

**IMMOBILISIERTE RIBONUCLEOSIDE—
IHRE SYNTHESE UND BIOAFFINITÄT**

Vom
Fachbereich Naturwissenschaften II
der Universität Paderborn -
Gesamthochschule

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von
Helmut Rosemeyer
aus
Bad Salzungen

**Die vorliegende Arbeit wurde von August 1976 bis November 1978
am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen,
und von Dezember 1978 bis Juli 1979 an der Universität
Paderborn – Gesamthochschule durchgeführt.**

Referent: Prof. Dr. Frank Seela, Paderborn

Korreferent: Prof. Dr. Friedrich Cramer, Göttingen

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Eckehart Schlimme, Paderborn

Datum der Abgabe: 12. 12. 1979

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 2. 1980

Datum der Veröffentlichung:

Meiner Frau und meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Abkürzungen

A	Adenosin
ADA	Adenosin Desaminase
6-AzaU	6-Azauridin
6-AzaUMP	6-Azauridin-0-5'-monophosphat
C	Cytidin
DC	Dünnschichtchromatographie
DE	Dünnschichtelektrophorese
DMF	Dimethylformamid
DMSO-d ₆	Dimethylsulfoxid, sechsfach deuteriert
E	Extinktion
HETP	Theoretische Bodenhöhe
I	Inosin
LS	Laufmittelsystem
n _D ²⁰	Brechungsindex, bezogen auf Natrium-D-Linie, 20°C
nm	Nanometer
NMR	Kernmagnetische Resonanz
OMP	Orotidin-5'-monophosphat
OMP-DC	Orotidin-5'-monophosphat Decarboxylase
OMP-PP	Orotidin-5'-monophosphat Pyrophosphorylase
R _E	Verhältnis der Fronten zweier Substanzen in der DE
R _F	Verhältnis der Fronten von Substanz zu Laufmittel in der DC
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
6-Thio-I	6-Thioinosin
T	Tubercidin (7-Desazaadenosin)
TBK	Triethylammoniumhydrogencarbonat
TMS	Tetramethylsilan
UV	Ultraviolett
UMP	Uridin-0-5'-monophosphat
U	Uridin
u	Durchflußgeschwindigkeit (ml/h)
X	Xanthosin
θ	Temperatur
ε	molarer Extinktionskoeffizient
δ	chemische Verschiebung in ppm relativ zu TMS
λ	Wellenlänge in nm

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1.	Einleitung.....	1
2.	Problemstellung.....	4
3.	Darstellung von 0-2',3'-cyclischen Purinnucleosid-Acetalen und ihre Immobilisierung.....	6
3.1.	Synthese und Eigenschaften von 0-2',3'-Ethylideninosin- und -adenosin-Acetalen mit variablem Alkylidenrest.....	6
3.1.1.	Synthese der 0-2',3'-Ethylideninosin-Derivate <u>2a</u> und <u>2b</u> durch Umacetalisierung.....	14
3.1.2.	0-2',3'-(1-(2-Carboxyethyl)ethyliden)-inosin-0-5'-monophosphat.....	18
3.2.	0-2',3'-Ethyliden-Derivate des Tubercidins, 6-Thioinosins und Nebularins.....	20
3.3.	Substrat- und Inhibitoreigenschaften modifizierter Purinnucleoside gegenüber Adenosin Desaminase.....	23
3.3.1.	Substrateigenschaften der 0-2',3'-Ethylidenadenosin-Derivate.....	27
3.3.2.	Inhibitoreigenschaften der Nucleosid-Derivate <u>3a-c</u> und <u>11b</u> bis <u>13b</u>	29
3.4.	Agarosegebundene Purinnucleoside.....	31
3.4.1.	Agarose - Struktur und Umsetzung zu kupplungsfähigen Polymeren.....	31
3.4.2.	Kupplung der Nucleosid-Derivate an 6-Aminohexylagarose.....	35
3.4.3.	Kinetische Untersuchungen zur enzymatischen Umwandlung polymergebundenen Adenosins.....	38
3.5.	Affinitätschromatographie von Adenosin Desaminase an polymergebundenen Purinnucleosiden	43

3.5.1.	Affinitätschromatographie von Adenosin Desaminase an polymergebundenem Inosin und Adenosin.....	44
3.5.2.	Affinitätschromatographie von Adenosin Desaminase an polymergebundenem Tubercidin und Nebularin - Spezifische und unspezifische Wechselwirkungen.....	50
3.5.3.	Aufreinigung von Adenosin Desaminase aus Kälberdarm an immobilisiertem Inosin und Adenosin	53
3.6.	Bestimmung thermodynamischer Funktionen der Reaktion zwischen Adenosin Desaminase und immobilisiertem Inosin durch Affinitätschromatographie.....	56
3.6.1.	Theoretische Vorbemerkungen.....	56
3.6.1.1.	HETP-Wert.....	56
3.6.1.2.	Spezifische Elution.....	58
3.6.2.	Bestimmung der Adsorptionsenthalpie ΔH^0 von Adenosin Desaminase am Produktgel <u>17a</u>	59
3.6.3.	Bestimmung von ΔG^0 und ΔS^0 für die Reaktion von Adenosin Desaminase mit immobilisiertem Inosin.....	64
3.6.4.	Abhängigkeit der theoretischen Bodenhöhe von der Durchflußgeschwindigkeit.....	68
3.7.	Synthese und Eigenschaften der 0-2',3'-Ethyliden-Derivate des Xanthosins und ihre Immobilisierung.....	71
3.7.1.	Darstellung.....	71
3.7.2.	Inhibitoreigenschaften der 0-2',3'-Ethyliden-Acetale des Xanthosins und Guanosins gegenüber Guanase und Xanthin Oxydase.....	72
3.7.3.	Kupplung von 0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-xanthosin an 6-Aminohexylagarose.....	74
3.7.4.	Affinitätschromatographie von Guanase an immobilisiertem Xanthosin und Guanosin.....	75
3.7.5.	Affinitätschromatographie von Xanthin Oxydase an immobilisiertem Xanthosin.....	76

4.	Darstellung von O-2',3'-cyclischen Pyrimidin-nucleosid-Acetalen und ihre Immobilisierung...	78
4.1.	Synthese und Eigenschaften von O-2',3'-Ethyliden-Acetalen des Cytidins, Uridins, 6-Azauridins und ihrer 5'-Monophosphate.....	78
4.2.	Inhibition von Orotidin-5'-monophosphat Decarboxylase durch O-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)-ethyliden]-6-azauridin-5'-monophosphat.....	81
4.3.	Kupplung der O-2',3'-Ethyliden-Acetale des Cytidins, Uridins und 6-Azauridins an 6-Aminohexylagarose.....	84
4.4.	Affinitätschromatographie von Orotidin-5'-monophosphat Decarboxylase an immobilisiertem UMP und 6-AzaUMP.....	86
5.	Zusammenfassung.....	88
6.	Experimenteller Teil.....	91
7.	Literaturverzeichnis.....	133

Dank

Publikationen

Lebenslauf

1. Einleitung

Obwohl in biologischen Systemen eine Vielzahl von Reaktionen heterogen an polymeren Oberflächen ablaufen, sind wir es gewohnt, die Reaktionen der isolierten Naturstoffe in homogener Phase zu untersuchen. Dies führt zu unvollständigen Modellvorstellungen über chemische Abläufe in der lebenden Zelle.

Die Immobilisierung von Naturstoffen an künstlichen und natürlichen Polymeren kann der Verfeinerung der Modelle dienen. Aber nicht nur diese theoretischen sondern auch anwendungstechnische Aspekte spielen bei der Synthese trägergebundener Naturstoffe eine große Rolle. So führte die Immobilisierung von Enzymen zu Polymeren mit katalytischer Aktivität¹⁻³, andererseits entwickelte sich mit der Merrifield-Technik^{4,5} in der präparativen organischen Chemie ein Weg zur automatisierten Synthese von polymeren Naturstoffen, wie Peptiden und Polynucleotiden^{6,7}.

Der Anwendungsbereich niedermolekularer, trägergebundener Naturstoffe liegt außer in der Schaffung von Vergleichsmöglichkeiten von Reaktionen in heterogener Phase mit solchen in homogener Lösung auf folgenden Gebieten:

- a) Biologisch aktive, trägergebundene Naturstoffe können in der analytischen Chemie zur Auftrennung komplizierter hochmolekularer Stoffgemische (Proteine, Nucleinsäuren) eingesetzt werden (Affinitätschromatographie)⁸⁻¹⁰.
- b) Durch Einführung reaktiver Gruppen in Naturstoffe, speziell in Antibiotika, kann das modifizierte Antibiotikum spezifisch an das Protein, mit dem es in der Zelle

in Wechselwirkung tritt, angeheftet werden. Damit kann der Wirkungsort des Antibiotikums nachgewiesen, und die Klärung seines Wirkungsmechanismus erlangt werden (Affinitätsmarkierung).

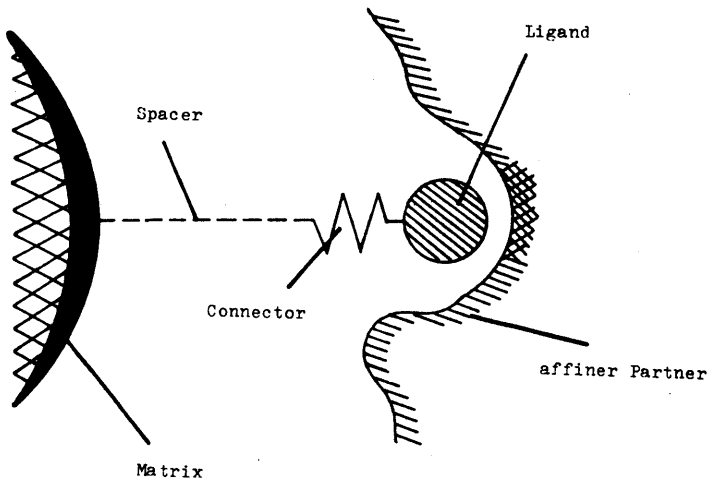
- c) Trägergebundene Schädlingsbekämpfungsmittel (Herbicide oder Pesticide) können bei langsamer Freisetzung der Wirksubstanz vom Polymer die Verminderung ihres mengenmäßigen Einsatzes in Land- und Forstwirtschaft bewirken, was eine Entlastung für Boden und Wasser mit sich bringt¹¹.
- d) Völlig neue Anwendungen eröffnen sich durch die Steuerung der Pharmakokinetik mit trägergebundenen Naturstoffen in der Medizin (Retard-Medikamente)¹².

Die Affinitätschromatographie gehört seit einigen Jahren zu den wichtigsten Methoden in der analytischen Chemie¹³.

Unter dem Begriff versteht man die Ausnutzung einer ultraspezifischen Wechselwirkung zweier Reaktionspartner für einen chromatographischen Prozess durch Immobilisierung eines Reaktionspartners an einem inerten Polymer.

In der anorganischen Analytik wird ein empfindliches und selektives Farbreagenz immobilisiert und am erhaltenen Polymer eine Chromatographie eines Metallionengemisches durchgeführt¹⁴.

In der biospezifischen Affinitätschromatographie wird in der Regel die hohe Selektivität einer enzymatischen Reaktion ausgenutzt, indem der niedermolekulare Reaktionspartner (Substrat, Produkt oder Inhibitor) immobilisiert wird. Folgende Darstellung gibt Auskunft über die derzeit gültige Nomenklatur zur Beschreibung eines Affinitätsgeles¹⁵:



Schema 1

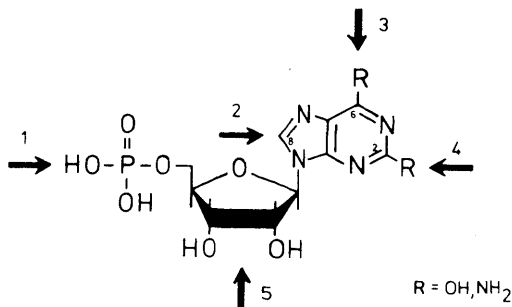
Folgende Faktoren beeinflussen die Qualität einer bio-spezifischen Affinitätschromatographie entscheidend: Matrix, Spacerlänge und Spacerhydrophilie, Ligand, Ligandenkonzentration, Säulendimensionen, Durchflußgeschwindigkeit und Temperatur.

2. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit werden Purin- und Pyrimidin-nucleoside, sowie ihre 5'-Monophosphate an Aminohexylagarose fixiert, und an diesen Polymeren Methoden der biospezifischen Chromatographie für Adenosin Desaminase, Orotidin-5'-monophosphat Decarboxylase und Guanin Aminohydrolase (Guanase) erarbeitet.

Das Ziel der Arbeit ist es fernerhin, an einem Beispiel ein affinitätschromatographisches System (Hier: Adenosin Desaminase - polymergebundenes Inosin) durch Variation chemischer und physikalischer Parameter zu optimieren und durch Bestimmung thermodynamischer Größen zu charakterisieren.

Zur Immobilisierung eines Nucleosides sind bereits mehrere Wege beschritten worden. Die Pfeile in folgender Abbildung geben die Stellen in einem Mononucleotid an, an denen eine kovalente Fixierung an ein Polymer erfolgt ist¹⁶⁻¹⁹:



- 1: Phosphorylierung
- 2: Substitution
- 3: Alkylierung
- 4: "
- 5: Perjodat-Oxydation

Schema 2

Soll bei der Verknüpfung von Nucleosiden oder Nucleotiden die biologische Funktion erhalten bleiben, so ist eine Reihe von Bedingungen zu erfüllen. Die Verknüpfung des Moleküls mit der polymeren Matrix muß an einer Stelle erfolgen, die die biospezifische Wechselwirkung nicht stört²⁰.

Bei der Immobilisierung des Nucleosidliganden ist weiterhin sicherzustellen, daß er für einen hochmolekularen Reaktionspartner (Enzym) frei zugänglich bleibt und damit möglichst wenig von seiner Reaktivität einbüßt. Letzteres wird dadurch gewährleistet, daß man Polymere mit hoher Porosität wählt und den Liganden in einem gewissen Abstand von der Polymeroberfläche hält²¹⁻²⁸.

Der Ort der chemischen Modifizierung am Naturstoff zum Zwecke der Immobilisierung richtet sich nach der biospezifischen Wechselwirkung, welche man für eine Affinitätschromatographie ausnutzen will. Bei der Chromatographie von nucleobasewandelnden Enzymen ist eine Modifizierung am glykonischen Rest des Nucleosides, möglichst unter Erhaltung des Kohlenhydratringes, vorteilhaft, da hier von vornherein durch die große Entfernung zwischen Immobilisierungsort und der Angriffsstelle des Enzyms eine nur geringe Beeinflussung der Wechselwirkung zu erwarten ist.

3. Darstellung von 0-2',3'-cyclischen Purinnucleosid-Acetalen und ihre Immobilisierung

3.1 Synthese und Eigenschaften von 0-2',3'-Ethylideninosin und -adenosin-Acetalen mit variablem Alkylidenrest

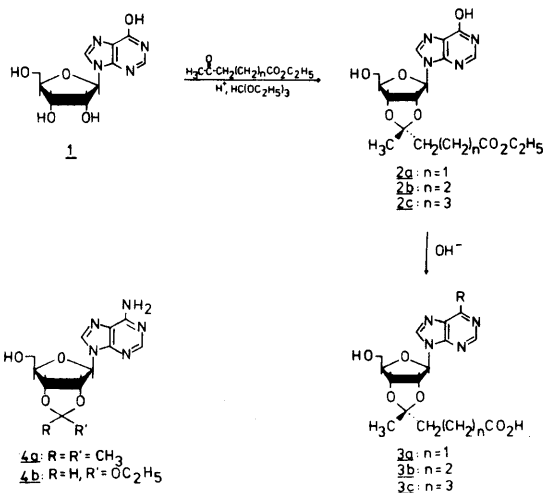
In der Nucleosidchemie kommt dem Isopropylidenrest als Schutzgruppe des cis-Diols der Ribonucleoside eine große Bedeutung zu, da sie leicht abspaltbar ist. Die Gruppe wird durch säurekatalysierte Umsetzung des Nucleosides mit Aceton in Gegenwart von Methanol eingeführt.

Der Versuch, Inosin (1) mit Lävulinsäureethylester unter entsprechenden Bedingungen umzusetzen schlägt fehl, was auf den großen Raumbedarf des Ethoxycarbonylethyl-Restes zurückgeführt werden kann. Setzt man jedoch - wie schon für die Acetalisierung von Adenosin mit Lävulinsäureethylester beschrieben²⁹ - der Reaktionsmischung Orthoameisensäuretriethylester zu, so läßt sich bereits nach zwei Stunden (Raumtemperatur) ein neues Reaktionsprodukt dünnschichtchromatographisch nachweisen, das mit dem Orthoester-Derivat 4b identisch ist.

Setzt man Inosin nur mit Orthoameisensäuretriethylester um, so entsteht ausschließlich dieses Orthoester-Derivat. Nach 24 Stunden ist 4b nicht mehr nachweisbar; dafür ist ein Produkt entstanden, das auf Kieselgel (LS B) langsamer als Inosin wandert und nach alkalischer Hydrolyse ein negativ geladenes Reaktionsprodukt ergibt. Letzteres gibt sich dadurch zu erkennen, daß es im Gegensatz zum Stammnucleosid und zur Ausgangssubstanz in der Elektrophorese zur Anode wandert.³⁰

Die Acetalisierungsreaktion führt also offenbar in Anwesenheit von Orthoameisensäuretriethylester zunächst zu einem kinetisch kontrollierten Produkt, dem Ethoxymethyleninosin, 4b. Dies wandelt sich innerhalb von 24 Stunden zum thermodynamisch kontrollierten Endprodukt um.

Die Isolierung dieses Endproduktes führt zu einer glasigen Substanz, die aus methanolischer Lösung durch Zugabe von Wasser kristallisiert werden kann. Sie zeigt das gleiche UV-Spektrum wie Inosin (245 nm). Eine Elementaranalyse sowie ein ¹H-NMR-Spektrum zeigen, daß es sich bei dem Produkt, wie erwartet, um ein cyclisches Acetalderivat des Inosins handelt, wobei zunächst noch unklar bleibt, ob die Acetalisierung an der 2',3'-Position oder an der 3',5'-Position des Nucleosides erfolgt. Die Klärung dieser Frage gelang durch ¹³C-NMR-Spektroskopie. Das ¹³C-NMR-Spektrum des Produktes zeigt für C-2'/C-3' Werte, die gegenüber Inosin um ca. 10 ppm zu tieferem Feld verschoben sind³¹.



Auch das Signal des 4-Keto-Kohlenstoffs des Lävulinsäure-ethylesters wird durch die Acetalisierung signifikant von 208 ppm nach 113.7 ppm verschoben. Somit hat das Acetalisierungsprodukt die Struktur 2a.

Bei der Bildung des cyclischen Acetals wird ein neues chirales Zentrum am Acetal-Kohlenstoff gebildet. Daher sollten sich zwei Diastereoisomere ergeben. Tatsächlich zeigt z.B. Isopropylideninosin im ^{13}C -NMR-Spektrum zwei Signale für die Acetal-Methylgruppen bei 25.126 ppm und 27.007 ppm. Das Spektrum des Esters 2a zeigt hingegen nur ein solches Signal bei 23.443 ppm. Dies deutet darauf hin, daß im wesentlichen nur ein Isomer gebildet wird. Auch das ^1H -NMR-Spektrum von 2a zeigt nur ein Methylsignal bei 1.35 ppm, während Isopropylideninosin, 4a, zwei Methylsignale bei 1.35 ppm und 1.65 ppm aufweist. Im hochaufgelösten ^{13}C -NMR-Spektrum lassen sich jedoch für C-2', C-3', Acetal-C sowie Acetal- CH_3 und Acetal- CH_2 zusätzliche Signale mit ca. 5% der Intensität der Hauptsignale erkennen, die andeuten, daß zu einem geringen Prozentsatz auch das andere Diastereoisomer entsteht. Der Anteil dieses anderen Isomers steigt bei den Verbindungen mit verlängerter Alkylidenkette (s.u.) geringfügig an.

Eine genaue Klärung, ob die Acetal-Methylgruppe exo- oder endo-ständig ist, also eine Bestimmung der Konfiguration des Acetal-Kohlenstoffs, ist jedoch durch Kernresonanzspektroskopie nicht möglich, da keine Vergleichsverbindungen zur Verfügung stehen, deren Acetalreste bereits zugeordnet sind.

Dies Problem kann erst durch die Darstellung von 0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-inosin, 3a, gelöst werden. Dazu wird der Ester 2a in ethanolischer Natronlauge gelöst und 30 Minuten bei Raumtemperatur verseift. Der Fortgang der Reaktion kann dünn-schichtchromatographisch verfolgt werden. Die basische Lösung wird an der Glas-elektrode durch Zugabe von saurem Ionenaustauscher neu-tralisiert. Nach Filtration kann die Säure 3a aus wässriger Lösung durch Zugabe einiger Tropfen Eisessig kristallisiert werden.

Das ^{13}C -NMR-Spektrum dieser Verbindung zeigt ebenfalls nur ein Signal bei 23.441 ppm für die Acetal-Methylgruppe, was ein Diastereoisomerengemisch ausschließt.

Von einer Vergleichssubstanz, dem 0-2',3'-[1-(2-Carboxy-ethyl)ethyliden]-adenosin, 6a, wurde eine Röntgenstruktur-analyse durchgeführt³². Die Säure 6a kristallisiert aus wässriger Lösung bei pH 5 in tetragonalen Bipyramiden.

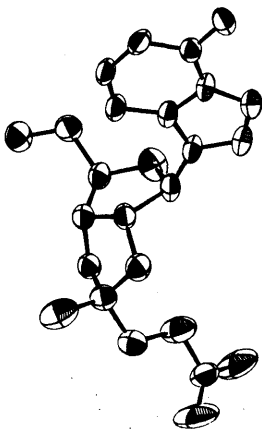


Abb. 1: Röntgenstrukturanalyse von 6a

Aus der Röntgenstrukturanalyse ist zu entnehmen, daß die Methylgruppe am Acetal-Kohlenstoff *exo*-ständig ist. Die Nucleobase nimmt die *syn*-Konformation ein. Diese Ergebnisse sind in sofern überraschend, da erwartet wurde, daß der raumerfüllende Alkylidenrest die *exo*-Stellung einnimmt. Offensichtlich dirigieren die 2',3'-H-Atome den Substituenten in die *endo*-Position.

Da im Adenosin die Nucleobase sowohl im Kristall als auch in wässriger Lösung die *anti*-Konformation einnimmt, weicht die Struktur von 6a auch in diesem Punkt von der des Stammnucleosides ab.

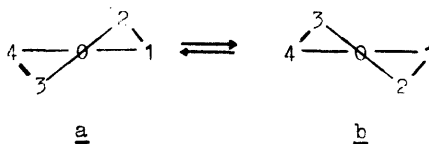
Eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carboxylgruppe der Verbindung 6a und der Nucleobase kann nicht nachgewiesen werden, wohl aber existieren intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carboxylgruppe des einen Moleküls zu N-1 und N-6 des benachbarten Moleküls.

Da im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum die chemische Verschiebung der Acetal-Methylgruppe von 6a mit der des dargestellten 3a übereinstimmt, ist auch hier diese Gruppe *exo*-ständig, und die absolute Konfiguration des Acetal-Kohlenstoffs ist R.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß bei allen dargestellten Verbindungen durch Vergleich der chemischen Verschiebungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Acetal-Methylgruppe eine *exo*-Konfiguration nachgewiesen werden kann.

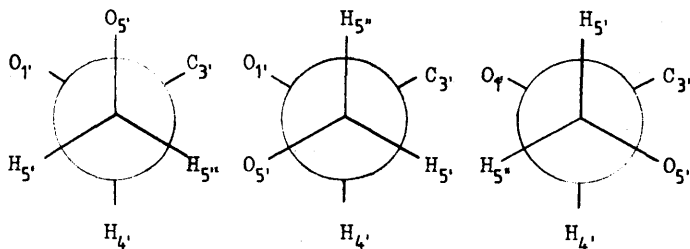
Wie die Röntgenstrukturanalyse von Ribonucleosiden zeigt³³, liegt der Riboserest normalerweise in einer der beiden "twist-Konformationen" (a oder b) vor. Bei substituierten Nucleosiden kann jedoch eine bestimmte Konformation begünstigt werden, oder es wird eine neue, die "envelope-Konformation"

eingenommen. Den Übergang von der "twist-Konformation a zur Konformation b bezeichnet man als Pseudorotation:



Die Atomgruppierung C-1/O/C-4 ist hier annähernd coplanar. Die Energiebarriere der Pseudorotation liegt bei $20 \text{ kJ} \times \text{M}^{-1}$. Im Vergleich besitzt die Rotation um die N-glykosidische Bindung eine Energiebarriere von $26 \text{ kJ} \times \text{M}^{-1}$ ³⁵. Wie die Röntgenstrukturanalyse von 6a zeigt, wird bei der 2',3'-Acetalbildung die "envelope-Konformation" eingenommen, in der C-1'/C-2'/C-4'/O-5' annähernd coplanar sind.

Eine konformative Abweichung der O-2',3'-cyclischen Acetale 2a und 3a betrifft die Konformation um die C-4'/C-5'-Bindungsachse. Hier können folgende Konformationen unterschieden werden:



gauche, gauche
(g,g)

gauche, trans
(g,t)

trans, gauche
(t,g)

Eine Analyse des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des Inosins nach:³⁴

$$\%g,g = 10 (13 - J(4',5') + J(4',5''))$$

ergibt eine hohe g,g -Population (ca. 100%), sodaß sich zwischen der 5'-OH-Gruppe und N-3 der syn-ständigen Nucleobase eine Wasserstoffbrückenbildung ausbilden kann. Dergleichen Befund zeigt eine Röntgenstrukturanalyse des 6-Thioinosins³³.

Bei den Acetalen 2a und 3a berechnet sich der g,g -Anteil nur zu ca. 30%. Da sich die einzelnen Populationsanteile additiv verhalten ($\%g,g + \%t,g + \%g,t = 100$), kann geschlossen werden, daß hier die Konformation um die C-4'/C-5' - Achse überwiegend t,g bzw. g,t ist, und somit die 5'-OH-Gruppe kaum noch für eine Wasserstoffbrückenbindung in Frage kommt.

Völlig analog im Hinblick auf Struktur und Konformation verhalten sich die dargestellten Acetale mit verlängerter Alkylidenkettenlänge 2b,c sowie 3b,c. Die Rolle dieser Verbindungen wird später unter dem Aspekt der Spacerverlängerung diskutiert.

Der zur Synthese von 2b und 3b benötigte 5-Oxohexansäureethylester wird aus 5-Oxohexansäure (4-Acetylbuttersäure) und Ethanol und Chlorwasserstoffgas als Katalysator dargestellt. Nach Fraktionierung im Hochvakuum erhält man in 69 proz. Ausbeute 4-Acetylbuttersäureethylester.

Die Acetalisierung von Inosin mit dem Ester erfolgt unter dergleichen Bedingungen wie oben beschrieben und führt zu 2b. Durch alkalische Hydrolyse ist die Säure 3b erhältlich.

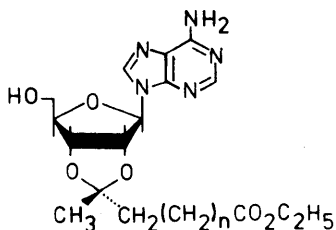
Zur Synthese der Acetale 2c und 3c geht man von 2-Acetylcyclopentanon aus. Dieses wird einer Säurespaltung unterworfen, indem man es in 5 proz. Natronlauge kocht. Nach Neutralisation wird die unumgesetzte Ausgangsverbindung mit Ether extrahiert. Die wässrige Phase wird mit Salzsäure stark angesäuert und mit Chloroform extrahiert. Nach Vertreibung des Lösungsmittels wird der Rückstand im Ölpumpenvakuum fraktioniert. Man erhält in 55 proz. Ausbeute 6-Oxohexansäure (6-Ketoönanthsäure) als farblose Substanz vom Schmp. 35°C ³⁷.

