

4. Ergebnisse

4.1 Die Chromatographieschritte zur Isolierung von Diadenosinhexaphosphat (Ap_6A)

4.1.1 Größenausschluss-Chromatographie

Die konzentrierte Probe wurde nach mechanischer Desintegration, Extraktion und präparativer Reversed-Phase Chromatographie der Größenausschluss-Chromatographie zugeführt. Das Chromatogramm zeigt zwei unscharf voneinander getrennte Peaks mit UV-Maxima bei 56,5 bzw. 112 Minuten. Im Bereich von ca. 125 bis 320 Minuten finden sich ineinander übergehende UV-Peaks.

Der dritte Peak stimmt in etwa mit dem ersten der beiden Leitfähigkeitspeaks überein. Der Anstieg der Leitfähigkeit deutet auf den Beginn der Elution der Probensalze bzw. geladener Substanzen hin, die bei 240 Minuten endet.

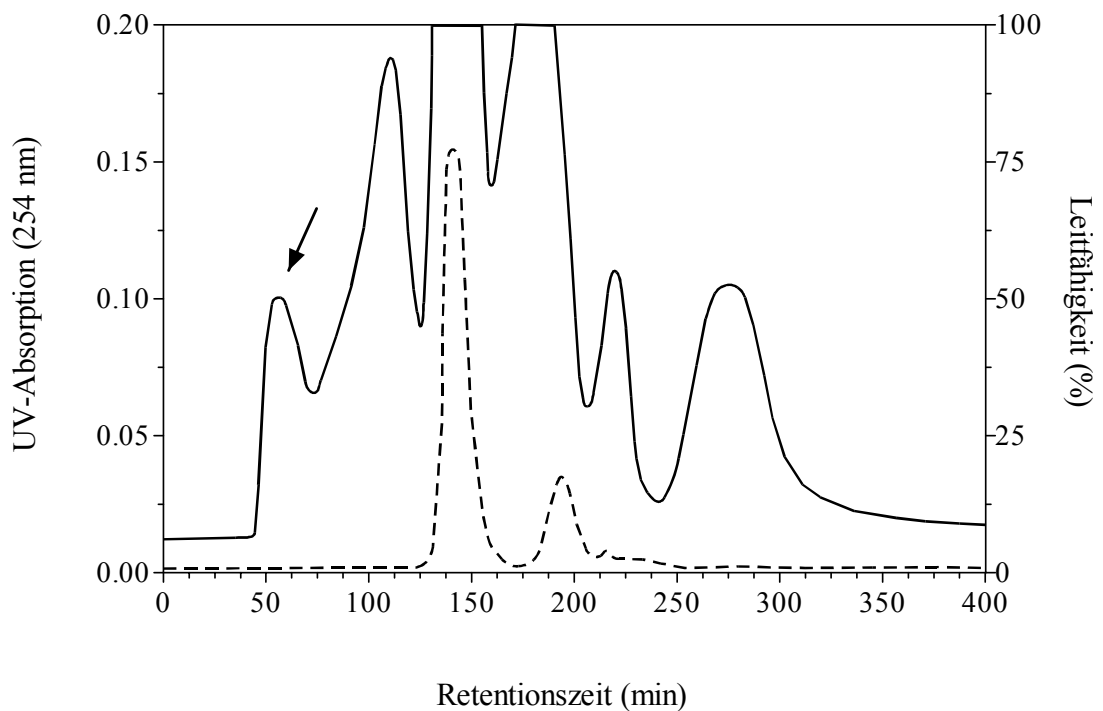


Abbildung 4: Chromatogramm der Größenausschluss-Chromatographie

Probe: Lyophilisat des Eluates der präparativen Reversed Phase
Säule : Sephacryl-100 High Resolution Gel, 1,6 x 100 mm

Fortsetzung der legende der Abb.4 von Seite 30

Fa. Pharmacia, Schweden
Laufmittel: Wasser
Fluss: 1 ml/min
Fraktionsgröße: 10 ml
UV-Detektion: 254 nm
—————: UV-Absorption
-----: Leitfähigkeit

4.1.2 Affinitätschromatographie

Zunächst wurde an den Kationenaustauscher Bio-Rex-70-Gel (Acrylmatrix mit einer Korngrößen von 70-150 μm) m-Amino-Phenylboronsäure angelagert, um die Anbindung von anionischen Dinukleotidpolyphosphaten über cis-Diol-Gruppen zu gewährleisten. Das Eluat der Größenausschluss-Chromatographie wurde über PBA-Bio-Rex-Trennsäule chromatographiert. Das Chromatogramm zeigte folgenden Verlauf:

