrobiologie, Kernforschungs-anlage Jülich

(Z. Naturforsch. **30 c**, 546–548 [1975]; received May 2, 1975)

Iodine-125, RNA, Polyadenylic Acid, Affinity Chromatography

Iodination of RNA with carrier-free ^{125}J changes the affinity to cellulose and polyuridylic acid. Because part of the radioactive RNA is tenaciously bound to the respective matrix [^{125}J]RNA cannot be used for affinity chromatography.

Das von Commerford¹ entwickelte Verfahren zur *in vitro* Jodierung von Polynucleotiden mit ^{125}J ermöglicht die radioaktive Markierung von Nucleinsäuren mit hoher spezifischer Aktivität. Es liegen zahlreiche Untersuchungen vor, die beweisen, daß sich jodierte RNA's für die molekulare Hybridisierungstechnik von Nucleinsäuren eignen und in dieser Beziehung keinen Unterschied gegenüber unbehandelten aufweisen². Auch fand ^{125}J -markierte RNA bei DNA-RNA-Hybridisierungen *in situ* in cytologischen Präparaten Verwendung³. Ferner wurde jodierte RNA für „Fingerprints“ und Sequenzanalysen benutzt⁴. Im Hinblick auf die biologischen Eigenschaften jodierter Ribonucleinsäuren wurde in einigen Fällen nachgewiesen, daß Transfer RNA auch nach Einführung von ^{125}J die Fähigkeit zur Aminoacylierung beibehält⁵. Von besonderem Interesse sind die Untersuchungen von Knöchel⁶ an Globin-Messenger-RNA. Nach Jodierung unter schonenden Bedingungen war diese mRNA in der Lage, noch ca. 30% ihrer ursprünglichen Effektivität bezüglich der Synthese von Globin-Ketten unter zellfreien Bedingungen zu entfalten.

Angesichts dieser relativ großen Stabilität jodierter Ribonucleinsäuren und der experimentellen Möglichkeit, schwer zugängliche RNA radioaktiv zu markieren, prüften wir wieweit die *in vitro* Markierung mit ^{125}J für den Nachweis von RNA mit endständigen Polyadenylsäure-Sequenzen (Poly A) herangezogen werden kann. Veranlassung hierfür waren keimungsphysiologische Untersuchungen an Weizenkaryopsen. Dabei interessierte u. a. die Frage, ob die in ruhenden Embryonen bereits vorliegende konservierte mRNA⁷

Poly A-Segmente enthält. Bei der Konzipierung eines einfachen Nachweises für Poly A-haltige RNA (mRNA) waren folgende Fakten ausschlaggebend: 1. Viele eukaryotische mRNA's sind durch das Vorhandensein von 3'-endständigen Poly A-Sequenzen charakterisiert⁸. In einigen Untersuchungen an Keimpflanzen von Weizen konnte ebenfalls mRNA mit Poly A-Segmenten nachgewiesen werden⁹. — 2. Aufgrund dieser Poly A-Sequenzen läßt sich mRNA selektiv anreichern, indem man die Affinität von Poly A gegenüber verschiedenen Adsorbenzien wie Polyuridylsäure (Poly U)¹⁰, Cellulose¹², Oligodesoxythymidylsäure¹³ oder Millipore-Filter¹⁴ ausnützt. — 3. Poly A ist resistent gegenüber der Einwirkung von Ribonucleasen (RNase A + T₁). — 4. Bei der *in vitro* Markierung mit ^{125}J wird dieses Nuklid fast ausschließlich in das Cytosin der Nucleinsäure eingebaut¹. — Unter der Voraussetzung, daß Poly A auch nach der Jodierung noch Bestandteil der betreffenden RNA ist, bestände die Möglichkeit, die im Cytosin markierte Poly A-haltige RNA durch Affinitätschromatographie anzureichern. Von einer auf diese Weise isolierten [^{125}J]mRNA wäre zu erwarten, daß nach einem RNase-Abbau und anschließender Affinitätschromatographie, z. B. an Poly U-Sepharose¹⁰, keine Bindung von Radioaktivität an diesen Träger erfolgen dürfte.