Diese wird mit Ethanol verestert. 6-Oxohexansäureethylester erhält man nach Fraktionierung im Ölpumpenvakuum in 75 proz. Ausbeute.

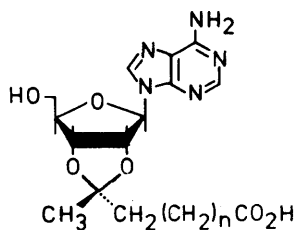
Die Umsetzung von Inosin mit diesem Ester führt zum Acetal 2c. Alkalische Hydrolyse von 2c ergibt die Säure 3c ³⁶.

Auf Grund ihrer größeren Lipophilie laufen die Acetale mit verlängerter Alkylidenkette im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, LS C) langsamer als die Inosin-Derivate 3a und 3b.

Die Darstellung der entsprechenden Adenosin-Derivate mit verlängerter Alkyliden Kettenlänge am Acetalrest erfolgt völlig analog den bereits beschriebenen Vorschriften ³⁶.



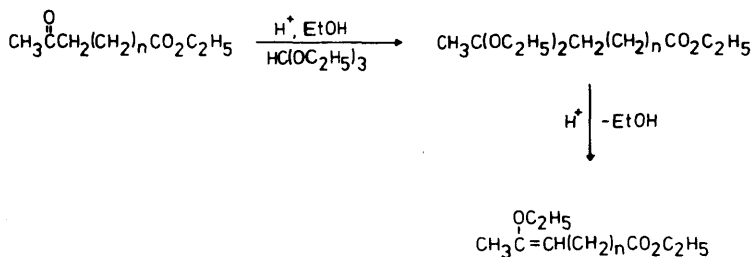
5a: n = 1
5b: n = 2
5c: n = 3



6a: n = 1
6b: n = 2
6c: n = 3

3.1.1. Synthese der 0-2',3'-Ethylideninosin-Derivate 2a und 2b durch Umacetalisierung

Da säurelabile Nucleoside unter den stark sauren Bedingungen der Acetalisierung (Lösung: ca. 1M HCl) N-Glykosidhydrolyse erfahren, ist es wünschenswert, daß die Umsetzung unter weniger sauren Bedingungen durchgeführt wird. Zu diesem Zweck wird statt Lävulinsäureethylester sein offenes Acetal 4,4-Diethoxypentansäureethylester eingesetzt. Da cyclische Acetale eine größere Stabilität besitzen als offene, gelingt es, ein offenes Acetal mit einem cis-Diol in ein geschlossenes zu überführen. Dazu sind nur geringe Säuremengen erforderlich, und das Gleichgewicht läßt sich durch Abdestillieren des aus dem offenen Acetal abgespaltenen Alkohols noch in die gewünschte Richtung verschieben³⁹.



Die Darstellung von 4,4-Diethoxypentansäureethylester erfolgt durch Umsetzung von Lävulinsäureethylester/Ethanol unter Säurekatalyse. Nach zwölfstündiger Reaktionszeit wird durch Zugabe von Triethanolamin neutralisiert.

Ameisensäureethylester sowie überschüssiges Ethanol wird abgedampft und der Rückstand im Ölpumpenvakuum fraktioniert. Man erhält 4,4-Diethoxypentansäureethylester in 83 proz. Ausbeute als farblose, aromatisch riechende Flüssigkeit⁴⁰.

Im ¹³C-NMR-Spektrum erscheint das Signal des Acetalkohlenstoffs nicht bei 113 ppm wie bei den Inosin- oder Adenosin-Acetalen, sondern bei 100.7 ppm, da das C-Atom nicht in einem gespannten, cyclischen Acetal eingebaut ist.

Bei Zugabe geringer Mengen Säure, bzw. unvollständiger Neutralisation mit Triethanolamin bei der Darstellung, entsteht aus dem offenen Acetal rasch der entsprechende Isopentenylether durch Abspaltung eines Moleküls Ethanol.

Bei der Synthese von 3,3-Diethoxybutansäureethylester (Ausgangssubstanz: Acetessigsäureethylester) entsteht selbst bei sorgfältiger Neutralisation stets gleichzeitig neben dem Acetal 3-Ethoxymethacrylsäureethylester. Das Verhältnis der beiden Produkte zueinander läßt sich durch analytische Gaschromatographie zu ca. 1:1 bestimmen. Die Bildung der ungesättigten Verbindung ist hier durch die Ausbildung konjugierter Doppelbindungen gegenüber dem offenen Acetal bevorzugt (Abb. 2).

Die Darstellung von 5,5-Diethoxyhexansäureethylester aus 5-Oxohexansäureethylester, Orthoameisensäuretriethylester und Ethanol verläuft unter den oben beschriebenen Bedingungen glatt. Das Signal des Acetalkohlenstoffs im ¹³C-NMR-Spektrum liegt hier bei 101.2 ppm.

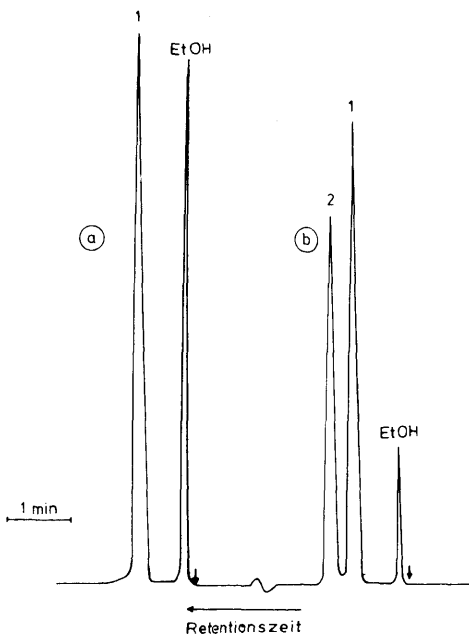


Abb. 2: Gaschromatogramm der Produkte aus der Acetalisierungsreaktion Acetessigsäureethylester/Ethanol; 1: 3-Ethoxymethacrylsäureethylester, 2: 3,3-Diethoxybutansäureethylester. a: nach Säurebehandlung, b: ohne Säurebehandlung.

Die Umsetzung von Inosin mit einem Überschuß von 4,4-Diethoxypentansäureethylester unter Zugabe geringer Mengen Chlorwasserstoff in Dioxan (Lösung: ca. 0.1M HCl) führt nach 2 h zum Dünnschichtchromatogramm a der Abb. 3. Daneben ist in Abb. 3 ein entsprechendes Chromatogramm der Reaktionsmischung nach 24 h abgebildet (b). Nach 2 h ist noch nicht alles Inosin umgesetzt. Neben dem gewünschten Endprodukt 2a ist noch ein Nebenprodukt erkennbar, das nach einer Reaktionszeit von 24 h nicht mehr vorhanden ist.

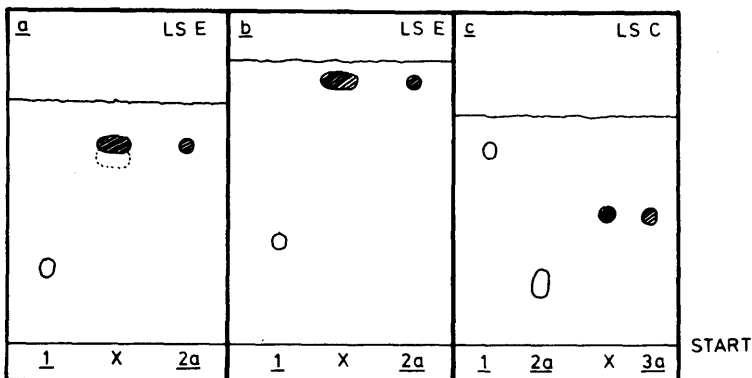


Abb. 3: Dünnschichtchromatogramme der Umsetzung von Inosin(1) mit 4,4-Diethoxypentansäureethylester zu 2a nach 2 h (a) und 24 h (b), sowie der alkalischen Hydrolyse von 2a zu 3a (c).

Bei diesem Produkt kann es sich nicht um Ethoxymethyleninosin, 4b, handeln, da sich dieses nur in Gegenwart von Orthoameisensäuretriethylester bilden kann. Bei dieser Verbindung handelt es sich entweder um ein Zwischenprodukt der Umacetalisierung, z.B. um ein Halbacetal, oder um ein kinetisch kontrolliertes Produkt, z.B. um das 3',5'-Acetalderivat des Inosins, welches sich langsam in das thermodynamisch kontrollierte Endprodukt 2a umwandelt.

Wird die Reaktionsmischung nach 24 h einer alkalischen Hydrolyse unterworfen, so entsteht die entsprechende Säure 3a (Abb. 3c).

Nach der Methode der Umacetalisierung läßt sich nach der Aufarbeitung 2a in 60 proz. Ausbeute erhalten.

Bei der Umacetalisierung von Inosin mit 5,5-Diethoxyhexansäureethylester entsteht, wie erwartet, das Acetal 2b in ebenfalls 60 proz. Ausbeute.

Der Vorteil der Umacetalisierungsreaktion liegt in der wesentlich geringeren Säuremenge, die zur Katalyse bei der Darstellung der gewünschten Nucleosid-Acetale erforderlich ist. Die Chlorwasserstoff-Molarität der Reaktionslösung ist hier um den Faktor 10 geringer (0.1 M) als bei der zuerst beschriebenen Methode (Kap. 3.1.). Möglicherweise hat auch dort Orthoameisensäuretriethylester in Verbindung mit der starken Säure die Aufgabe, das offene Acetal des Ketosäureesters zu bilden, welches dann in einer Umacetalisierungsreaktion weiterreagiert. Die kinetisch kontrollierte Bildung von Ethoxymethylen-Nucleosid-Derivaten wäre somit das Ergebnis einer Nebenreaktion.²⁹.

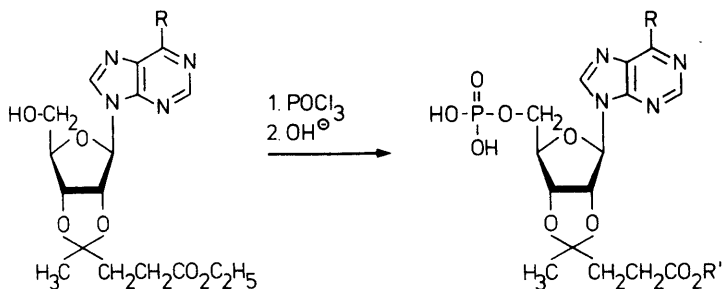
3.1.2. 0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-inosin-0-5'-monophosphat

Die Acetalisierung von Inosin-5'-monophosphat (IMP) mit Lävulinsäureethylester unter 2a-Bedingungen führt, wie die Chromatographie des Reaktionsansatzes (Kieselgel, LS C) zeigt, nicht zum Acetal 7a. Auch bei der Umacetalisierung mit 4,4-Diethoxypentansäureethylester entsteht 7a nicht. Die Ursache für dieses Ausbleiben ist nicht bekannt.

Bei Änderung der Reaktionsfolge, also Acetalisierung von Inosin und anschließende Phosphorylierung von 2a in Triethylphosphat mit Phosphoroxytrichlorid, entsteht der phosphorylierte Ester 7a, der ohne Isolierung mit 0.5 N Natronlauge zu 7b hydrolysiert und nach Neutralisation an DE-52-Cellulose chromatographiert wird. Wasser eluiert unphosphoryliertes 3a. Elution mit einem linearen Gradienten aus 0.5 M Triethylammoniumbicarbonat-Puffer/Wasser (11) führt bei einer 0.3 M Pufferkonzentration zum Auswaschen des 5'-Monophosphates 7b. Nach Abdampfen fällt es in 42 Proz. Ausbeute (optisch bestimmt mit $\epsilon = 10500$) als farblose, glasige Substanz an.

Durch enzymatischen Abbau von 7b mit alkalischer Phosphatase entsteht ausschließlich 0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-inosin, 3a, als Reaktionsprodukt, was zeigt, daß es sich um ein 5'-Monophosphat handelt.

Die quantitative Phosphatbestimmung nach der Molybdänblau-Methode⁴¹ ergibt 1 mol Phosphat/mol Nucleosid.³⁰



2a: R = OH
5a: R = NH₂ ²⁹⁾

7a: R = OH, R' = C₂H₅
7b: R = OH, R' = H
7c: R = NH₂, R' = C₂H₅ ⁴²⁾
7d: R = NH₂, R' = H ⁴²⁾

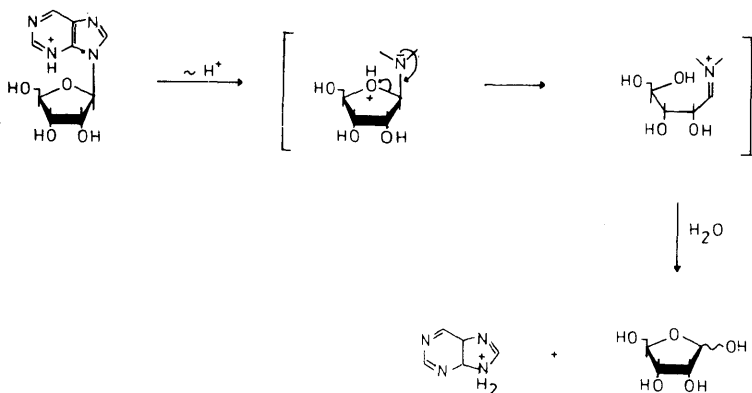
3.2. O-2',3'-Ethyliden-Derivate des Tubercidins, 6-Thioinosins und Nebularins⁴³

Die Umsetzung von 7-Desazaadenosin (Tubercidin)^{44,45}, 8, mit Lävulinsäureethylester und Orthoameisensäuretriethylester unter 2a-Bedingungen führt in 82 proz. Ausbeute zu O-2',3'-[1-(2-Ethoxycarbonyl)ethyliden]-tubercidin, 11a.

Alkalische Verseifung dieses Esters ergibt nach Chromatographie an einem Anionenaustauscher (Acetatform) analysenreines O-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-tubercidin, 11b.

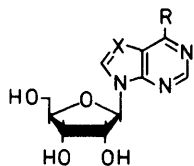
Die Umsetzung von Nebularin in derselben Weise mißlingt auf Grund der Säurelabilität der N-glykosidischen Bindung^{46,47}, sodaß auch eine Acetalbildung durch Umacetalisierung nicht zum gewünschten Erfolg führen kann.

Die saure Hydrolyse des Nebularins verläuft wahrscheinlich nach folgendem Mechanismus⁴⁸:



Eine Protonierung in Position N-3 des Purinringes im Nebularin ermöglicht bei Rotation der Nucleobase um die N-glykosidische Bindung einen Protonentransfer zum Ribosylsauerstoff. Dadurch wird der Zerfall des Nucleosidmoleküls zu Ribose und protoniertem Purin eingeleitet.

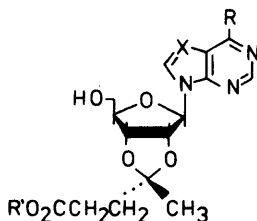
Die Hydrolyseempfindlichkeit von Nebularin erfordert, daß dessen Acetale über die 6-Mercaptoverbindung, 9, dargestellt werden, die nicht säurelabil ist. Aus 6-Thioinosin erhält man so 0-2',3'-[1-(2-Ethoxycarbonyl)ethyliden]-6-thioinosin, 12a, glatt und in hoher Ausbeute (82%). Auch die Verseifung von 12a zur Säure 12b erfolgt in 83 proz. Ausbeute. 12a und 12b zeigen ein UV-Spektrum mit jeweils einem Maximum bei 325 nm.



8: X=CH, R=NH₂

9: X=N, R=SH

10: X=N, R=H

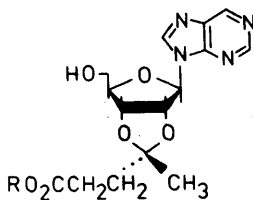


11a: X=CH, R=NH₂, R'=C₂H₅

11b: X=CH, R=NH₂, R'=H

12a: X=N, R=SH, R'=C₂H₅

12b: X=N, R=SH, R'=H



13a: R=C₂H₅

13b: R=H

Die Reduktion von O-2',3'-[1-(2-Ethoxycarbonyl)ethyliden]-6-thioinosin mit Raney-Nickel in einer Zweiphasenreaktion (n-Butanol/Wasser, 2 h, 90°C) führt in 65 proz. Ausbeute zu farblosem, amorphem O-2',3'-[1-(2-Ethoxycarbonyl)ethyliden]-nebularin, 13a.

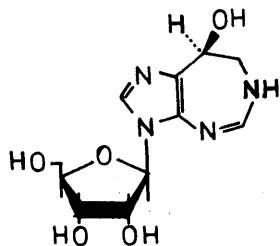
Zur Darstellung von O-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-nebularin, 13b, wird O-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-6-thioinosin, 12b, mit Raney-Nickel reduziert. Da sowohl die Ausgangsverbindung, als auch das Produkt wasserlöslich sind, kann die Reaktion in homogener Phase durchgeführt werden. Das Rohprodukt enthält jedoch noch kolloidales Nickelsulfid und wird deshalb an einem Kationenaustauscher (Lewatit, CP 3050, H⁺-Form) chromatographiert. Wasser eluiert 13b, das nach Kristallisation analysenrein und in 39 proz. Ausbeute erhalten wird.

3.3. Substrat- und Inhibitoreigenschaften modifizierter Purinnucleoside gegenüber Adenosin Desaminase

Adenosin Desaminase (ADA), ein Enzym mit einem Molekulargewicht von 35000 Dalton^{49,50}, katalysiert in einem pH-Bereich von 5.5 bis 9.6 die Hydrolyse von Adenosin zu Inosin. Um pH 9 katalysiert das Enzym in Gegenwart von Ammoniak auch die Rückreaktion⁵¹.

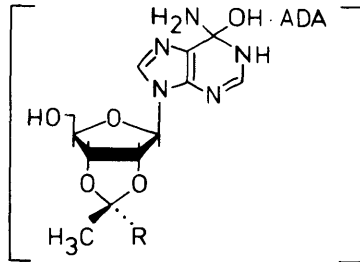
Zahlreiche Untersuchungen zeigen eine auffällig geringe Spezifität des Enzyms gegenüber C-6 - Derivaten des Adenosins. So sind N⁶-Methyladenosin, 6-Chloradenosin und 6-Thioinosin noch Substrate⁵²⁻⁵⁴. Wird jedoch ein voluminöser Substituent in C-6 eingeführt, so werden die Substrateigenschaften signifikant schlechter. So wirkt N⁶,N⁶-Dimethyladenosin bereits als Inhibitor. Isopentenyladenosin wird weder als Inhibitor noch als Substrat in das aktive Zentrum des Enzyms gebunden.^{55,53}

Dagegen führt die Ringaufweitung des Purinringes zu einem siebengliedrigen Ring (Coformycin) zu einer verstärkten Bindung von ADA. Dies wird durch den K_I-Wert des Antibiotikums Coformycin (s. Tab. 1) belegt.^{56,57}



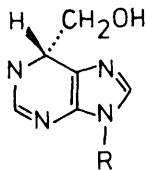
Coformycin

Wolfenden postuliert für den enzymatischen Reaktionsmechanismus einen tetraedrischen Übergangszustand an C-6, in den das Enzym bzw. enzymgebundenes Wasser involviert ist; die Bildung dieses Übergangszustandes soll der geschwindigkeitbestimmende Reaktionsschritt sein.^{58,59}

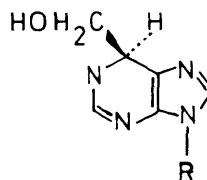


R = variabler Rest

Für dieses Modell spricht vor allem die folgende Tatsache: Modellsubstanzen für den Übergangszustand, wie 14a, sind starke Inhibitoren; 14a wird mit einem K_I -Wert von $0.76 \times 10^{-6} \text{ M}$ etwa vierzig Mal stärker als Adenosin gebunden. Da aus dem C-6 des Purins bei 14a ein chirales C-Atom geworden ist, wurde auch das Diastereomer 14b isoliert



14a



14b

und dessen Bindung zu Adenosin Desaminase untersucht; 14b wird deutlich schwächer an das Enzym gebunden (K_I -Wert: $12.5 \times 10^{-6}M$), was auf einen stereospezifischen Angriff des enzymgebundenen Wassers auf das Nucleosid hinweist.⁵⁸

Essentiell für die Desaminierung von Purinnucleosiden durch Adenosin Desaminase ist ein freies Stickstoffatom in Position 7 - Nucleoside wie Tubercidin (7-Desazaadenosin) oder N^7 - β -D-Ribofuranosyladenin zeigen weder Inhibitor- noch Substrateigenschaften gegenüber dem Enzym. Auch die dargestellten Tubercidin-Acetale 11a und 11b werden nicht in das aktive Zentrum gebunden.⁵⁴

Weiterhin ist für die Bindung eine freie 5'-Hydroxylgruppe wichtig. Dies wird erkennbar aus der Tatsache, daß für die Desaminierung von AMP ein besonderes Enzym, die Schmidts Desaminase, existiert. Auch das dargestellte 5'-Monophosphat 7d wird von Adenosin Desaminase nicht, sondern nur von Schmidts Desaminase als Substrat akzeptiert. Oligo- und Polynucleotide werden ebenfalls nicht durch ADA desaminiert.^{54,60}

Der Einfluß der Pseudorotation des Furanoseringes, sowie der Substituenten in der C-2' bzw. C-3'-Position des Kohlenhydratrestes auf eine Desaminierung durch ADA ist ebenfalls intensiv untersucht worden⁶¹.

Dabei gelangte man zu folgenden Ergebnissen: a) das Enzym benötigt ein Substrat in der C-2' endo und/oder C-3' endo Konformation; b) eine C-4' exo oder C-1' exo Konformation des Kohlenhydratrestes hat ein völliges Verschwinden der Substrataktivität zur Folge; c) voluminöse Halogensubstituenten (Br, J) an C-2'/C-3' verschlechtern die Substrateigenschaften signifikant.

Substrate	K_M (μ Mol)	v_{max}
Adenosin	31	100
2'-Desoxyadenosin	34	185
3'-Desoxyadenosin	43	120
8,2'-Thioanhydroadenosin (anti)	200	7
8-Thioadenosin	-	-
N ⁶ -Methyladenosin	11	0.16
N ⁶ -Ethyladenosin	120	0.14
6-Chloroadenosin	710	23
2'-O-Methyladenosin	22	53
2',3'-Isopropylidenadenosin	48	49
8,2'-Anhydro-8-hydroxy-9- β -D-Arabinofuranosyladenin	180	1.7

Inhibitoren	K_I (μ Mol)
6-Methoxyl-9- β -D-ribofuranosylpurin	2.5
9-(n-Hexyl)adenin	19 ⁵⁴
Nebularin	8.8
Inosin	160
Coformycin	9.3
<u>14a</u>	0.76
<u>14b</u>	12.5

Tab. 1: Substrate und Inhibitoren für Adenosin Desaminase⁶²⁻⁶⁶

In Widerspruch hierzu steht die Tatsache, daß die Ausbildung eines cyclischen Acetals in der Position C-2'/C-3', wie im Isopropylidenadenosin, keinen bemerkenswerten Einfluß auf die Desaminierung ausübt (s. Kap. 3.3.1.).

3.3.1. Substrateigenschaften der O-2',3'-Ethylidenadenosin-Derivate

Der K_M -Wert für Isopropylidenadenosin legt die Vermutung nahe, daß auch die O-2',3'-Ethylidenadenosin-Derivate^{29,38,36} noch Substrate für Adenosin Desaminase sind.

Um qualitativ zu testen, ob die O-2',3'-cyclischen Adenosin-Acetale sich als Substrate für ADA eignen, werden zu Lösungen von 5a-c und 6a-c in Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7.6) jeweils 5 units in 5 μ l Glycerin gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37°C vergleicht man die Lösungen dünnschichtchromatographisch (Kieselgel, LS C); alle Adenosin-Acetale haben sich zu den entsprechenden Inosin-Verbindungen umgesetzt. Dies zeigt, daß die O-2',3'-Ethylidenadenosin-Derivate in das aktive Zentrum von Adenosin Desaminase gebunden werden. (Tab. 2).

Eine quantitative Untersuchung^{36,38} über den Einfluß der Alkylidenkettenlänge der Acetale auf die Substratwirksamkeit zeigt, daß insbesondere bei den Säuren 6a-c die Desaminierungsgeschwindigkeit mit wachsender Alkylidenkettenlänge steigt, wenn auch die Geschwindigkeit wie beim Adenosin nicht erreicht wird.

Ferner ist bemerkenswert, daß die Ester 5a-c wesentlich schneller desaminiert werden, als die entsprechenden Säuren. Dies läßt vermuten, daß im oder am aktiven Zentrum von Adenosin Desaminase eine Häufung hydrophober Gruppen auftritt. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Befund, daß Adenin-Derivate, die in Position 9 einen hydrophoben Alkylrest tragen, als Inhibitoren in das aktive Zentrum gebunden werden.

So beträgt der K_I -Wert von 9-(n-Hexyl)-adenin $19 \mu\text{mol}$, während der K_M -Wert von Adenin $150 \mu\text{mol}$ beträgt.

Möglicherweise wird eine Schwächung der Bindung zwischen Nucleosid und Enzym - hervorgerufen durch eine Acetalisierung in der 2',3'-Position - durch nunmehr wirksam werdende hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Acetal-Alkylidenkette und Adenosin Desaminase kompensiert.

Komponente	$\Delta E/\text{min} \times 10^{-3}$
5a	69
5b	108
5c	114
6a	4
6b	23
6c	71
16a	0
16b	3
16c	5

Tab. 2: Extinktionsdifferenzen (260 nm) der Anfangsgeschwindigkeiten (linearer Bereich) der enzymatischen Desaminierung von 5a-c, 6a-c und 16a-c bei konstanter Menge von Adenosin Desaminase (2.5×10^{-2} units)

3.3.2. Inhibitoreigenschaften der Nucleosid-Derivate

3a-c und 11b bis 13b

Zur Bestimmung der Inhibitorwirkung der Verbindungen 3a-c, 11b, 12b und 13b, sowie deren Stammnucleoside, werden jeweils 100 μ l einer Adenosin-Stammlösung, die 0.1 μ mol Adenosin enthält, entweder direkt mit Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7.6) oder nach Zusatz von 100 μ l einer Inhibitor-Stammlösung, die zwischen 0.1 und 1 μ mol des betreffenden Inhibitors enthält, auf 1 ml verdünnt. Man versetzt mit 2.5×10^{-2} units Adenosin Desaminase und bestimmt die relativen Anfangsgeschwindigkeiten der Desaminierungsreaktion UV-spektroskopisch bei 260 nm mit und ohne Inhibitor.

Komponente	Mol. Verhältnis A : Inhibitor	v _{rel}
Adenosin	-	100
0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-tubercidin, <u>11b</u>	1:10	100
0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-6-thioinosin, <u>12b</u>	1:10	42
0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-nebularin, <u>13b</u>	1:1	55
0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-inosin, <u>3a</u>	1:10	71
0-2',3'-[1-(3-Carboxypropyl)ethyliden]-inosin, <u>3b</u>	1:10	58
0-2',3'-[1-(4-Carboxybutyl)ethyliden]-inosin, <u>3c</u>	1:10	60
Inosin	1:10	79
6-Thioinosin	1:8	47
Nebularin	1:1	34

Tab. 3: Relative Anfangsgeschwindigkeiten der Desaminierungsreaktion von Adenosin durch Adenosin Desaminase in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren

Die negative Steigung des linearen Bereiches (1. bis 2. Minute) der Messung ohne Inhibitor wird gleich 100% gesetzt und mit den entsprechenden Werten der Inhibitoren verglichen (Tab. 3).