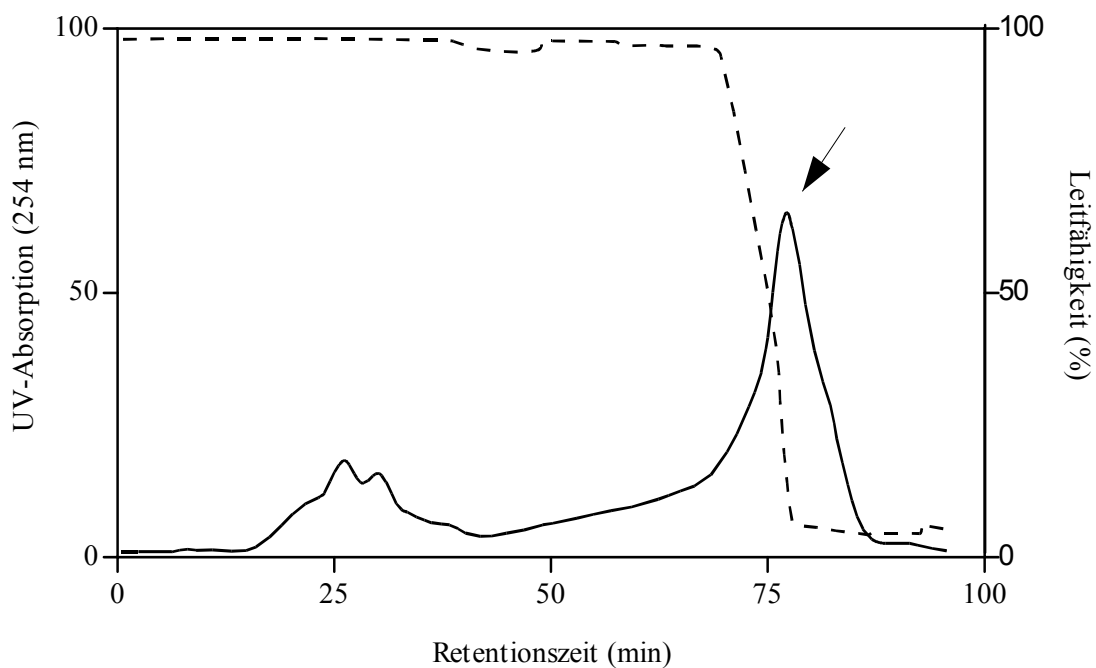


Abbildung 5: Affinitätschromatographie

Legende der Abb.5 auf Seite 32

Probe:	Gesammelte Fraktion aus der Größenausschluss-Chromatographie
Säule:	PBA-BioRex70
Eluent A:	1M NH ₄ Ac, pH 9,5
Eluent B:	10mM HCl
Fluss:	1ml/min
UV-Detektion:	254 nm
_____:	UV-Absorption
-----:	Leitfähigkeit

Das Chromatogramm zeigt zwei deutlich voneinander getrennte Peaks. Der erste breite, größere Peak eluiert in einem Zeitraum von 15-35 Minuten. Er enthält alle nicht an das Gel anbindenden Substanzen. Nachdem dieser in der UV-Absorption die Basislinie erreicht hat, wurde die Substanz mit 10 mM HCl eluiert (zweite Peak auf der Abbildung 5). Dieser zweite Peak geht mit einem Absinken der Leitfähigkeit einher. Das HCl-Eluat wurde im Zeitraum zwischen 75-90 Minuten, dem Zeitpunkt des neuerlichen Erreichens der Basislinie, gesammelt, danach entsalzt und anschließend lyophilisiert.

4.1.3 Displacementchromatographie

Das Eluat aus der Affinitätschromatographie wurde einer Reversed Phase-Säule zugeführt. Es ergab sich folgendes Chromatogramm:

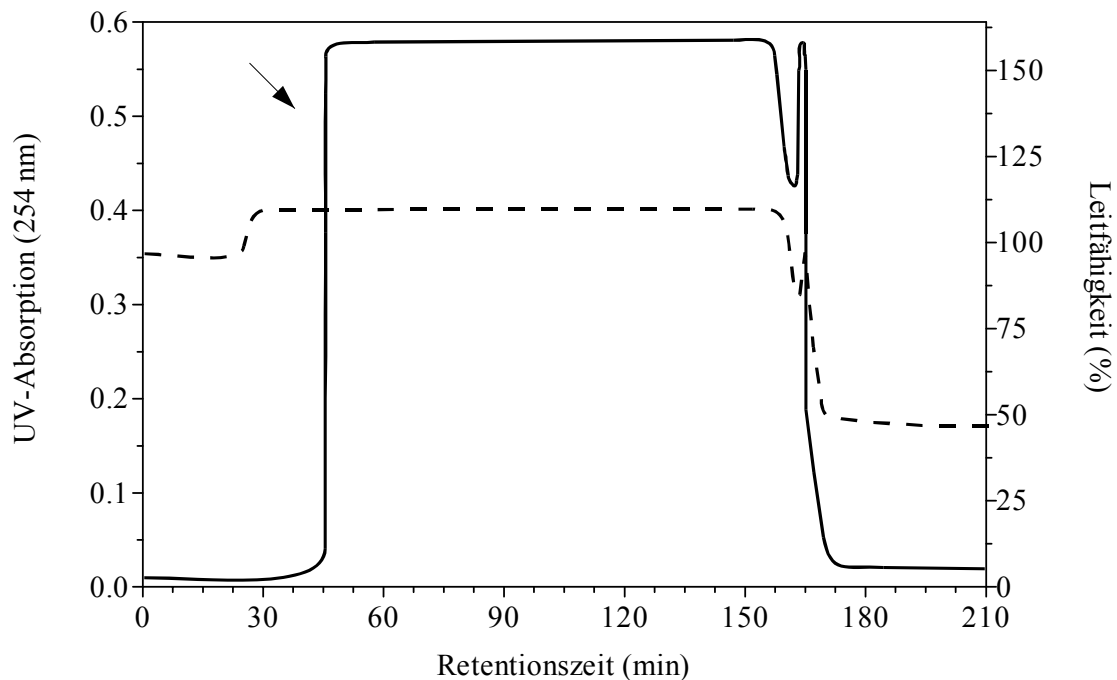


Abbildung 6: Displacementchromatographie

Probe:	Eluat aus der Affinitätschromatographie
Säule:	Supersphere RP 18 HPLC Säule (250 x 4,6mm)
Laufmittel:	40 mM TEAA in Wasser
Displacerlösung:	160 mM n-Butanol in 40 mM TEAA in Wasser
Flussrate:	0,1 ml/min
UV-Detektion:	254 nm
_____:	UV-Absorption
-----:	Leitfähigkeit

In diesem Chromatogramm sind zwei UV-Absorptions-Banden unterscheidbar. Die erste und breitere Bande im Zeitraum 0,45h bis 2h 35min entsteht durch Substanzen, die an die Säule anbinden bzw. eine nur geringe Affinität zu der stationären Phase der Säule aufweisen. Die zweite abgrenzbare Bande eluiert zwischen 2h 40min und 2h 45min. Die Fraktion, die aus diesem Bereich gesammelt wurde, beinhaltet das gesuchte Nukleotid.

4.1.4 Anionenaustausch-Chromatographie

Die Trennung erfolgte nach Ladung und Hydrophobizität. Das lyophilisierte Eluat aus dem ersten Peak der Displacement-Chromatographie wurde anschließend über eine Anionenaustausch-HPLC-Säule chromatographiert. Abbildung 7 zeigt das entsprechende Chromatogramm.

