

5. Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse zur Isolierung und Identifizierung von Diguanosinhexaphosphat aus bovinem Nebennierengewebe gliedert sich in Arbeitsschritte zur Isolierung der Substanz und zur Identifizierung der molekularen Struktur.

Die Isolierung von Diguanosinhexaphosphat aus bovinem Nebennierengewebe erfolgte mittels präparativen beziehungsweise analytischen Chromatographie-Methoden. Die Identifizierung der molekularen Struktur des Diguanosinhexaphosphats erfolgte mit Hilfe massenspektrometrischer und enzymatischer Analytik.

5.1 Präparative Reversed-Phase-Chromatographie

Der nach der mechanischen Desintegration und Extraktion isolierte Überstand des Nebennierenextrakts wurde mittels einer präparativen Reversed-Phase-Chromatographie konzentriert und entsalzt. Das resultierende Chromatogramm ist in Abbildung 3 gezeigt.

Die UV-Absorption bei 254 nm zeigt drei deutlich voneinander getrennte UV-Absorptionspeaks mit Absorptionsmaxima bei 28, 45 und 80 min. Der intensivste, mit einem durchgezogenen Pfeil markierte UV-Absorptionspeak in dem Retentionszeitbereich von 75 min bis 90 min mit einem Maximum bei 80 min wurde nach dem Auftrag einer wässrigen 20 %-igen Acetonitril-Lösung detektiert. In dem Retentionszeitbereich von 15 min bis 45 min wurden mehrere, ineinander übergehende Leitfähigkeitspeaks und ein weiterer Leitfähigkeitspeak mit einem Maximum bei 78 min detektiert. Die Fraktionen im Retentionszeitbereich von 75 min bis 90 min wurden gesammelt, zusammengefasst, lyophilisiert und der weiteren Aufarbeitung zugeführt. In der vorliegenden Arbeit ist die weitere Aufarbeitung der Fraktionen des mit einem durchgezogenen Pfeil markierten UV-Absorptionspeaks dargestellt, die zur Isolierung und Identifizierung von Diguanosinhexaphosphat führte.

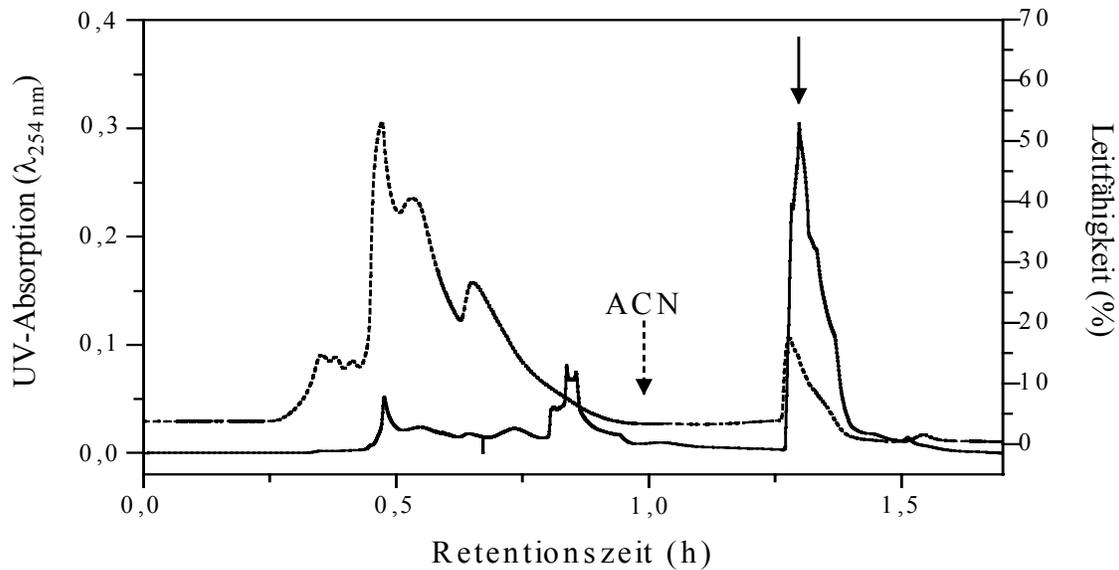


Abbildung 3: Chromatogramm der präparativen Reversed-Phase-Chromatographie

Probe:	lyophilisiertes Nebennierextrakt
Säule:	Lichoprep RP C18, 310 mm x 25 mm (Firma Merck)
Detektor:	UV-Photometer, $\lambda_{254 \text{ nm}}$
Eluent A:	40 mM wässrige Triethylammoniumacetat-Lösung
Eluent B:	wässrige 20% Acetonitril-Lösung
Flussrate:	2 ml/min
_____:	UV-Absorptionsverlauf, $\lambda_{254 \text{ nm}}$
-----:	Leitfähigkeitsverlauf

5.2 Grössenausschluss-Chromatographie

Die Fraktionierung des Lyophilisats der präparativen Reversed-Phase-Chromatographie erfolgte durch eine Grössenausschluss-Chromatographie mit einer Sephacryl S100 Trennsäule (1,6 x 100, Firma Pharmacia). Das resultierende Chromatogramm zeigt die Abbildung 4.

In dem Chromatogramm ist ein deutlicher UV-Absorptionspeak mit einem Maximum bei einer Retentionszeit von 80 min mit einem Pfeil markiert, der von zwei weiteren ineinander übergehenden UV-Absorptionspeaks im Bereich von 105 bis 170 min getrennt ist. Die Fraktionen im Retentionszeitbereich von 50-100 min wurden zusammengefasst und die zugrunde liegende Substanz durch weitere chromatographische Methoden bis zur Homogenität aufgetrennt. Aus den

Fraktionen des mit einem Pfeil markierten UV-Absorptionspeaks, deren weitere Aufarbeitung in der vorliegenden Arbeit dargestellt wird, konnte im Verlauf Diguanosinhexaphosphat isoliert werden.