Die Derivate 12b, 13b und 3a-c zeigen alle eine deutliche Inhibitionswirkung auf die Desaminierungsgeschwindigkeit von Adenosin durch ADA, die sich nur gering von der der Stammnucleoside unterscheidet.

Wie zu erwarten war, wird O-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-tubercidin, wie auch Tubercidin selbst, nicht in das aktive Zentrum des Enzyms gebunden.

Beim Vergleich der Inhibitionen durch die O-2',3'-Ethyliden-Inosin-Derivate 3a-c untereinander ist eine Zunahme mit steigender Alkylidenkettenlänge zu beobachten. Dies steht im Einklang mit den Messungen der Substrateigenschaften der O-2',3'-Ethylidenadenosin-Verbindungen (Tab. 2).

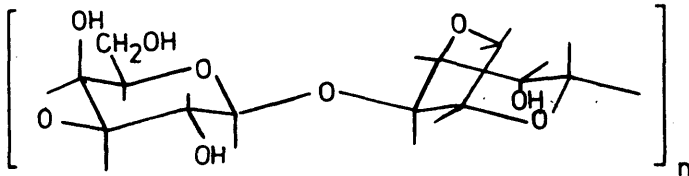
Die bisherigen Untersuchungen über Substrat- bzw. Inhibitor-eigenschaften der dargestellten O-2',3'-Ethylidennucleosid-Derivate lassen den Schluß zu, daß bei Immobilisierung dieser Acetale über die endständigen Carboxylgruppen in der Alkylkette, Polymere erhalten werden, die - zumindest zu einem Teil - eine biospezifische Wechselwirkung mit Adenosin Desaminase eingehen können. Die Alkylkette stellt dabei einen Connector dar, sodaß die dargestellten Acetal-Derivate bereits Strukturelemente eines späteren Spacers enthalten.

3.4. Agarosegebundene Purinnucleoside

3.4.1. Agarose - Struktur und Umsetzung zu kupplungs- fähigen Polymeren

Ein für die Immobilisierung von Nucleosiden zum Zweck einer biospezifischen Affinitätschromatographie brauchbares Polymer muß verschiedenen chemischen und mechanischen Anforderungen genügen. Der Träger selbst sollte möglichst keine oder doch nur minimale Wechselwirkung mit dem affinen Partner eingehen. Ferner sollte er auch bei extremen pH-Werten nicht seine Struktur ändern. Gute Durchflusseigenschaften, die auch nach der Fixierung der Liganden erhalten bleiben, stellen eine weitere Anforderung dar. Der polymere Träger soll ein poröses, dreidimensionales Netzwerk bilden, das die Diffusion selbst großer Teilchen nur unwesentlich behindert.⁶⁶

Das aus Rhodophyceae gewonnene Polysaccharid Agarose vereinigt diese Eigenschaften in idealer Weise.

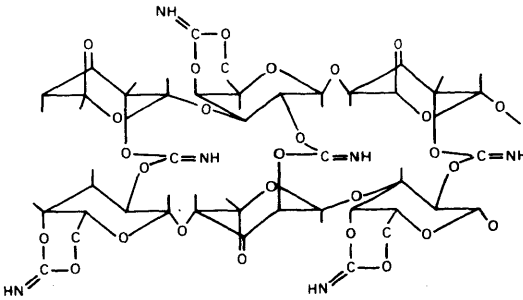


Agarose ist ein alternierendes Copolymer aus 1,3-verknüpften

β -D-Galaktose Einheiten und 1,4-verknüpften 3,6-Anhydro- α -L-Galaktose Einheiten.

Agarose bildet parallele Doppelhelices mit einer axialen Periodizität von 0.95 nm. Jede Kette der Doppelhelix ist eine dreizählige, linksgängige Helix mit einer Ausdehnung von 1.90 nm. 10 bis 10000 dieser Helices sind in parallelen Strängen von ca. 20 bis 300 Å Durchmesser zusammengefaßt und vernetzen jeweils an dergleichen Stelle. So entsteht ein dreidimensionales Netzwerk mit großen Hohlräumen, die auch den Durchtritt großer Moleküle gestatten⁶⁷⁻⁶⁹

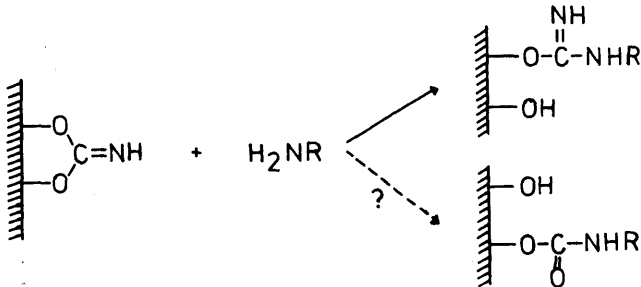
Agarose wird kommerziell unter gleichzeitiger Einführung eines Spacers in ein kupplungsfähiges Derivat mit primären Aminogruppen überführt.



Schema 4: Hypothetische Struktur bromcyan-aktivierter Agarose

Hierzu wird das Polysaccharid zunächst mit Bromcyan umgesetzt, wobei sich vermutlich intra- und intermolekulare Imidocarbonatgruppen bilden (Schema 4), die mit einem Überschuß von 1,6-Diaminohexan zu einem N-substituierten

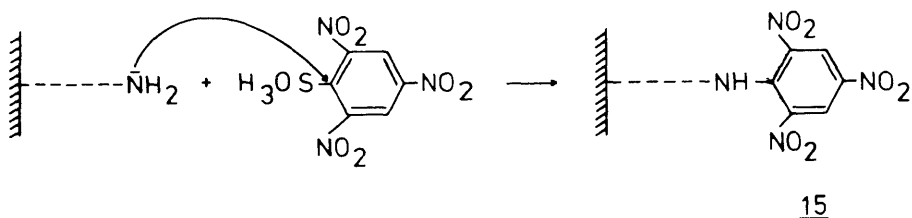
Harnstoff abreagiert werden können. Diese 6-Aminohexyl-agarose (AH-Agarose) enthält nun im Abstand von sechs Methylengruppen primäre Aminogruppen, die z.B. mit aktivierten Carbonsäure-Derivaten umgesetzt werden können.^{70,71}



Schema 5: Umsetzung bromcyanaktivierter Agarose mit einem primären Amin

Obgleich durch eine Bromcyan-Aktivierung eine Quervernetzung der Agarosestränge erfolgt, was durch eine Erhöhung des Schmelzpunktes erkennbar wird (Agarose: Schmp. ca. 60°C; AH-Agarose: Schmp. ab 150°C unter Zersetzung), bleibt dennoch eine grobe, schwammartige Struktur erhalten. Dies wird in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 4,5) deutlich. Die Abb. 4 zeigt ein kompaktes AH-Agarose-Teilchen mit Poren von einer Größe zwischen 20 und 50 µm. Abb. 5 zeigt den Blick in das Innere einer dieser Poren.

Vor einer Kupplungsreaktion von AH-Agarose mit einem Carbonsäure-Derivat wird eine quantitative Bestimmung der primären Aminogruppen durchgeführt. Hierzu wird eine eingewogene Menge gequollener AH-Agarose in gesättigter Natriumtetraborat-Lösung mit Trinitrobenzolsulfonsäure umgesetzt. Die stark positivierende Wirkung der vier Substituenten im Reagenz ermöglicht einen nucleophilen Angriff der Aminogruppe am Aromaten. Das entstehende Agarose-Derivat 15 ist orange gefärbt.⁷²



Dieses wird in 2N Salzsäure bei 100°C gelöst und die Extinktion bei 415 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge besitzt hydrolysierte Agarose keine nennenswerte Eigenabsorption⁷³ mehr. Mittels einer Eichkurve, die durch Reaktion variierter Mengen n-Hexylamin mit Trinitrobenzolsulfonsäure erhalten wird, ist die Zahl der primären Aminogruppen bestimmbar.

Kommerzielle AH-Agarose enthält

6 bis 10 $\mu\text{mol NH}_2/\text{g Gel}$.

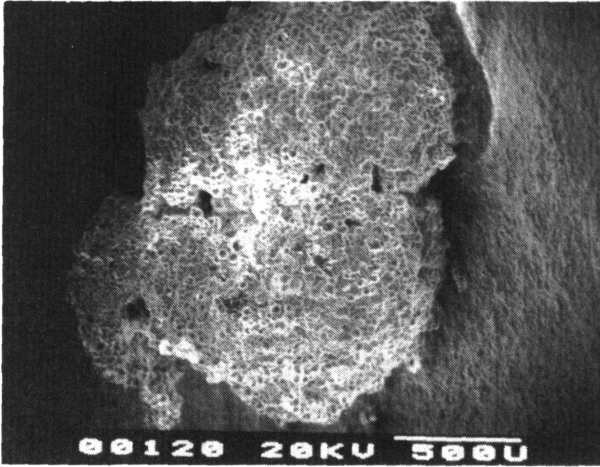


Abb. 4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von AH-Agarose. Kalibrierung: 500 μm

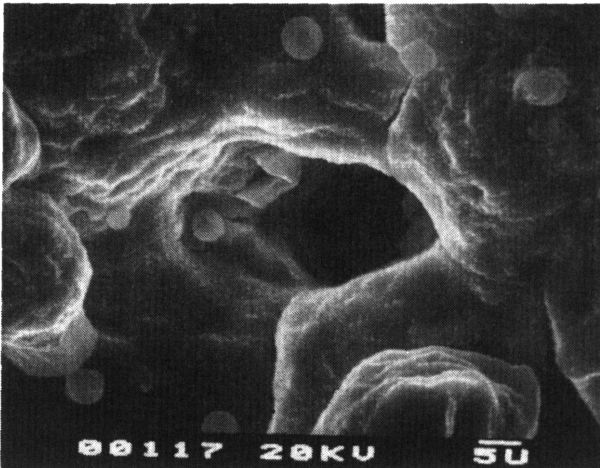


Abb. 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von AH-Agarose. Kalibrierung: 5 μm

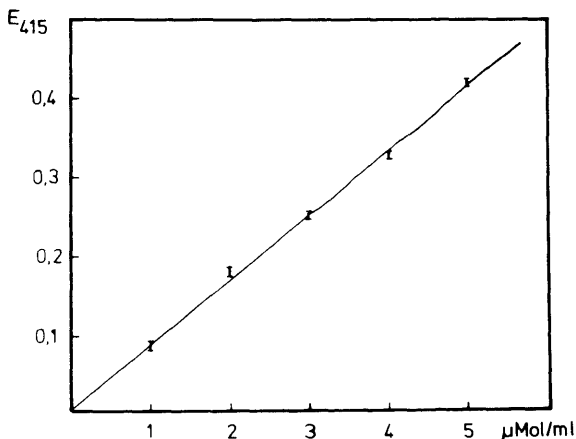


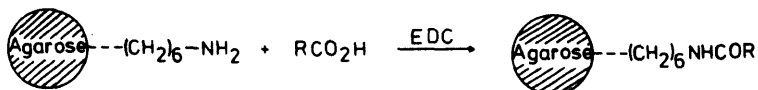
Abb. 6: Eichkurve zur Bestimmung primärer Aminogruppen an Aminohexylagarose durch Reaktion mit Trinitrobenzolsulfonsäure

3.4.2. Kupplung der Nucleosid-Derivate an 6-Aminohexyl-agarose

Zur Immobilisierung der 0-2',3'-Ethyldennucleosid-Derivate wird kommerziell erhältliche, gefriergetrocknete 6-Aminohexylagarose verwendet. Durch Quellen in 0.5M Natriumchlorid-Lösung und anschließendem Auswaschen mit Wasser wird sie von Stabilisierungshilfsstoffen befreit. Das Gel wird abgesaugt, bis die Oberfläche bricht und in der Kälte aufbewahrt. In diesem Zustand enthält AH-Agarose 96 Gewichtsprozent Wasser.

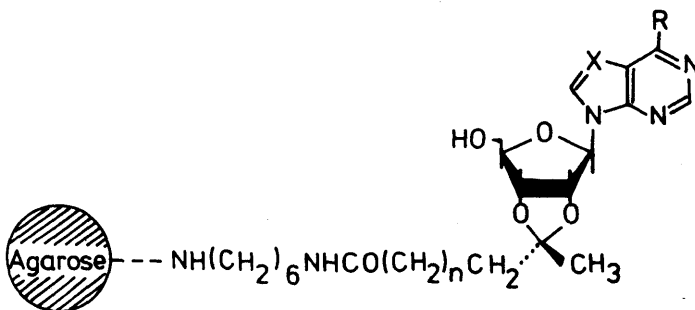
Zur Kupplung der Säuren 6a-c, 3a-c sowie 11b bis 13b werden diese jeweils in Wasser/p-Dioxan (7:3) gelöst und die vorbereitete AH-Agarose in die Lösung eingetragen.

Bis zu einem Lösungsmittelverhältnis 1:1 bleibt die Struktur der AH-Agarose weitgehend unverändert. Die Säuren werden mittels *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC) innerhalb von 12 h bei Raumtemperatur an die freien Aminogruppen der 6-Aminohexylagarose gekuppelt.



R = 0-2',3'-Ethylidennucleosid-Rest

Die dargestellten Gele 16a-c, 17a-c und 18 bis 20 werden sorgfältig gewaschen und können in der Kälte mehrere Jahre aufbewahrt werden.



16a: n=1, X=N, R=NH₂

16b: n=2, X=N, R=NH₂

16c: n=3, X=N, R=NH₂

17a: n=1, X=N, R=OH

17b: n=2, X=N, R=OH

17c: n=3, X=N, R=OH

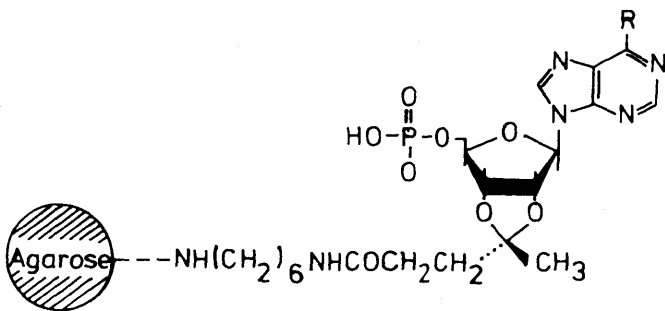
18: n=1, X=CH, R=NH₂

19: n=1, X=N, R=SH

20: n=1, X=N, R=H

Um die Konzentration des kovalent gebundenen Nucleosid-Liganden zu bestimmen, werden 500 mg der feuchten Gele sowie feuchte AH-Agarose bei 95°C im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, wobei ein Gewichtsverlust von 96% eintritt. Von den getrockneten Gelproben werden jeweils gleiche Mengen sowie eine definierte Menge der entsprechenden Liganden in je 50 ml 1N Salzsäure genau 30 min bei 100°C hydrolysiert. Anschließend werden die Extinktionen beim zugehörigen λ_{\max} des Nucleosidliganden bestimmt. Durch Differenzbildung aus E_{Gel} - $E_{\text{AH-Agarose}}$ und Vergleich mit der Extinktion des jeweiligen Ligandenhydrolysates ist die Ligandenkonzentration zu berechnen.

Die Kupplung der 5'-Monophosphate 7b und 7d an AH-Agarose zu den Gelen 16d und 17d erfolgt in der beschriebenen Weise, jedoch ist hier die Ligandenkonzentration einfacher durch eine quantitative Phosphatbestimmung nach der Molybdänblau-Methode bestimmbar.



16d: R = NH₂

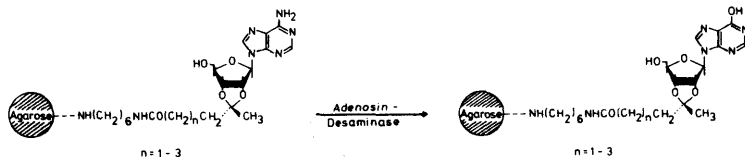
17d: R = OH

In der Regel betragen die Konzentrationen der polymergebundenen Liganden um 200 $\mu\text{mol/g}$ trocknes Gel. Dies entspricht ca. 8 $\mu\text{mol/g}$ feuchtes Gel. Da kommerzielle AH-Agarose zwischen 6 und 10 μmol primäre Aminogruppen pro g enthält, ist somit die Höchstgrenze der Beladung erreicht.

Um auszuschließen, daß die 5'-Monophosphate 7b,d über den Phosphatrest mit AH-Agarose gekuppelt werden, wird AMP mit dem Gel in Anwesenheit von EDC in der beschriebenen Weise umgesetzt. Eine anschließende quantitative Phosphatbestimmung ergibt einen Gehalt von weniger als 0.5 $\mu\text{mol/g}$ feuchtes Gel. Hieraus ist ersichtlich, daß auch bei den Polymeren 16d und 17d der Ligand über die Carboxylgruppe gebunden ist.

3.4.3. Kinetische Untersuchungen zur enzymatischen Umwandlung polymergebundenen Adenosins

Der einfachste und zugleich sicherste Weg zum Nachweis der biospezifischen Wechselwirkung zwischen einem Enzym und seinem polymergebundenen Substrat ist die enzymatische Umwandlung des Substratgels in das entsprechende Produktgel.



Inkubiert man ca. 250 mg der Adenosin-Gele 16a-c mit Adenosin Desaminase (1 unit) in 1/15 M Sørensen-Phosphatpuffer (pH 7.6, 3 d, 37°C), so läßt sich nach Hydrolyse der Gele mit 0.5N Salzsäure bei 100°C Adenosin, Inosin und Hypoxanthin dünnschichtelektrophoretisch (Kieselgel, LS H, I) nachweisen. Ein Blindversuch mit 16a ergibt nach der Hydrolyse lediglich Adenosin.

Dieser qualitative Test beweist eine biospezifische Wechselwirkung der Adenosin Desaminase mit dem über die 2',3'-Position des Ribofuranosyl-Restes polymergebundenen Adenosin. Auch die spezifischen Inhibitoreigenschaften des Inosins, 6-Thioinosins und Nebularins sollten bei der Fixierung an Polymere - wenigstens zu einem Teil - erhalten bleiben. Die Gele 16a-c, 17a-c und 18 bis 20 stellen also - entsprechend der Definition - brauchbare Gele für eine biospezifische Affinitätschromatographie dar.

Aus einer Reihe von Untersuchungen ist bekannt, daß die Länge eines Spacers einen starken Einfluß auf die Bindungsstärke zwischen einem immobilisierten Liganden und seinem affinen Partner ausübt. Bei Polymer-Derivaten, die den Spacerarm enthalten und erst dann mit dem Liganden gekuppelt werden, können zwar Reaktionen an biospezifischen Polymeren untersucht werden, unklar bleibt jedoch, inwieweit schon der Spacer die Reaktivität der Liganden verändert. Aus diesem Grund kann die Untersuchung derartig modifizierter Liganden, die bereits Strukturelemente des späteren Spacers enthalten, bessere Aufschlüsse über die zu erwartende

Biospezifität eines Affinitätsharzes als der unmodifizierte Ligand geben. In Kap. 3.3.1. wurde bereits unter diesem Aspekt die Rolle der Alkylidenkette der O-2',3'-Ethyliadenosin-Derivate diskutiert.

Um nun den Einfluß der Spacer-Alkylidenkettenlänge auf die Desaminierungsgeschwindigkeit der polymergebundenen Adenosin-Acetale zu untersuchen, werden 0.5-mm-Küvetten mit den Polymeren 16a-c in dichter Kugelpackung gefüllt und mit 5 μ l (2.5×10^{-2} units) Adenosin Desaminase versetzt. Während bei 16a, dem Adenosin mit der kürzesten Spacerlänge, innerhalb von einer Stunde keine Umsetzung (Extinktionsabfall bei 260 nm) zu beobachten ist, setzen sich die Gele 16b und 16c zu den Inosinungen 17b und 17c um (Extinktionsabfall ca. 50%). Die negativen Anfangssteigungen der Desaminierungsgeschwindigkeiten verhalten sich von 16b zu 16c wie 3 zu 5 (Tab. 2).

Das zeigt, daß eine Verlängerung der hydrophoben Alkylidenkette einen positiven Einfluß auf die Wechselwirkung zwischen ADA und polymergebundenem Adenosin besitzt. Dies entspricht den Befunden an den Monomeren und unterstützt die Annahme hydrophober Gruppen in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms.

Bei der Desaminierung von polymergebundenem Adenosin-Acetal 16b und O-2',3'-[1-(3-Carboxypropyl)ethyliden]-adenosin, 6b, sind folgende Umsätze zu beobachten: für das Polymer $\Delta E/30 \text{ min} = 0.14$ (Start bis 30. Minute). Für den vorliegenden Fall einer maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit (v_{\max}) läßt sich eine Zeitnormierung der Werte durchführen, woraus sich ein Umsatz von $\Delta E/30 \text{ min} = 1.2$ ($\lambda_{\max} = 260 \text{ nm}$) ergibt.

Somit ist der Umsatz der Desaminierungsreaktion des Adenosin-Acetal 6b ca. 8 mal so groß wie bei der enzymatischen Desaminierung des Polymers 16b.

Eine Berechnung der jeweiligen Molverhältnisse von Substrat, bzw. polymergebundenem Substrat, und Enzym führt zu folgenden Werten:

a) Polymer: 3×10^{-2} units ADA/100 μ l 16b entsprechen 300 units ADA/l 16b. Bei einer Aktivität von 200 units/mg ADA und einem Molekulargewicht des Enzyms von 35000 Dalton ergibt sich eine Aktivität von 6×10^9 units/mol ADA. 300 Units ADA entsprechen somit 1.67×10^{-8} mol. Da die Ligandenkonzentration des Geles 16b 4 μ mol/ml feuchtes 16b (= 4 mmol Acetal/l 16b) beträgt, beläuft sich das molare Verhältnis Adenosin Desaminase zu polymergebundenem Adenosin-Acetal, 16b, auf 4.2×10^{-6} mol : 1 mol.

b) Bei der Desaminierung des Acetals 6b ergibt sich nach einer entsprechenden Berechnung (3×10^{-2} units/1.18 E_{260} -Einheiten 6b) ein molares Verhältnis von 6.25×10^{-5} mol ADA : 1 mol 6b.

Beim Vergleich beider molaren Verhältnisse (1:80) und unter Berücksichtigung der oben berechneten Umsätze zeigt sich, daß in gleicher Zeit für die in heterogener Phase ablaufende Reaktion ca. 10 mal weniger Adenosin Desaminase benötigt wird, als für die Reaktion in homogener Lösung, da das Enzym in der die Gelmatrix umgebenden Solvathülle angereichert werden kann.

Zu analogen Schlüssen gelangen Jakubke et.al. bei der Untersuchung der heterogenen enzymatischen Reaktion zwischen

α -Chymotrypsin und agarosegebundenem L-Phenylalanin-4-nitroanilid.⁷⁴

Möglicherweise laufen viele enzymatische Reaktionen an polymergebundenen Substraten schneller ab als in homogener Phase. Diese Resultate können Bedeutung für Modellvorstellungen über heterogen ablaufende enzymatische Reaktionen in vivo besitzen.

Direkte Messungen kinetischer Parameter von enzymatischen Reaktionen an polymeren Oberflächen sind technisch nur schwer durchzuführen. Hier bringt vielleicht die Anwendung der photoakustischen Spektroskopie (PAS) Fortschritte, damit ihrer Hilfe auch Elektronenanregungsspektren von undurchsichtigen Gelen und Membranen erhalten werden können. Eigene Untersuchungen hierzu sind in Vorbereitung.

3.5. Affinitätschromatographie von Adenosin Desaminase an polymergebundenen Purinnucleosiden

Zur Aktivitätsbestimmung von Adenosin Desaminase vor und nach einer Affinitätschromatographie wurde - anlehnend an Arbeiten von Kalkar - eine quantitative Bestimmungsmethode für das Enzym erarbeitet.⁷⁵

Die Methode beruht auf der Messung der Anfangsgeschwindigkeit der Desaminierung einer definierten Substratmenge durch steigende Enzymmengen. Zur Aufnahme einer Eichkurve wird 0.1 μmol Adenosin in 1 ml Sörensen Phosphatpuffer, pH 7.6, mit 3 bis 15 $\times 10^{-3}$ units Adenosin Desaminase versetzt. Die Desaminierung wird durch Verfolgung des E_{262} -Wertes beobachtet. Aus den Auftragungen E_{262} gegen die Zeit werden die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion bestimmt (Steigung zwischen der 1. und 3. Minute). Eine Auftragung der negativen Steigungen gegen die Enzymkonzentration ergibt innerhalb des vermessenen Konzentrationsbereiches eine Gerade.

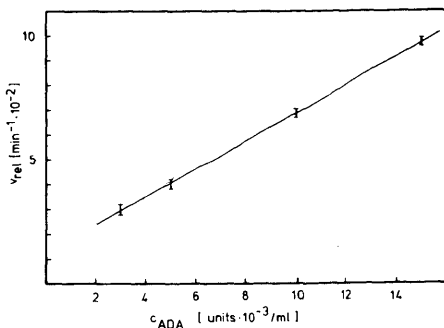


Abb. 7: Eichgerade zur Bestimmung von ADA

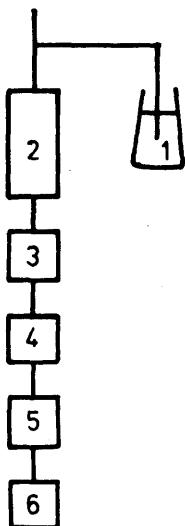
Zur Aktivitätsbestimmung ist neben einer quantitativen ADA-Bestimmung noch eine Messung des Gesamtproteingehaltes erforderlich. Sie wird nach der Methode von Lowry durchgeführt.

Der Quotient aus ADA-Gehalt und Gesamtproteingehalt gibt die spezifische ADA-Aktivität einer Lösung an.

3.5.1. Affinitätschromatographie von Adenosin Desaminase an polymergebundenem Inosin und Adenosin

Alle affinitätschromatographischen Experimente werden in einer thermostatierten Glassäule durchgeführt. Die Charakterisierung des Effluens erfolgt durch Leitfähigkeitsmessung und Extinktionsmessung bei 260 nm und 280 nm.

Schema 6 zeigt die verwendete Apparatur.



- 1: Puffervorrat bzw. Elutionslösung
- 2: Affinitätssäule
- 3: Leitfähigkeitsmeßgerät
- 4: Durchflußphotometer (gleichzeitige Messung von E_{260} und E_{280})
- 5: peristaltische Pumpe
- 6: Fraktionssammler

Schema 6: Apparatur zur Affinitätschromatographie

0.5 mg Adenosin Desaminase (100 units, 100 μ l Glycerin) werden durch ein T-Stück mit Septum auf eine Säule mit immobilisiertem Inosin, 17a, (0.9 x 20 cm, 25°C) das zuvor mit zwei bis drei Totvolumina Sörensen Phosphatpuffer (1/15 M, pH 7.6) äquibriert wurde, aufgegeben. Eine kontinuierliche Messung der Extinktionen bei 260 und 280 nm zeigt, daß das Enzym vollständig vom Gel retardiert wird. Auch durch Waschen der Säule mit ca. 30 Totvolumina des Puffers wird Adenosin Desaminase nicht merklich eluiert.

Zur Elution des Enzyms wird eine 0.5M Natriumchlorid-Lösung mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 20 ml/h durch die Säule gepumpt. Nach Durchtritt eines Säulentotvolumens wird Adenosin Desaminase quantitativ eluiert, wobei kein Aktivitätsverlust auftritt.