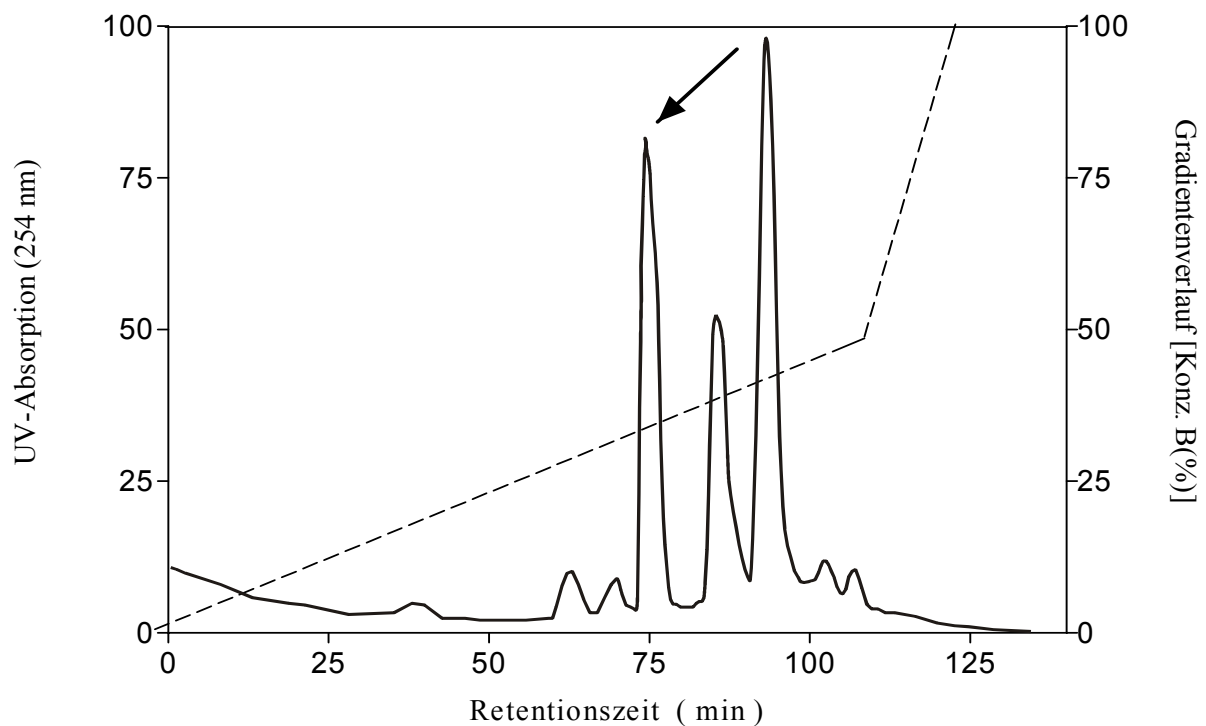


Abbildung 7: Anionenaustausch-HPLC

Probe:	Lyophilisat der Fraktion der Displacementchromatographie
Säule:	Mono-Q-HR-5/5-Säule (50 x 0,5mm , Fa. Pharmacia Biosystems)
Laufmittel A:	20 mM K_2HPO_4 -Lösung, pH 8
Laufmittel B:	20 mM K_2HPO_4 in Wasser 1M NaCl in Wasser
	0 min : 0% B; 0-10 min: 0-5% B; 10-100 min: 5-35% B; 100-105 min : 35-40% B; 105-115 min: 40-100% B
Fluss:	0,5 ml/min
UV-Detektion	254 nm

Das Chromatogramm zeigt drei deutliche Peaks. Fraktionen mit einer ausgeprägten UV-Absorption wurden im weiteren Verlauf auf die zu bestimmende Substanz hin untersucht. Es wurden folgende Fraktionen : 43-46 gesammelt. Diese Fraktionen (43-46) sind in der Abbildung gekennzeichnet.

Der nächste Trennungsvorgang wurde auf einer Reversed Phase-HPLC-Gel durchgeführt.

4.1.5 Reversed-Phase-Chromatographie

Die Fraktionen 43-46 der Anionenaustausch-HPLC wurden auf einer RP-HPLC-Säule weiter fraktioniert. Um eine Trennung auf dieser Säule zu erreichen, mussten die Fraktionen in 40 mM TEAA-Wasser als Ionenpaarreagenz gelöst werden. Folgendes Chromatogramm wurde detektiert:

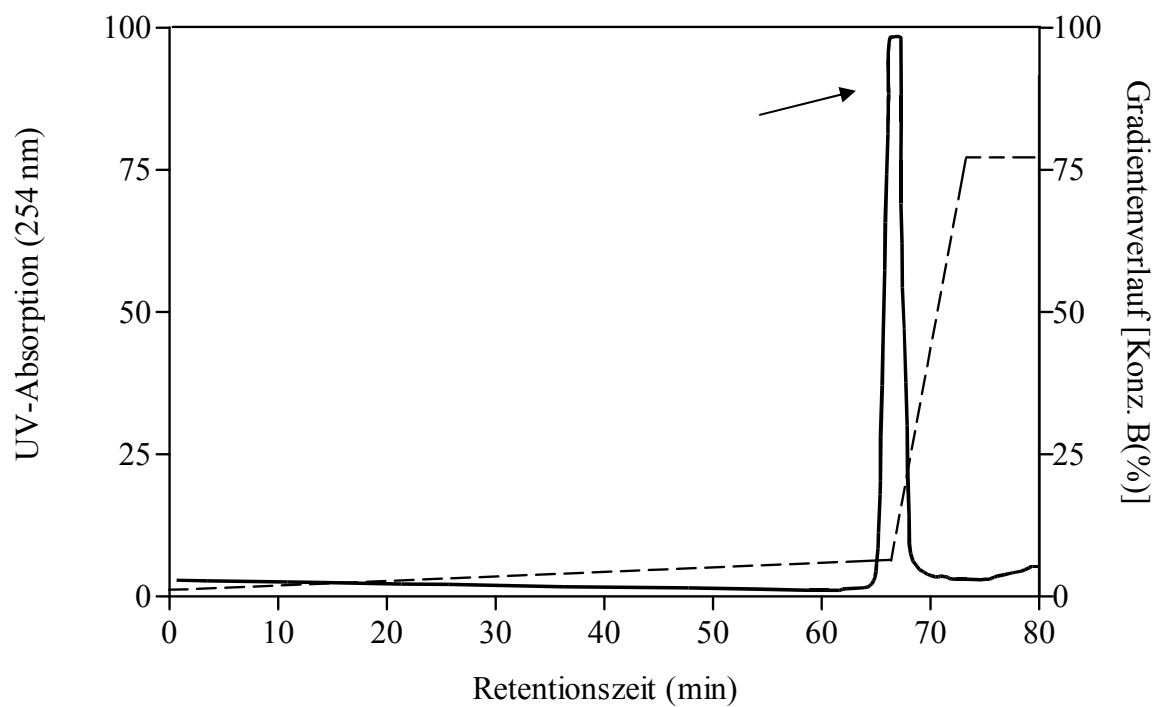


Abbildung 8: Chromatogramm der Reversed Phase-HPLC

Legende der Abb.8 auf Seite 36

Probe: Fraktion 43-46 der Anionenaustausch-HPLC
Säule: Supersphere 100 RP-C18 endcapped
(250 x 4 mm, Fa. Merck)
Laufmittel A: 40 mM TEAA in Wasser
Laufmittel B: 100% ACN
0 min: 0% B; 0-4 min: 0-1% B; 4-50 min: 1-10% B;
50-56 min: 10-60% B; 56-57 min: 60-80% B; 57-61 min: 80% B
Fluss: 0,5 ml/min
UV-Detektion : 254 nm

Bis zur 60. Minute bleibt die UV-Absorption im Bereich der Basislinie, zeigt dann aber innerhalb der nächsten 10 Minuten einen Peak von höherer Intensität.

Die Massen der Substanzen der Fraktionen, die in dem Retentionsbereich von 64 Minuten bis 66 Minuten eluieren (Fraktionen 94-95) wurden anschließend mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie bestimmt.

4.2 Identifizierung der isolierten Substanz

4.2.1 MALDI-Massenspektrometrie

Die aufgereinigte und entsaltzte Fraktionen der Reversed Phase-HPLC (Fraktionen 94-95, Abb.8) wurden der MALDI-Massenspektrometrie zugeführt. Nachstehendes Spektrum wurde dabei aufgenommen (Abb.9):

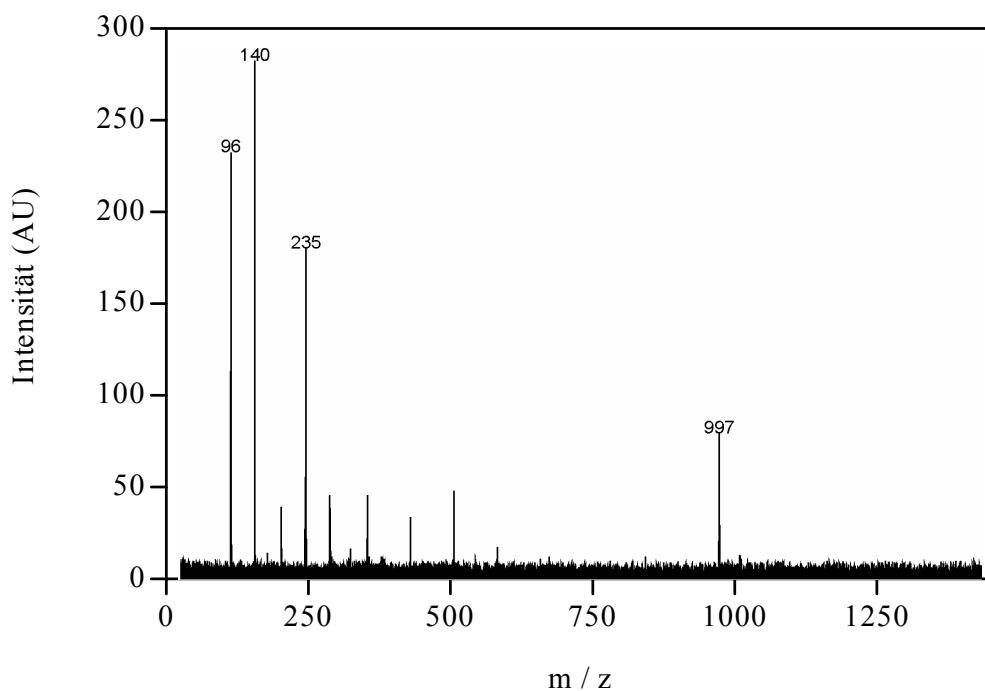


Abbildung 9: Maldi-Massenspektrometrie der lyophilisierten Fraktionen des pfeilmarkierten Peaks aus Abb. 8

Ordinate: relative Intensität
Abszisse: Massenzahl pro Ladung (m/z)

Durch die MALDI-Massenspektrometrie konnte für gesuchte vasoaktive Substanz eine Masse von 997 Da bestimmt werden (Abb.9). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde festgestellt, dass es sich bei der isolierten Substanz um Diadenosinhexaphosphat (Ap_6A) handelt. Alle übrigen Massenpeaks entstehen durch desorbierte Matrixmoleküle.