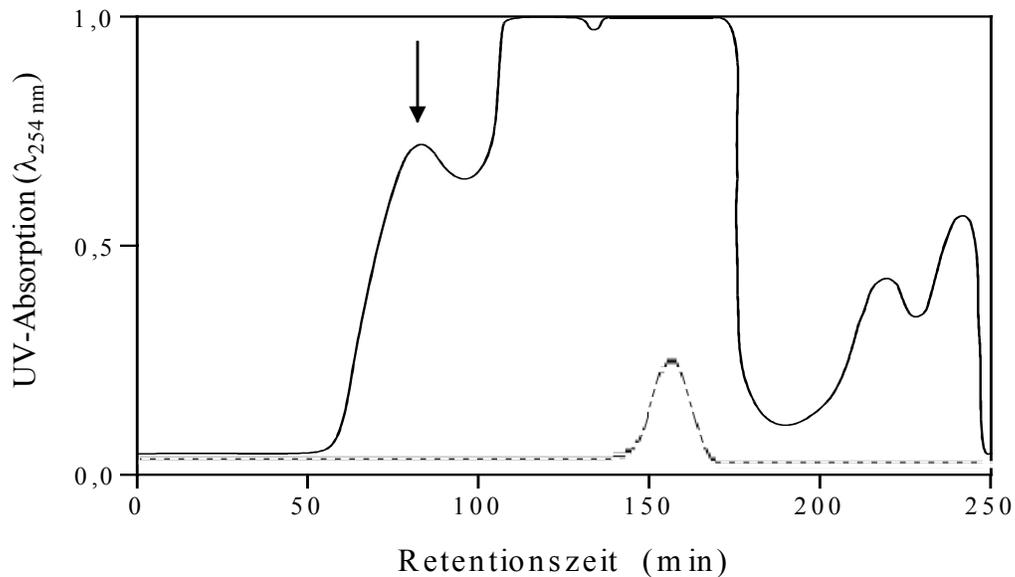


Abbildung 4: Chromatogramm der Grössenausschluss-Chromatographie

Probe:	Lyophilisiertes Eluat der Fraktionen der pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der präparativen Reversed-Phase-Chromatographie aus Abbildung 3
Säule:	Sephacryl S100, 1,6 x 100 mm, (Firma Pharmacia)
Detektor:	UV-Photometer, $\lambda_{254 \text{ nm}}$
Eluent:	H ₂ O
Flussrate:	1 ml/min
Fraktionsgrösse:	10 ml
_____:	UV-Absorptionsverlauf, $\lambda_{254 \text{ nm}}$
-----:	Leitfähigkeitsverlauf

5.3 Affinitäts-Chromatographie

Die weitere Chromatographie der Substanzen, die bei der Grössenausschluss-Chromatographie im Retentionszeitbereich von 50 min – 100 min eluierten, wurde mit einem mit m-

Aminophenylboronsäure [67] derivatisierten Kationenaustauscher durchgeführt. Das resultierende Chromatogramm ist in Abbildung 5 dargestellt.

Es zeigt zwei getrennte UV-Absorptionspeaks. Der erste UV-Absorptionspeak wird durch die nicht durch die Trennsäule retendierten Substanzen bedingt. Nachdem die UV-Absorption die Basislinie erreicht hat, erfolgte mit einer wässrigen 10 mM HCl-Lösung die Elution der an der Trennsäule retendierten Substanzen. Dieser zweite mit einem Pfeil markierte UV-Absorptionspeak hat ein Maximum bei einer Retentionszeit von 48 min. Nach etwa 55 min erreicht die UV-Absorption wieder die Basislinie.

Das Eluat der Affinitätschromatographie wurde gesammelt und mit einer Reversed-Phase-Chromatographie wie in Abschnitt 4.4 beschrieben entsalzt und anschliessend lyophilisiert. Die weitere Aufarbeitung der Fraktionen des mit einem Pfeil markierten UV-Absorptionspeaks ist in der vorliegenden Arbeit dargestellt und führte zur Isolierung und Identifizierung von Diguanosinhexaphosphat.

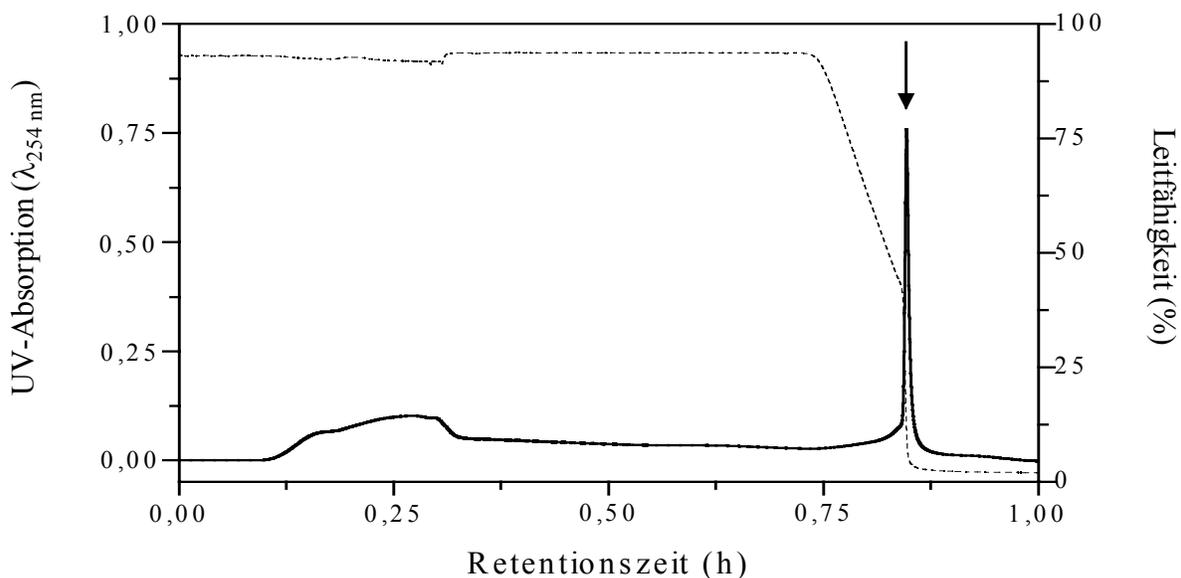


Abbildung 5: Chromatogramm der Affinitätschromatographie

Probe:	Lyophilisiertes Eluat der Fraktionen des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Grössenausschluss-Chromatographie aus Abbildung 4
Säule:	Kationenaustauscher (Biorex-70, Firma Biorad)
Detektor:	UV-Photometer, $\lambda_{254 \text{ nm}}$
Eluent A:	wässrige 1 M Ammoniumacetatlösung, pH 9,5
Eluent B:	wässrige 10 mM HCl-Lösung
Flussrate:	1 ml/min
_____:	UV-Absorptionsverlauf, $\lambda_{254 \text{ nm}}$
-----:	Leitfähigkeitsverlauf