Elutionsversuche mit NaCl-Lösungen, deren Konzentrationen stufenweise steigen, zeigen, daß eine minimale Desorptionskonzentration existiert, unterhalb der auch durch Waschen mit ca. 30 Säulentotvolumina das Enzym nicht eluiert werden kann. Oberhalb dieser kritischen Salzkonzentration wird das Protein in jedem Fall bereits nach einem Totvolumen von der Säule gewaschen. Das gleichzeitige Austreten von NaCl kann durch eine kontinuierliche Leitfähigkeitsmessung gezeigt werden. Die minimale NaCl-Desorptionskonzentration liegt für die Elution von Adenosin Desaminase von immobilisiertem Inosin bei 0.3M.

Diese Salzkonzentration (entsprechend einer Ionenstärke von 0.3) ist einer bestimmten Bindungsstärke zwischen Enzym und Ligand äquivalent, die sich aus einem biospezifischen und einem unspezifischen Anteil zusammensetzt.

Sie kann sich aus Wasserstoffbrückenbindungen, ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen addieren. Nur bei einem hohen, durch sterische Faktoren bedingten biospezifischen Bindungsanteil kann man von einer "biospezifischen Affinitätschromatographie" sprechen.

Bei einer Elution - gleich welcher Art - müssen solche Bedingungen gewählt werden, daß die Freisetzung sämtlicher Bindungen zum Protein praktisch gleichzeitig erfolgt.

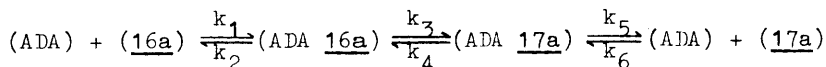
Bei einer Ionenstärkeelution (z.B. durch NaCl) werden die elektrostatischen Bindungen (zu denen auch Wasserstoffbrückenbindungen gehören) zwischen Enzym und Ligand von einer immer größeren Anzahl von Ionen umgeben, die durch ihr elektrisches Feld das Feld der elektrostatischen Bindung zwischen Protein und Ligand stören und dadurch die Bindung schwächen. Oberhalb einer definierten Ionenstärke wird durch diese Störung die Bindung aufgehoben - das Enzym wird eluiert. Inwieweit Konformationsänderungen im Enzym durch Erhöhung der Ionenstärke ("deforming buffer"⁷⁶) eine Schwächung der Bindung bewirken, ist nicht abzuschätzen. Eine Alles-Oder-Nichts-Elution wird nicht nur beim System ADA - I-Gel, sondern auch bei allen noch später beschriebenen Chromatographieexperimenten beobachtet.

Tritsch berichtet, daß die Bindung zwischen Adenosin Desaminase und seinem Produktinhibitor Inosin bei Erniedrigung der Dielektrizitätskonstanten um 4 (von 78, für Wasser, auf 74), hervorgerufen durch Zugabe von Dioxan, praktisch aufgehoben wird. Da durch Erhöhung der Molarität einer Lösung eines einwertigen Salzes um 1 die Dielektrizitätskonstante der Lösung um 11 erniedrigt wird, bedeutet eine Elution

mit einer 0.3M NaCl-Lösung eine Erniedrigung des DE-Wertes um 3.3. Dies ist vergleichbar mit dem von Tritsch gefundenen Wert.⁵⁵

Wird eine mit dem Inosin 17a gefüllte Säule mit einem Überschuß an Adenosin Desaminase überladen, und anschließend die gebundene Enzymmenge eluiert, so läßt sich die Durchbruchskapazität (für 20 ml/h) bestimmen. Sie ist zwischen 15 und 25°C temperaturunabhängig und beträgt 10.8 nmol/g feuchtes 17a. Bei Erhöhung der Temperatur auf 35°C sinkt die Kapazität um 16%. Durch Division der Ligandenkonzentration des I-Gels (7.2 µmol/g feuchtes 17a) durch die Durchbruchskapazität ergibt sich ein Molverhältnis des Inosin-Liganden zu gebundenem Protein wie 650:1.

Eine Affinitätschromatographie des Enzyms mit anschließender Elution durch einen linearen Salzgradienten (5M NaCl gegen Wasser, je 25 ml), bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 20 ml/h ergibt ein Elutionsprofil, das einer Poisson-Funktion entspricht. Bei Erhöhung der Durchflußgeschwindigkeit auf 80 ml/h folgt das Profil einer Gauss-Funktion. Die hohe Rate wirkt der Rückreaktion des Enzyms mit dem Liganden, dargestellt durch den Schritt k_6 im folgenden Schema, entgegen.



Der Schritt k_1/k_2 beschreibt die Adsorption (k_1) und die Elution (k_2) von Adenosin Desaminase an Adenosin 16a (Substratgel); k_3 beschreibt die Umwandlung des polymer-

gebundenen Adenosins, während k_5/k_6 Elution und Rückadsorption des Enzyms für das I-Gel (Produktgel) charakterisiert.

Eine Affinitätschromatographie von ADA an polymergebundenem Adenosin und Elution mit NaCl-Lösungen stufenweise steigender Konzentration ergibt eine minimale Desorptionskonzentration von 0.9M NaCl. Dies bedeutet, daß die Bindungsstärke zwischen Enzym und dem A-Gel größer ist, als zwischen Enzym und dem I-Gel. Dies Ergebnis entspricht den Erwartungen, da der K_M -Wert des Adenosins ($3.1 \times 10^{-5}M$) kleiner ist, als der K_I -Wert des Inosins ($16 \times 10^{-5}M$), und somit das Substrat 5 mal stärker an das Enzym gebunden wird als das Produkt.

Nach längerer Verweildauer des Enzyms auf der Säule beginnt sich das Adenosin 16a in das Inosin 17a umzuwandeln.

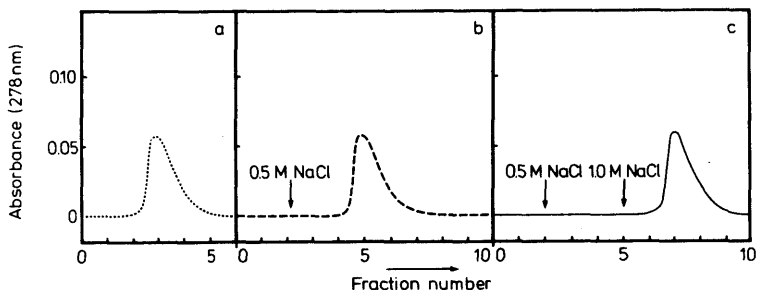


Abb. 8: Affinitätschromatographie von Adenosin Desaminase an AH-Agarose (a), 17a (b) und 16a (c); 0.2 E280-Einheiten des Enzyms werden auf Säulen (0.9 x 20 cm) chromatographiert; Equilibrierung mit 1/15 M Phosphat-Puffer, pH 7.6; Elution mit NaCl

So sind die Adenosingele mit verlängertem Spacer 16b,c für eine Chromatographie von Adenosin Desaminase unbrauchbar, da sie sich sehr rasch umwandeln.

Die entsprechenden Inosingele 17b,c, zeigen nur eine geringe Affinität zu Adenosin Desaminase - hier ergeben sich minimale NaCl-Desorptionskonzentrationen von 0.2M NaCl.

Die Gele 16a und 17a sind jedoch für Trennungen des Enzyms von Begleitenzymen gut geeignet. Werden Gemische von Adenosin Desaminase und Guanase oder Alkohol Dehydrogenase an 16a oder 17a chromatographiert, so werden die letzteren Enzyme in jedem Fall mit dem Aufgabepuffer (Sörensen Phosphat-Puffer, pH 7.6) eluiert, während ADA nur durch 0.3 bzw. 0.9M NaCl-Lösungen ausgewaschen werden kann (Abb. 9).

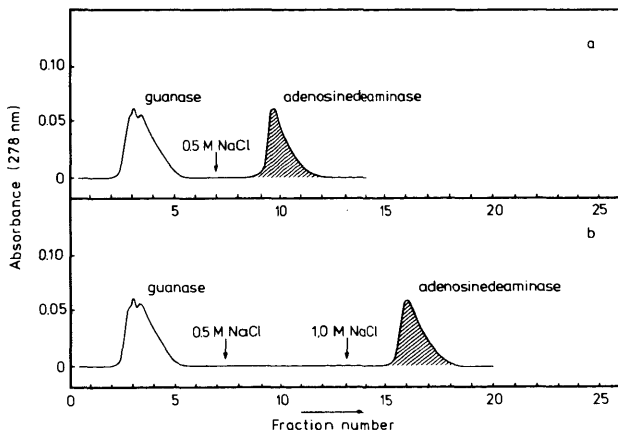


Abb. 9: Affinitätschromatographie von Adenosin Desaminase in Gegenwart von Guanase an den Gelen 17a und 16a; ein Gemisch aus je 0.2 E₂₈₀-Einheiten beider Enzyme wird an Säulen (20 x 0.9 cm) chromatographiert; Equilibrierung mit Phosphat-Puffer (1/15 M, pH 7.6); Elution durch NaCl.

3.5.2. Affinitätschromatographie von Adenosin Desaminase an polymergebundenem Tubercidin und Nebularin - Spezifische und unspezifische Wechselwirkungen

Inwieweit die Bindung zwischen Adenosin Desaminase und immobilisiertem Adenosin bzw. Inosin auf biospezifische oder unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen ist, ist nur schwer abzuschätzen. Chromatographieveruche mit ADA an unmodifizierter Agarose sowie an 6-Aminohexylagarose zeigen, daß das Enzym keine Affinität zur Matrix besitzt (Abb. 8a). Trotzdem können zwischen ADA und dem Connector hydrophobe, bzw. zum Liganden ionische Wechselwirkungen existieren, die einen beträchtlichen unspezifischen Bindungsanteil an der Gesamtbindungsstärke bedingen. Eine Abschätzung der einzelnen Bindungsanteile wird durch eine Chromatographie von Adenosin Desaminase an immobilisiertem Tubercidin ermöglicht: Wie bereits beschrieben, zeigt weder das Nucleosid noch 2',3'-O-[1-(2-Carboxyethyl) ethyliden]-tubercidin eine Affinität zum aktiven Zentrum des Enzyms. Somit sollte auch ein Tubercidingel ADA nicht retardieren. Es ergibt sich jedoch eine Retention, und das Enzym kann nur durch eine NaCl-Lösung mit einer minimalen Desorptionskonzentration von 0.15M eluiert werden. Da ein Tubercidingel (18) den Gelen 16a und 17a in jeder Hinsicht optimal entspricht, der Ligand jedoch nicht in das aktive Zentrum des Enzyms gebunden wird, muß die gemessene NaCl-Desorptionskonzentration einer unspezifischen Bindungsstärke zwischen ADA und Ligand äquivalent sein, die auch in den Gesamtbindungsstärken zum Adenosin bzw. Inosin enthalten ist.

Subtrahiert man von den minimalen NaCl-Desorptionskonzentrationen von A-Gel, 16a, und I-Gel, 17a, jeweils die Desorptionskonzentrationen des T-Gels, 18, so sollten die biospezifischen Bindungsanteile erhalten werden. Werden diese Werte miteinander verglichen, so zeigt sich, daß das Enzym 5 mal stärker an das Substratgel als an das Produktgel gebunden wird.

$$\frac{(\text{Na}^+\text{Cl}^-)_{\text{min}}^{\text{A-Gel}} - (\text{Na}^+\text{Cl}^-)_{\text{min}}^{\text{T-Gel}}}{(\text{Na}^+\text{Cl}^-)_{\text{min}}^{\text{I-Gel}} - (\text{Na}^+\text{Cl}^-)_{\text{min}}^{\text{T-Gel}}} = \frac{900 - 150}{300 - 150} = 5$$

Werden der K_M -Wert von Adenosin und der K_I -Wert des Inosins gegenüber ADA miteinander verglichen, so ergibt sich ebenfalls, daß das Enzym 5 mal stärker an das Substrat als an das Produkt gebunden wird.

Eine biospezifische Affinitätschromatographie von Adenosin Desaminase an immobilisiertem Nebularin, 20, einem starken Inhibitorgel, zeigt eine sehr starke Wechselwirkung zwischen Enzym und Ligand, die nur durch Elution mit einer 1.4M NaCl-Lösung aufgebrochen werden kann (Abb. 10). Dies steht im Einklang mit der starken Inhibition von ADA durch Nebularin sowie 0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-nebularin. Eine Kalkulation der minimalen Desorptionskonzentrationen in gleicher Weise wie für das Substrat- und das Produktgel zeigt, daß nurmehr eine generelle aber keine numerische Parallelität besteht.

Aus den bisherigen Ergebnissen läßt sich der Schluß ziehen, daß für die Ausschließung störender, unspezifischer Bindungen zwischen einem Enzym und einem Affinitätsgel die Konzentration des Aufgabepuffers so gewählt werden sollte, daß sie nur geringfügig unterhalb der zugehörigen minimalen NaCl-Desorptionskonzentration liegt.

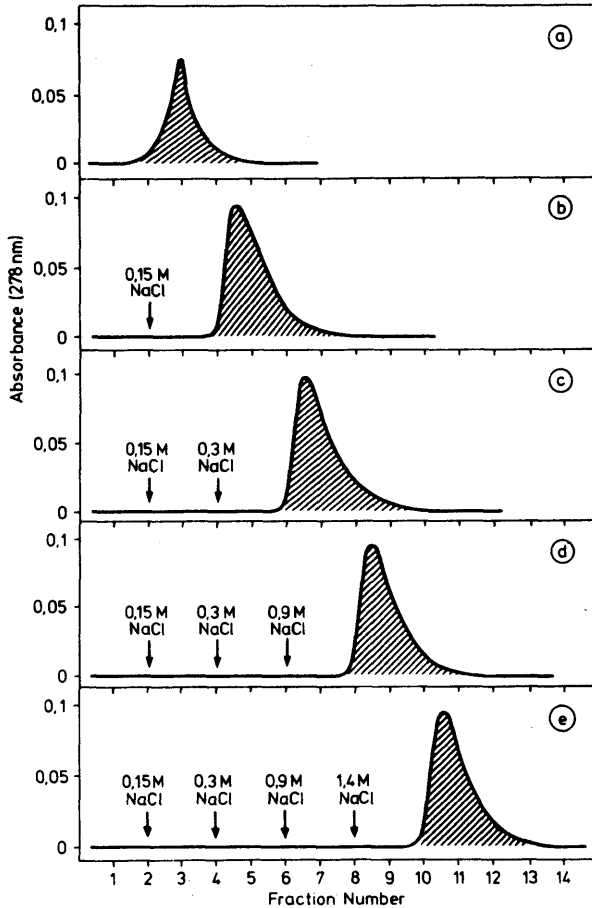


Abb. 10: Affinitätschromatographie von Adenosin Desaminase an AH-Agarose (a), 18 (b), 17a (c), 16a (d) und 20 (e).

3.5.3. Aufreinigung von Adenosin Desaminase aus Kälberdarm an immobilisiertem Inosin und Adenosin

Ein künstliches Gemisch aus 116 mg Rinderserum Albumin und 29 units Adenosin Desaminase in 500 ml Sörensen Phosphatpuffer (1/15 M, pH 7.6) wird auf eine Säule (\varnothing : 0.9 cm) mit 5.4 ml Adenosin 16a aufgebracht und bei 20°C und einer Durchflußgeschwindigkeit von 24 ml/h chromatographiert. Für die aufgegebene Proteinlösung errechnet sich eine spezifische ADA-Aktivität von 0.25 units/mg. Die Hauptmenge des Proteins wird bereits durch den Aufgabepuffer eluiert. Eluiert man mit einer 1M NaCl-Lösung, so läßt sich eine kleine Proteinzone isolieren, deren Aktivität sich durch quantitative ADA-Bestimmung und Gesamtproteinbestimmung (nach Lowry) zu 115.4 units/mg errechnet. Dies ergibt einen Trennfaktor von:

$$\beta = \frac{115.4 \text{ units/mg}}{0.25 \text{ units/mg}} = 462$$

Das Ergebnis zeigt, daß sich das Adenosin 16a zur Abtrennung auch großer Überschüsse an Fremdprotein von Adenosin Desaminase eignet.

Im Folgenden soll untersucht werden, inwieweit sich Adenosin Desaminase aus einem natürlichen Material durch nur einen Chromatographieschritt an Inosin 17a und Adenosin 16a aufreinigen läßt.

Als natürliche Quelle dient frischer Kälberdarm. Dieser wird mit Wasser gereinigt, homogenisiert und anschließend bei 13000 Umdehungen/min zentrifugiert. Der Überstand wird auf 1 l mit Phosphatpuffer aufgefüllt und anschließend auf das vierfache Volumen mit Aceton verdünnt. Das dabei aus-

fallende Rohprotein wird einmal umgefällt, getrocknet und bei -18°C aufbewahrt.

288 mg des Rohproteins wird 4 h bei Raumtemperatur mit 250 ml Phosphatpuffer extrahiert und anschließend an einer Säule mit immobilisiertem Inosin chromatographiert (9.5 ml 17a, RT, 24 ml/h). Die aufgebene Lösung enthält 12.5 units Adenosin Desaminase und besitzt vor der Chromatographie eine spezifische Aktivität von 0.0434 units/mg. Nach Elution mit einer 0.5M NaCl-Lösung läßt sich eine ADA-enthaltende Zone isolieren, die noch 7.2 units des Enzyms enthält. Somit beträgt die Ausbeute 57.6%. Die spezifische Aktivität beträgt 0.514 units/mg; somit ergibt sich ein Trennfaktor von 12.

Eine zweite Affinitätschromatographie an 17a unter gleichen Bedingungen steigert den Gesamttrennfaktor auf 20 bei einer Ausbeute von 100%.

In einem weiteren Versuch werden 200 mg der Proteintrockenmasse mit 43 ml Puffer extrahiert. Die Lösung enthält 9.5 units Adenosin Desaminase und besitzt eine spezifische Aktivität von 0.072 units/mg. Diese Lösung wird an einer Säule mit immobilisiertem Adenosin, 16a, chromatographiert, wobei der Hauptteil des Proteins bereits mit dem Aufgabepuffer eluiert wird (5.0 ml 16a, 10°C , 24 ml/h).

Elution mit 0.5M NaCl führt zu drei Zonen im Elutionsprofil, von denen jedoch keine Adenosin Desaminase enthält (qualitative Dünnschichtchromatographie). Erst durch Elution mit einer 1M NaCl-Lösung läßt sich eine weitere, ADA-

enthaltende Zone isolieren, die noch 7.5 units des Enzyms (79%) enthält. Die spezifische Aktivität beträgt 7.5 units/mg, sodaß sich ein β von 104 ergibt.

Sowohl das Substratgel 16a als auch das Produktgel 17a sind also zur Aufreinigung von Adenosin Desaminase aus einem Rohmaterial geeignet. Für eine bessere Aufreinigung bedarf es jedoch weiterer Reinigungsschritte.

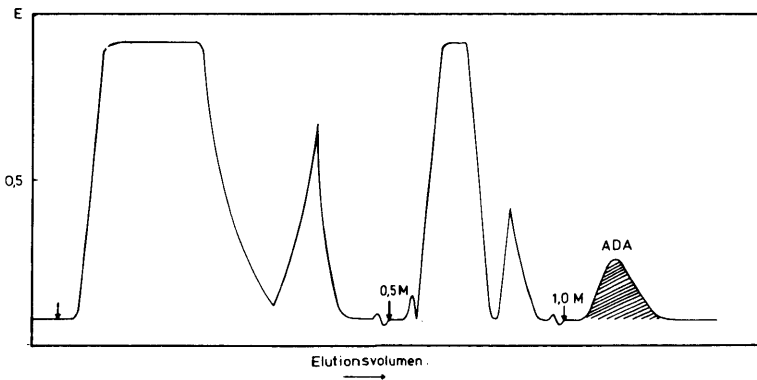


Abb. 11: Aufreinigung von Adenosin Desaminase aus Kälberdarm an Adenosin gel 16a

3.6. Bestimmung thermodynamischer Funktionen der Reaktion zwischen Adenosin Desaminase und immobilisiertem Inosin durch Affinitätschromatographie

Im vorliegenden Abschnitt wird der Einfluß der Temperatur und der Durchflußgeschwindigkeit auf die biospezifische Affinitätschromatographie von Adenosin Desaminase an immobilisiertem Inosin, 17a, untersucht. Daraus lassen sich Informationen über die Thermodynamik dieser Adsorptions-Desorptions-Reaktion erhalten.

3.6.1. Theoretische Vorbemerkungen

3.6.1.1. HETP-Wert

Ein wichtiger Parameter zur Kennzeichnung einer Chromatographiesäule ist die Höhe eines theoretischen Bodens, der HETP-Wert (HETP: height equivalent of a theoretical plate). Er entspricht einer Gleichgewichtsstufe einer Säule und wird in mm angegeben. Eine effektive Säule besitzt einen

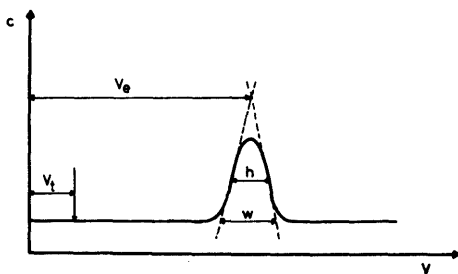


Abb. 12: Größen zur Bestimmung des HETP-Wertes aus einem Elutionsprofil

kleinen HETP-Wert und somit bei einer gegebenen Säulenlänge H eine hohe Trennstufenzahl N .

Der HETP-Wert läßt sich aus einem Elutionsprofil errechnen. Für den Fall, daß das Elutionsprofil einer Gauss-Funktion gehorcht (also symmetrisch ist), und das Elutionsvolumen V_e groß gegenüber dem Säulentotvolumen V_t ist (Abb. 12), gelten folgende Beziehungen:⁷⁷

$$N = \left[\frac{4 V_e}{w} \right]^2 \quad (1)$$

$$\text{HETP} = \frac{H}{N} = \frac{H}{16} \left[\frac{w}{V_e} \right]^2 \quad (2)$$

$$\text{HETP} \sim w^2$$

$$\text{HETP} \sim \left[\frac{1}{V_e} \right]^2$$

w : Basisbreite; h : Halbhöhenbreite (Abb. 12)

Eine geringe Basisbreite w und ein großes Elutionsvolumen V_e bedingen also eine große Trennstufenzahl N .

Da ein Elutionsprofil in der Regel jedoch einer unsymmetrischen Poisson-Funktion gehorcht, ist ein nach (2) berechneter HETP-Wert fehlerbehaftet. Aus dem diskontinuierlichen Chromatographiemodell von Martin und Synge⁷⁸ haben Hrapia und Leipnitz durch mathematische Behandlung die Gleichung⁷⁹

$$N = 8 \ln 2 \frac{V_e (V_e - V_t)}{h^2} \quad (3)$$

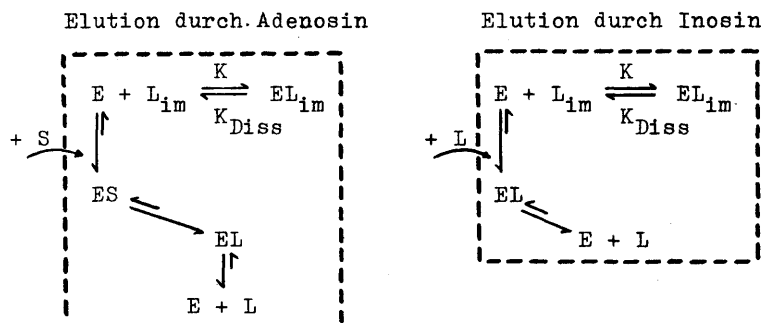
abgeleitet, die bis zu einem Verhältnis $V_e/V_t \geq 2$ gute Ergebnisse liefert. Gleichung (3) wird im Folgenden für die Berechnung des HETP-Wertes verwendet.

3.6.1.2. Spezifische Elution⁸⁰

Bei der spezifischen Elution eines Proteins von seinem Affinitätsharz wird mit der Lösung einer Verbindung eluiert, die selbst eine spezifische Bindung zum adsorbierten Enzym zeigt. Auf diese Weise stellt sich ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen adsorbiertem und freiem Enzym ein.

In der Praxis zeigt die spezifische Elution oft den Vorteil einer Erhöhung der Spezifität einer Affinitätschromatographie. Nachteilig ist, daß nach der Elution der Komplex aus Enzym und Elutionsmittel wieder zerstört werden muß.

In den nachstehend beschriebenen Experimenten wird Adenosin Desaminase von immobilisiertem Inosin, 17a, durch eine Adenosin- bzw. Inosin-Lösung spezifisch eluiert. Die chemischen Reaktionen, die sich dabei auf der Säule abspielen, können folgendermaßen dargestellt werden:

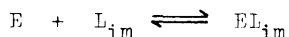


L_{im} : immobilisiertes Inosin; E: Adenosin Desaminase;

S: Adenosin; L: Inosin

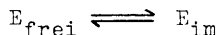
3.6.2. Bestimmung der Adsorptionsenthalpie ΔH^0 von Adenosin Desaminase am Produktgel 17a⁹

Die Adsorption eines Enzyms an seinem Affinitätsharz kann durch folgendes Gleichgewicht beschrieben werden:



Ist die Konzentration des Liganden L_{im} groß gegenüber der aufgetragenen Enzymkonzentration E , so kann sie als konstant angenommen werden.

Mit der Annahme $(EL_{im}) = (E_{im})$ existiert also auf der Säule das Gleichgewicht:



Für den chromatographischen Verteilungskoeffizienten K_V gilt:

$$K_V = \frac{(E_{im})}{(E_{frei})}$$

Unter affinitätschromatographischen Bedingungen führt ein Anstieg der Temperatur zu einer höheren Konzentration des Enzyms in der mobilen Phase.

Die quantitative Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten von der absoluten Temperatur berechnet sich wie folgt:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_V$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad \text{Daraus folgt:}$$

$$K_V = \exp(\Delta S^0/R) \exp(-\Delta H^0/RT).$$

Da für kleine ΔT -Werte der Wert ΔS^0 unabhängig von T ist, folgt:

$$\ln K_v = \text{const} - \Delta H^0/RT \quad (4)$$

ΔH^0 , ΔS^0 und ΔG^0 stellen die standartisierten thermodynamischen Funktionen der Adsorption des Enzyms am Affinitätsharz dar.

Bei der Elution eines Enzyms vom Affinitätsgel gilt für den Verteilungskoeffizienten:

$$K_v = \frac{V_e - V_t}{V_i}$$

V_e : Elutionsvolumen; V_t : Totvolumen (Zwischenkornvolumen);

V_i : inneres Gelvolumen.

Da V_t und V_i konstant sind, besteht die Proportionalität:

$$K_v \sim V_e$$

In den durchgeführten Experimenten zur Bestimmung der Adsorptionseenthalpie ΔH^0 wird Adenosin Desaminase mit einem linearen Adenosin-Gradienten eluiert.

Auf Grund der Temperaturabhängigkeit des Verteilungskoeffizienten des Enzyms steigt das Elutionsvolumen V_e mit sinkendem T. Bei einem linearen Gradienten besteht eine Proportionalität zwischen K_v , V_e und der Adenosin-Konzentration am Peak-Maximum, c_{max} . Aus diesem Grund lassen sich neben Gleichung (4) auch die Gleichungen (5) und (6) aufstellen:

$$\ln V_e = \text{const}' - \Delta H^0/RT \quad (5)$$

$$\ln c_{\text{max}} = \text{const}'' - \Delta H^0/RT \quad (6)$$

Mit Hilfe dieser Gleichungen ist die Adsorptionswärme bestimmbar.

Jeweils 100 units Adenosin Desaminase werden bei 0, 5, 12, 20 und 30°C auf einer Säule mit Inosingel (17a)chromatographiert und mit einem linearen Adenosin-Gradienten eluiert. Außer der Temperatur werden alle übrigen Parameter (s. Kap. 5) konstant gehalten. Das Eluat wird in 3-ml-Fractionen aufgefangen, und anschließend wird in jeder Fraktion eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt. Eine Auftragung E_{620} gegen die Fraktionsnummer ergibt das Elutionsprofil. Abb. 13 zeigt die beiden extremen Profile bei 0 und 30°C, sowie die geometrische Bestimmung der Konzentration c_{\max} .

