

4 Methodik

4.1 Aufreinigungsschema

Die Abbildung 2 zeigt die Übersicht, der in der vorliegenden Arbeit angewendeten Aufreinigungsschritte zur Isolierung von Diguanosinhexaphosphat aus Rindernebennieren.

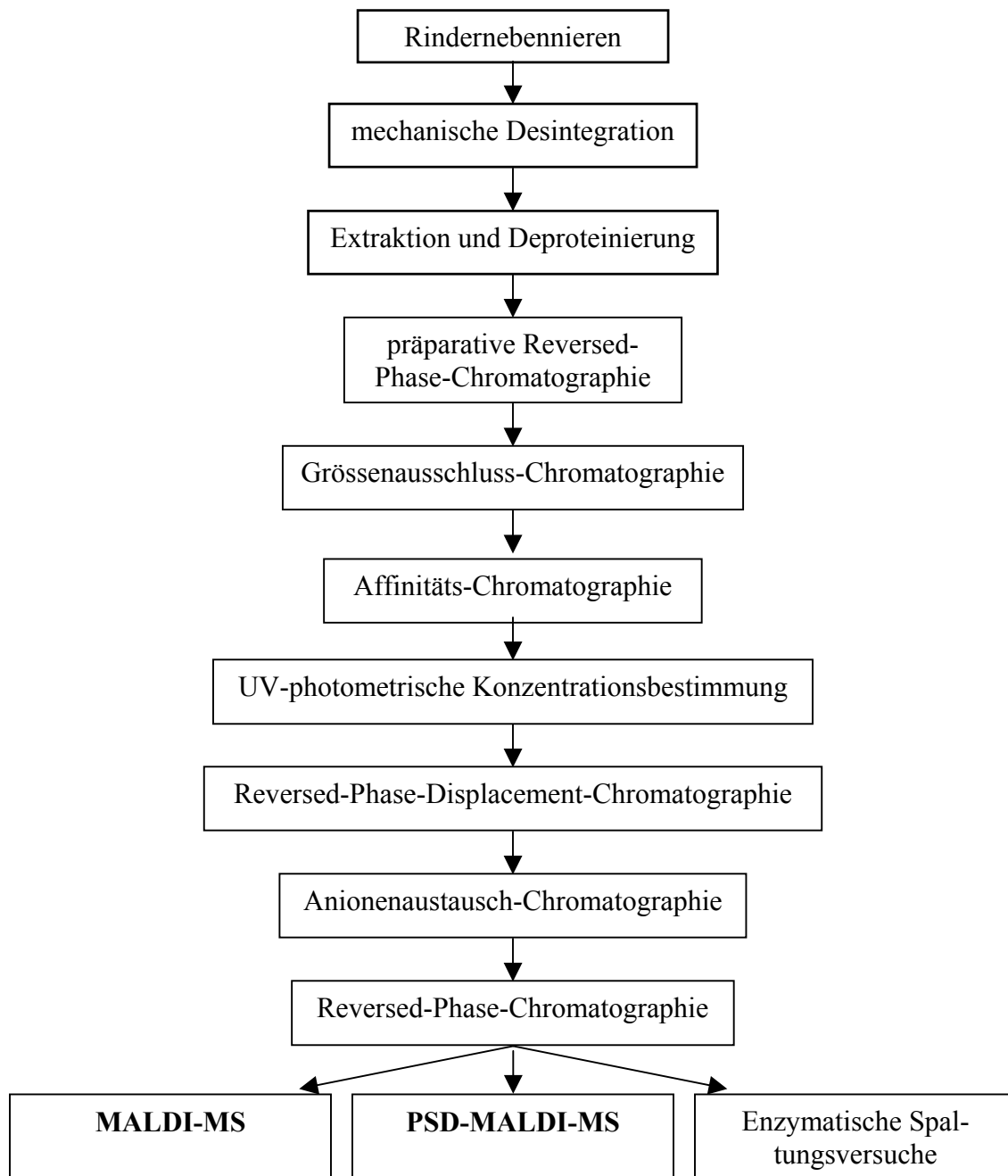


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Isolierung und Identifizierung von Diguanosinhexaphosphat aus Rindernebennieren