In Verfolgung dieses Zieles wurden die hier kurz beschriebenen Experimente durchgeführt. Zunächst wurden verschiedene RNA-Präparate aus Weizenembryonen oder aus Keimpflanzen gewonnen und nach den Angaben von Knöchel⁶ mit trägerfreiem ^{125}J umgesetzt. Zur Lokalisierung des Nuklids in der RNA und zur Differenzierung zwischen inkorporiertem und freiem ^{125}J erfolgte eine Hydrolyse mit Trifluoressigsäure, gefolgt von einer dünnschichtchromatographischen Trennung der Hydrolyseprodukte (Abb. 1)*. In allen untersuchten Fällen traten auf den Chromatogrammen zwei klar voneinander getrennte radioaktive Spots auf, die als Abbauprodukte von 5-Jodcytosin aufgefaßt werden¹. Für unsere Zwecke erwies sich diese drastische Hydrolyse als brauchbar, da es auch dann zu keiner Verschmierung der Chromatogramme kam, wenn hohe Radioaktivitäten eingesetzt wurden. In Fällen, in denen doppelmarkierte RNA, die zunächst *in vivo* mit [^3H]Adenosin markiert und nach Isolierung *in vitro* mit ^{125}J umgesetzt worden war, hydrolysiert wurde, ließen sich die beiden ^{125}J -haltigen Flecke klar von Tritium in der Position von Adenin trennen. Ferner kann mit dieser Methode freies ^{125}J von einge-

Sonderdruckanforderungen an H. Kern, D-5170 Jülich, KFA-IBO, Institut für Botanik und Mikrobiologie, Postfach 365.

* Abb. 1 siehe Tafel auf Seite 548 a.

Tab. I. Affinitätschromatographische Fraktionierung von RNA aus Weizenpolysomen.

RNA-Präparat	Behandlung	Trägermaterial	Durchlauf [%]	Eluat [%]	Bindung [%]
¹²⁵ J-Markierung	—	Cellulose	32	50,2	17,2
dto.	—	Poly U-Sepharose	76,7	10,1	13,2
dto.	RNase	Poly U-Sepharose	60,1	19,6	20,2
dto.	—	Poly U-Glasfaser	12	— **	88
dto.	RNase	Poly U-Glasfaser	65,4	—	34,6
³ H-Markierung, mit inaktivem Jod behandelt *	—	Poly U-Sepharose	94,1	—	5,9
dto.	RNase	Poly U-Sepharose	96,8	—	3,2
dto.	—	Poly U-Glasfaser	36,2	—	63,8
dto.	RNase	Poly U-Glasfaser	38,9	—	61,1

* *In vivo* mit [³H]Adenosin markierte polysomale RNA wurde durch Bindung an Poly U-Sepharose von Poly A befreit und dann *in vitro* mit inaktivem Jod umgesetzt.

** Bei diesen Fraktionierungen wurde auf die Eluierung verzichtet.

bautem unterschieden werden (Abb. 1, vgl. A und B mit D).

Wurde RNA aus den Polysomen von Weizenpflanzen nach 48 h Keimung isoliert, mit ¹²⁵J markiert und dann einer Affinitätschromatographie an Poly U-Sepharose¹⁰ oder Cellulose¹² unterworfen, so pasierte ein großer Teil der Radioaktivität die betreffende Säule. Allerdings war die an das Trägermaterial gebundene Radioaktivität zu hoch, um als Indikator für Poly A-haltige RNA gewertet zu werden (Tab. I). Zum anderen war die Bindung an die Säule derart fest, daß eine völlige Eluierung der gebundenen RNA mit Formamid¹⁰ oder dest. Wasser^{12, 17} mißlang. Obwohl die RNA nach der Jodierung durch mehrfache Passagen durch Sephadex G-25 und außerdem durch Dialyse von ungebundenem ¹²⁵J befreit war, wurde zusätzlich noch eine Reinigung der RNA mit Cetyltrimethylammoniumbromid¹¹ vorgenommen. Auch diese weiteren Reinigungsprozeduren hatten keinen Einfluß auf das Verhalten der [¹²⁵J]RNA gegenüber Poly U-Sepharose oder Cellulose. Die Abwesenheit von freiem ¹²⁵J konnte außerdem durch die chromatographische Analyse entsprechender Säurehydrolysate (s. oben) sichergestellt werden.

Da möglicherweise die für die Affinitätschromatographie verwendeten Materialien eine unspezifische Bindung der jodierten RNA bewirken könnten, wurde außerdem an Glasfaser-Filter gebundenes Poly U¹⁵ geprüft. Hierbei erfolgte jedoch eine noch stärkere Bindung (Tab. I). Diese Bindung an die benutzten Adsorbentien ließ sich nicht aufheben, wenn die RNA-Präparate vor der chromatographischen Fraktionierung mit einem Überschuß an zugesetztem Poly A inkubiert wurden. Damit läßt sich eine Beteiligung von Poly A-Sequenzen in der polysomalen RNA an dieser Bindung ausschließen. Von Interesse war ferner, daß eine vor der Chromato-

graphie durchgeführte RNase-Behandlung keine wesentliche Veränderung in der Bindung an das Säulenmaterial bewirkte. Demnach werden auch enzymatische Abbauprodukte der RNA an Poly U gebunden.