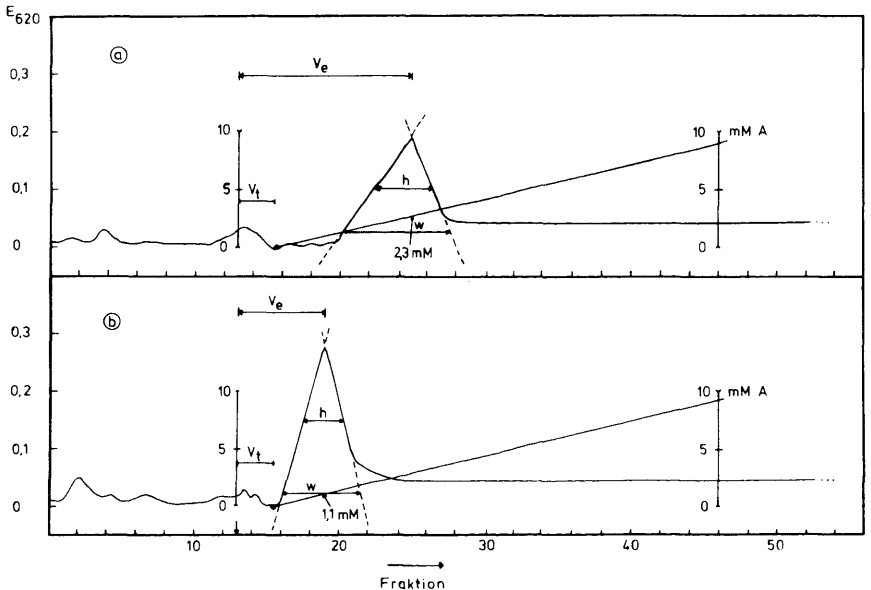


Abb. 13: Profile einer spezifischen Elution von ADA bei 0 und 30°C von 17a

Abb. 14 zeigt die Abhängigkeit der Bindungsstärke (c_{\max}) von der Temperatur ϑ ($^{\circ}\text{C}$). Es ergibt sich erwartungsgemäß eine annähernd negativ-exponentielle Abhängigkeit.

Aus der Auftragung $\ln c_{\max}$ gegen $1/T$ (K^{-1}) läßt sich mit $R = 1.986 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ die Adsorptionsenthalpie ΔH° von $-3.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($\pm 0.4 \text{ kcal mol}^{-1}$) nach Gleichung (6) errechnen.

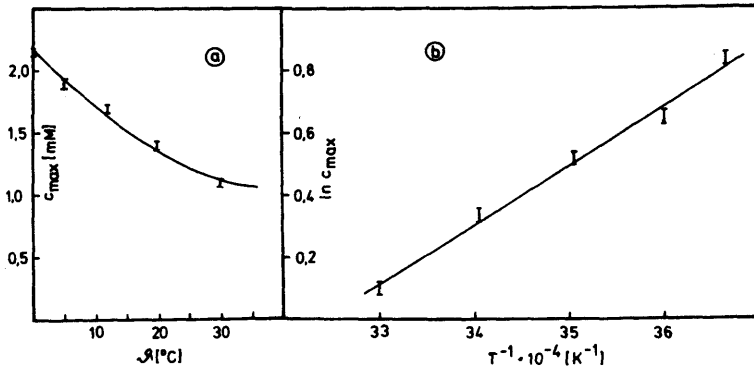


Abb. 14: Auftragnngen c_{\max} gegen ϑ , $\ln c_{\max}$ gegen T^{-1}

Eine Auftragung $\ln V_e$ gegen $1/T$ (Abb. 15) führt zum gleichen Ergebnis. Dies zeigt, daß der Verlauf des Adenosin-Gradienten bei allen Versuchen linear war.

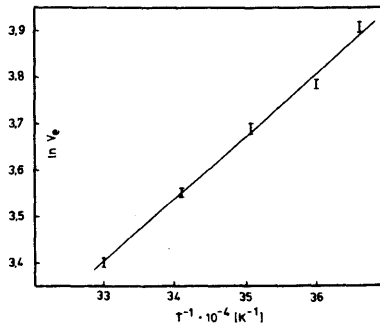


Abb. 15: Auftragung $\ln V_e$ gegen T^{-1}

Der gefundene Wert für ΔH° entspricht der Bindungsenergie von einer oder zwei Wasserstoffbrückenbindungen. Inwieweit auch tatsächlich Wasserstoffbrücken an der Bindung zwischen dem Enzym und seinem Liganden beteiligt sind, läßt sich nicht entscheiden. Da jedoch der N-7 des Purinringes für eine Bindung zwischen einem Purinnucleosid und ADA essentiell ist, ist sehr wahrscheinlich auch mindestens eine Wasserstoffbrückenbindung (zwischen N-7 und dem aktiven Zentrum) an der Adsorption des Enzyms an seinem Affinitätsharz beteiligt.

Abb. 16 zeigt die Abhängigkeit der HETP-Werte der Inosingelsäule (17a) von der Temperatur. Hier zeigt sich, daß zwischen 10 und 15°C ein Optimum durchlaufen wird; bei niedrigen Temperaturen ist das Elutionsvolumen zwar groß ($\text{HETP} \sim V_e^{-1}$), der Elutionspeak jedoch breit ($\text{HETP} \sim w$), was zu einem großen HETP-Wert führt. Bis ca. 12°C wirkt sich Abnahme der Basisbreite w stärker aus als die Abnahme des Elutionsvolumen V_e . Oberhalb dieser Temperatur überkompensiert die Verringerung von V_e schließlich den Einfluß des kleiner werdenden w .

Die HETP-Werte in Abb. 16 wurden nach Gleichung (1) und (3) berechnet. Es zeigt sich, daß (1) zur Berechnung bei höherer Temperatur nicht mehr geeignet ist, da hier das Verhältnis $V_e/V_t \leq 2$ ist.

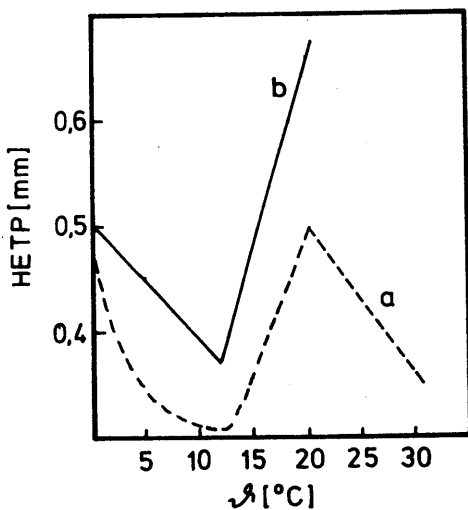
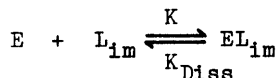


Abb. 16: Abhängigkeit des HETP-Wertes von der Temperatur
 a: Berechnung des HETP-Wertes nach (1); b: Berechnung nach (3).

3.6.3. Bestimmung von ΔG° und ΔS° für die Reaktion von Adenosin Desaminase mit immobilisiertem Inosin

Zur Bestimmung von ΔG° der Adsorptions-Desorptions-Reaktion



aus der Gleichgewichtskonstanten K dieser Reaktion gibt es im wesentlichen zwei Ansätze, bei denen K aus chromatographischen Experimenten ermittelt wird.

1. Mit Hilfe von Gleichung (8) läßt sich durch Messung des Elutionsvolumens und des Totvolumens bei bekannter Ligandenkonzentration die Dissoziationskonstante K_{Diss} bestimmen, aus der wiederum die freie Energie ΔG° der Adsorptions-Desorptions-Reaktion erhalten werden kann.⁹

$$V_e = V_t + \frac{V_t (L_{\text{im}})_o}{K_{\text{Diss}}} \quad *$$

Gleichung (8) gilt jedoch nur für den Sonderfall der Elution mit dem Startpuffer, also für eine Chromatographie, bei der nur sehr geringe Wechselwirkungen zwischen Adsorbens und adsorbiertem Protein eine Rolle spielen.

*

Für die Dissoziationskonstante der Gleichgewichtsreaktion $E + L_{\text{im}} \rightleftharpoons EL_{\text{im}}$ gilt:

$$K_{\text{Diss}} = \frac{(E)(L_{\text{im}})}{(EL_{\text{im}})} = \frac{[(E)_o - (EL_{\text{im}})] [(L_{\text{im}})_o - (EL_{\text{im}})]}{(EL_{\text{im}})}$$

$(E)_o$, $(L_{\text{im}})_o$: Anfangskonzentrationen des Enzyms bzw. des immobilisierten Liganden.

Wenn $(L_{\text{im}})_o \gg (E)_o$, so gilt:

$$K_{\text{Diss}} = \left[\frac{(E)_o - (EL_{\text{im}})}{(EL_{\text{im}})} \right] (L_{\text{im}})_o \quad (7)$$

Für den chromatographischen Verteilungskoeffizient K_V gilt:

$$K_V = \frac{(E_{\text{im}})}{(E_{\text{frei}})} = \frac{(EL_{\text{im}})}{(E)_o - (EL_{\text{im}})_o} = \frac{(L_{\text{im}})_o}{K_{\text{Diss}}} \quad \text{mit (7)}$$

Weiterhin berechnet sich K_V nach der Gleichung:

$$K_V = \frac{V_e - V_t}{V_t}, \text{ oder: } V_e = V_t + K_V V_t; \text{ daraus folgt:}$$

$$\frac{V_e}{V_t} = 1 + \frac{(L_{\text{im}})_o}{K_{\text{Diss}}}, \text{ bzw.: } V_e = V_t + \frac{V_t (L_{\text{im}})_o}{K_{\text{Diss}}} \quad (8)$$

Für den Fall einer spezifischen Elution von einem stark retardierenden Gel geben Dunn und Chaiken folgende Beziehung zwischen Elutionsvolumen und Dissoziationskonstante an:⁸¹

$$V_e = V_o + \frac{(V_o - V_t) \frac{(L_{im})_o}{K_{Diss}}}{\left(1 + \frac{(L)}{K_I}\right)} \quad (9)$$

V_e : Elutionsvolumen, V_o : Elutionsvolumen bei Abwesenheit einer Wechselwirkung zwischen Enzym und Gel, K_{Diss} : Dissoziationskonstante des Komplexes aus immobilisiertem Liganden und Enzym, $(L_{im})_o$: Ligandenkonzentration, (L) : Konzentration des spezifischen Elutionsmittels, K_I : Dissoziationskonstante des Komplexes aus Enzym und spezifischem Elutionsmittel.

Für den Fall $(L) = 0$ ergibt sich die Gleichung:

$$V_e = V_o + (V_o - V_t) \frac{(L_{im})_o}{K_{Diss}} \quad (10)$$

Sie gilt wie Gleichung (8) nur für die Elution mit dem Startpuffer.

Die Größe K_I wird in der Regel durch Gleichgewichtsdialyse bestimmt. Dies läßt sich jedoch umgehen, wenn mit einem linearen Inosin-Gradienten eluiert wird. Unter der Annahme, daß Adenosin Desaminase keine Wechselwirkung mit der Matrix eingeht, kann K_{Diss} gleich K_I gesetzt werden. Dies konnte bereits praktisch durch eine Chromatographie von ADA an 6-Aminohexylagarose gezeigt werden (Abb. 8a).

Mit $K_{\text{Diss}} = K_{\text{I}} = K^*$ ergibt sich:

$$V_e = V_o + \frac{(V_o - V_t) \frac{(L_{\text{im}})_o}{K^*}}{\left(1 + \frac{(L)}{K^*}\right)} \quad (11)$$

$$K^* = \frac{V_o (L_{\text{im}})_o - V_t (L_{\text{im}})_o - V_e (L) + V_o (L)}{(V_e - V_o)} \quad (12)$$

Der Wert V_o läßt sich aus dem Elutionsprofil einer "Chromatographie" von ADA an einer Säule mit 6-Aminohexylagarose bestimmen, wobei das Gelbettvolumen (entspricht $\approx V_t$) dem Gelbettvolumen der I-Gel-Säule entspricht.

Abb. 17 zeigt das Elutionsprofil einer Affinitätschromatographie von 100 units ADA an einer I-Gel-Säule mit einer Elution durch einen linearen Inosin-Gradienten.

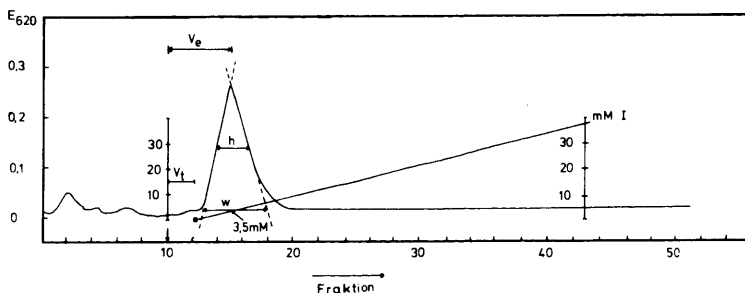


Abb. 17: Profil einer spezifischen Elution von Adenosin Desaminase von 17a durch einen linearen Inosin-Gradienten

Aus den Experimenten ergeben sich die Werte $V_e = 15$ ml, $V_t = 6.5$ ml und $V_0 = 10$ ml. Mit der Ligandenkonzentration des verwendeten Inosingeles 17a von $10.0 \mu\text{mol/g}$ feuchtes 17a und einem $c_{\text{max}} = 3.5$ mM ergibt sich ein K^* von 3.5×10^{-3} mol l^{-1} . Die Gleichgewichtskonstante $K = K^{*-1}$ beträgt 285. Nach der Gleichung $\Delta G^0 = -RT \ln K^*$ ergibt sich daraus ein Wert von -3.3 kcal mol^{-1} .

Mit der Gleichung $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ folgt für die Adsorptionsentropie: -2.0 cal $\text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$.

Der niedrige Wert für ΔS^0 deutet auf die Tatsache hin, daß an der Bindung zwischen Adenosin Desaminase und dem Liganden nur Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind und keine hydrophoben Wechselwirkungen. Da bei der Aufbrechung einer hydrophoben Bindung Wassermoleküle freigesetzt werden, ist ein solcher Vorgang stets mit einem stärker negativen ΔS^0 verbunden.

3.6.4. Abhängigkeit der theoretischen Bodenhöhe von der Durchflußgeschwindigkeit⁷⁷

Die Durchflußgeschwindigkeit u der mobilen Phase kann einen erheblichen Einfluß auf die Trennbodenhöhe (HETP-Wert) haben.

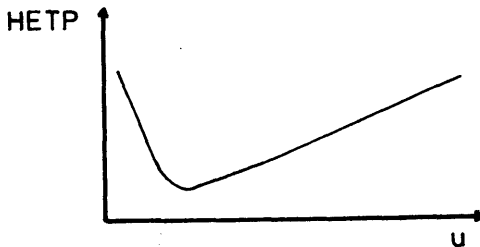


Abb. 18: Abhängigkeit der theoretischen Bodenhöhe von der Durchflußgeschwindigkeit u

Der Zusammenhang zwischen beiden Größen wird vereinfacht durch die van-Deemter-Beziehung wiedergegeben (Abb. 18):

$$\text{HETP} = A + B/u + Cu$$

A, B und C: empirische Konstanten

Der Term A stellt die durch die stationäre Phase verursachte Streudiffusion dar. In der Größe B sind die Faktoren erfaßt, die die Longitudinal-Diffusion berücksichtigen. Der dritte Summand der Gleichung beachtet die endliche Einstellungsgeschwindigkeit des Gleichgewichtes zwischen den Phasen.

Es werden je 100 units Adenosin Desaminase auf einer Säule mit Inosin 17a (Ligandenkonzentration: $10 \mu\text{mol/g}$ 17a, Säulenlänge H: 9.5 cm, $T = 20^\circ\text{C}$, $V_t = 6.6 \text{ ml}$) chromatographiert und mit einer Adenosin-Lösung (2 mM) eluiert. Die Chromatographieversuche werden bei Durchflußgeschwindigkeiten von 0.8, 8, 24, 40 und 56 ml/h durchgeführt; das Eluat wird in 3-ml-Fraktionen gesammelt. In jeder Fraktion wird eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt. Eine Auftragung E_{620} gegen die Fraktionsnummer ergibt das Elutionsprofil, aus dem nach Gleichung (3) der HETP-Wert errechnet wird.

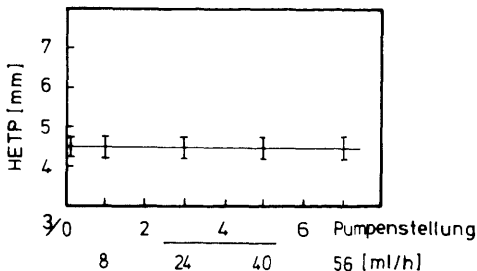


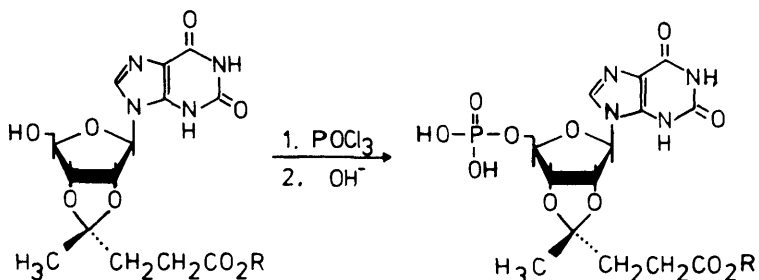
Abb. 19: Auftragung HETP-Wert gegen u

Abb. 19 zeigt die Auftragung des HETP-Wertes gegen die Durchflußgeschwindigkeit u. Es zeigt sich, daß im beobachteten Durchflußgeschwindigkeitsbereich keine Abhängigkeit des HETP-Wertes besteht. Diese Tatsache zeigt, daß sich das Gleichgewicht zwischen den Phasen sehr rasch einstellt. Der relativ hohe HETP-Wert zeigt, daß die Spezifität des Affinitätsgeles weniger durch eine niedrige Trennbodenhöhe, als vielmehr durch die Spezifität der heterogenen, biochemischen Reaktion bedingt wird.

3.7. Synthese und Eigenschaften der O-2',3'-Ethylen- Derivate des Xanthosins und ihre Immobilisierung

3.7.1. Darstellung

Wird Xanthosin mit Lävulinsäureethylester und Orthoameisensäuretriethylester in Dimethylformamid unter stark saurer Katalyse umgesetzt, so tritt innerhalb von 2 - 3 h vollständige Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung ein. Der Grund hierfür sind die in Xanthosin enthaltenen 12 Gewichtsprozent Kristallwasser. Wird das Nucleosid wasserfrei eingesetzt und die verwendeten Lösungsmittel absolutiert, so läßt sich bei der Umsetzung in 48 Proz. Ausbeute das Xanthosin-Acetal 21a erhalten. Alkalische Hydrolyse des Esters 21a führt zu nicht kristallisierbarem 21b. Das Produkt wird in verdünnter Ammoniaklösung aufgenommen (pH 10) und an einer Anionenaustauschersäule (Gegenion: Acetat) chromatographiert. Elution mit einem linearen Gradienten aus 500 ml 0,5N Essigsäure und 500 ml Wasser ergibt in 64 Proz. Ausbeute analysenreines 21b.



21a: R = C₂H₅

21b: R = H

22a: R = C₂H₅

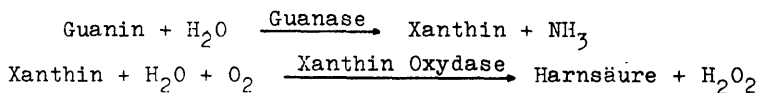
22b: R = H

Phosphorylierung des Esters 21a und anschließende Verseifung führt in 50 proz. Ausbeute zum 5'-Monophosphat 22b. Sowohl 22b als auch 21a,b sind wie das Stammnucleosid im Hinblick auf die N-glykosidische Bindung hydrolyseempfindlich.

3.7.2. Inhibitoreigenschaften der O-2',3'-Ethylidenacetale des Xanthosins und Guanosins gegenüber Guanase und Xanthin Oxydase

Das Xanthosinacetal 21b sowie das bereits beschriebene entsprechende Acetal des Guanosins⁴² stellen brauchbare Liganden für eine biospezifische Affinitätschromatographie von Guanase (Guanin Aminohydrolase) bzw. Xanthin Oxydase dar.

Guanase, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 170000 Dalton, katalysiert die Desaminierung von Guanin zu Xanthin⁸², während Xanthin Oxydase die Oxidation des Xanthins zu Harnsäure beschleunigt:



Für Guanase wird Guanosin, Xanthosin, O-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-xanthosin und O-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-guanosin als Inhibitor getestet. Dazu werden 0,1 μmol Guanin, 0,85 μmol des Inhibitors und 5×10^{-3} units (5 μl) Guanase aus Rattenleber in 1 ml Sörensen-Phosphatpuffer (1/15 M, pH 7.6) gelöst, und in einer 1-cm-Quarzküvette die Extinktionsabnahme bei 246 nm kontinuierlich ver-

folgt. Die negativen Steigungen des linearen Bereiches der Auftragungen E_{246} gegen t stellen die Anfangsgeschwindigkeiten der Desaminierung dar. In Tab. 4 sind die Anfangsgeschwindigkeiten relativ zur Desaminierung von Guanin angegeben.

<u>Guanase</u>		
Inhibitor	mol. Verhältnis Substrat:Inhibitor	v_{rel}
Guanin	-	100
Guanosin	1:8.5	95
Xanthosin	1:8.5	60
O-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl) ethyliden]-xanthosin	1:8.5	65
O-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl) ethyliden]-guanosin	1:8.5	60
<u>Xanthin Oxydase</u>		
Xanthosin	1:16	100
O-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl) ethyliden]-xanthosin	1:16	95

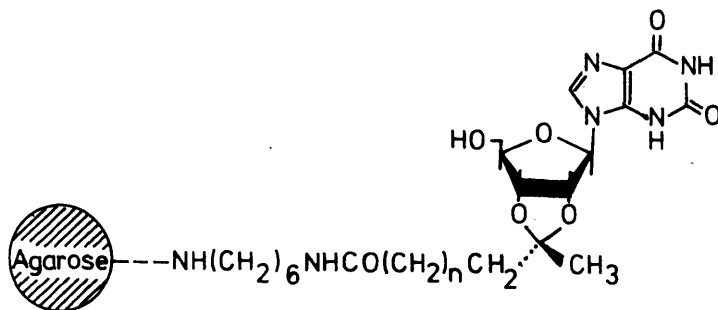
Tab. 4: Inhibitoreigenschaften verschiedener Inhibitoren gegenüber Guanase und Xanthin Oxydase

Es zeigt sich, daß sowohl das Xanthosinacetal 21b als auch das entsprechende Guanosinacetal eine deutliche Inhibitions-
wirkung auf Guanase besitzen. Somit sollten beide Acetale
brauchbare Liganden für eine biospezifische Affinitäts-
chromatographie sein. Eine qualitative Dünnschichtchroma-
tographie zeigt, daß Guanase das Guanosinacetal nicht in
das entsprechende Xanthosinacetal 21b umzuwandeln vermag.

Für Xanthin Oxydase wird Xanthosin und 0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-xanthosin, 21b, als Inhibitor auf entsprechende Weise getestet. Hier zeigt nur das Acetal eine schwache Inhibitionswirkung (Tab. 5).

3.7.3. Kupplung von 0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-xanthosin an 6-Aminohexylagarose

Zur Kupplung der Säure 21b wird diese in Wasser/Dioxan (7:3) gelöst und in der Kälte mit gequollener 6-Aminohexylagarose und dem Kupplungsreagens EDC versetzt. Nach 12 h wird das Gel filtriert und gewaschen. Eine Ligandenbestimmung einer bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Gelprobe nach der bereits beschriebenen Hydrolysemethode ergibt einen Wert von 200 $\mu\text{mol/g}$ 21c.



21c n = 1

3.7.4. Affinitätschromatographie von Guanase an immobilisiertem Xanthosin und Guanosin

Laut Literaturangaben⁸² besteht Guanase (aus Kaninchenleber) aus zwei Komponenten, einer Hauptkomponente mit einem Molekulargewicht von 170000 Dalton und einer Nebenkomponeute von 525000 Dalton, die durch Chromatographie an Sephadex G 200 nicht getrennt werden können.

So zeigt auch Abb. 9, daß die aus Guanase bestehende Vorzone aus zwei Komponenten besteht.

Durch Chromatographie von 1 mg Guanase in 100 μ l Sörensen-Phosphatpuffer (1/15 M, pH 7.6) an einer Säule mit immobilisiertem Xanthosin, 21c, (0.9 x 20 cm) kann eine Vorzone abgetrennt werden, die keine Guanase-Aktivität zeigt (qualitative Dünnschichtchromatographie), aber eine Leitfähigkeit aufweist.

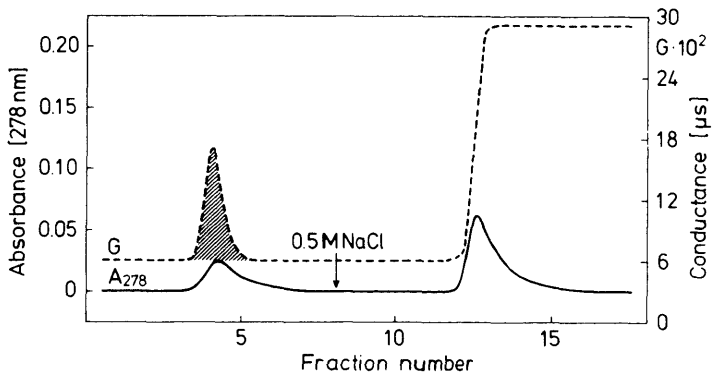


Abb. 20: Affinitätschromatographie von Guanase an 21c;
 --- Leitfähigkeitsmessung, — Extinktion (278 nm)

Eine Elution mit einer 0.5M NaCl-Lösung führt zu einer weiteren Zone, die nunmehr Guanase-Aktivität besitzt. Aus einem qualitativen Vergleich der Flächen der Vorzone und der Hauptzone ist ersichtlich, daß es sich bei der Vorzone um die hochmolekulare Nebenkomponente des Enzyms handelt. Eine entsprechende Chromatographie von Guanase an einer Säule mit immobilisiertem Guanosin führt zum gleichen Trennergebnis.

Letzteres zeigt, daß trotz unspezifischer Wechselwirkung zwischen Ligand und Enzym eine Trennung der beiden Komponenten möglich ist.

3.7.5. Affinitätschromatographie von Xanthin Oxydase an immobilisiertem Xanthosin

Durch eine Affinitätschromatographie von 1 mg Xanthin Oxydase (aus Kuhmilch) an einer Säule mit Xanthosin 21c (Abb. 21)

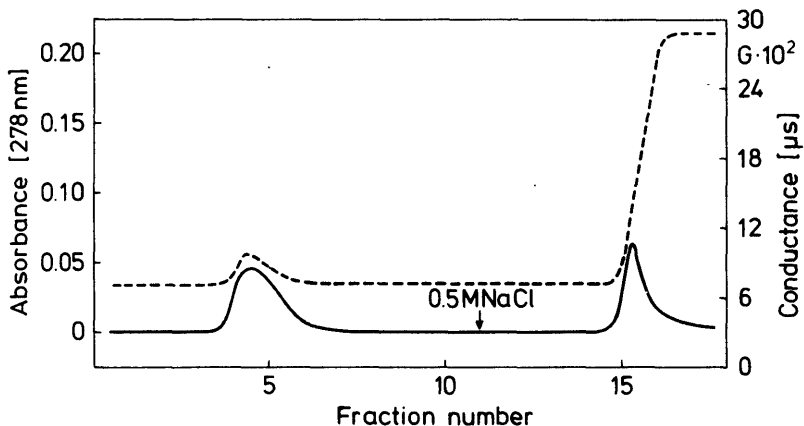


Abb. 21: Affinitätschromatographie von Xanthin Oxydase an 21c

(alle Mengen- und Konzentrationsangaben wie in 3.7.4.) führt ebenfalls zu einer Vorzone, die keine Oxydase-Aktivität aufweist (qualitative Dünnschichtchromatographie). Durch Elution mit einer 0.5M NaCl-Lösung wird eine Protein-komponente von der Säule gewaschen, die nach Inkubation mit Xanthin (Sörensen-Phosphatpuffer, 1/15 M, pH 7.6, 37°C) und anschließender Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, LS C) als Xanthin Oxydase identifiziert werden kann.