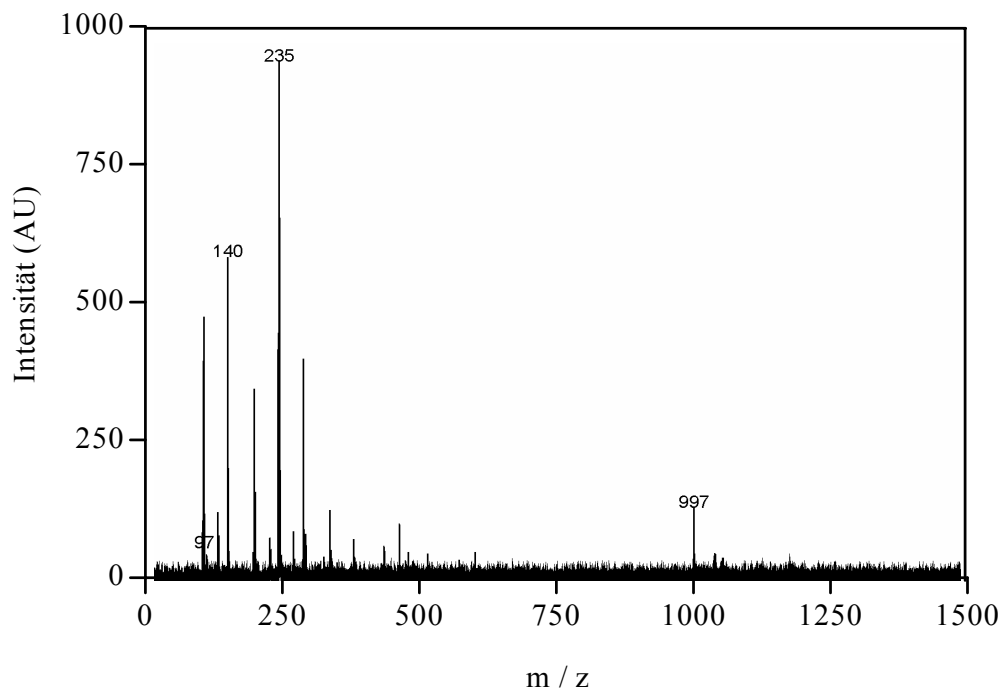


Abbildung 10 MALDI-Massenspektroskopie der lyophilisierten Fraktionen des pfeilmarkierten Peaks aus Abb. 8

Ordinate: relative Intensität

Abszisse: Massenzahl pro Ladung (m/z)

Das Massenspektrum in Abb.10 enthält einen Peak bei 997 Dalton. Dieser Massenzahl kann als zugehörige Substanz Ap₆A zugeordnet werden.

4.2.2 PSD-MALDI-Massenspektrometrie

Eine Sequenzanalyse der pfeilmarkierten Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie (Fraktionen 94-95) erfolgte mit Hilfe der PSD-MALDI-Massenspektrometrie.

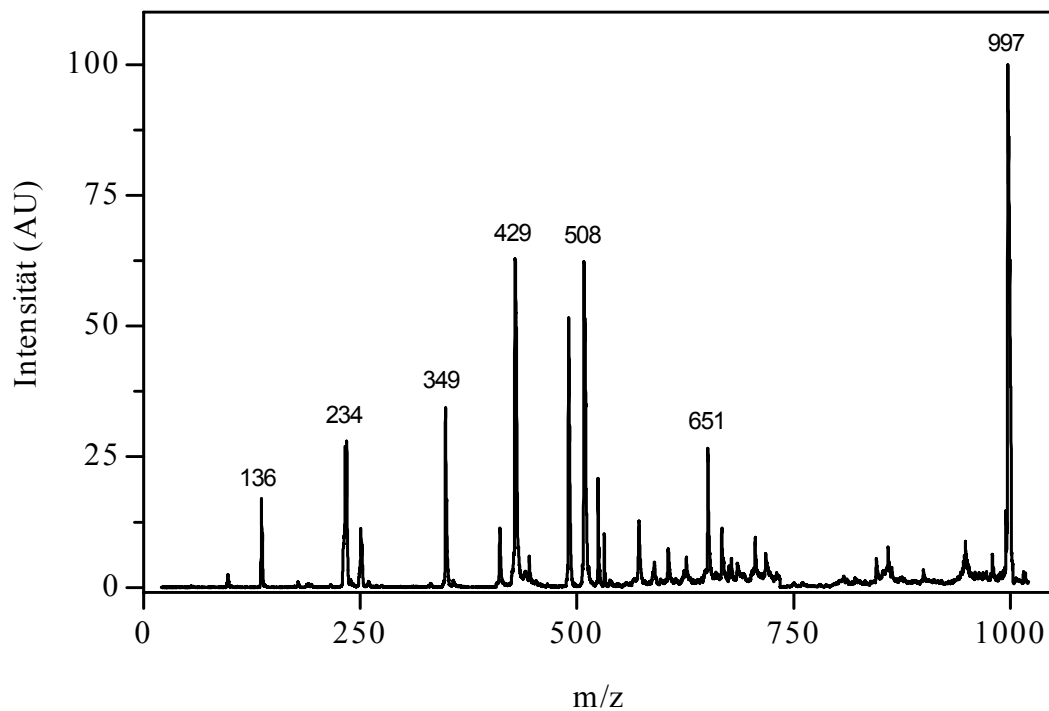


Abbildung 11: PSD-MALDI-Massenspektren der lyophilisierten Fraktion des pfeilmarkierten Peaks aus Abb. 8

Ordinate: relative Intensität

Abszisse: Massenzahl pro Ladung (m/z)

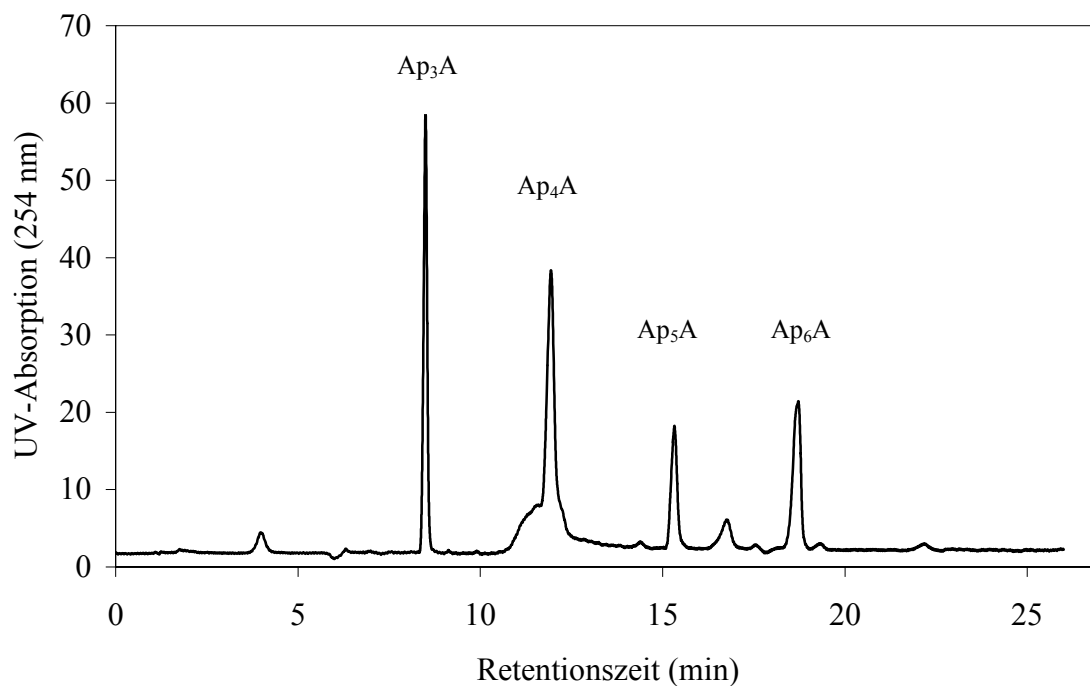
Folgende Moleküle bzw. Molekülfragmente konnten den aufgezeichneten Massenpeaks im Rahmen der Massengenauigkeit zugeordnet werden (Tabelle 6).