5.4 UV-photometrische Konzentrationsbestimmung

Abbildung 6 zeigt die UV-Absorption ($\lambda_{254 \text{ nm}}$) von in Wasser gelösten ATP in dem Konzentrationsbereich von 0 bis 25 $\mu\text{g/ml}$ und die aus diesen Wertepaaren berechnete Regressionsgerade. Anhand der Regressionsgerade wurde der Nukleotid-Gehalt der Probe ermittelt. Es wurde die UV-Absorption bei 254 nm von 1 μl der Probe, die nach der Reversed-Phase-Chromatographie aus Abbildung 6 gesammelt wurde bestimmt, nachdem das Lyophilisat in 1 ml H_2O gelöst wurde. Die Messung ergab einen UV-Absorptionswert von 0,164 AU. Die zwei Pfeile in Abbildung 6 zeigen auf den Schnittpunkt der in der Probe gemessenen UV-Absorption von 0,164 AU mit der Regressionsgerade. Die Bildung eines Wertepaares ergibt für die Probe eine Nukleotidkonzentration von 7,6 $\mu\text{g/ml}$. Bei einem Probenvolumen von 1,8 ml beträgt die Nukleotidmenge der Probe somit 13,7 μg .

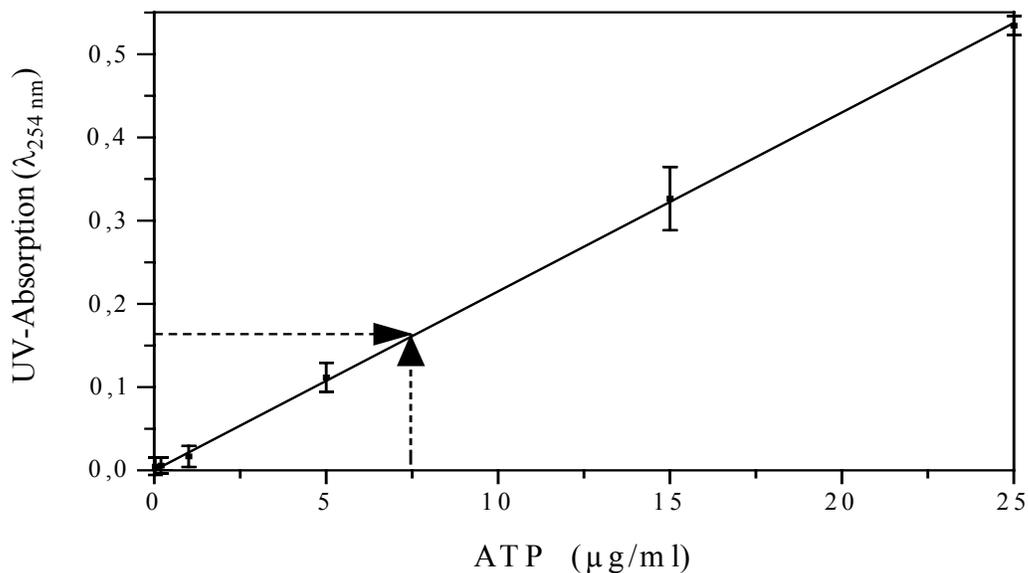


Abbildung 6: Regressionsgerade der gemessenen UV-Absorptionswerte unterschiedlicher ATP-Konzentrationen bei 254 nm (Mittelwert \pm N=5)

5.5 Reversed-Phase Displacement-Chromatographie

Die Displacement-Chromatographie des lyophilisierten Eluats der Affinitäts-Chromatographie wurde mittels einer Reversed-Phase-Säule (Supersphere 100 C18 endcapped, 100 x 2,1 mm, Korngrösse 4 μm , Porengrösse 10 nm, Firma Merck) durchgeführt. Die Abbildung 7 zeigt das resultierende Chromatogramm.

In dem Chromatogramm sind mehrere UV-Absorptionspeaks sichtbar. Die Fraktionen der Displacement-Chromatographie mit UV-Absorption bei 254 nm wurden weiter aufgereinigt. Die Aufarbeitung der zugehörigen Fraktionen des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks ist in der vorliegenden Arbeit dargestellt und führte zur Isolierung und Identifizierung von Diguanosinhexaphosphat.