4. Darstellung von O-2',3'-cyclischen Pyrimidinnucleosid-Acetalen und ihre Immobilisierung^{83,84}

4.1. Synthese und Eigenschaften von O-2',3'-Ethylidenacetalen des Cytidins, Uridins, 6-Azauridins und ihrer 5'-Monophosphate

Wie die Immobilisierung von Substraten, Produkten und Inhibitoren mit Purinnucleosid-Struktur gezeigt hat, besitzen die Polymere ähnliche Bindungsspezifitäten gegenüber Adenosin Desaminase wie die freien Nucleoside. Im vorliegenden Abschnitt soll geprüft werden, ob sich das Verfahren auch für die Immobilisierung von Pyrimidinnucleosiden eignet, und sich Polymere mit hoher Biospezifität darstellen lassen.

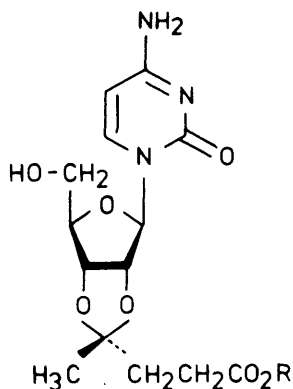
Kondensiert man Cytidin mit Lävulinsäureethylester in Gegenwart von Orthoameisensäuretriethylester unter starker Säurekatalyse, so entsteht das Cytidinacetal 23a, das als Hydrochlorid in 84 proz. Ausbeute kristallin isoliert werden kann²⁹.

Überträgt man die Reaktion auf Uridin, so läßt sich nur ein amorphes Produkt, 24a, isolieren, das jedoch im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, LS C) einheitlich wandert.

Wie das ¹³C-NMR-Spektrum zeigt, erfolgt auch bei den Pyrimidinnucleosiden Cytidin und Uridin die Acetalbildung ausschließlich an den 2',3'-Hydroxylgruppen, denn die ¹³C-NMR-Signale von C-2'/C-3' der Acetale 23a und 24a sind um ca. 10 ppm im Vergleich zu den Stammnucleosiden zu höherem Feld verschoben. Das ¹³C-NMR-Spektrum des Cyti-

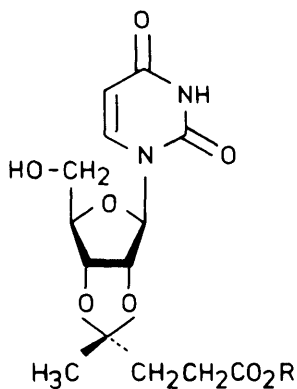
dinacetals 23a zeigt für C-4 ein Signal, das gegenüber dem des Cytidins um 21.4 ppm verschoben ist. Dies ist auf die Hydrochloridbildung zurückzuführen.

Aus den Estern 23a und 24a lassen sich die Säuren 23b und 24b durch alkalische Hydrolyse gewinnen. Die Säuren, die nach Abfangen überschüssiger Natronlauge mit saurem Ionenaustauscher in der Dünnschichtelektrophorese (Kieselgel, LS A) als Anionen mit R_F -Werten von jeweils + 3.0 relativ zu den Stammnucleosiden einheitlich wandern, sind nur schwierig von anorganischen Salzen zu befreien. Ihre große Wasserlöslichkeit macht auch eine Extraktion mit organischen Lösungsmitteln unmöglich. Erst durch Chromatographie an Dowex 1 x 2 - Anionenaustauscher (Acetat-Form) und Elution mit einem linearen Essigsäure-Gradienten (0.5M) lassen sich 23b und 24b analysenrein erhalten.



23a: R = C₂H₅; [HCl]

23b: R = H



24a: R = C₂H₅

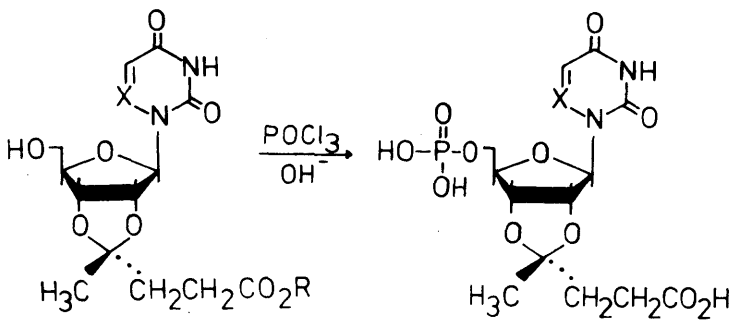
24b: R = H

Die $^1\text{H-NMR}$ -Signale der Acetalmethylgruppen von 23b bzw. 24b fallen mit dem des Adenosinacetals 6a zusammen. Da bei diesem durch Röntgenstrukturanalyse die Konfiguration am Acetalkohlenstoff mit R bestimmt worden war, sind die Methylgruppen auch bei den Pyrimidinnucleosidacetalen exo-ständig.

Eine Phosphorylierung von 1 mmol 24a mit Phosphoroxotrichlorid und anschließender alkalischer Hydrolyse der Estergruppe führt in 32 proz. Ausbeute zu O-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-uridin-5'-monophosphat, 26. Die Synthese entspricht der in Kap. 3.1.2. beschriebenen Phosphorylierungsreaktion. Die Charakterisierung erfolgt ebenfalls durch quantitative Phosphatbestimmung und enzymatischen Abbau zu 24b.

Auch die Darstellung der O-2',3'-cyclischen Acetale des modifizierten Nucleosides 6-Azauridin kann auf die herkömmliche Weise erfolgen. Die Synthese von amorphem O-2',3'-[1-(2-Ethoxycarbonyl)ethyliden]-6-azauridin, 25a gelingt in 46 proz. Ausbeute, ebenso die Darstellung der Säure 25b durch alkalische Hydrolyse des Esters 25a.

Phosphorylierung von 1 mmol des Esters 25a mit Phosphoroxotrichlorid und anschließende Verseifung führt nach Chromatographie an DE-52-Cellulose in 32 proz. Ausbeute zum glasigen Monophosphat 27. Das Produkt wandert sowohl auf Kieselgel als auch auf Polyethylenimin-Cellulose einheitlich. Es wird durch quantitative Phosphatbestimmung und durch enzymatischen Abbau zur Säure 25b charakterisiert.



- 24a: X=CH, R=C₂H₅
- 24b: X=CH, R=H
- 25a: X= N, R=C₂H₅
- 25b: X= N, R=H

- 26: X=CH
- 27: X=N

4.2. Inhibition von Orotidin-5'-monophosphat Decarboxylase durch 0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-6-aza-uridin-5'-monophosphat

In der Biosynthese von Pyrimidinnucleosiden spielen Orotidin-5'-monophosphat Pyrophosphorylase (OMP-PP) und Orotidin-5'-monophosphat Decarboxylase (OMP-DC) eine Schlüsselrolle^{85,86}. Ersteres katalysiert die Bildung von Orotidin-5'-monophosphat (OMP) aus 5'-Phospho-β-D-ribofuranosyl-pyrophosphat und Orotsäure, während letzteres dessen Decarboxylierung zu Uridin-5'-monophosphat (UMP) bewirkt.

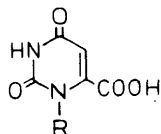
6-Azauridin und sein 5'-Monophosphat sind starke Inhibitoren dieses Biosyntheseweges. 6-AzaUMP zeigt eine Bindung zum aktiven Zentrum von OMP-DC, die um eine Zehnerpotenz größer ist, als die des Substrates OMP. Diese Tatsache bedingt eine cytostatische Aktivität. Die Selektivität in der Wirksamkeit des 6-AzaUMP gegen Krebszellen haben zu einer klinischen Anwendung in der Behandlung von Leukaemie geführt^{87,88}. Da die O-2',3'-Ethylenacetale des UMP und des 6-AzaUMP eine Modifizierung des Nucleotides an einer Stelle aufweisen, die nicht direkt zum aktiven Zentrum des Enzyms OMP-DC hingee richtet ist, sollte eine Immobilisierung über die 2',3'-Position des Riboserestes zu Polymeren führen, die eine biospezifische Affinität zu OMP-DC besitzen.

Durch Immobilisierung des 6-AzaUMP über diese Position an lösliche Dextrane werden möglicherweise pharmakologisch aktive Polymere erhalten, die eine zu rasche Ausscheidung des 6-AzaUMP beheben und somit eine verlängerte pharmakologische Wirksamkeit besitzen⁸⁹.

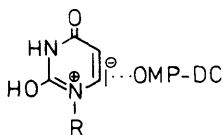
Da die Decarboxylierung von OMP (28) ohne Coenzym abläuft, wird ein dipolar-ionisches Tautomer des Substrates postuliert, das durch OMP-DC selbst stabilisiert wird (29) und schließlich zum Produkt weiterreagiert. 6-AzaUMP ist ein Analogon zum Übergangszustand (30) und zeigt eine höhere Affinität zu OMP-DC als das Substrat selbst⁹⁰.

Um zu zeigen, daß auch das Acetal 27 noch in das aktive Zentrum von OMP-DC gebunden wird - es also einen brauchbaren Liganden für eine biospezifische Affinitätschromatographie darstellt - wird es als Inhibitor in einer Decarboxylierungsreaktion getestet. Die kontinuierliche Verfolgung des Reaktionsfortganges beruht auf der Änderung des UV-Spektrums

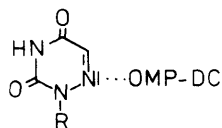
von OMP zu UMP. Die Abnahme der Extinktion kann bei 285 nm verfolgt werden ⁹¹. Dabei zeigt sich, daß die relative Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Decarboxylierung auf 85% bei einem molaren Verhältnis Substrat zu Inhibitor wie 1:1 absinkt und bei einem Verhältnis von 1:7,3 nurmehr 35% beträgt.



28



29

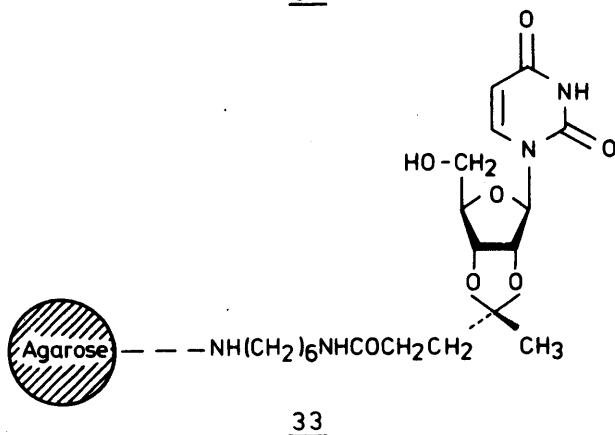
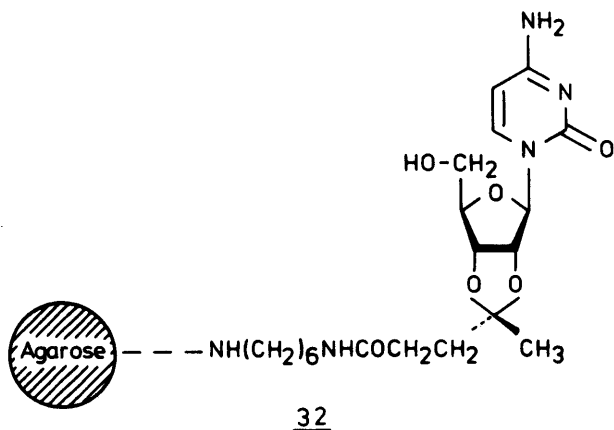


30

R = 5'-Phospho-β-D-ribofuranosyl

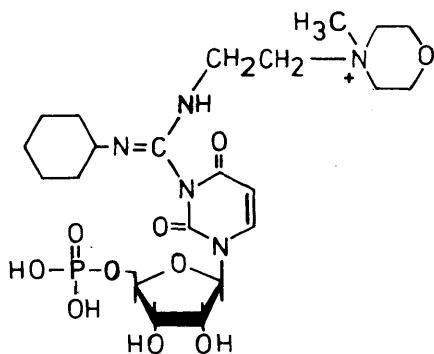
4.3. Kupplung der 0-2',3'-Ethylidenacetale des Cytidins, Uridins und 6-Azauridins an 6-Aminohexylagarose

Die Kupplung der Säuren 23b und 24b sowie der Monophosphate 26 und 27 an 6-Aminohexylagarose erfolgt in Wasser/Dioxan (7:3) in Gegenwart von EDC in bereits beschriebener Weise. Man erhält die Gele 32-35.



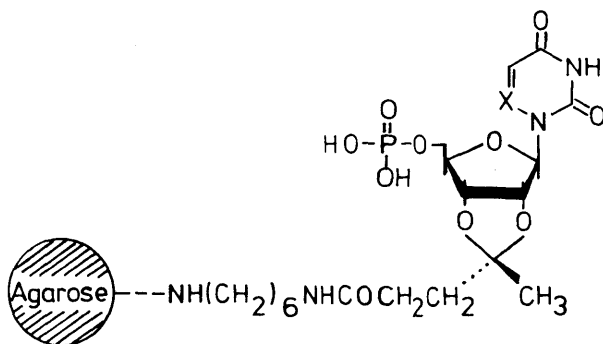
Metz und Brown berichten über eine Reaktion von UMP mit N-Cyclohexyl-N'-β(-4-methylmorpholinium)-ethylcarbodiimid-

p-toluolsulfonat zum Produkt 31⁹².



31

Um auszuschließen, daß eine analoge Reaktion nicht auch zwischen dem Acetal 24b und EDC eintritt, wird 24b in Gegenwart des Kondensationsmittels 24 h bei pH-Werten zwischen 4 und 10 aufbewahrt. Unverändertes 24b kann in allen Fällen dünnschichtchromatographisch (Kieselgel, LS C) nachgewiesen werden.



34: X = CH

35: X = N

Eine Ligandenbestimmung erfolgt bei den Polymeren 32 und 33 nach der Hydrolysemethode und bei den Polymeren 34 und 35 durch quantitative Phosphatbestimmung. Es ergeben sich Konzentrationen von 166 $\mu\text{mol/g}$ 32, 189 $\mu\text{mol/g}$ 33, 124 $\mu\text{mol/g}$ 34 und 26 $\mu\text{mol/g}$ 35.

Das Polymer 32 stellt möglicherweise ein geeignetes Gel für eine biospezifische Affinitätschromatographie von Cytidin Desaminase dar.

4.4. Affinitätschromatographie von OMP-DC an immobilisiertem UMP und 6-AzaUMP

1 mg eines Rohenzymgemisches aus OMP-DC und OMP-PP in 200 μl Sörensen-Phosphatpuffer (1/15 M, pH 7.6) werden auf eine thermostatierte Säule (10°C , 0.9 x 10 cm) mit 34 bzw. 35 aufgebracht. Durch Elution mit dem Aufgabepuffer wird OMP-PP von beiden Säulen gewaschen, während OMP-DC in beiden Fällen retardiert wird. Durch Waschen mit einer 0.5M NaCl-Lösung wird OMP-DC vom Produktgel 34 eluiert, während 35 das Enzym weiterhin zurückhält. Erst durch Elution mit einer 1M NaCl-Lösung kann das Protein auch vom Inhibitorgel 35 gewaschen werden.

Während des Elutionsvorganges wird am Säulenboden kontinuierlich die Leitfähigkeit des Eluates gemessen, (Abb. 22) um zu zeigen, daß das Enzym jeweils nach einem Säulentotvolumen eluiert wird.

Nach jeder Affinitätschromatographie wird der Gehalt der Elutionszonen getestet. Dabei kann durch qualitative

Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, LS C) nach Inkubation der proteinhaltigen Fraktionen mit OMP (1 h, 37°C) gezeigt werden, daß nur das retardierte Protein OMP-DC-Aktivität aufweist, während die Vorzone in keinem Fall eine Decarboxylase-Aktivität besitzt. Somit ist auch hier eine Biospezifität der Gele 34 und 35 nachgewiesen.

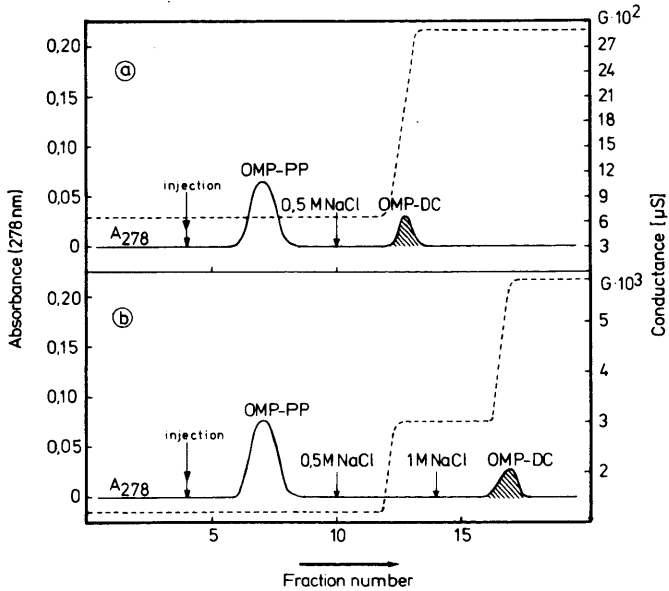


Abb. 22: Affinitätschromatographie von OMP-PP/OMP-DC an 34 (a) und 35 (b).

5. Zusammenfassung

1. Es werden die O-2',3'-Ethylidenacetale des Inosins 2a-c, die sich im Alkylidenrest um jeweils eine Methylen-Gruppe unterscheiden, durch Acetalisierung mit Ketoestern dargestellt und zu den entsprechenden Säuren 3a-c verseift. Die Verbindungen können auch durch Umacetalisierung des Nucleosides mit den Diethylacetalen der Ketoester erhalten werden, was den Vorteil einer milderen Säurekatalyse besitzt. Durch Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von 3a-c mit der Modellsubstanz 6a, die am Acetalkohlenstoffatom die R-Konfiguration besitzt, kann gezeigt werden, daß auch die Acetalisierung von Inosin stereoselektiv verläuft, und das neue chirale Zentrum in R-Konfiguration vorliegt. Durch Phosphorylierung und anschließende Verseifung des Esters 2a ist das 5'-Monophosphat 7b erhältlich.

2. Auf gleiche Weise werden die cyclischen Acetale des Tubercidins und 6-Thioinosins dargestellt. Durch Reduktion der 6-Thioinosin-Acetale mit Raney-Nickel entstehen die O-2',3'-Ethylidenacetale des Nebularins, die auf direktem Weg auf Grund der Hydrolyseempfindlichkeit des Nucleosides nicht erhalten werden können.

3. Substrat- und Inhibitoreigenschaften der dargestellten Purinnucleosid-Acetale gegenüber Adenosin Desaminase werden getestet, wobei gezeigt werden kann, daß die Biospezifität der Nucleoside gegenüber dem Enzym durch eine Modifizierung an der 2',3'-Position des β -D-Ribofuranosyl-Restes in der durchgeführten Weise im wesentlichen erhalten bleibt.

4. Die Immobilisierung der dargestellten 0-2',3'-Ethyliden-nucleosid-Acetale, sowie der bereits bekannten Adenosin-Acetale an 6-Aminohexylagarose führt zu Polymeren, die eine Biospezifität zu Adenosin Desaminase besitzen (Substrat-Produkt- und Inhibitorigel). Im Zusammenhang mit kinetischen Untersuchungen zur enzymatischen Umwandlung polymergebundenen Adenosins wird das "Spacerproblem" diskutiert.

5. Anwendung finden die dargestellten Polymere in der biospezifischen Affinitätschromatographie von Adenosin Desaminase zum Zweck der Aufreinigung des Enzyms sowohl aus künstlichen Proteingemischen als auch aus natürlichem Material.

6. Durch Chromatographie von Adenosin Desaminase an immobilisiertem Tubercidin - einem Nucleosid, das nicht in das aktive ~~Zen~~trum des Enzyms gebunden wird - lassen sich spezifische und unspezifische Bindungsanteile in der Wechselwirkung des Proteins mit seinen Affinitätsgelen abschätzen.

7. Durch Anwendung der spezifischen Elution in der Affinitätschromatographie gelingt die Bestimmung der thermodynamischen Funktionen der Reaktion zwischen Adenosin Desaminase und immobilisiertem Inosin. Somit sind Aussagen über Art und Ort der Bindung zwischen Ligand und affinem Partner möglich.

8. Durch Messung des Einflusses von Temperatur und Durchflußgeschwindigkeit auf die theoretische Bodenhöhe läßt sich die biospezifische Affinitätschromatographie von Adenosin Desaminase an immobilisiertem Inosin weiter optimieren.

9. Die Acetalisierung von Xanthosin mit Lävulinsäureethylester führt zum Ester 21a, der direkt zur Säure 21b verseift oder zunächst phosphoryliert und anschließend verseift werden kann. Durch Kupplung der Säure 21b an 6-Aminohexylagarose entsteht das Gel 21c, das zu einer nicht spezifischen Affinitätschromatographie von Guanase und Xanthin Oxydase verwendet wird.

10. Die Acetalisierung von Pyrimidinnucleosiden, wie Cytidin, Uridin und 6-Azuridin mit Lävulinsäureethylester führt zu den Verbindungen 23a, 24a und 25a, die zu den entsprechenden Säuren 23b, 24b und 25b verseift werden. Durch Phosphorylierung der Ester 24a und 25a und anschließende alkalische Hydrolyse sind die 5'-Monophosphate des 0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-uridins und -6-azauridins erhältlich. Beide Phosphate werden in das aktive Zentrum von Orotidin-5'-monophosphat Decarboxylase gebunden. Kupplung von 26 und 27 führt zu den Gelen 34,35, an denen eine biospezifische Affinitätschromatographie von Orotidin-5'-monophosphat Decarboxylase und Orotidin-5'-monophosphat Pyrophosphorylase durchgeführt wird.

6. Experimenteller Teil

Schmelzpunkte: SMP 20 Schmelzpunktgerät (Büchi, Schweiz) bzw. Monoskop (Reichert, Österreich); die Werte sind nicht korrigiert.

Brechungsindices: Abbe-Refraktometer (Zeiss, Oberkochen).

Elementaranalysen: Mikroanalytisches Labor Beller (Göttingen).

NMR-Spektren: HX 60 und WH 270 Spektrometer (Bruker, Spectrospin, Schweiz); δ in ppm relativ zu Tetramethylsilan (TMS) als innerem Standard.

UV-Spektren: Photometer PMQ 3 (Zeiss, Oberkochen) bzw.

UV-200 Spektrophotometer (Shimadzu, Japan).

IR-Spektrum: PE 157 Spektrophotometer (Perkin-Elmer, Überlingen).

Analytische Dünnschichtchromatographie bzw. Dünnschicht-elektrophorese wurde an Kieselgel-Dünnschichtplatten F-254 (Woelm, Eschwege) bzw. Polyethylenimin-Cellulose-Platten (Woelm, Eschwege) ausgeführt. Der Substanznachweis erfolgte durch UV-254-Adsorption.

Die Dünnschichtelektrophorese erfolgte in einer DE-Doppelkammer (Desaga, Heidelberg).

Laufmittelsysteme:

LS A: Wasser; LS B: Wasser/Methanol 4:1; LS C: 0.25M LiCl;

LS D: 1.0M LiCl; LS E: Chloroform/Methanol 8:2; LS F:

Chloroform/Methanol 9:1; LS G: 0.1M Natriumcitrat-Puffer,

pH 6.5; LS H: 0.1M Natriumformiat-Puffer, pH 3.5; LS I:

0.1M Natriumborat-Puffer, pH 10.0.

Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (TEBK) wurde bereitet durch Einleiten von CO_2 in eine Lösung aus 720 ml Triethylamin in 4260 ml Wasser, bis der pH 7.0 erreicht war.

Chromatographie: Zur präparativen Säulenchromatographie der 0-5'-Monophosphate wurde Diethylaminoethyl-Cellulose, DE-52 (Whatman, England) verwendet.

Ionenaustauschchromatographie erfolgte an Dowex 1 x 2 - Anionenaustauscher, Acetat-Form, 200 - 400 mesh (Serva, Heidelberg) bzw. an Lewatit CP 3050, H⁺-Form, 200 - 400 mesh (Serva, Heidelberg).

Die Fraktionierung erfolgte nach UV-254-Absorptionsmessung durch einen UltraRac-Fraktionensammler mit Uvicord II (LKB-Instruments, Schweden). Durchflußgeschwindigkeiten wurden mit einer Perpex-Pumpe (LKB-Instruments, Schweden) fest eingestellt.

0-2',3'-[1-(2-Ethoxycarbonyl)ethyliden]-adenosin, 5a,
 0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-adenosin, 6a,
 0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-adenosin-5'-mono-
 phosphat, 7d, 0-2',3'-[1-(2-Ethoxycarbonyl)ethyliden]-
 guanosin und 0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-guanosin
 sowie die entsprechenden polymergebundenen Nucleoside wurden
 nach Seela und Waldek⁴² bzw. Seela und Cramer²⁹ dargestellt.
 Nebularin wurde nach Fox et. al.⁴⁷ dargestellt.

6-Aminohexylagarose (AH-Agarose 4B) wurde von der Firma Pharmacia (Uppsala, Schweden) bezogen und vor der Verwendung folgendermaßen aufgearbeitet: 1. Waschen mit 500 ml/g Gel 0.5M NaCl; 2. Waschen mit Wasser. Das Gel wird soweit abgesaugt, bis die Oberfläche bricht und dann verschlossen und kühl aufbewahrt.

Enzyme: Adenosin Desaminase aus Kälberdarm, E.C. 3.5.4.4., (Boehringer, Mannheim) 5 mg/ml Glycerin, 1 mg = 200 units (1 unit desaminiert 1 μ mol Adenosin/min); Guanase (Guanin Aminohydrolase) aus Kaninchenleber, E.C. 3.5.4.3., (Boehringer) 10 mg/ml Suspension in 3.2M Ammoniumsulfat-Lösung, 0.06 units/mg; Xanthin Oxydase aus Kuhmilch, E.C. 1.2.3.2., (Boehringer) 20 mg/2 ml Suspension in 3.2M Ammoniumsulfat-Lösung, 0.4 units/mg; AMP-Aminohydrolase (Schmidts Desaminase), E.C. 3.5.4.6., (Sigma, U.S.A.) 10 units/ml 66 proz. Glycerin; Crotidin-5'-monophosphat Decarboxylase aus Hefe, E.C. 4.1.1.23., (Sigma) Lyophilisat, 10-30 units/mg; Crotidin-5'-monophosphat Pyrophosphorylase aus Hefe, E.C. 2.4.2.10., (Sigma) Lyophilisat, 25 units/mg; OMP-DC/OMP-PP, käufliches Gemisch (Sigma) Lyophilisat, 0.2 - 0.3 units/mg.

