

3. Methodik

3.1 Gesamtübersicht

Die Abbildung 3 zeigt eine Gesamtübersicht der experimentellen Schritte, die bei der Isolierung und Identifizierung des Dinukleosidpolyphosphates Ap_6A aus den Nierengewebe angewandt wurden. Dieses Aufarbeitungsschema wurde insgesamt viermal durchgeführt. Im folgenden werden die einzelnen Schritte dargestellt.

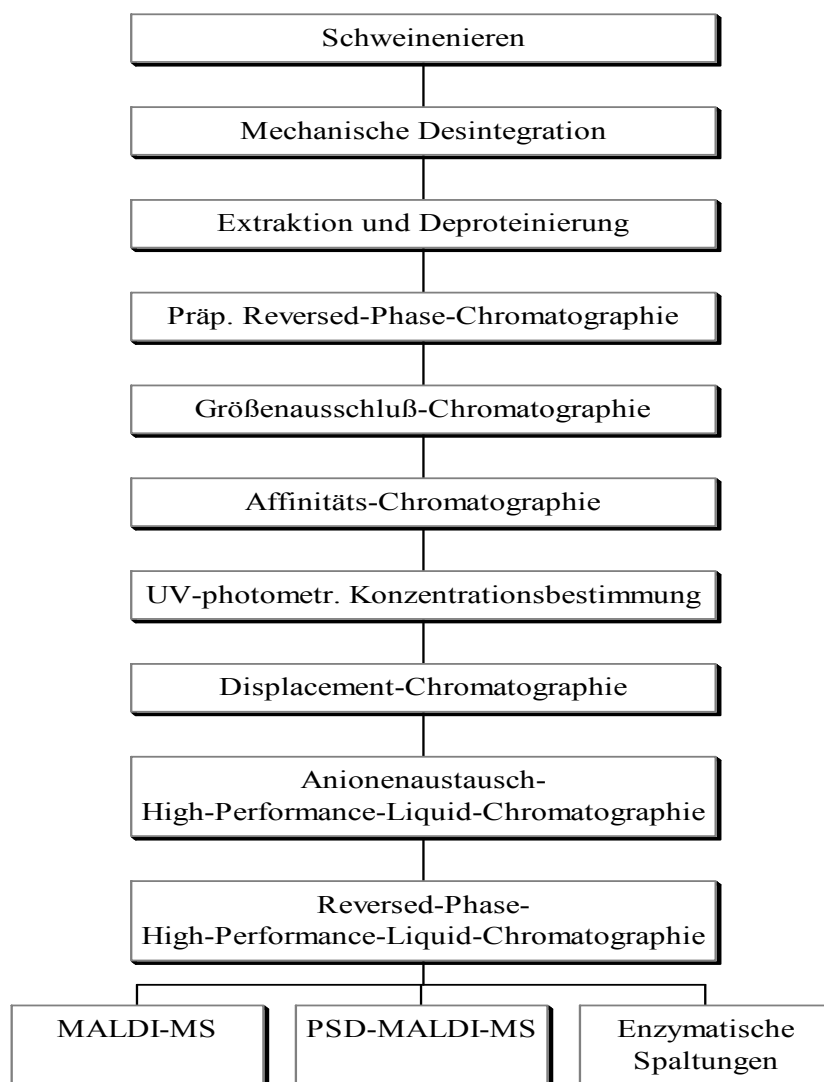


Abbildung 3: Isolierungs- und Charakterisierungsschritte zum Nachweis und zur Isolierung von Ap_6A aus Schweinenieren.

3.2 Isolierung der gesuchten vasoaktiven Substanz

3.2.1. Mechanische Desintegration

Mechanische Desintegration der Nieren basierte auf der von Wheelock beschriebenen Methodik (Wheelock, 1991). Unmittelbar nach Tod wurden Schweinen Nieren entnommen und diese bis zum Zerschneiden der Organe in eiskalter Ringer-Lösung aufbewahrt. Die Organe wurden von Fett- und Bindegewebe befreit, in Stücke von etwa 1 cm Kantenlänge geteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und lyophilisiert. Unter flüssigem Stickstoff wurden die gefriergetrockneten Schweinenieren gemörsert. Das entstandene Pulver wurde in Portionen von je 20 g abgewogen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80° C gelagert.