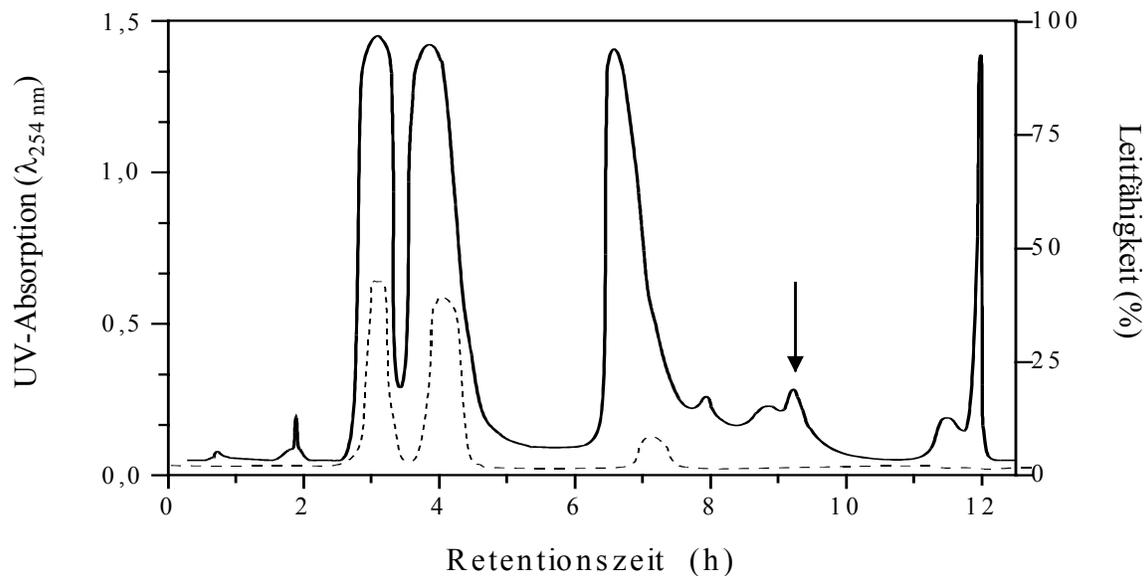


Abbildung 7: Chromatogramm der Reversed-Phase-Displacement-Chromatographie

Probe:	Lyophilisiertes Eluat der Fraktionen des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Affinitäts-Chromatographie aus Abbildung 5
Säule:	Supersphere 100 C18 endcapped (100 x 2,1 mm, Korngrösse 4 μm , Porengrösse 10 nm, Firma Merck)
Detektor:	UV-Photometer, $\lambda_{254 \text{ nm}}$
Carrier:	40 mM wässrige Triethylammoniumacetat-Lösung
Displacer:	160 mM wässrige Butanol-Lösung
Flussrate:	10 $\mu\text{l}/\text{min}$
_____:	UV-Absorptionsverlauf, $\lambda_{254 \text{ nm}}$
-----:	Leitfähigkeitsverlauf

5.6 Anionenaustausch-Chromatographie

Die Fraktion des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Reversed-Phase-Displacement-Chromatographie aus Abbildung 7 wurde mittels eines Anionentauschers unter Verwendung einer Gradientenelution chromatographiert. In Abbildung 8 ist das resultierende Chromatogramm dargestellt. Das Chromatogramm zeigt in dem Retentionszeitbereich von 18 bis 117 min mehrere voneinander getrennte Peaks mit UV-Absorption bei 254 nm. Von der 117ten min bis zum Ende des Elutionsvorganges bleibt die UV-Absorption im Bereich der Basislinie. Die weitere Aufarbeitung der Fraktionen des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks ist in der vorliegenden Arbeit dargestellt. Diese führte zur Isolierung und Identifizierung des Diguanosinhexaphosphat.

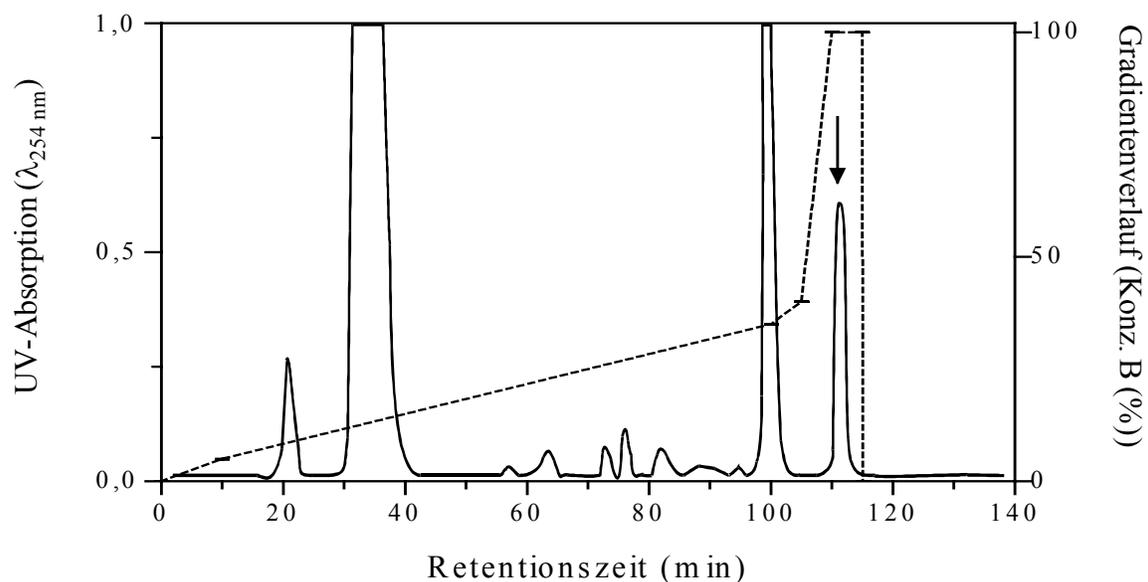


Abbildung 8: Chromatogramm der Anionenaustausch-Chromatographie

Probe: Lyophilisiertes Eluat der Fraktionen des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Reversed-Phase-Displacement-Chromatographie aus Abbildung 7

Säule: Mono Q-5/5 (50 mm x 5 mm, Firma Pharmacia)

Detektor: UV-Photometer, $\lambda_{254 \text{ nm}}$

Eluent A: wässrige 20 mM $\text{K}_2 \text{HPO}_4$ -Lösung

Eluent B: wässrige 20 mM $\text{K}_2 \text{HPO}_4$ mit 1 M NaCl -Lösung

Gradient:

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

Flussrate: 0,5 ml/min

_____ : UV-Absorptionsverlauf, $\lambda_{254 \text{ nm}}$

----- : Konzentration B (%)

5.7 Reversed-Phase-Chromatographie

Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Fraktionen des mit einem Pfeil markierten UV-Absorptionspeak der Anionenaustausch-Chromatographie aus Abbildung 8 über eine Supersphere 100 C18-Trennsäule chromatographiert. Dabei wurde das in Abbildung 9 dargestellte Chromatogramm aufgezeichnet. Bis zur 24ten min nach Beginn des Gradienten ist keine UV-Absorption bei 254 nm detektierbar.