4.2 Mechanische Desintegration

Die Nebennieren wurden Rindern im Schlachthof entnommen. Der Transport erfolgte unter Eiskühlung in physiologischer NaCl-Lösung. Zur Desintegration wurde die von Wheelock beschriebene Methode verwendet [66]. Das Untersuchungsgut wurde in Stücke von 1 cm³ geschnitten, in flüssigem Stickstoff gefroren und für mindestens 12 h bei -80 °C gelagert. Anschliessend erfolgte eine Gefriertrocknung. Das Lyophilisat wurde unter ständiger Kühlung pulverisiert.

4.3 Extraktion

20 g Nebennierenpulver wurde in 200 ml H₂O suspendiert. Anschliessend wurde konzentrierte Perchlorsäure bis zu einer Endkonzentration von 0,6 M hinzugefügt. Die ausgefallenen Proteine wurden in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C bei einer Beschleunigung von 100.000 g für 30 min zentrifugiert. Der pH-Wert des Überstands wurde mit KOH auf einen Wert von 9,0 titriert. Der Überstand wurde vom Niederschlag dekantiert und zur möglichst vollständigen Ausfällung des KClO₄ bei -30 °C eingefroren.

4.4 Präparative Reversed-Phase-Chromatographie

Zur Konzentrierung des Extrakts wurde eine Reversed-Phase-Säule (Lichoprep RP C18, 310 mm x 25 mm, Firma Merck) verwendet. Die Säule war mit einer Kieselgelmatrix gepackt. Die Kieselgelmatrix wies eine Korngrösse von 40-63 µm auf. Die Konditionierung der Säule erfolgte mit 150 ml 100 %-igem Acetonitril und die Äquilibration mit 150 ml einer wässrigen 40 mM Triethylammoniumacetat -Lösung. Nach Auftauen wurde die Probe mit einer wässrigen 1 M Triethylammoniumacetat-Lösung als Ionenpaarreagenz zu einer Endkonzentration von 40 mM versetzt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit HCl auf einen Wert von 6,5. Es folgte der Auftrag der Probe auf die Säule. Um die nicht-bindenden Substanzen aus der Säule zu entfernen, wurde nach vollständigem Probenauftrag mit 150 ml der wässrigen 40 mM Triethylammoniumacetat-Lösung eluiert. Die aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an die Säule gebundenen Substanzen wurden mit 150 ml einer wässrigen 20 %igen Acetonitril-Lösung bei einer Flussrate von 2 ml/min eluiert. Von dem Eluat wurden die ersten 50 ml verworfen und die

folgenden 100 ml gesammelt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Zur Entfernung des Triethylammoniumacetat und des Acetonitrils wurde die Probe lyophilisiert. Die Probe wurde bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.5 Grössenausschluss-Chromatographie

Zur Grössenausschluss-Chromatographie wurde das Grössenaustauschgel Sephacryl S-100 High Resolution (1,6 x 100, Firma Pharmacia) verwendet. Es handelt sich dabei um ein kreuzvernetztes Kopolymer des Allyl-Dextran und N,N'-Methylen-Bisarcylamid. Die Kreuzvernetzung verleiht dem Gel eine hohe mechanische Festigkeit und chemische Stabilität. Die Säule wurde in 20%-iger wässriger Alkohol-Lösung gelagert und vor Gebrauch mit 200 ml H_2O äquilibriert. Das Lyophilisat der präparativen Reversed Phase-Chromatographie wurde in 2 ml H_2O gelöst. Es folgte die Zugabe von EDTA und ATP (Konzentration: 2,5 mg/ml). Die Probe wurde auf die Säule pipettiert, und die Elution mit H_2O erfolgte bei einem Fluss von 1 ml/min unter Detektion der Leitfähigkeit und der UV-Absorption bei 254 nm. Das Volumen der resultierenden Fraktionen betrug 10 ml.