3.3 Extraktion mit PCA

20 g des Pulvers wurde mit 200 ml eiskalter 0,6 mM Perchlorsäure versetzt und mit Hilfe eines Ultra-Turrax in 10 Intervallen von je 30 sec mit Pausen von jeweils 60 sec bei 1200 U/s homogenisiert. Eiskühlung und Pausen von je 1 Minute sollten eine Temperatursteigerung über 4°C und somit einsetzende Abbaureaktionen verhindern. Das Homogenat wurde mit 100.000 g bei 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit Hilfe von konzentrierter KOH auf pH 9,0 titriert und eingefroren. Das entstehende Perchlorat wurde als KClO_4 mit einer erneuten Zentrifugation bei 4°C, 4.000 g für 10 Minuten entfernt. Der Überstand wurde bei -30°C eingefroren, lyophilisiert und der präparativen Reversed-Phase-Chromatographie zugeführt.

3.4 Reversed-Phase Chromatographie

Eine mit Reversed-Phase-Gel beladene Niederdrucksäule der Firma Merck (LiChroprep C18, 310 x 25 mm, Kieselgelmatrix, Korngröße 40-63 µm) wurde mit 200 ml 100% Acetonitril (ACN) konditioniert und mit wässrigem 40 mM Triethylammoniumacetat (TEAA) äquilibriert. Der aufgetauten Probe wurde 1 M TEAA hinzugefügt, bis eine Endkonzentration von 40 mM erreicht wurde. Gleichzeitig wurde der pH-Wert mit Hilfe

von 0,1 M Salzsäure auf 6,5 eingestellt. Die Probe wurde durch eine peristaltische Pumpe mit einer Flussrate von 2 ml/min aufgetragen. Danach wurde die Säule mit 200 ml 40 mM TEAA-Lösung gewaschen und anschließend mit 200 ml 30%iger ACN-Lösung eluiert. Die Säule wurde mit 100%igem Acetonitril gereinigt. Anschließend wurde das Eluat lyophilisiert und bei -30°C gelagert.

3.5 Größenausschluß-Chromatographie

Das Sephacryl-100-High Resolution Gel wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers (Pharmacia) vorbereitet. Es wurde 60 Minuten entgast und in eine Glassäule (100 x 1,6 cm) gefüllt. Die Lösung der Probe erfolgte in 5 ml Wasser, die Flussgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Die UV-Absorption wurde bei 254 nm kontinuierlich bestimmt und Fraktionen von 10 ml aufgefangen. Anschließend wurden die Fraktionen zusammengefasst, lyophilisiert und bei -30°C gelagert.

3.6 Affinitätschromatographie

3.6.1 Herstellung des Phenylboronsäure Bio-Rex-70-Gels

Eine Suspension von 100g Phenylboronsäure Bio-Rex-Resin-Gel (Acrylmatrix, Korngröße 70-150 μm , Firma Bio Rad Laboratories) erfolgte in 400 ml wässriger 0,25 M Natriumacetatlösung bei einem pH-Wert von 5,0. Nachdem der pH-Wert auf 5,0 eingestellt worden war, wurden 10g 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimidhydrochlorid zugefügt und 15 Minuten im Schüttler vermengt. Anschließend wurden 10 g m-Aminophenylboronsäurehemisulfat zugegeben und erneut 15 Minuten gemischt. Der pH-Wert wurde auf 5,0 eingestellt und das Gel 18 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Mittels einer Fritte wurde die Flüssigkeit abgetrennt und verworfen, das Gel in eine Glassäule (310 x 25 mm) gegeben und mit 1 Liter dest. Wasser gewaschen. Danach wurden weitere Waschschrte mit 500 ml einer 100 mM Natriumacetat- und 1 M Natriumchloridlösung bei einem pH-Wert von 4,5 und 500 ml einer wässrigen 100 mM Ammoniumacetat- und 1 M Natriumchloridlösung durchgeführt. Zuletzt wurde das Gel mit 500 ml dest. Wasser aufgefüllt und 60 Minuten entgast.

3.6.2 Festphasenextraktion mit PBA

Zunächst wurde das in einer Glassäule gefüllte PBA-BioRex-70-Gel mit 200 ml dest. Wasser gewaschen. Die Säule wurde mit wässriger 1 M Ammoniumacetatlösung (pH 9,5) äquilibriert. Nach Auftragen der Probe und Erreichen der Basislinie wurden die gebundenen Substanzen mit wässriger 10 mM HCl-Lösung eluiert. Die UV-Absorption wurde bei 254 nm gemessen. Das Eluat wurde eingefroren. Jeweils wurden 10 PBA-Läufe zusammengefasst.