Um weiter sicherzustellen, daß die Jodierung selbst und nicht etwa noch vorhandenes freies ¹²⁵J für diese Ergebnisse verantwortlich zu machen ist, wurden entsprechende Versuche mit ³H-markierter polysomaler RNA durchgeführt. Nach einer *in vivo* Markierung mit [³H]Adenosin⁹ wurde die aus den Polysomen isolierte RNA durch mehrfache Passagen durch Poly U-Sepharose¹⁷ von Poly A-haltiger RNA befreit und bei sonst gleichen Bedingungen⁶ einer Jodierung mit inaktivem Jod ausgesetzt. Auch diese Präparate zeigen ein verändertes Verhalten bei der Affinitätschromatographie an Poly U. Trotz Abwesenheit von Poly A-haltiger RNA erfolgte eine Bindung von ³H an Poly U-Sepharose wie an Poly U-Glasfaser-Filter (Tab. I). Auch durch RNase-Behandlung der RNA ließ sich keine wesentliche Verringerung der Bindung an diese Adsorbentien bewirken.

Die hier mitgeteilten Ergebnisse dürften von allgemeinem Interesse sein. Offensichtlich werden durch die Jodierung Veränderungen verursacht, die zu einer unspezifischen Bindung der betreffenden RNA an das für die Affinitätschromatographie verwendete Material führen. Da nicht nur polysomale RNA, sondern auch ribosomale RNA und Transfer RNA ein ähnliches Verhalten nach der Jodierung zeigten, erscheint die Verwendung von [¹²⁵J]RNA für die Affinitätschromatographie für den eingangs erwähnten Zweck und bei den beschriebenen Bedingungen als aussichtslos.

Experimentelles

Die aus ruhenden oder aus Weizenkeimpflanzen gewonnene RNA⁹ wurde nach den Angaben von

Knöchel⁶ mit trägerfreiem ¹²⁵J umgesetzt und von ungebundenem Jod durch Fällung mit Äthanol, der in einigen Fällen mehrfache Passagen durch Sephadex G-25, Dialyse gegen 0,1 × SSC (SSC: 0,15 M NaCl – 0,015 M Natriumcitrat) oder Fällung mit CTAB¹¹ vorausgingen, befreit. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Tritium-Kanal eines TriCarb-Scintillationszählers². Die verwendeten RNA-Präparate hatten Aktivitäten in der Größenordnung von 10⁶ cpm/μg RNA.

Die Hydrolyse der RNA wurde mit Trifluoressigsäure¹⁶ in zugeschmolzenen Pyrexampullen 30 min bei 170 °C durchgeführt, das Hydrolysat im Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft, mit wenig Wasser aufgenommen, auf Cellulose-DC-Platten („Eastman Chromatogram Blatt 6055“ mit Fluoreszenzindikator) appliziert und eindimensional aufsteigend in Methanol – HCl – H₂O (70:20:10, v/v) chromatographiert. Die Identifizierung der Basen (Abb. 1 C) erfolgte anhand von Vergleichssubstanzen. Die Lokalisierung von ¹²⁵J auf den DC-Platten wurde durch Autoradiographie oder durch Messung der Radioaktivität in Teilabschnitten der Chromatogramme in Gegenwart von Instagel (Packard) im Scintillationszähler vorgenommen. Die in Abb. 1 A dargestellte Verteilung von ¹²⁵J erfolgte mit Hilfe

eines Dünnschichtscanners (Berthold) mit fensterloser Blende.

Die Affinitätschromatographie wurde an Cellulose (Sigma) nach den Angaben von Schutz *et al.*¹², an Poly U-Sepharose nach der Methode von Lindberg *et al.*¹⁰ unter Verwendung von Formamid oder nach Firtel *et al.*¹⁷ mit wässrigen Medien vorgenommen. Im Falle der Poly U-Glasfaser-Filter folgten wir der Originalmethode von Sheldon *et al.*¹⁵. Wie in Tab. I angeführt, wurde in einigen Analysen zwischen ungebundener (Durchlauf) und gebundener RNA differenziert und dabei eluierbare RNA von fest an das Säulenmaterial gebundener unterschieden. Bei den übrigen Fraktionierungen wurde auf eine Eluierung der RNA verzichtet und die nach Auswaschung der ungebundenen Nucleinsäure auf der Säule bzw. auf den Poly U-Filtern zurückbleibende Radioaktivität gemessen, indem die Poly U-Sepharose-Säulchen (100 mg) direkt und die Filter nach Waschung mit TCA und Äthanol¹⁵ in die Meßgläschen übergeführt wurden. Bei der Behandlung mit RNase wurden die Ansätze nach der Inkubation zur Inaktivierung des Enzyms mit Diäthylpyrocarbonat (0,1% v/v) versetzt und dann chromatographiert. Von den anfallenden Fraktionen wurden 1 ml-Portionen entnommen und im TriCarb gemessen.