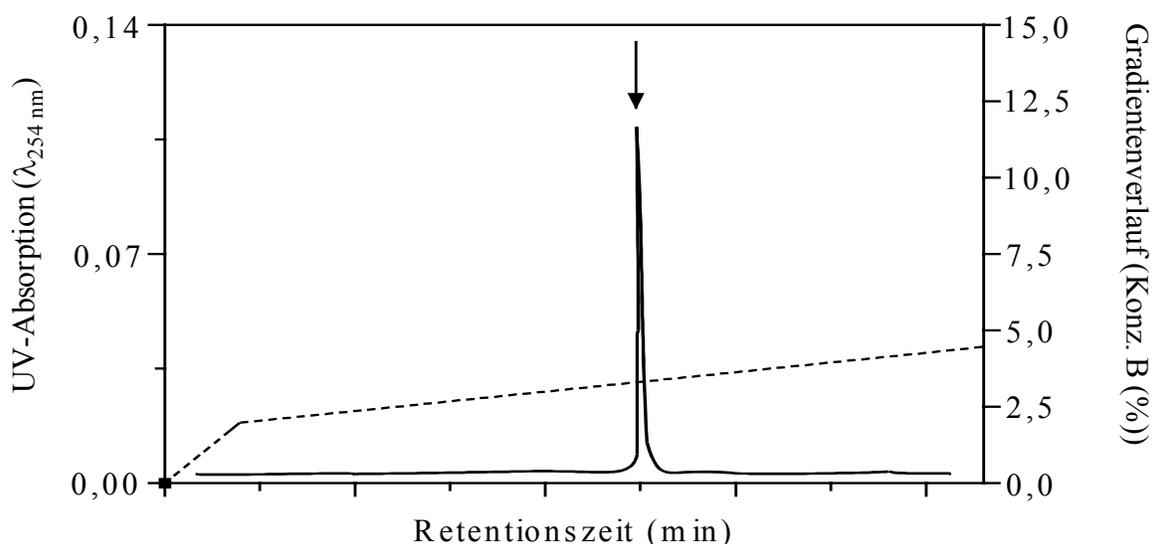


Abbildung 9: Reversed-Phase-Chromatographie

Probe: Lyophilisiertes Eluat der Fraktionen des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Anionenaustausch-Chromatographie aus Abbildung 8
 Säule: Supersphere 100 C18 end. (100 x 2,1 mm, Korngrösse 4 μm , Porengrösse 10 nm, Firma Merck)
 Detektor: UV-Photometer, $\lambda_{254 \text{ nm}}$
 Eluent A: 40 mM wässrige Triethylammoniumacetat-Lösung
 Eluent B: wässrige 80% Acetonitril-Lösung siehe oben
 Gradient:

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

Flussrate: 0,5 ml/min
 _____: UV-Absorptionsverlauf, $\lambda_{254 \text{ nm}}$
 -----: Konzentration B (%)

5.8 MALDI-Massenspektrometrie

Die lyophilisierten Fraktionen des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Reversed-Phase-Chromatographie aus Abbildung wurden mittels der Matrix-unterstützten Laser-Desorptions-/ Ionisations-Massenspektrometrie analysiert. In der Abbildung 10 ist das resultierende MALDI-Massenspektrum dargestellt. Das MALDI-Massenspektrum zeigt zwei Massensignale bei 1029 und bei 1068. Der Massenzahl 1029 kann als zugrundeliegende Substanz Diguanosinhexaphosphat zugeordnet werden. Das Massensignal bei 1068 Da entsteht durch die Addition eines K-Kation mit einer Masse 39 Dalton an das Diguanosinhexaphosphat.

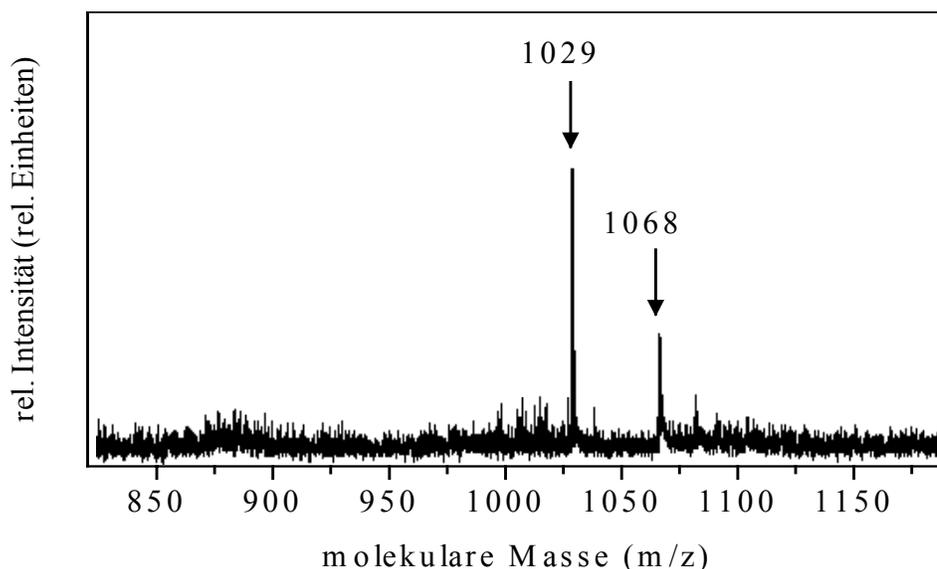


Abbildung 10: Matrix-unterstützten Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrum des lyophilisierten Eluats des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Reversed-Phase-Chromatographie aus Abbildung 9

Probe: Lyophilisiertes Eluat der Fraktionen des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Reversed-Phase-Chromatographie aus Abbildung 9
Instrument: MALDI REFLEX III (Firma Bruker Deutschland)
Laser: 337 nm; 4 ns
Matrix: 50 mg/ml 3-Hydroxypicolinsäure in H₂O
Abszisse: molekulare Masse in Dalton
Ordinate: relative Intensität (dimensionslos)

5.9 PSD MALDI-Massenspektrometrie

Die Sequenzierung der Fraktionen des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Reversed-Phase-Chromatographie aus Abbildung 9 erfolgte mittels Post-Source-Decay Matrix-unterstützten Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie. Das entsprechende PSD-Fragmentspektrum zeigt Abbildung 11. Die Interpretation der molekularen Massen der Fragmenten ist in Tabelle 4 dargestellt.