Tabelle 6: MALDI-MS der Fraktionen 94-95 der Reversed Phase-Chromatographie

Massenzahl als $[M+H]^+$	Zuordnung
96	Phosphat
140	Adenin
235	Adenosin
997	Ap ₆ A
97	Phosphat
140	Adenin
235	Adenosin
997	Ap ₆ A

4.2.3 Vergleich der Retentionszeiten

Die in einer Vakuumzentrifuge eingedampften und in 2 mM TBAHSO₄- und 10 mM K₂HPO₄-Lösung gelösten Fraktionen 94 und 95 der Reversed Phase-HPLC wurden einzeln mit Hilfe der Poros R2/H-Säule chromatographiert. Um Vergleichsmöglichkeiten zu gewinnen, wurde ein Standardlauf gemacht. Es wurden folgende Chromatogramme detektiert:

**Abbildung 12:** RP-Chromatographie eines Standardgemisches

Legende auf Seite 41

Probe : Gemisch aus Ap₃A, Ap₄A, Ap₅A, Ap₆A
 Säule : Poros R2/H (2,1 x 100 mm)
 Laufmittel : 2 mM TBAHSO₄ / 10 mM K₂HPO₄
 Eluent : A: 2 mM TBAHSO₄ / 10 mM K₂HPO₄
 B: 80% ACN
 Fluss : 300 µl/min
 UV-Detektion : 254 nm

Das Chromatogramm der Trennung von authentischen Ap₃A, Ap₄A, Ap₅A, Ap₆A zeigt vier voneinander Basislinien-getrennte Peaks. Den einzelnen Peaks sind dabei folgende Substanzen mit den entsprechenden Retentionszeiten zuzuordnen:

Tabelle 7:RP-Chromatographie-Ergebnisse eines Standardgemisches

Substanz	Retentionszeit (min)
Ap ₃ A	8,5
Ap ₄ A	11,9
Ap ₅ A	15,3
Ap ₆ A	18,7

Zur Bestätigung, dass es sich bei der isolierten Substanz um Diadenosinhexaphosphat handelt wurde die Retentionszeit der isolierten Substanz auf einer Reversed-Phase-C18-Säule mit der Retentionszeit von reinem Diadenosinhexaphosphat verglichen (Abb.13 und 14).

Beide Chromatogramme zeigen jeweils einen breitbasigen UV-Peak mit einem Maximum bei 18,4 min (Abb.13 und 14). Ein Retentionszeitenvergleich mit authentischer Substanz ergab, dass die Retentionszeit der isolierten Substanz identisch mit der von Adenosinhexaphosphat (Ap₆A) ist. Die Annahme, dass es sich bei der hydrophilen, anionischen Verbindung um ein Diadenosinhexaphosphat handelt, konnte somit bestätigt werden.

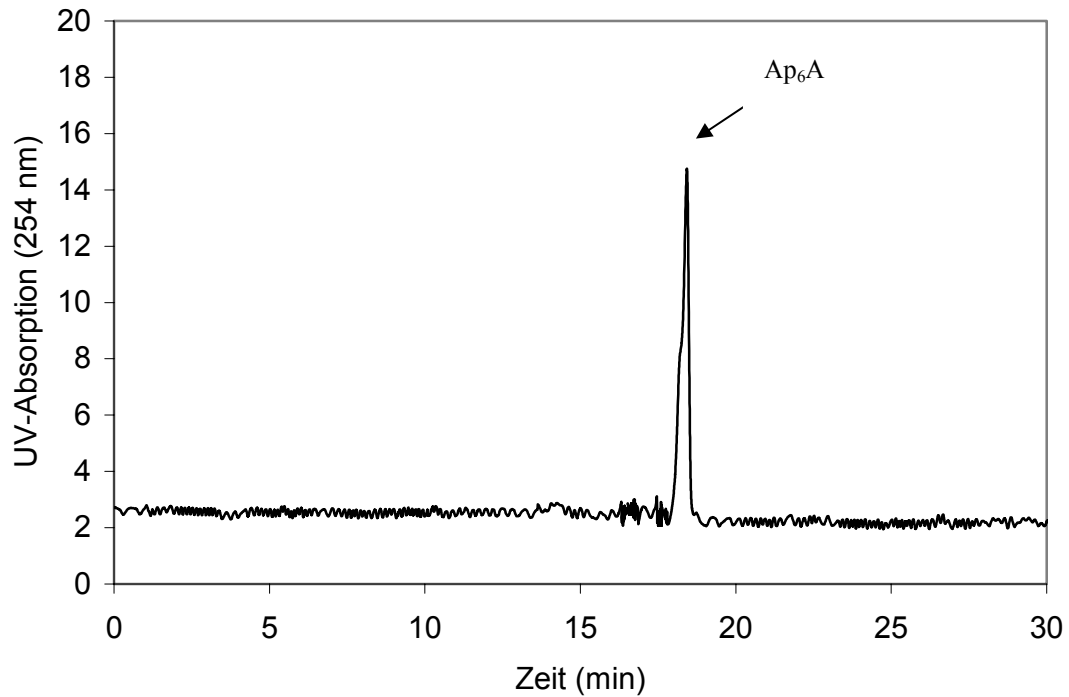


Abbildung 13: Fraktion 94 der Reversed Phase-HPLC (Aus Abb.8)