¹ S. L. Commerford, *Biochem.* **10**, 1993 [1971].

² M. J. Getz, L. C. Altenburg u. G. F. Saunders, *Biochim. Biophys. Acta* **287**, 485 [1972].

³ W. Prensky, D. M. Steffensen u. W. L. Hughes, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **70**, 1860 [1973].

⁴ H. D. Robertson, E. Dickson, P. Model u. W. Prensky, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **70**, 3260 [1973].

⁵ F. J. Schmidt, D. R. Omilianowski u. R. M. Bock, *Biochemistry* **12**, 4980 [1973].

⁶ W. Knöchel, *Mol. Biol. Reports* **1**, 311 [1974].

⁷ D. Chen, S. Sarid u. E. Katchalski, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **60**, 902 [1968].

⁸ M. Adesnik, M. Salditt, W. Thomas u. J. E. Darnell, *J. Mol. Biol.* **71**, 21 [1972].

⁹ H. Kern, *Anal. Biochem.*, im Druck.

¹⁰ U. Lindberg u. T. Persson, *Eur. J. Biochem.* **31**, 246 [1972].

¹¹ A. Sibatani, *Anal. Biochem.* **33**, 279 [1970].

¹² G. Schutz, M. Beato u. P. Feigelson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**, 680 [1972].

¹³ M. Edmonds, *Procedures in Nucleic Acid Research* (G. L. Cantoni and D. R. Davies, eds.), **Vol. 2**, p. 629, Harper & Row, New York 1971.

¹⁴ S. Y. Lee, J. Mendecki u. G. Brawerman, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 1331 [1971].

¹⁵ R. Sheldon, Ch. Jurale u. J. Kates, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **69**, 417 [1972].

¹⁶ M. Klagsbrun, *J. Biol. Chem.* **248**, 2612 [1973].

¹⁷ R. A. Firtel, A. Jacobson u. H. F. Lodish, *Nature New Biol.* **239**, 225 [1972].

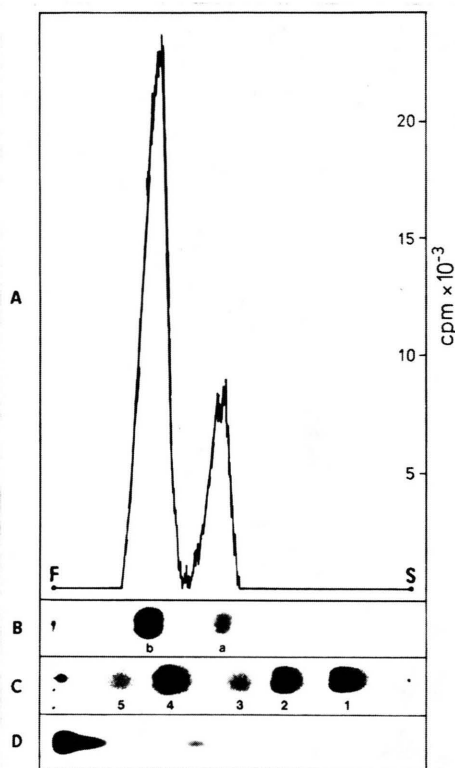


Abb. 1. Dünnschichtchromatographische Trennung von RNA-Hydrolysaten. Die Hydrolyse erfolgte mit Trifluoressigsäure¹⁶ bei 170 °C, die DC wurde auf Cellulose mit dem Laufmittel Methanol-HCl-H₂O (70:20:10, v/v) durchgeführt. — A: Verteilung der Radioaktivität im Hydrolysat von ^{125}J -markierter RNA aus Polysomen von Weizenpflanzen (48 h). Die Messung wurde mit einem Scanner vorgenommen. — B: Gleiches Präparat wie unter A, die Lokalisierung von ^{125}J erfolgte durch Autoradiographie. — C: Ortung der Basen im UV-Licht.: 1 = Guanin, 2 = Adenin, 3 = Cytosin, 4 = Uracil, Spot No. 5 wurde nicht identifiziert¹⁶. — D: Chromatographische Trennung eines hydrolysierten Gemisches aus trägerfreiem ^{125}J und nichtmarkierter Transfer RNA aus Weizen, Lokalisierung der Radioaktivität durch Autoradiographie. Die Lage des Startpunktes (S) und der Lösungsmittelfront (F) gilt für alle Chromatogramme.