Quantitative Bestimmung primärer, aliphatischer Aminogruppen an 6-Aminohexylagarose

Eichkurve

Zur Aufstellung einer Eichkurve wird folgender Pipettierplan durchgeführt (50 ml Reiskolben):

- a) 1 - 5 ml n-Hexylamin-Stammlösung (1 μ mol/ml)
- b) 1 ml gesättigte Natriumtetraborat-Lösung ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)
- c) auf 6 ml mit Wasser auffüllen
- d) 100 μ l 3 proz. TNBS-Lösung in Wasser
- e) 30 min. bei 37^oC inkubieren
- f) 4 ml 2N Salzsäure
- g) 5 ml Aceton

- h) 1:3 mit Aceton/Wasser (1:1) verdünnen
 i) Extinktion bei 415 nm in 1-cm-Quarzküvette messen.

Bestimmung der Aminogruppen am Gel

- a) Einwaage 250 mg 6-Aminohexylagarose
 b) - d) wie oben
 e) 30 min bei 37°C inkubieren
 f) 4 ml 2N Salzsäure
 g) auf dem siedenden Wasserbad lösen
 h) 5 ml Aceton
 i) 1:3 mit Aceton/Wasser (1:1) verdünnen
 j) Extinktion bei 415 nm in 1-cm-Quarzküvette messen
 k) Umrechnung auf 1g Gel.

Wertetabelle 5:*

$\mu\text{mol Ligand/ml}$	E_{415}
1	0.082
2	0.175
3	0.245
4	0.322
5	0.413

Es wurde bei jeder verwendeten Probe 6-Aminohexylagarose die Konzentration primärer Aminogruppen bestimmt, wobei sich stets ein Wert von 8 - 10 $\mu\text{mol/g}$ ergab.

* Abbildung der Eichkurve s. Kap. 3.4.1.

Optische Ausbeutebestimmung und Phosphatgehalte von 7b,
22b, 26 und 27

Das getrocknete, glasige Monophosphat wird in 20 ml Wasser aufgenommen. 10 μ l dieser Lösung werden auf 1 ml mit Wasser verdünnt und die Extinktion bei λ_{\max} des jeweiligen Nucleosides bestimmt. Die Ausbeute ergibt sich nach folgender Gleichung:

$$\text{Anzahl } \mu \text{ mol} = \frac{E \times 100 \times 20 \times 1000}{\epsilon}$$

E: Extinktion bei λ_{\max}

ϵ : Jeweiliger molarer Extinktionskoeffizient.

Zur Phosphatbestimmung nach der Molybdänblau-Methode wird ein Aliquot (0.7 ml) einer frisch bereiteten Mischung (1:6) aus einer 10 proz. wässrigen L-Ascorbinsäure-Lösung und einer 0.42 proz. Ammoniummolybdat-Lösung ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$) in 0.5M Schwefelsäure mit 0.3 ml der bereiteten Lösung des unbekanntes Phosphates gemischt. Die Lösung wird eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert; anschließend wird die Extinktion bei 820 nm in einer 1-ml-Küvette bestimmt. Man errechnet die Extinktion der gesamten Phosphat-Lösung (20 ml) und kann daraus die Anzahl der μ mol Phosphat bestimmen. 24 E_{820} -Einheiten entsprechen 1 μ mol Phosphat.

Durch Vergleich der durch Phosphatbestimmung erhaltenen Phosphatwerte (in μ mol) mit der Ausbeute (in μ mol) läßt sich ersehen, ob es sich bei dem unbekanntes Phosphat um ein Monophosphat oder ein höher phosphoryliertes Produkt handelt.

Spaltung der 0-5'-Monophosphate mit Alkalischer Phosphatase

Eine Suspension (10 μ l) von alkalischer Phosphatase aus E. coli (E.C. 3.1.3.1., Boehringer, 1 mg/ml) wird mit 0.25M TRIS* - HCl - Puffer (90 μ l, pH 8) verdünnt. 10 μ l dieser Lösung werden zu 10 μ l der Substrat-Lösung hinzugefügt und 2 h bei 37°C inkubiert. Durch Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, LS C) lassen sich die unphosphorylierten Produkte identifizieren.

Proteinbestimmung nach Lowry

- Lösungen: 1) 2 proz. $\text{CuSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ aq
 2) 4 proz. Natriumtartrat aq
 3) 3 proz. Na_2CO_3 in 0.1N NaOH
 4) Folin-Ciocalteus-Phenolreagens (Merck, Darmstadt)

Aus 1), 2) und 3) wird jeweils frisch eine Gebrauchslösung hergestellt (4:4:192). 0.5 ml der Testlösung werden mit 5 ml Gebrauchslösung gemischt und 10 min bei Raumtemperatur belassen. Dann werden 0.5 ml der Lösung 4), die mit Wasser verdünnt ist (1:3, v/v), hinzugefügt und nach 30 min bei 620 nm die Extinktion gegen einen Blindansatz gemessen. Auf die Aufnahme einer Eichkurve wird verzichtet und statt dessen vor jeder Bestimmung ein Eichwert mit 100 μ l einer Rinder Serum-Albumin-Stammlösung (1 g/l) gemessen.

* TRIS: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Quantitative Bestimmung von Adenosin Desaminase

In Anlehnung an Arbeiten von Kalkar⁷⁵ wurde eine quantitative Bestimmungsmethode für Adenosin Desaminase erarbeitet: 10 μ l einer Adenosin-Stammlösung (0.01M, 0.1 μ mol/10 μ l) werden mit Sörensen-Phosphat-Puffer, pH 7.6, auf 1 ml verdünnt. In der Küvette werden anschließend steigende Mengen des Enzyms hinzugefügt (3 - 15 $\times 10^{-3}$ units) und jeweils die Desaminierung durch Verfolgung des E_{262} -Wertes beobachtet. Aus den Auftragungen E_{262} gegen die Zeit werden die relativen Anfangsgeschwindigkeiten der enzymatischen Reaktion bestimmt (Steigung zwischen 1. und 3. Minute). Eine Auftragung der relativen Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Enzymkonzentration ergibt innerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches eine Gerade.

Wertetabelle 6: *

c_{ADA} (units $\times 10^{-3}$ /ml)	v_{rel} ($\text{min}^{-1} \times 10^{-2}$)
3	- 3.1
5	- 4.17
10	- 6.8
15	- 9.67

Zur Aktivitätsbestimmung wird jeweils eine spezifische ADA-Bestimmung und eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt. Angegeben wird die Zahl der units/mg Protein.

* Abb. der Eichkurve siehe Kap. 3.5.

0-2',3'-[1-(2-Ethoxycarbonylethyl)ethyliden]-inosin (2a)

10.73 g (40 mmol) Inosin (1) werden in 150 ml getrocknetem Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 11.52 g (80 mmol) Lävulinsäureethylester und 10 ml (60 mmol) Ortho-ameisensäuretriethylester wird das unlösliche Material durch Zugabe von 20 ml 7M Chlorwasserstoff in trockenem p-Dioxan (5.04 g/20 ml) gelöst. Nachdem die Lösung 24 h bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde, wird sie in 1500 ml Ether gegossen. Die obere Phase wird abdekantiert und der ölige Rückstand zweimal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen und durch Zugabe einiger Milliliter 2 proz. wässriger NaHCO₃-Lösung gelöst. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft. Das Rohprodukt wird in Methanol gelöst und durch Zugabe einiger Tropfen Wasser ausgefällt. Umkristallisation aus Wasser/Methanol ergibt 8.92 g (57.2%) farblose Nadeln vom Schmp. 207 - 209°C.

DC (Kieselgel, LS A): R_F = 0.88.

UV (Methanol): λ_{\max} = 245 nm (ϵ = 10500).

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 8.3 (s, 2-H); 8.1 (s, 8-H); 6.15 (d, 1'-H); 5.35 (q, 2'-H); 4.95 (q, 3'-H); 4.2 (m, 4'-H); um 4.06 (q, CH₂-Ester); 3.5 (d, 5'-CH₂); 2.3 (m, aliphatisches CH₂); 1.35 (s, CH₃-Acetal); 1.2 ppm (s, CH₃-Ester).

¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ = 172.48 (C=O); 156.47 (C-6); 113.76 (C-Acetal); 89.59 (C-1'); 86.76 (C-4'); 83.85 (C-2'); 81.15 (C-3'); 61.34 (C-5'); 59.83 (O-CH₂); 33.33 (CH₂-C=O); 28.08 (CH₂-Acetal); 23.44 (CH₃-Acetal); 13.97 ppm (CH₃-Ester).

$C_{17}H_{22}N_4O_7$ (394.23) Ber. C 51.77 H 5.62 N 14.21
 Gef. C 51.70 H 5.73 N 14.23.

0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-inosin (3a)

2.0 g (5.07 mmol) des Esters 2a werden in einem Gemisch aus 120 ml Ethanol/1N NaOH aq (1:1) gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Lösung wird durch Zugabe von Ionenaustauscher (Amberlit, H⁺-Form) an einer Glaselektrode neutralisiert, anschließend filtriert und das Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand wird in heißem Wasser aufgenommen und durch Zugabe einiger Tropfen Eisessig auskristallisiert. Nach Abkühlen erhält man 1.76 g (89 %) farblose Kristalle vom Schmp. 188 - 190°C.

DC (Kieselgel, LS B): $R_f = 0.56$.

UV (Methanol): $\lambda_{max} = 245$ nm ($\epsilon = 9900$).

¹H-NMR (DMSO-d₆): $\delta = 8.3$ (s, 4-H); 8.1 (s, 8-H); 7.6 (m, OH); 6.15 (d, 1'-H); 5.26 (q, 2'-H); 4.96 (q, 3'-H); 4.25 (m, 4'-H); 3.55 (d, 5'-CH₂); 2.2 (m, aliphatisches CH₂); 1.3 ppm (s, CH₃-Acetal).

¹³C-NMR (DMSO-d₆): $\delta = 175.71$ (C=O); 156.95 (C-6); 147.81 (C-4); 146.58 (C-2); 138.85 (C-8); 124.43 (C-5); 114.48 (C-Acetal); 89.57 (C-1'); 86.67 (C-4'); 83.68 (C-2'); 81.11 (C-3'); 61.4 (C-5'); 35.06 (CH₂-C=O); 30.50 (CH₂-Acetal); 23.44 ppm (CH₃-Acetal).

$C_{15}H_{18}N_4O_7$ (366.23) Ber. C 48.18 H 4.95 N 15.29
 Gef. C 48.24 H 5.04 N 15.26.

0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-inosin-0-5'-mono-
phosphat (7b)

394 mg (1 mmol) des Esters 2a werden in 5 ml Triethylphosphat gelöst und mit 180 μ l (2 mmol) POCl_3 bei 4°C versetzt. Nach zwölfstündigem Aufbewahren bei dieser Temperatur wird mit 1N NaOH aq neutralisiert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels im Hochvakuum wird der Rückstand in 20 ml 0.5N NaOH aq aufgenommen und 30 min gerührt. Nach Neutralisation mit 1N HCl aq wird die Lösung auf 300 ml mit Wasser verdünnt und auf einer DEAE-Cellulose-Säule (25 x 3.5 cm) chromatographiert. Nach Waschen mit Wasser wird mit einem linearen Gradienten aus 1000 ml 0.5M TBK-Puffer und 1000 ml Wasser eluiert. Die erste Zone des Elutionsprofils enthält unphosphoryliertes 3a. Das Monophosphat 7b wird bei einer Pufferkonzentration von ca. 0.3M eluiert. Die phosphathaltigen Fraktionen werden gesammelt und zur Trockne eingedampft. Überschüssiger Puffer wird durch mehrmaliges Abdampfen mit Methanol entfernt. 4410 E_{245} -Einheiten (42%)* farbloses, amorphes 7b. DC (Kieselgel, LS B): $R_F = 0.61$.
Phosphatbestimmungen: a) Abbau mit alkalischer Phosphatase ergibt ausschließlich 3a als Reaktionsprodukt;
b) 0.44 E_{245} -Einheiten 7b (0.042 μ mol) ergeben 0.96 E_{820} -Einheiten des Molybdänblau-Kolloides, entsprechend 0.04 μ mol Phosphat.

* mit $\epsilon = 10500$

0-2',3'-[1-(3-Ethoxycarbonylpropyl)ethyliden]-inosin (2b)

10.73 g (40 mmol) Inosin werden - wie beschrieben - mit 8.8 g (80 mmol) 6-Oxohexansäureethylester umgesetzt und aufgearbeitet. Nach Umkristallisation aus Methanol enthält man 4.84 g 2b (30%) vom Schmp. 214 - 216°C.

DC (Kieselgel, LS B): $R_f = 0.1$.

UV (Methanol): $\lambda_{\max} = 245 \text{ nm}$ ($\epsilon = 11300$).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 8.28$ (s, 2-H); 8.06 (s, 8-H); 6.10 (d, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 1'-H); 5.32 (q, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 2'-H); 4.83 (q, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 3'-H); 4.18 (m, 4'-H); 4.00 (q, CH_2 -Ester); 3.52 (m, 5'-H); um 2.5 und 1.77 (m, aliphatisches CH_2); 1.31 (s, CH_3 -Acetal); 1.19 ppm (t, CH_3 -Ester).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 172.6$ (C=O); 156.3 (C-6); 147.5 (C-2); 146.0 (C-4); 138.7 (C-8); 124.4 (C-5); 114.3 (C-Acetal); 89.5 (C-1'); 86.8 (C-4'); 83.9 (C-2'); 81.1 (C-3'); 61.5 (C-5'); 59.6 (O- CH_2); 38.2 (γ - CH_2); 33.4 (α - CH_2); 23.4 (CH_3 -Acetal); 18.9 (β - CH_2); 14.0 ppm (CH_3 -Ester).

$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_7$ (408.42) Ber. C 52.93 H 5.92 N 13.72
Gef. C 52.83 H 6.04 N 13.70.

0-2',3'-[1-(3-Carboxypropyl)ethyliden]-inosin (3b)

Alkalische Hydrolyse von 1.0 g (2.5 mmol) 2b unter den Bedingungen wie für 2a liefert 825 mg (89%) farbloses 3b. Nach Umkristallisation aus Wasser besitzt die Substanz einen Schmp. von 164 - 166°C.

DC (Kieselgel, LS C): $R_F = 0.61$ (Inosin: 0.84).

UV (Methanol): $\lambda_{\max} = 245 \text{ nm}$ ($\epsilon = 11200$).

$C_{16}H_{20}N_4O_7$ (372.39) Ber. C 50.52 H 5.30 N 14.73

Gef. C 50.50 H 5.45 N 14.60.

0-2',3'-[1-(4-Ethoxycarbonylbutyl)ethyliden]-inosin (2c)

10.73 g (40 mmol) Inosin werden - wie beschrieben - mit 6-Oxoheptansäureethylester umgesetzt und aufgearbeitet.

Nach Umkristallisation aus Methanol erhält man 11.5 g (68%) kristallines 2c vom Schmp. 213 - 216°C.

DC (Kieselgel, LS D): $R_F = 0.60$.

UV (Methanol): $\lambda_{\max} = 245 \text{ nm}$ ($\epsilon = 10700$).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 8.30$ (s, 4-H); 8.10 (s, 8-H); 6.08 (d, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 1'-H); 5.3 (q, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 2'-H); 4.95 (q, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 3'-H); 4.20 (m, 4'-H); 4.0 (m, $\text{CH}_2\text{-Ester}$); 3.5 (d, $J = 5 \text{ Hz}$, 5'-H); um 2.2 und 1.65 (m, aliphatisches CH_2); 1.30 (s, $\text{CH}_3\text{-Acetal}$); 1.15 ppm (t, $\text{CH}_3\text{-Ester}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 172.8$ (C=O); 156.5 (C-6); 147.7 (C-2); 146.0 (C-4); 138.7 (C-8); 124.4 (C-5); 114.7 (C-Acetal); 89.5 (C-1'); 86.8 (C-4'); 84.2 (C-2'); 81.1 (C-3'); 61.5 (C-5'); 59.7 (O- CH_2); 38.9 ($\gamma\text{-CH}_2$); 33.5 ($\alpha\text{-CH}_2$); 24.6 ($\delta\text{-CH}_2$); 23.4 ($\text{CH}_3\text{-Acetal}$); 22.8 ($\beta\text{-CH}_2$); 14.3 ppm ($\text{CH}_3\text{-Ester}$).

$C_{19}H_{26}N_4O_7$ (422.45) Ber. C 54.02 H 6.30 N 13.26

Gef. C 54.03 H 6.48 N 13.33.

0-2',3'-[1-(4-Carboxybutyl)ethyliden]-inosin (3c)

Alkalische Hydrolyse von 3.0 g (7.1 mmol) 2c unter 3a - Bedingungen ergeben 1.7 g (61%) kristallines 3c, das nach Umkristallisation aus Wasser bei 162 - 164°C schmilzt.

DC (Kieselgel, LS C): $R_f = 0.44$.

UV (methanol): $\lambda_{\max} = 245 \text{ nm}$ ($\epsilon = 10100$).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 8.29$ (s, 4-H); 8.08 (s, 8-H); 6.10 (d, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 1'-H); 5.32 (q, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 2'-H); 4.96 (q, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 3'-H); 4.18 (m, 4'-H); 3.53 (d, $J = 5 \text{ Hz}$, 5'-H); 2.22 und 1.55 (m, aliphatisches CH_2); 1.30 ppm (s, CH_3 -Acetal).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 172.8$ (C=O); 156.6 (C-6); 147.8 (C-2); 146.1 (C-4); 138.8 (C-8); 124.4 (C-5); 114.6 (C-Acetal); 89.5 (C-1'); 86.8 (C-4'); 84.1 (C-2'); 81.1 (C-3'); 61.4 (C-5'); 59.5 (O- CH_2); 38.9 (δ - CH_2); 33.4 (α - CH_2); 24.5 (γ - CH_2); 23.5 (CH_3 -Acetal); 22.7 ppm (β - CH_2).

$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_7$ (394.40) Ber. C 51.90 H 5.89 N 17.80

Gef. C 52.00 H 5.95 N 17.89.

0-2',3'-[1-(2-Ethoxycarbonyl)ethyliden]-tubercidin (11a)

2.0 g (7.51 mmol) Tubercidin werden mit 2.5 ml (15 mmol) Lävulinsäureethylester und 1.85 ml (11.2 mmol) Ortho-ameisensäuretriethylester sowie 2.4 ml 7M Chlorwasserstoff in p-Dioxan umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhält 2.4 g (81.6%) farbloses, glasiges 11a.

DC (Kieselgel, LS C): $R_f = 0.25$ (Tubercidin, $R_f = 0.76$).

UV (Methanol): $\lambda_{\max} = 271 \text{ nm}$ ($\epsilon = 11600$).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ = 8.60 (s, 2-H); 7.35 (d, J = 3.5 Hz, 6-H); 7.05 (s, NH_2); 6.60 (d, J = 3.5 Hz, 5-H); 6.18 (d, J = 3 Hz, 1'-H); 5.25 (q, 2'-H); 4.95 (q, 3'-H); 4.20 (q, 4'-H); 4.03 (m, CH_2 -Ester); 3.50 (t, 5'-H); 2.30 (m, aliphatisches CH_2); 1.30 (s, CH_3 -Acetal); 1.25 ppm (t, J = 7.5 Hz, CH_3 -Ester).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ = 172.54 (C=O); 157.57 (C-4); 151.87 (C-2); 149.72 (C-8); 122.2 (C-6); 113.97 (C-Acetal); 102.90 (C-9); 100.03 (C-5); 88.87 (C-1'); 85.17 (C-4'); 83.44 (C-3'); 81.02 (C-2'); 61.58 (C-5'); 59.85 (O- CH_2); 33.37 (CH_2 -C=O); 28.22 (CH_2 -Acetal); 23.55 (CH_3 -Acetal); 14.00 ppm (CH_3 -Ester).

$\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_6$ (392.42) Ber. C 55.06 H 6.12 N 14.28
Gef. C 55.09 H 6.16 N 14.19.

0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-tubercidin (11b)

1g (2.55 mmol) des Esters 11a werden -wie beschrieben - alkalisch hydrolysiert und aufgearbeitet. Man erhält 850 mg (92%) farbloses, amorphes 11b.

DC (Kieselgel, LS C): R_F = 0.60.

DE (Kieselgel, LS G): R_E = + 2.4 (relativ zu Tubercidin).

UV (Methanol): λ_{max} = 272 nm (ϵ = 11900).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ = 8.05 (s, 2-H); 7.33 (d, J = 3.5 Hz, 6-H); 7.05 (s, breits, NH_2); 6.60 (d, J = 3.5 Hz, 5-H); 6.15 (d, J = 3 Hz, 1'-H); 5.20 (q, 2'-H); 4.90 (q, 3'-H); 4.60 (s, breit, OH); 4.10 (m, 4'-H); 3.50 (m, 5'-H); 2.10 (m, aliphatisches CH_2); 1.30 ppm (s, CH_3 -Acetal).

$C_{16}H_{21}N_4O_6$ (364.31) Ber. C 52.74 H 5.53 N 15.37
 Gef. C 52.90 H 5.68 N 15.14.

0-2',3'-[1-(2-Ethoxycarbonyl)ethyliden]-6-thioinosin (12a)

10 g (24.4 mmol) 6-Thioinosin werden unter 2a - Bedingungen umgesetzt. Das ölige Rohprodukt wird in n-Butanol unter Zugabe von 2 proz. wässriger $NaHCO_3$ -Lösung gelöst. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und zur Trockne eingedampft. Man erhält ein schwach gelbes Material, das aus Methanol kristallisiert wird. 6.71 g (82%) gelbliches, kristallines 12a vom Schmp. 248 - 252°C.

DC (Kieselgel, LS B): $R_f = 0.87$.

UV (Methanol): $\lambda_{max} = 325$ nm ($\epsilon = 23600$).

1H -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 8.45$ (s, 2-H); 8.10 (s, 6-H); 6.15 (d, $J = 2$ Hz, 1'-H); 5.2 (m, 2'-H); 4.95 (m, 3'-H); 4.20 (m, 4'-H); 4.0 (q, $J = 7.5$ Hz, CH_2 -Ester); 3.5 (m, 5'-H); 2.3 (m, aliphatisches CH_2); 1.35 (s, CH_3 -Acetal); 1.20 ppm (s, CH_3 -Ester).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 176.31$ (C-6); 172.44 (C=O); 145.16 (C-2); 143.41 (C-4); 141.15 (C-8); 135.57 (C-5); 113.87 (C-Acetal); 89.80 (C-1'); 87.21 (C-4'); 84.02 (C-3'); 81.29 (C-2'); 61.45 (C-5'); 59.85 (O- CH_2); 33.61 ($\underline{CH_2}$ -C=O); 28.28 (CH_2 -Acetal); 23.48 (CH_3 -Acetal); 14.00 ppm (CH_3 -Ester).

$C_{17}H_{22}N_4O_6S$ (410.46) Ber. C 49.75 H 5.40 N 13.65 S 7.81
 Gef. C 49.78 H 5.49 N 13.70 S 7.84.

0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-6-thioinosin (12b)

1.0 g (2.44 mmol) des Esters 12a werden unter 3a - Bedingungen alkalisch hydrolysiert. Das Rohprodukt wird in Wasser gelöst und nach Zugabe einiger Tropfen konzentrierten Ammoniaks (pH 10) auf einer Dowex 1 x 2 - Ionenaustauschersäule (20 x 1.5 cm, Acetat-Form) chromatographiert. Eluiert wird mit 500 ml 50 proz. Essigsäure. Man erhält 760 mg (83%) farblose Kristalle vom Schmp. 217 - 219°C.

DC (Kieselgel, LS C): $R_F = 0.57$.

DE (Kieselgel, LS G): $R_E = + 1.6$ (relativ zu 6-Thioinosin).

UV (Methanol): $\lambda_{\max} = 325 \text{ nm}$ ($\epsilon = 22400$).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 8.35$ (s, 2-H); 8.26 (s, 6-H); 6.10 (d, $J = 2 \text{ Hz}$, 1'-H); 5.40 (m, 2'-H); 4.95 (m, 3'-H); 4.20 (m, 4'-H); 3.55 (d, $J = 5 \text{ Hz}$, 5'-H); 2.20 (m, aliphatisches CH_2); 1.30 ppm (s, CH_3 -Acetal).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 180.01$ (C-6); 172.34 (C=O); 146.49 (C-2); 143.26 (C-4); 139.51 (C-8); 135.18 (C-5); 113.57 (C-Acetal); 89.26 (C-1'); 86.39 (C-4'); 82.86 (C-3'); 80.65 (C-2'); 60.98 (C-5'); 33.81 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-C=O}$); 28.944 (CH_2 -Acetal); 22.98 ppm (CH_3 -Acetal).

$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$ (382.37) Ber. C 47.12 H 4.74 N 14.65 S 8.38
Gef. C 47.27 H 4.84 N 14.63 S 8.25.

0-2',3'-[1-(2-Ethoxycarbonyl)ethyliden]-nebularin (13a)

3.0 g (7.3 mmol) des Esters 12a werden in n-Butanol gelöst und mit 5 g Raney Nickel, suspendiert in Wasser, versetzt. Die Lösung wird 2 h auf 90°C erhitzt. Anschließend wird der Katalysator abfiltriert und mit 200 ml heißem Wasser gewaschen. Die Phasen werden vereinigt, einige Minuten kräftig geschüttelt und getrennt. Nach Eindampfen der organischen Phase wird mehrmals mit Ether nachgedampft. Man erhält 1.8 g (65.2%) gelbliches, amorphes 13a

DC (Kieselgel, LS E): $R_f = 0.70$.

UV (Methanol): $\lambda_{\max} = 262 \text{ nm}$ ($\epsilon = 5800$).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 9.19$ (s, 2-H); 8.98 (s, 8-H); 8.82 (s, 6-H); 6.37 (d, $J = 2 \text{ Hz}$, 1'-H); 5.50 (m, 2'-H); 5.10 (m, 3'-H); 4.37 (m, 4'-H); 4.13 (q, CH_2 -Ester); 3.53 (d, $J = 5 \text{ Hz}$, 5'-H); 2.35 (q, aliphatisches CH_2); 1.38 (s, CH_3 -Acetal); 1.27 ppm (s, CH_3 -Ester).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 172.78$ (C=O); 152.31 (C-4); 150.82 (C-2); 148.30 (C-6); 145.58 (C-8); 134.31 (C-5); 114.04 (C-Acetal); 90.02 (C-1'); 87.42 (C-4'); 83.99 (C-3'); 81.6 (C-2'); 61.72 (C-5'); 60.10 (O- CH_2); 33.68 (CH_2 -C=O); 28.43 (CH_2 -Acetal); 23.64 (CH_3 -Acetal); 14.12 ppm (CH_3 -Ester).

$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_6$ (378.40) Ber. C 53.96 H 5.86 N 14.81

Gef. C 54.23 H 6.10 N 14.61.

0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-nebularin (13b)

Zu einer Lösung von 1 g (2.61 mmol) 12b in heißem Wasser werden 1.7 g Raney Nickel portionsweise zugefügt. Die

Suspension wird 2 h auf 90°C erhitzt, der Katalysator abfiltriert und mit 100 ml heißem Wasser gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden auf ein Volumen von 3 ml eingengt und 13b durch Zugabe einiger Tropfen Ethanol ausgefällt. Man erhält 780 mg Rohprodukt. Dies wird in 10 ml Wasser aufgenommen und auf eine Ionenaustauschersäule (Lewatit CP 3050, H⁺-Form, 1 x 25 cm) aufgetragen. Die Säure 13b wird mit Wasser eluiert und durch Eindampfen des Lösungsmittels analysenrein erhalten. 360 mg (39%) amorphes 13b

DC (Kieselgel, LS C): R_F = 0.38.

DE (Kieselgel, LS G): R_E = + 1.57 (relativ zu Nebularin).

UV (Methanol): λ_{max} = 261 nm (ε = 5500).