4.6 Affinitäts-Chromatographie

Die Fraktionen der Grössenausschluss-Chromatographie wurden mit einem mit m-Aminophenylboronsäure derivatisierten [67] Kationenaustauscher (Biorex-70, Firma Biorad) durchgeführt. Das Gel wurde gequollen, entgast und in eine Glassäule zwischen zwei Fritten eingepackt. Die Äquilibrierung der Säule erfolgte mit 100 ml einer wässrigen 1 M Ammoniumacetatlösung (pH 9,5) bei einem Fluss von 2 ml/min. Die Probe wurde in einer wässrigen 1 M Ammoniumacetatlösung gelöst, der pH-Wert der Probe auf einen Wert von 9,5 eingestellt und bei einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule gepumpt. Nicht von dem Gel retinierte Substanzen wurden mit einer wässrigen 1 M Ammoniumacetatlösung eluiert. Unter Detektion der UV-Absorption bei 254 nm und der Leitfähigkeit erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min die Elution mit 10 mM HCL-Lösung. Das Eluat wurde mittels einer Reversed-Phase-Chromatographie unter den in 3.4 beschriebenen Bedingungen entsalzt, lyophilisiert und bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

4.7 UV-photometrische Konzentrationsbestimmung

Es wurden 6,2 mg ATP in 10 ml H₂O gelöst und von dieser Lösung eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Lösungen wurden in Mikro-Quarzküvetten gefüllt und die UV-Absorption bei 254 nm bestimmt. Es wurde graphisch eine Regressionsgerade erstellt, die die UV-Absorption einer Konzentration der Lösung zuordnet. Die Konzentration der in der Probe aus dem vorhergehenden Aufreinigungsschritt vorhandenen Dinukleosidpolyphosphate konnte anhand der ATP-Vergleichskurve bestimmt werden.

4.8 Reversed-Phase-Displacement-Chromatographie

Zur Displacement-Chromatographie wurde eine Reversed-Phase-Säule (Supersphere 100 C18 endcapped, 100 x 2,1 mm, Korngrösse 4 µm, Porengrösse 10 nm, Firma Merck) verwendet. Die Konditionierung der Säule erfolgte mit 2 ml einer wässrigen 40 mM Triethylammoniumacetat-Lösung bei einer Flussrate von 10 µl/min. Vor dem Probenauftrag wurde die zu trennende Probe in der Trägerflüssigkeit, einer wässrigen 40 mM Triethylammoniumacetat-Lösung, gelöst. Nicht von dem Gel retinierte Substanzen wurden mit der Trägerflüssigkeit bei einer Flussrate von 10 µl/min eluiert. Anschliessend wurde mit dem Displacer, einer 160 mM wässrigen Butanol-Lösung, bei einer Flussrate von 10 µl/min unter Detektion der UV-Absorption bei 254 nm und der Leitfähigkeit eluiert. Fraktionen, die eine deutliche UV-Absorption aufwiesen, wurden bis zur Trockne in einer Vakuumzentrifuge eingedampft und bei -30 °C gelagert.

4.9 Anionenaustausch-Chromatographie

Für diesen Trennungsschritt wurde ein Anionenaustauscher, eine Mono Q-5/5-Säule (Firma Pharmacia), genutzt. Als anionische Austauschgruppen des Gels diente ein hydrophober Mono-Beads-Harz auf einer Polystyren/Divinylbenzen-Matrix mit 10 µm grossen, porösen, monodispersen Teilchen. Die Äquilibrierung der Säule erfolgte mit 20 mM K₂HPO₄-Lösung. Nicht an das Gel bindende Substanzen wurden mit 20 mM K₂ HPO₄ bei einer Flussrate von 0,5 ml/min eluiert. Unter Detektion der UV-Absorption bei 254 nm und der Leitfähigkeit erfolgte die Elution der Probe mit einer wässrigen 20 mM K₂HPO₄ in 1 M NaCl-Lösung. Der verwendete Gradient