3.7 UV-Spektroskopie

Für die Untersuchungen wurde ein UV/Vis- Spektrophotometer der Firma Beckmann (DU 600) benutzt. Für die Messungen wurden Quarzküvetten mit einem Volumen von 60 µl und mit 10 mm Schichtdicke verwendet. Die Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 200-450 nm aufgenommen. Als Referenz diente das Wasser.

3.8 Displacementchromatographie

Es wurde eine Supersphere RP18 HPLC-Säule der Firma Merck (250 x 4,6 mm, Korngröße 4 µm) eingesetzt. Die Äquilibrierung der Säule erfolgte mittels 40 mM TEAA-Lösung (Flussrate: 0,1 ml/min). Die Probe wurde in 1 ml 40 mM TEAA in Wasser gelöst, zentrifugiert (10 min, 4° C, 4.000g) und anschließend mit einer Flussrate von 0,1 ml/min auf die Säule aufgetragen. 40 mM TEAA-Lösung diente als Trägersubstanz und 160 mM n-Butanol in 40 mM TEAA-Lösung als Displacer. Die UV-Absorption wurde bei 254 nm gemessen. Das Eluat wurde fraktioniert, gesammelt, mit einer Vakuumentrifuge getrocknet und bei -80° C gelagert.

3.9 Anionenaustausch-Chromatographie

Es wurde die MonoQ-HR-5/5-Säule der Firma Pharmacia Biosystems (50 x 0,5 mm, Korngröße 10 μm) benutzt. Das hydrophobe Harz Mono Beads basiert auf einer Polystyren-Divinylbenzen-Matrix und wurde als Trägermaterial benutzt.

Die Äquilibration der Säule erfolgte mit wässriger 20 mM K_2HPO_4 -Lösung. Die Probe wurde in wässriger 20 mM K_2HPO_4 -Lösung gelöst, zentrifugiert und auf die Säule aufgetragen. Zur Elution wurde eine wässrige 20 mM K_2HPO_4 /1 M NaCl-Lösung verwendet. Dabei wurde der in der Tabelle 2 dargestellte Gradient benutzt.

Die UV-Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm gemessen. Die Leitfähigkeit wurde kontinuierlich registriert.

Tabelle 2: Gradient der Anionenaustausch-Chromatographie (Säule: Mono-Q-5/5, Fa. Pharmacia; Flussrate: 0,5 ml/min; UV-Absorption: 254 nm)

Zeit [min]	Konzentration [%]
0	0
10	5
100	35
105	40
115	100

3.10 Reversed-Phase-Chromatographie

Die Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie wurden mit wässriger 1 M TEAA-Lösung auf eine TEAA-Endkonzentration von 40 mM gebracht. Danach wurden die Fraktionen auf einer Supersphere 100 RP-C18 end-capped-Säule (250 x 4 mm, mittlere Korngröße 4 μm , mittlere Porengröße 10 μm) getrennt. Als Elutionsmittel diente Acetonitril. Die Fraktionsgröße betrug 1 ml bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Die Fraktionen, die eine UV-Absorption zeigten, wurden mittels einer Vakuumzentrifuge eingedampft und bei -80°C gelagert.

Tabelle 3: Gradient der Reversed-Phase-Chromatographie (Säule: Supersphere 100 C18endc., Fa. Merck; Flussrate: 0,5ml/min; UV-Absorption: 254 nm)

Zeit [min]	Konzentration [%]
0	0
4	2
50	7
56	60
57	80
61	80

3.11 Analytik

3.11.1 MALDI-Massenspektrometrie

Als Probenmatrix wurde 3-Hydroxypicolinsäure (50 mg/ml) benutzt. Die Probenpräparation erfolgte nach der von Nordhoff entwickelten Methode (Nordhoff, 1992).

1-2 µl Matrixlösung wurde tropfenförmig auf den Probenhalter des Massenspektrometers pipettiert. Nachdem die gefriergetrockneten Proben in 10 µl dest. Wasser gelöst worden waren, wurde 1 µl dieser Lösung mit Matrixtröpfchen auf dem Probenträger vermischt. Danach wurde 0,5 µl Kationenaustauscherharz hinzugefügt. Anschließend wurde die Probe eingetrocknet und der Probenhalter über die Vakuumschleuse in das Massenspektrometer eingesetzt. Das Laserlicht wurde mit einer Pulsdauer von 3-5 ns ausgesendet, hatte eine Wellenlänge von 337 nm und wurde in einem Winkel von 45° auf den Probenhalter gelenkt. Die Desorption der Probenionen erfolgte durch Beschuss der Probe mit einer Energie von 10^6 - 10^7 W/cm² und einer kreisförmigen Bestrahlungsfläche von 50-100 µm Durchmesser. Für die Untersuchungen wurde ein Reflektor-Flugzeitmassenspektrometer (BRUKER REFLEX III) benutzt.