Säule: Poros R2/H (2,1x 100 mm),
Hersteller: Applied Biosystems
Laufmittel: 2 mM TBAHSO₄ / 10 mM K₂HPO₄
Eluent: A: 2 mM TBAHSO₄/ 10 mM K₂HPO₄
B: 80% ACN
Fluss: 300 µl/min
UV-Detektion: 254 nm

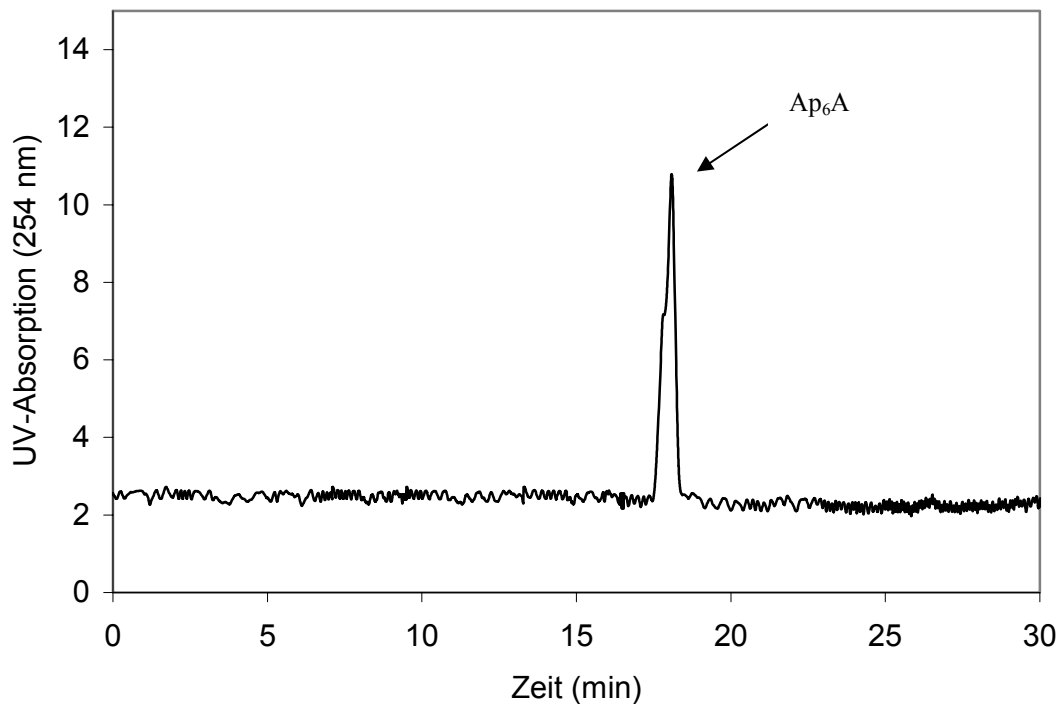


Abbildung 14: Fraktion 95 der Reversed Phase-HPLC (Aus Abb.8)

Säule: Poros R2/H (2,1 x 100 mm),
Hersteller: Applied Biosystems
Laufmittel: 2 mM TBAHSO₄/ 10 mM K₂HPO₄
Eluent: A: 2 mM TBAHSO₄/ 10 mM K₂HPO₄
B: 80% ACN
Fluss: 300 µl/min
UV-Detektion: 254 nm

4.2.4 UV-Spektroskopie

Durch die UV-spektroskopische Untersuchungen sollte weiterhin geklärt werden, ob es sich bei der isolierten Substanz um Adenosinhexaphosphat (Ap₆A) handelt. Es wurde ein Absorptionsspektrum zwischen 200 und 450 nm gewählt.

Dadurch, dass die lyophilisierten aktiven Fraktionen bei einem pH-Wert von 3,0 , 7,0 und 9,0 spektroskopisch untersucht wurden, gelang es die Anhaltspunkte über die Substanzklasse der vasoaktiven Moleküle zu gewinnen.

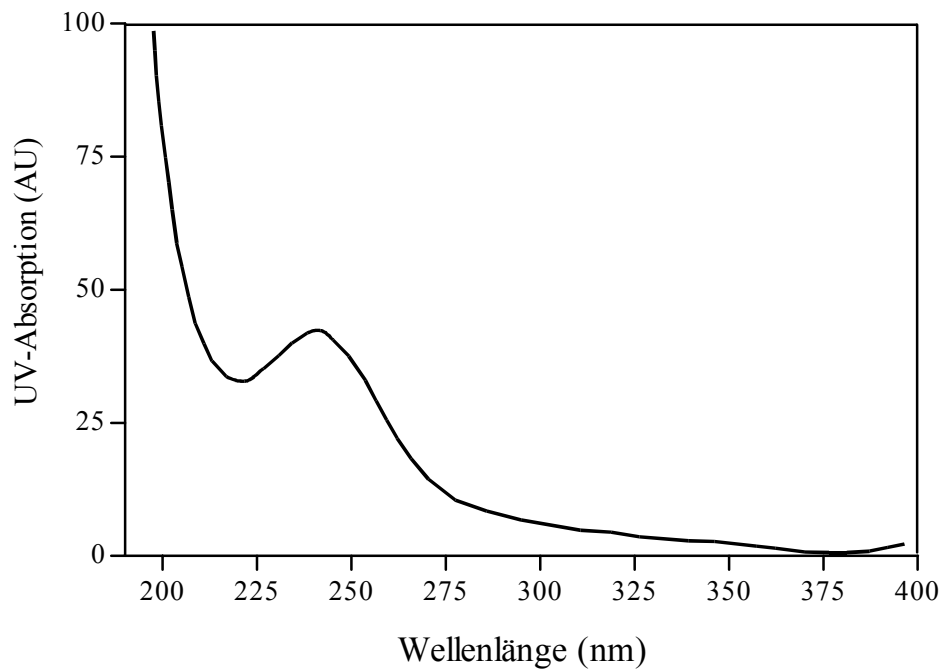


Abbildung 15: UV-Absorptionsspektrum bei pH von 3,0

Das Spektrum bei pH=3,0 weist ein Maximum bei 257 nm und ein Minimum bei 230 nm auf. Im neutralen Bereich hatte sich das Maximum infolge der Deprotonierungen zu längeren Wellenlängen verschoben (260 nm). Das Minimum liegt bei 227 nm.