ist in Tabelle 1 dargestellt. Das Volumen der Fraktionen betrug 1 ml und wurde bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Tabelle 1: Gradient der Anionenaustausch-Chromatographie (Säule: Mono-Q-5/5, Firma Pharmacia; Eluent A: 20 mM K_2HPO_4 , Eluent B: 20 mM K_2HPO_4 mit 1 M NaCl, Flussrate: 0,5 ml/min)

t (min)	0	10	100	105	110	115
Konzentration B (%)	0	5	35	40	100	100

4.10 Reversed-Phase-Chromatographie

Zur weiteren Aufreinigung wurde eine Reversed-Phase-Chromatographie mit einer Supersphere 100 C 18 endcapped Säule (250 x 4 mm, mittlere Korngrösse 4 μm , mittlere Porengrösse 10 nm, Firma Merck) durchgeführt. Die Konditionierung der Säule erfolgte mit Acetonitril und die Äquilibrierung mit einer wässrigen 40 mM Triethylammoniumacetat-Lösung. Die Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie wurden nach dem Auftauen mit einer wässrigen 1 M Triethylammoniumacetat-Lösung versetzt zu einer Endkonzentration von 40 mM. Es folgte der Auftrag der Probe auf die Säule mit einer Flussrate von 0,5 ml/min. Um die nicht-bindenden Substanzen von der Säule zu eluieren, wurde die Säule mit 20 ml einer wässrigen 40 mM Triethylammoniumacetat-Lösung gespült. Unter Detektion der UV-Absorption bei 254 nm und der Leitfähigkeit erfolgte die Elution der Probe mit dem in Tabelle 2 dargestellten Gradienten. Fraktionen, die eine deutliche UV-Absorption aufwiesen, wurden bis zur Trockne in einer Vakuumzentrifuge eingedampft und bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tabelle 2: Gradient der Reversed-Phase-Chromatographie (Säule: Supersphere 100 C 18 endcapped, Firma Merck; Eluent A: 40 mM Triethylammoniumacetat, Eluent B: 80% Acetonitril mit H_2O , Flussrate: 0,5 ml/min)

t (min)	0	4	79	85	86	90
Konzentration B (%)	0	2	7	60	80	80

4.11 Massenbestimmung durch MALDI-Massenspektrometrie

Die Fraktionen mit deutlicher UV-Absorption der Reversed-Phase-Chromatographie wurden mittels einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 10 μl H_2O gelöst. Vor der Messung erfolgte eine Präparation der Probe. Als Probenmatrixlösung wurde die UV-absorbierende Desorptionsmatrix 3-Hydroxypicolinsäure (Konzentration 50 mg/ml) hinzugesetzt, und als Kationen-Austauschharz wurden Kationenaustauscher-Beads (AG 50, W-X12, 200-400 mesh, Firma BioRad) mit NH_4^+ als Gegenion verwendet. Zur Präparation der Probe für die massenspektrometrische Messung wurden 0,5 μl der Probenlösung sowie 0,5 μl der Probenmatrixlösung auf den Probenhalter des Massenspektrometers pipettiert und mit einem kalten Luftstrom zur Trockne eingedampft. Über eine Vakuumschleuse wurde der Probenhalter mit dem kristallinen Präparat in das Massenspektrometer (MALDI REFLEX III, Firma Bruker Deutschland) eingeschleust. Ein Stickstoff-Laserstrahl (VSL-337 ND, Firma Laser Science, Wellenlänge 337 nm, Impulsdauer 4 ns, Energie $10^6 - 10^7$ W/cm^2 , Durchmesser des Bestrahlungsfeldes 50–100 μm) wurde auf das Bestrahlungsfeld gelenkt und führte zur Desorption der Probenionen. Die Beschleunigungsspannung U_{acc} im elektrostatischen Feld betrug 18 kV und das Vacuum im System $6-8 \times 10^{-7}$ mbar. Die analogen Detektorsignale wurden von einem Digitaloszilloskop (Le Croy 9400, Firma Le Croy) digitalisiert und von einem Computer in Flugzeitmassenspektren umgerechnet und ausgewertet.