3.11.2 PSD-MALDI-Massenspektrometrie

Die isolierte Substanz wurde in 10 µl Wasser gelöst. Als Probenmatrix wurde wiederum 3-Hydroxypicolinsäure gewählt. Auf die metallische Oberfläche des Proben Tellers wurde 1 µl des resultierenden Gemisches pipettiert und zur vollständigen Trocknung eingedampft. Die Ionisation der Proben erfolgte mit einem Stickstofflaser (337 nm, 5 ns Pulsdauer). Es wurde ein zweistufiger Reflektor verwendet und ein Beam-Blanker eingesetzt, durch den die Ionen ausgeblendet werden können. Die Beschleunigungsspannung betrug 10 kV und es wurde mit einem Druck von $6-8 \times 10^{-12}$ mbar gearbeitet. Es wurden jeweils 50-100 Spektren summiert. Um ein Fragmentspektrum zu erhalten, betrug die Dauer einer Messung 5-10 Minuten.

3.11.3 Vergleich der Retentionszeiten

Es handelt sich bei der Säule um eine RP-Perfusionssäule mit Poren (6.000-8.000 Å) in den Partikeln des Säulenfüllmaterials. Diese Poren ermöglichen, dass die zu trennenden Substanzen bei genügend hoher Flussrate mit der mobilen Phase durch die Partikel hindurch fließen, statt von außen in diese hinein zu diffundieren. Dadurch sind höhere Flussraten möglich als bei herkömmlichen Säulen, ohne dass die Trennung an Auflösung verliert.

Für diese Messungen wurde die Poros R2/H-Säule (2,1x100 mm) verwendet und mit einer 2 mM TBAHSO₄- und 10 mM K₂HPO₄-Lösung bei einem Fluss von 300 µl/min äquilibriert. Die Probe wurde im gleichen Lösungsmittel aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Es wurde mit 80% ACN-Lösung eluiert. Dazu wurde der in der Tabelle 4 gezeigte Gradient mit kontinuierlichem Übergang gewählt. Die UV-Absorption erfolgte bei 254 nm. Die Größe der einzelnen Peakflächen wurde integriert.

Tabelle 4: Gradient der Reversed-Phase-Chromatographie zum Vergleich der Retentionszeiten der isolierten Substanzen und der authentischen Ap_xA, x=2-6(Flussrate: 300 µl/min; UV-Absorption: 254 nm)

Zeit [min]	Konzentration [%]
0	0
4	10
16	22
17	50

3.11.4 Enzymatische Spaltungen

Zur Strukturaufklärung wurden die bis zur Homogenität aufgereinigten und gefriergetrockneten Proben enzymatisch gespalten. Mit alkalischer Phosphatase (EC 3.1.3.1.) lassen sich terminale Phosphatgruppen identifizieren, Die 5'-Nukleotidase (Schlangengift, EC 3.1.15.1.) und die 3'-Nukleotidase (Kalbs-Milz, EC 3.1.16.1.) wurden benutzt, um die Bindung der Phosphate in 3'- oder 5'-Position an der Ribose der Nukleotide zu bestimmen. Für die enzymatischen Spaltungen wurden die getrockneten Probenmoleküle in jeweils 10 µl Wasser gelöst. 1 µl Lösung und 1 µl (0,01 U/ml) des jeweiligen Enzyms wurden gemischt und bei 37°C für 5 Minuten inkubiert. Das Enzym wurde durch Zentrifugieren mit einem Filter (10 kD cut-off) entfernt. Das Produktgemisch wurde mit der Anionenaustausch-Chromatographie (HPLC, Mono-Q HR 5/2 Pharmacia, Schweden) auf Spaltprodukte untersucht. Es wurde mit folgenden Gradienten gearbeitet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Gradient der Mono-Q HR 5/2-Säule der enzymatischen Spaltungen.

Zeit [min]	Konzentration [%]
0	0
3	0
20	50
21	100
22	100