Sämtliche Massenfragmentsignale konnten Diguanosinhexaphosphat zugeordnet werden. Darüberhinaus war das in der Abbildung 11 gezeigte PSD-Fragmentspektrum deckungsgleich mit dem entsprechenden PSD-Fragmentspektrum von authentischem Diguanosinhexaphosphat.

Tabelle 4: Interpretation der der PSD MALDI-MS-Fragmente aus Abbildung 11 mit Interpretation

Molekulare Masse ($M + H^+$)	Fragment
152	Guanin
249	Guanosin-2 H ₂ O
365	Guanosinmonophosphat
445	Guanosindiphosphat
524	Guanosintriphosphat
668	Guanosinpentaphosphat
764	Guanosinpentaphosphat + H ₂ O
1029	Guanosinhexaphosphat

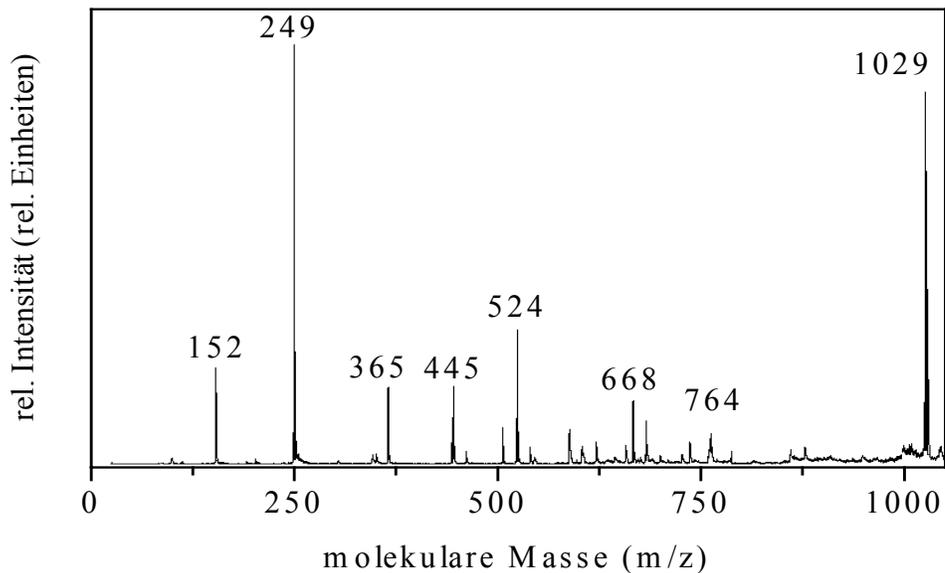


Abbildung 11: Post-Source-Decay Matrix-unterstützten Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrum des lyophilisierten Eluats des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Reversed-Phase-Chromatographie aus Abbildung 9

Probe: pfeilmakierte Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie aus Abbildung 9
 Instrument: MALDI REFLEX III (Firma Bruker Deutschland)
 Laser: 337 nm; 4 ns
 Matrix: 50 mg/ml 3-Hydroxypicolinsäure mit H₂O
 Abszisse: Masse pro Ladung (m/z)
 Ordinate: relative Intensität (dimensionslos)

5.10 Enzymatische Spaltungsversuche

Zur Identifizierung der Bindung der Phosphatgruppen an die Guanosine innerhalb des Moleküls wurde die isolierte Substanz (Fraktionen des mit pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks aus der Reversed-Phase-Chromatographie aus Abbildung 9 mit einer 5'-, einer 3'-Phosphodiesterase und einer alkalischer Phosphatase inkubiert. Anschliessend wurde jeweils eine Anionenaustauschchromatographie (UnoQ-1-Säule, 7 x 35 mm, Firma BioRad) durchgeführt. Die resultierenden Chromatogramme sind im Folgenden dargestellt und beschrieben.

Abbildung 12 zeigt das Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie der Substanz ohne die Inkubation mit einem Enzym. In dem Retentionszeitbereich von der 50ten bis zur 60ten min ist ein deutlicher UV-Absorptionspeak dargestellt. Ein Retentionszeitvergleich mit authentischen Substanzen ergab, dass die Retentionszeit der isolierten Substanz mit der von authentischem Diguanosinhexaphosphat vergleichbar ist.

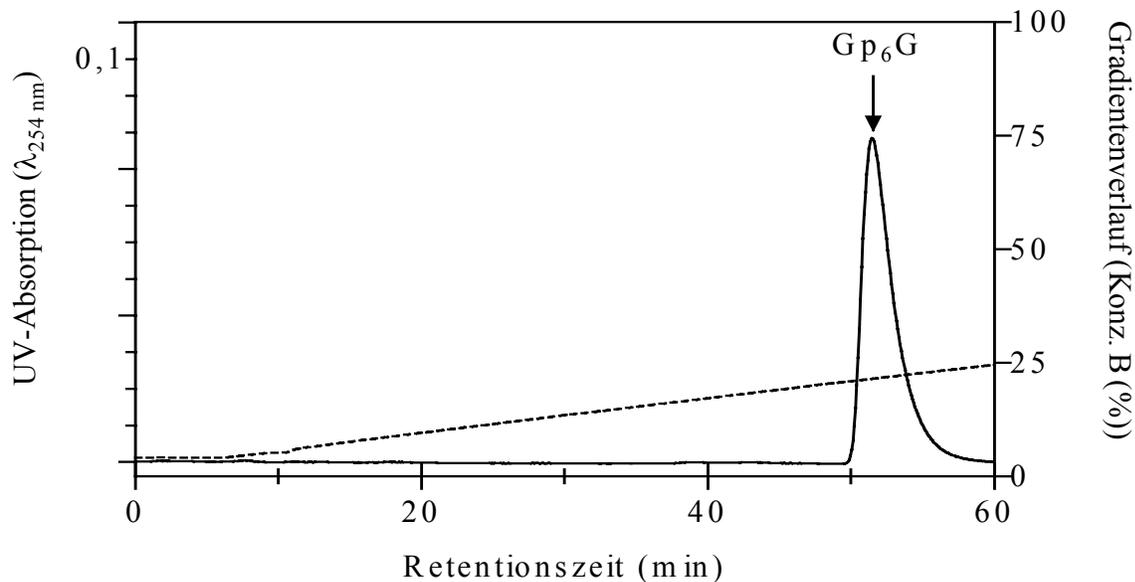


Abbildung 12: Chromatogramm der Anionenaustausch-Chromatographie eines Aliquots des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Reversed-Phase-Chromatographie aus Abbildung 9