4.12 PSD MALDI-Massenspektrometrie

Bei der MALDI-Massenspektrometrie unterliegen die desorbierten Probe-Ionen während des Fluges im feldfreien Raum dem sogenannten „post source decay“ (PSD). Mit Hilfe eines RETOF-Aufbaus können die entstehenden Fragmentspektren analysiert werden und geben Aufschluss über die Vorläufersubstanz. Die aus der Reversed-Phase-Chromatographie resultierenden Fraktionen wurden nach der in 4.11 dargestellten Methode präpariert. Ein Stickstoff-Laserstrahl, der auf das Bestrahlungsfeld gelenkt wurde, führte zur Desorption der Probenionen. Die Beschleunigungsspannung betrug 20 kV. Die Detektion der Ionen erfolgte durch ein mit einem Zwei-Ebenen-Reflektoren ausgestatteten MALDI-RETOF-Massenspektrometer. Die analogen Detektorsignale wurden von einem Digitaloszilloskop (Le Croy 9400, Firma Le Croy) digitalisiert und von einem Computer in Flugzeitmassenspektren umgerechnet.

4.13 Enzymatische Spaltungsversuche

Als Enzyme für enzymatischen Spaltungsversuche wurden eine 5'-Nukleotidase, eine 3'-Nucleotidase und eine alkalische Phosphatase verwendet. Aliquots der zu analysierenden Probe der Reversed-Phase-Chromatographie wurden mittels einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingedampft. Anschliessend wurde eine Anionenaustausch-Chromatographie (UnoQ-1-Säule, 7 * 35 mm, Firma BioRad) durchgeführt. Die Äquilibration der Säule erfolgte mit 20 mM K_2HPO_4 -Lösung. Nicht an das Gel bindende Substanzen wurden mit 20 mM $K_2 HPO_4$ bei einer Flussrate von 0,5 ml/min eluiert. Unter Detektion der UV-Absorption bei 254 nm und der Leitfähigkeit erfolgte die Elution der Probe mit einer wässrigen 20 mM K_2HPO_4 in 1 M NaCl-Lösung. Der verwendete Gradient ist in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Gradient der Anionenaustausch-Chromatographie (Säule: UnoQ-1-Säule, 7 * 35 mm, Firma BioRad; Eluent A: 20 mM $K_2 HPO_4$, Eluent B: 20 mM $K_2 HPO_4$ mit 1 M NaCl, Flussrate: 0,5 ml/min)

t (min)	0	10	100
Konzentration B (%)	0	5	35

Ein Aliquot wurde direkt chromatographiert. Ein weiteres Aliquot wurde in 10 μ l H_2O gelöst. Von dieser Lösung wurde 1 μ l entnommen, mit 1 μ l 5'-Phosphodiesterase versetzt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Vor der weiteren Aufreinigung über eine Anionenaustausch-Chromatographie (UnoQ-1-Säule, 7 * 35 mm, Firma BioRad, Bedingungen siehe 4.9) wurde das Gemisch durch einen Filter (10 kDa cut-off) zentrifugiert. Nach dem gleichen Arbeitsschema wurden die Spaltversuche mit der 3'-Phosphodiesterase und der alkalischen Phosphatase durchgeführt. Um die Spaltprodukte zu identifizieren, wurden die ermittelten Retentionszeiten mit denen authentischer Substanzen verglichen.