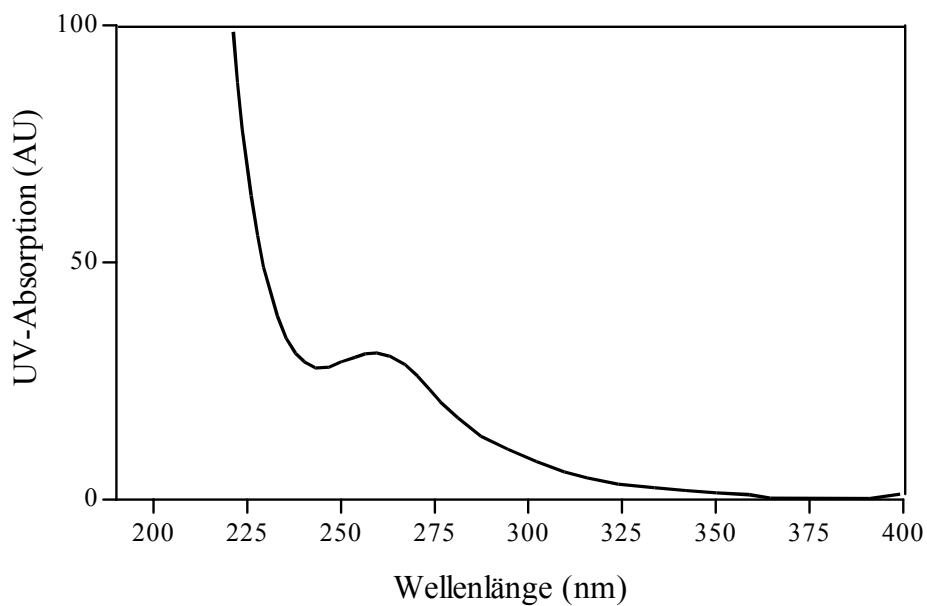


Abbildung 16: UV-Absorptionsspektrum bei pH von 7,0

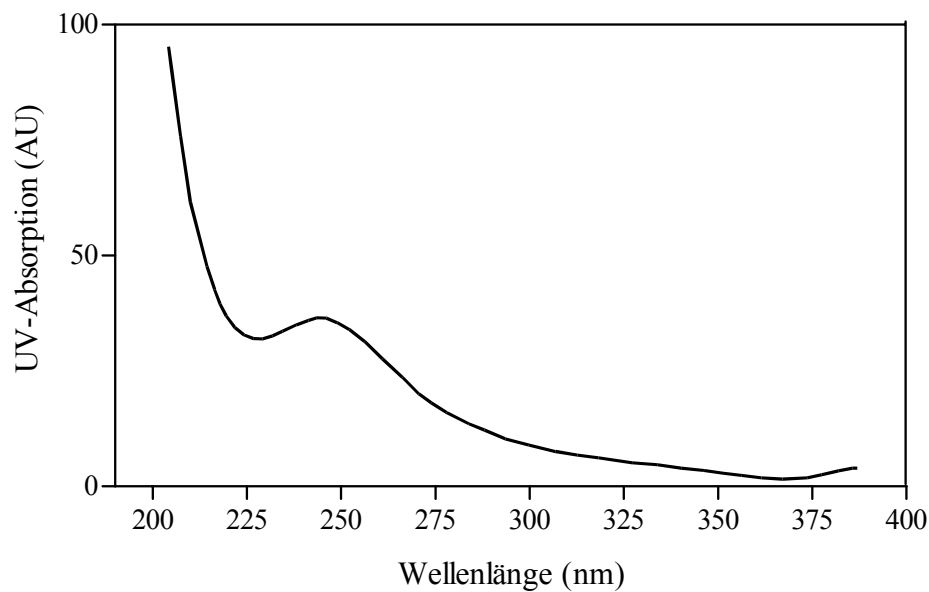


Abbildung 17: UV-Absorptionsspektrum bei pH von 9,0

Das Minimum bei 230 nm und das Maximum bei 256 nm deuten auf ein Adenosinderivat hin.

4.2.5 Enzymatische Spaltungen

Anhand der bisherigen Ergebnisse und einer Datenbankrecherche ließ sich eine Substanz präzisieren, die den ermittelten Eigenschaften entsprach. Aus diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Substanz der Fraktion 94-95 der Reversed Phase-Chromatographie mit Diadenosin-5'-hexaphosphat (Ap_6A) identisch ist.

Die aufgereinigte, entsalzte und lyophilisierte Fraktion 94-95 der analytischen Reversed Phase-Chromatographie wurde vor und nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase massenspektrometrisch untersucht.

Im MALDI-Massenspektrum zeigte sich nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase weiterhin die Massenzahl, die vor der Inkubation mit dem Enzym zu erkennen war, also hatte die alkalische Phosphatase die Probenmoleküle nicht spalten können. Dies bedeutet, dass die Phosphatgruppen nicht endständig miteinander gebunden sind, und im Inneren des Moleküls zwischen den beiden Ribose-Molekülen liegen. Bei der Inkubation mit 3'-Phosphodiesterase war ebenfalls nur das Massensignal mit der Masse erkennbar, die schon vor der Inkubation zu erkennen war, das Molekül wurde somit nicht von dem Enzym gespalten. Dies bedeutet, dass die Moleküle keine Verknüpfung der Phosphatgruppen mit der Ribose aufweisen. Bei der Inkubation mit der 5'-Phosphodiesterase traten die Massen der Spaltungsprodukte AMP bzw. GMP im Massenspektrum auf, das ursprüngliche Massensignal war nicht vorhanden. Es liegt somit eine 5'-Verknüpfung zwischen den Phosphaten und der Ribose vor. Es kann auch ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Probenmolekülen um Bruchstücke aus RNA oder DNA handelt, da diese auch von der 3'-Phosphodiesterase gespalten wurden.