Probe: Aliquot der Fraktionen des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Reversed-Phase-Chromatographie aus Abbildung 9

Säule: UnoQ-1 (7 x 35 mm, Firma BioRad)

Detektor: UV-Photometer, $\lambda_{254 \text{ nm}}$

Eluent A: wässrige 20 mM K_2HPO_4 -Lösung

Eluent B: wässrige 20 mM $\text{K}_2 \text{HPO}_4$ in 1 M NaCl -Lösung

Flussrate: 0,5 ml/min

_____ : UV-Absorptionsverlauf, $\lambda_{254 \text{ nm}}$

----- : Konzentration B (%)

Die Abbildung 13 zeigt das resultierende Chromatogramm nach Inkubation mit der 5'-Phosphodiesterase. Es wurden drei deutliche UV-Absorptionspeaks mit Maxima bei einer Retentionszeit von 11 min, 41 min beziehungsweise 52 min detektiert. Ein Retentionszeitvergleich mit authentischen Substanzen zeigte, dass die Retentionszeiten der drei UV-Absorptionspeaks vergleichbar mit denen von Guanosinmonophosphat, Guanosinpentaphosphat und Diguanosinhexaphosphat sind.

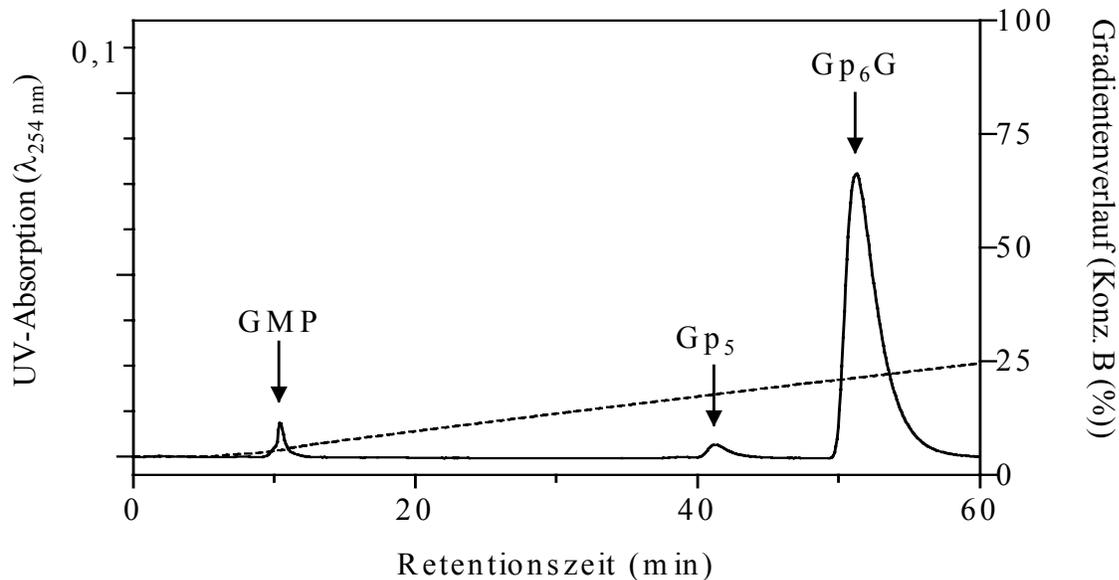


Abbildung 13: Chromatogramm der Anionenaustausch-Chromatographie eines Aliquots der Fraktionen des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Reversed-Phase-Chromatographie nach Inkubation mit 5'-Phosphodiesterase

Probe: Aliquot der Fraktionen des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Reversed-Phase-Chromatographie aus Abbildung 9 nach Inkubation mit 5'-Phosphodiesterase

Säule: UnoQ-1 (7 x 35 mm, Firma BioRad)

Detektor: UV-Photometer, $\lambda_{254 \text{ nm}}$

Eluent A: wässrige 20 mM K_2HPO_4 -Lösung

Eluent B: wässrige 20 mM $\text{K}_2 \text{HPO}_4$ in 1 M NaCl -Lösung

Flussrate: 0,5 ml/min

—————: UV-Absorptionsverlauf, $\lambda_{254 \text{ nm}}$

-----: Konzentration B (%)

Abbildung 14 zeigt das aufgezeichnete Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie nach Inkubation mit 3'-Phosphodiesterase. Das Chromatogramm zeigt einen deutlichen UV-

Absorptionspeak mit einem Maximum bei einer Retentionszeit von 52 min. Somit konnten im Vergleich zum Chromatogramm der Substanz ohne Enzymzusatz aus Abbildung 12 keine Veränderungen detektiert werden.

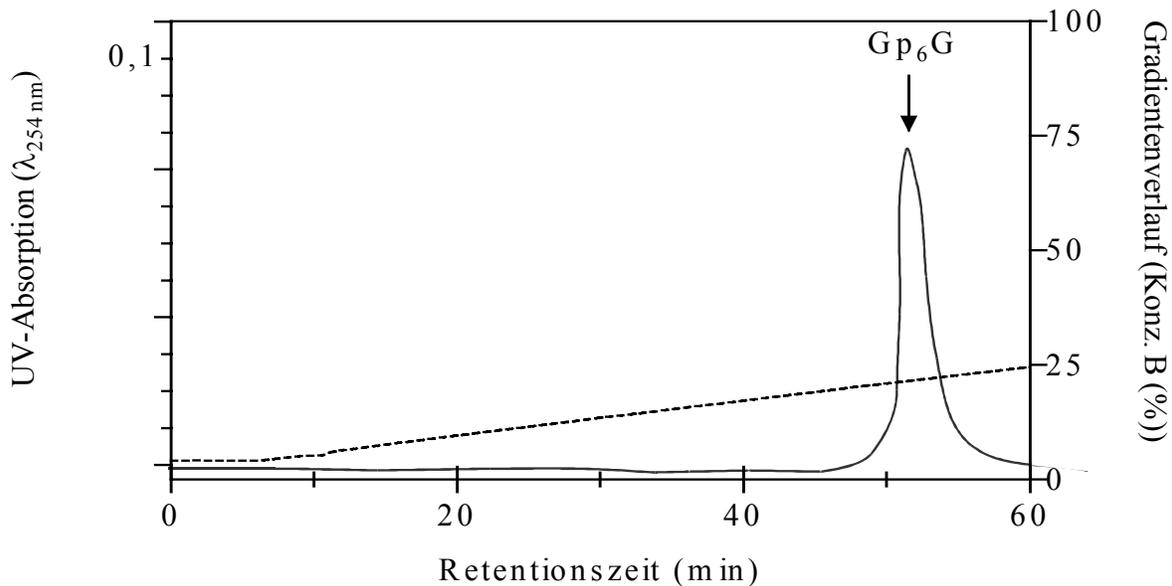


Abbildung 14: Chromatogramm der Anionenaustausch-Chromatographie eines Aliquots der Fraktionen des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Reversed-Phase-Chromatographie nach Inkubation mit 3'Phosphodiesterase

Probe: Aliquot der Fraktionen des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Reversed-Phase-Chromatographie aus Abbildung 9 nach Inkubation mit 3'-Phosphodiesterase

Säule: UnoQ-1 (7 x 35 mm, Firma BioRad)

Detektor: UV-Photometer, $\lambda_{254 \text{ nm}}$

Eluent A: wässrige 20 mM K_2HPO_4 -Lösung

Eluent B: wässrige 20 mM $\text{K}_2 \text{HPO}_4$ mit 1 M NaCl -Lösung

Flussrate: 0,5 ml/min

_____ : UV-Absorptionsverlauf, $\lambda_{254 \text{ nm}}$

----- : Konzentration B (%)

Die folgende Abbildung 15 zeigt das Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase. Das Chromatogramm zeigt einen deutlichen UV-Absorptionspeak mit einem Maximum bei einer Retentionszeit von 52 min.

Somit konnten im Vergleich zum Chromatogramm der Substanz ohne Enzymzusatz aus Abbildung 12 keine Veränderungen detektiert werden.

Die enzymatische Analytik bestätigt somit, daß es sich bei der isolierten Substanz um das Diguanosinhexaphosphat handelt. Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der Isolierung des Diguanosinhexaphosphat aus dem Nebennierengewebe wurde der beschriebene Aufreinigungsweg insgesamt dreimal wiederholt (N=3). Es konnte bei jedem dieser Aufreinigungen das Diguanosinhexaphosphat isoliert und identifiziert werden.

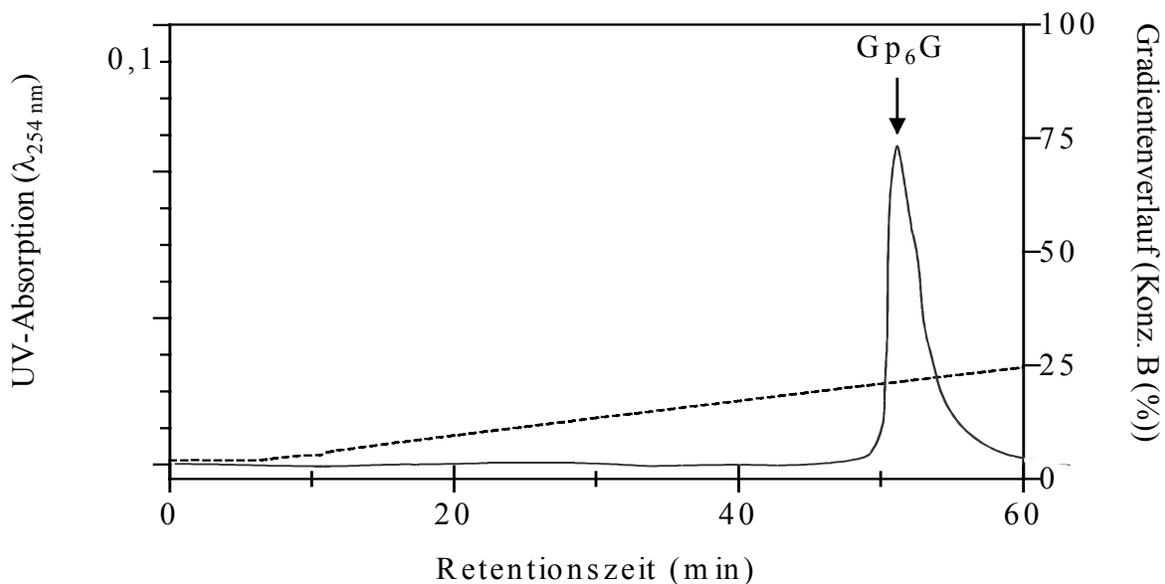


Abbildung 15: Chromatogramm der Anionenaustausch-Chromatographie eines Aliquots der Fraktionen des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Reversed-Phase-Chromatographie nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase

Probe: Aliquot der Fraktionen des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks der Reversed-Phase-Chromatographie aus Abbildung 9 nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase

Säule: UnoQ-1 (7 x 35 mm, Firma BioRad)

Detektor: UV-Photometer, $\lambda_{254 \text{ nm}}$

Eluent A: wässrige 20 mM K_2HPO_4 -Lösung

Eluent B: wässrige 20 mM $\text{K}_2 \text{HPO}_4$ mit 1 M NaCl -Lösung

Flussrate: 0,5 ml/min

—————: UV-Absorptionsverlauf, $\lambda_{254 \text{ nm}}$

-----: Konzentration B (%)