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 9.17 (s, 2-H); 8.97 (s, 8-H); 8.77 (s, 6-H); 6.30 (d, J = 2.5 Hz, 1'-H); 5.53 (q, J = 2.5 Hz, 2'-H); 5.0 (q, J = 2.5 Hz, 3'-H); 4.24 (q, J = 2.5 Hz, 4'-H); 3.68 (s, breit, OH); 3.56 (t, J = 5.5 Hz, 5'-H); 2.24 (q, J = 9 Hz, aliphatisches CH₂); 1.34 ppm (s, CH₃-Acetal).

IR (cm⁻¹): 1565, 1380 (COO⁻); 1280 (C=O); 885 (OH, wagging).

C₁₅H₁₈N₄O₆ (360.34) Ber. C 51.42 H 5.18 N 15.99

Gef. C 51.33 H 5.30 N 15.91.

0-2',3'-[1-(2-Ethoxycarbonyl)ethyliden]-xanthosin (21a)

5.7 g (20 mmol) Xanthosin* werden in 100 ml trockenem Dimethylformamid suspendiert und mit 5.76 g (40 mmol) Läv-

* 24 bei 50°C im Hochvakuum getrocknet

linsäureethylester, 5 ml (30 mmol) Orthoameisensäuretriethylester und 10 ml 7M Chlorwasserstoff in p-Dioxan versetzt. Die Mischung wird 24 h bei Raumtemperatur aufbewahrt und dann in 1 l trockenen Ether gegossen. Das sich abscheidende Öl wird mit 200 ml trockenem Ether gewaschen und zur Trockne eingedampft. Zurückbleibendes Öl wird mit Ethylacetat versetzt, worauf die Kristallisation einsetzt. Zur Umkristallisation löst man in wenig Methanol und fügt bis zur Kristallisation Ethylacetat hinzu. Man erhält 3.83 g (48%) farblose Nadeln vom Schmp. 198 - 200°C.

DC (Kieselgel, LS E): $R_F = 0.81$.

UV (Methanol): $\lambda_{\max} = 241, 257 \text{ nm}$ ($\epsilon = 7600, 8100$).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 7.95$ (s, 8-H); 6.02 (d, $J = 3 \text{ Hz}$, 1'-H); 5.05 (q, 2'- und 3'-H); um 4.1 (m, CH_2 -Ester); 4.06 (q, $J = 7 \text{ Hz}$, 4'-H); 3.50 (d, $J = 4.0 \text{ Hz}$, 5'-H); um 2.3 (m, CH_2 -C=O); um 2.1 (m, CH_2 -Acetal); 1.35 (s, CH_3 -Acetal); 1.20 ppm (s, CH_3 -Ester).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 172.58$ (C=O); 157.82 (C-2); 150.63 (C-4); 139.88 (C-6); 134.70 (C-8); 115.98 (C-5); 114.17 (C-Acetal); 89.24 (C-1'); 85.81 (C-4'); 83.09 (C-3'); 80.82 (C-2'); 61.13 (C-5'); 59.84 (O- CH_2); 28.24 (CH_2 -Acetal); 23.39 (CH_3 -Acetal); 13.99 ppm (CH_3 -Ester).

$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_8$ (410.40)	Ber.	C 49.75	H 5.40	N 13.50
	Gef.	C 49.66	H 5.38	N 13.48.

0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-xanthosin (21b)

2.0 g (5.02 mmol) des Esters 21a werden in 60 ml Ethanol/1N NaOH (1:1, v/v) gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zusatz von Kationenaustauscher Amberlit IR 120 (H⁺-Form) wird an der Glaselektrode neutralisiert. Nach Abfiltrieren und Waschen des Ionenaustauschers wird zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 50 ml Wasser aufgenommen und mit einer konz. Ammoniaklösung auf pH 10 eingestellt. Die Lösung wird auf eine Dowex-1 x 2 Anionenaustauschersäule (Acetat-Form, 30 x 1.5 cm) aufgetragen. Elution mit einem linearen Gradienten aus 500 ml Wasser/ 500 ml 0.5N Essigsäure ergibt eine Hauptzone, aus der nach Eindampfen 1.28 g (64%) glasiges Produkt erhalten wird.

DC (Kieselgel, LS C): R_F = 0.63.

UV (Methanol): λ_{\max} = 253 nm (ϵ = 7800).

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 7.02 (s, 8-H); 6.55 (d, J = 3 Hz, 1'-H); 5.1 (m, 2'- und 3'-H); 4.3 (m, 4'-H); 3.56 (d, J = 3 Hz, 5'-H); um 2.3 (m, aliphatisches CH₂); 1.35 ppm (s, CH₃-Acetal).

C₁₅H₁₈N₄O₈ (382.35) Ber. C 47.12 H 4.75 N 14.65

Gef. C 47.42 H 4.92 N 14.91.

0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-xanthosin-0-5'-monophosphat (22b)

410 mg (1 mmol) des Esters 21a werden - wie für 7b beschrieben - mit POCl₃ phosphoryliert und aufgearbeitet. 4080 E₂₅₇-Einheiten (50.4%) farbloses, amorphes 22b.

DC (Kieselgel, LS B): $R_F = 0.78$.

Phosphatbestimmungen: a) Abbau mit alkalischer Phosphatase ergibt ausschließlich 21b als Reaktionsprodukt. b) 0.52 E_{257} -Einheiten (0.064 μmol) ergeben 1.44 E_{820} -Einheiten des Molybdänblau-Kolloides, entsprechend 0.06 μmol Phosphat.

0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-cytidin (23b)

1.0 g (2.46 mmol) des Hydrochlorides des Esters (23a)²⁹ werden unter 21b - Bedingungen alkalisch hydrolysiert und aufgearbeitet. Nach Chromatographie an Dowex 1 x 2 (Acetat-Form) läßt sich eine Zone isolieren, aus der nach Abdampfen 600 mg (71.4%) glasiges 23b erhalten werden.

DC (Kieselgel, LS C): $R_F = 0.50$.

DE (Kieselgel, LS G): $R_E = + 3.0$ (relativ zu Cytidin).

UV (Methanol): $\lambda_{\text{max}} = 235, 269 \text{ nm}$ ($\epsilon = 7200, 7500$).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 7.70$ (d, $J = 7 \text{ Hz}$, 6-H); 7.28 (s, breit, NH_2); 5.70 (d, $J = 7 \text{ Hz}$, 5-H); 5.57 (d, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 1'-H); um 4.9 (m, 2'- und 3'-H); um 4.0 (m, 4'-H); um 3.6 (m, 5'-H); um 2.3 (m, $\text{CH}_2\text{-C=O}$); um 2.0 (m, $\text{CH}_2\text{-Acetal}$); 1.27 ppm (s, $\text{CH}_3\text{-Acetal}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 174.0$ (C=O); 165.8 (C-2); 154.7 (C-4); 143.1 (C-6); 113.6 (C-Acetal); 94.1 (C-5); 92.9 (C-1'); 86.7 (C-4'); 84.2 (C-3'); 80.7 (C-2'); 61.5 (C-5'); 33.8 ($\text{CH}_2\text{-C=O}$); 28.3 ($\text{CH}_2\text{-Acetal}$); 23.6 ppm ($\text{CH}_3\text{-Acetal}$).

$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7$ (341.33) Ber. C 49.26 H 5.61 N 12.31
Gef. C 49.05 H 5.50 N 12.25.

0-2',3'-[1-(2-Ethoxycarbonylethyl)ethyliden]-uridin (24a)

4.88 g (20 mmol) Uridin werden in 75 ml trockenem Dimethylformamid suspendiert und mit 5.7 g (40 mmol) Lävulinsäure-ethylester, 5 ml Orthoameisensäuretriethylester und 10 ml 7M Chlorwasserstoff in p-Dioxan versetzt. Die Mischung wird 24 h bei Raumtemperatur belassen und dann in 500 ml trockenen Ether gegossen. Das sich abscheidende Öl wird mit 200 ml trockenem Ether gewaschen, in Chloroform unter Zugabe von einigen Millilitern 2 proz. wässriger NaHCO_3 -Lösung gelöst, die organische Phase mit Wasser gewaschen und zur Trockene eingedampft. Das Produkt fällt als leicht braunes Öl an, das sich durch häufiges Nachdampfen mit Aceton zum Aufschäumen bringen läßt. Man erhält 5.92 g (80%) glasiges, gelbliches 24a.

DC (Kieselgel, LS C): $R_F = 0.41$.

UV (Methanol): $\lambda_{\max} = 261 \text{ nm}$ ($\epsilon = 9600$).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 7.45$ (d, $J = 7 \text{ Hz}$, 6-H); 5.72 (d, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 1'-H); 5.38 (d, $J = 7 \text{ Hz}$, 5-H); um 4.8 (m, 2'- und 3'-H); um 4.1 (m, 4'-H); 4.07 (q, $J = 7 \text{ Hz}$, CH_2 -Ester); 3.55 (d, 5'-H); um 2.2 (m, O- CH_2); um 2.0 (m, CH_2 -Acetal); 1.28 (s, CH_3 -Acetal); 1.20 ppm (t, $J = 7 \text{ Hz}$, CH_3 -Ester).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 172.6$ (C=O); 163.2 (C-4); 150.4 (C-2); 142.0 (C-6); 113.8 (C-Acetal); 101.7 (C-5); 91.1 (C-1'); 86.5 (C-4'); 83.8 (C-3'); 80.5 (C-2'); 61.3 (C-5'); 59.9 (O- CH_2); 33.4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -C=O); 28.2 (CH_2 -Acetal); 23.6 (CH_3 -Acetal); 14.0 ppm (CH_3 -Ester).

$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_8$ (370.37) Ber. C 51.89 H 5.99 N 7.56

Gef. C 51.99 H 6.16 N 7.54.

0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-uridin (24b)

1.0 g (2.7 mmol) des Esters 24a werden - wie für 21b beschrieben - alkalisch hydrolysiert und aufgearbeitet.

591 mg (64%) farbloses, glasiges 24b.

DC (Kieselgel, LS C): $R_F = 0.62$.

DE (Kieselgel, LS G): $R_E = + 3.0$ (relativ zu Uridin).

UV (Methanol): $\lambda_{\max} = 261 \text{ nm}$ ($\epsilon = 8700$).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 7.77$ (d, $J = 7 \text{ Hz}$, 6-H); 5.65 (d, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 1'-H); 5.43 (d, $J = 7 \text{ Hz}$, 5-H); um 4.8 (m, 2'- und 3'-H); 4.10 (m, 4'-H); 3.55 (m, 5'-H); um 2.2 (m, $\underline{\text{CH}_2\text{-C=O}}$); um 2.0 (m, $\text{CH}_2\text{-Acetal}$); 1.25 ppm (s, $\text{CH}_3\text{-Acetal}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 174.1$ (C=O); 163.1 (C-4); 150.3 (C-2); 142.0 (C-6); 113.9 (C-Acetal); 101.7 (C-5); 91.1 (C-1'); 86.5 (C-4'); 83.7 (C-3'); 80.5 (C-2'); 61.3 (C-5'); 32.8 ($\underline{\text{CH}_2\text{-C=O}}$); 28.2 ($\text{CH}_2\text{-Acetal}$); 23.6 ppm ($\text{CH}_3\text{-Acetal}$).

$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_8$ (342.31)	Ber.	C 49.12	H 5.30	N 8.18
	Gef.	C 49.23	H 5.48	N 8.22.

0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-uridin-0-5'-monophosphat (26)

370 mg (1 mmol) des Esters 24a werden - wie für 7b beschrieben - phosphoryliert und aufgearbeitet. 120 mg (32%) farbloses, amorphes 26.

DC (Kieselgel, LS C): $R_F = 0.60$; DC (PEI-Cellulose, LS C): $R_F = 0.57$.

Phosphatbestimmungen: a) Abbau mit alkalischer Phosphatase ergibt ausschließlich 24b als Reaktionsprodukt. b) 0.348 E₂₆₁₋

Einheiten ($0.04 \mu\text{mol}$)* ergeben $1.08 E_{820}$ -Einheiten des Molybdänblau-Kolloides, entsprechend $0.045 \mu\text{mol}$ Phosphat.

0-2',3'-[1-(2-Ethoxycarbonylethyl)ethyliden]-6-azauridin (25a)

Zu einer Suspension von 5 g (20.4 mmol) 6-Azauridin in trockenem Dimethylformamid (70 ml) werden 6.25 ml (40 mmol) Lävulinsäureethylester und 4.64 ml (30 mmol) Orthoameisensäuretriethylester zugefügt und die Mischung im Eisbad abgekühlt. Das unlösliche Material wird durch Zugabe von 8.5 ml 7M Chlorwasserstoff in p-Dioxan gelöst und die Mischung 72 h bei 4°C aufbewahrt. Der Fortgang der Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Die Mischung wird in 750 ml trockenen Ether gegossen und das sich abscheidende ölige Produkt zweimal mit Ether gewaschen. Anschließend löst man in Chloroform unter Zugabe von 2 proz. wässriger NaHCO_3 -Lösung, wäscht die organische Phase mit Wasser und dampft das Lösungsmittel ab. Man erhält ein farbloses, schweres Öl, das sich auch durch häufiges Nachdampfen mit Aceton oder Ether nicht zum Aufschäumen bringen läßt. Nach mehrtägigem Trocknen im Exsiccator erhält 3.42 (46%) farbloses 25a.

DC (Kieselgel, LS C): $R_F = 0.58$.

UV (Methanol): $\lambda_{\text{max}} = 263 \text{ nm}$ ($\epsilon = 4800$).

* $\epsilon = 8700$

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ = 172.58 (C=O); 156.59 (C-4); 147.97 (C-2); 136.32 (C-5); 113.13 (C-Acetal); 90.92 (C-1'); 87.94 (C-4'); 83.15 (C-3'); 81.73 (C-2'); 61.97 (C-5'); 59.84 (O-CH₂); 33.29 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-C=O}$); 28.04 (CH₂-Acetal); 23.44 (CH₃-Acetal); 13.99 ppm (CH₃-Ester).

$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_8$ (371.36) Ber. C 48.52 H 5.70 N 11.32
Gef. C 48.88 H 5.91 N 11.53.

0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-6-azauridin (25b)

1.0 g (2.7 mmol) des Esters 25a werden unter 21b - Bedingungen alkalisch hydrolysiert und aufgearbeitet. 600 mg (65%) farbloses, amorphes 25b.

DC (Kieselgel, LS C): R_F = 0.70.

DE (Kieselgel, LS G): R_E = + 1.7 (relativ zu 6-Azauridin).

UV (Methanol): λ_{max} = 264 nm (ϵ = 4500).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ = 174.07 (C=O); 156.52 (C-4); 147.91 (C-2); 136.25 (C-5); 113.20 (C-Acetal); 90.86 (C-1'); 87.94 (C-4'); 83.02 (C-3'); 81.66 (C-2'); 61.91 (C-5'); 33.48 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-C=O}$); 28.11 (CH₂-Acetal); 23.38 ppm (CH₃-Acetal).

$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_8$ (343.3) Ber. C 45.48 H 4.99 N 12.24
Gef. C 45.26 H 5.28 N 12.11.

0-2',3'-[1-(2-Carboxyethyl)ethyliden]-6-azauridin-0-5'-mono-phosphat (27)

370 mg (1 mmol) des Esters 25a werden - wie für 7b beschrieben - mit POCl_3 phosphoryliert und aufgearbeitet. Man erhält

6700 E_{264} -Einheiten (32%)* farbloses, glasiges 27.

DC (Kieselgel, LS C): $R_F = 0.60$; DC (PEI-Cellulose, LS C):
 $R_F = 0.54$.

Phosphatbestimmungen: a) Abbau mit alkalischer Phosphatase ergibt ausschließlich 25b als Reaktionsprodukt. b) 0.335 E_{264} -Einheiten (0.056 μmol) ergeben 0.152 E_{820} -Einheiten des Molybdänblau-Kolloides, entsprechend 0.06 μmol Phosphat.

6-Oxoheptansäure (6-Ketoönanthsäure)

12.6 g (0.1 mol) 1-Acetylcyclopentanon werden 3 h mit 100 ml 5 proz. wässriger NaOH-Lösung gekocht. Nach Abkühlen wird das Gemisch in 300 ml Wasser gelöst und tropfenweise mit so viel konz. Salzsäure versetzt, daß sie gerade noch alkalisch reagiert. Es wird mit Ether extrahiert, und die wässrige Phase mit konz. Salzsäure stark angesäuert. Man extrahiert mit Chloroform und destilliert im Ölpumpenvakuum nach Vertreibung des Lösungsmittels. Farbloser Festkörper, Sdp., 123°C, Schmp. 35°C, Ausbeute 6.62 g (55%).

6-Oxoheptansäureethylester

6.02 g (0.05 mol) 6-Oxoheptansäure und 0.25 mol Ethanol werden mit trockenem Chlorwasserstoffgas gesättigt und die Mischung 10 h unter Rückfluß gekocht. Die Hauptmenge des überschüssigen Alkohols wird über eine 20 cm Vigreux-Kolonnen

* $\epsilon = 6100$

abdestilliert und der Destillationsrückstand in die fünf-
fache Menge Eiswasser gegeben. Man trennt die organische
Phase ab und extrahiert die wässrige Phase dreimal mit
Ether. Die vereinigten organischen Phasen werden mit konz.
Sodalösung entsäuert, über CaCl_2 getrocknet und anschlies-
send im Ölpumpenvakuum fraktioniert. 6.47 g (75%) farblose
Flüssigkeit, Sdp.₁₄: 117 - 122°C, $n_D^{25} = 1.4306$ (Lit.³⁷ Sdp.₁₄:
117 - 122°C, $n_D^{25} = 1.4305$).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 208.07$ (C-6); 172.78 (C-1); 59.64
(O- CH_2); 42.41 (C-5); 33.42 (C-2); 29.59 (C-7); 24.09 (C-4);
22.75 (C-3); 14.12 ppm (CH_3 -Ester).

5-Oxohexansäureethylester

20 g (154 mmol) 5-Oxohexansäure werden - wie beschrieben -
verestert. 16.8 g (69%) farblose Flüssigkeit vom Sdp.₁₂:
110 - 115°C (Lit.³⁷ Sdp.₁₂: 110 - 115°C), $n_D^{23} = 1.4265$.

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): $\delta = 207.75$ (C-5); 172.58 (C-1); 59.71
(O- CH_2); 41.12 (C-2); 32.77 (C-4); 29.59 (C-6); 18.72 (C-3);
14.12 ppm (CH_3 -Ester).

4,4-Diethoxypentansäureethylester

144 g (1 mol) Lävulinsäureethylester werden mit 183 g (1.1 mol)
Orthoameisensäuretriethylester und 36 g (1 mol) wasserfreiem
Ethanol sowie 10 Tropfen konz. Schwefelsäure versetzt und über
Nacht stehen gelassen. Anschließend neutralisiert man mit
3 ml Triethanolamin und dampft den entstandenen Ameisen-
säureethylester sowie überschüssiges Ethanol am Wasserbad ab.

Der Rückstand wird im Ölpumpenvakuum destilliert. 76.5 g (83%) einer farblosen, aromatisch riechenden Flüssigkeit, Sdp.₇: 98 - 100°C, Sdp._{0.5}: 70 - 71°C (Lit.⁴⁰ Sdp.₇: 98 - 100°C); $n_D^{25} = 1.4219$.

¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ = 172.84 (C-1); 100.70 (C-4); 60.03 (CH₂-Ester); 55.43 (2 x O-CH₂-Acetal); 32.51 (C-2); 29.53 (C-3); 21.82 (C-5); 14.25 ppm (CH₃-Ester).

5,5-Diethoxyhexansäureethylester

8.3 g (52.4 mmol) 4-Acetylbuttersäureethylester, 8.5 ml (51 mmol) Orthoameisensäuretriethylester, 3.6 ml (100 mmol) wasserfreies Ethanol sowie 5 Tropfen konz. Schwefelsäure werden - wie für 4,4-Diethoxypentansäureethylester beschrieben - umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhält 4.1 g (80%) einer farblosen, aromatisch riechenden Flüssigkeit, Sdp._{0.8}: 78 - 80°C, $n_D^{23} = 1.4261$.

¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ = 172.84 (C-1); 101.02 (C-5); 59.84 (CH₂-Ester); 55.17 (2 x O-CH₂-Acetal); 33.94 (C-2); 33.09 (C-3); 19.88 (C-6); 19.04 (C-4); 15.48 (2 x CH₃-Acetal); 14.25 ppm (CH₃-Ester).

Darstellung von 2a durch Umacetalisierung

1.0 g (3.7 mmol) Inosin werden in 30 ml Dimethylformamid suspendiert und mit 4.5 g (20 mmol) 4,4-Diethoxypentansäureethylester sowie 0.5 ml 7M Chlorwasserstoff in p-Dioxan versetzt. Nach 2 h und 24 h wird der Reaktionsmischung

eine Probe entnommen und dünnschichtchromatographisch (Kieselgel, LS C) mit Inosin und 2a verglichen (Abb. 3). Nach 24 h bei Raumtemperatur ist die Umsetzung vollständig, und die Reaktionsmischung kann - wie für 2a beschrieben - aufgearbeitet werden. 880 mg 2a (59.5%), physikalische Daten entsprechen denen auf S. 98.

Eine Verseifung von 2a mit 1N NaOH aq führt zur Säure 3a, was dünnschichtchromatographisch (Kieselgel, LS D) nachgewiesen werden kann (Abb. 3).

Darstellung von 2b durch Umacetalisierung

1.0 g (3.7 mmol) Inosin werden - wie für 2a beschrieben - mit 4.5 g (20 mmol) 5,5-Diethoxyhexansäureethylester umgesetzt und aufgearbeitet. Hier ist die Reaktion nach 5 h vollständig. Eine Verseifung des Produktes mit 1N NaOH aq führt auch hier zur Säure 3b, was dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden kann (Kieselgel, LS D). Man erhält 2b in 60 proz. Ausbeute (915 mg), die physikalischen Daten entsprechen denen auf S.101.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Kupplung der 0-2',3'-Ethyldennucleosid-Derivate und deren 5'-Phosphate mit 6-Aminohexylagarose

0.1 bis 1 mmol der Säuren 3a-c, 6a-c, 7b,d, 11b-13b, 21b, 23b, 24b, 26 und 27 (s. Tab. 7) werden in 20 ml Wasser/Dioxan (7:3, v/v) gelöst, wenn erforderlich, unter leichtem

Erwärmen. Die Lösungen werden mit Mengen zwischen 5 und 20 g feuchter 6-Aminoheylagarose (s. Tab. 7) versetzt. Die Suspension wird 10 min. geschüttelt und dann mit 200 mg (1 mmol) N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid (EDC) in der Kälte versetzt. Man schüttelt über Nacht an einem Schwenkschüttler, filtriert und wäscht mit je 250 ml Wasser/Dioxan (7:3), 0.1 M NaHCO₃, 0.01 M Salzsäure, 0.5 M NaCl und Wasser. Man erhält die farblosen Agarose-Derivate.

Ligandenbestimmung der Nucleosidgele

Gleiche Mengen der feuchten Gele 16a-c, 17a-c, 18-20, 21c, 32 und 33 (500 mg), sowie feuchte 6-Aminoheylagarose (Blindwert) werden bei 95°C im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (ca. 72 h). Von diesen Proben werden jeweils gleiche Mengen und eine definierte Menge der Acetale 6a-c, 3a-c, 11b-13b, 21b, 23b und 24b in je 5 ml 1N Salzsäure genau 30 min bei 100°C hydrolysiert. Anschließend werden die Extinktionen beim jeweiligen λ_{\max} des zugehörigen Nucleosides in 1-cm-Quarzküvetten bestimmt. Durch Differenzbildung aus $E_{\text{Gel}} - E_{\text{AH-Agarose}}$ und Vergleich mit der Extinktion des jeweiligen Ligandenhydrolysates erhält man die Ligandenkonzentration (s. Tab. 7).

Ligandenbestimmung der Nucleotidgele

500 mg der Gele 16d, 17d, 34 und 35 werden bei 95°C bis zur Gewichtskonstanz im Vakuum getrocknet, wobei das Gel

ca. 96% seines Gewichtes verliert. Eine definierte Menge des Harzes wird in 0.5 ml Wasser gequollen und anschließend mit 1.5 ml 10 proz. $Mg(NO_3)_2$ -Lösung in Ethanol/Wasser (1:1, v/v) versetzt. Die Lösung wird in einem Duran-Testrohr verascht, und der Rückstand mit 7.5 ml 1N Salzsäure 30 min bei 100°C hydrolysiert. Ein Aliquot dieser Lösung (300 μ l) wird mit 700 μ l einer frisch bereiteten Mischung (1:6, v/v) aus einer 10 proz. wässrigen L-Ascorbinsäure-Lösung und einer 0.42 proz. Ammoniummolybdat ($x 4 H_2O$)-Lösung in 0.5M Schwefelsäure versetzt. Die Lösung wird 1 h bei 37°C inkubiert, und anschließend die Extinktion bei 820 nm (Küvettdicke 1 cm) bestimmt. Mit der Äquivalenz 1 μ mol Phosphat = 24 E_{820} -Einheiten läßt sich die Ligandenkonzentration berechnen (s. Tab. 7).

Enzymatische Desaminierung der Polymere 16a bis c

Eine 0.5-mm-Quarzküvette (Helma, 170 μ l Inhalt) wird mit einer Suspension der Polymere 16a, 16b bzw. 16c in Sörensen Phosphatpuffer (1/15 M, pH 7.6) gefüllt und mit 2.5×10^{-2} units (5 μ l) Adenosin Desaminase versetzt. Nach dem Absitzen des Geles (ca. 3/4 Füllhöhe) wird zwischen der 10. und 60. Minute der Extinktionsabfall bei 260 nm bestimmt und die Steigungen der linearen Bereiche miteinander verglichen (s. Tab. 2).

Wertetabelle 7

Gel	Ansatz		Ligandenkonzentrationsbestimmung				Gel	Extinktion		C Ligand ($\mu\text{mol/g}$)
	Ligandenmenge (mg)	AH-Agarose (ml)	Reaktions- volumen (ml)	Gel (mg)	AH-Agarose (mg)	Ligand (mol)		Gel AH-Agarose	Ligand	
16a	50	5	10	9.3	9.3	10.02	0.717	0.422	1.67	190.2
16b	50	5	10	12.3	12.3	9.96	0.655	0.309	2.19	160.0
16c	50	5	10	11.5	11.5	8.50	0.515	0.345	1.86	165.4
17a	146	10	20	5.8	5.8	1.25	0.370	0.020	0.34	215.0
17b	400	20	20	12.7	12.7	1.71	0.728	0.440	0.41	240.0
17c	400	20	20	12.7	12.7	1.94	0.599	0.440	0.54	100.0
18	54.6	5	10	9.5	9.5	10.0	0.698	0.415	1.51	202.0
19	54.5	5	10	9.0	9.0	10.0	0.505	0.380	1.10	126.0
20	54.5	5	10	9.0	9.0	10.0	0.725	0.585	0.89	176.0
21c	50	5	10	6.0	6.0	1.25	0.340	0.173	0.17	200.0
32	50	5	10	8.4	8.4	2.83	0.624	0.505	0.25	166.0
33	51	5	10	8.4	8.4	10.20	0.578	0.463	0.75	189.0
16d	89.2	5	10	3.8	-	-	0.680	-	-	184.4
17d	67.1	5	10	3.8	-	-	0.822	-	-	223.0
34	42.2	5	10	14.3	-	-	1.270	-	-	124.0
35	8.5	5	10	14.3	-	-	0.254	-	-	26.0

Inhibition von Adenosin Desaminase

Jeweils 100 μ l einer Adenosin-Stammlösung, die 0.1 μ mol Adenosin enthält, wird entweder direkt mit Sörensen-Phosphatpuffer (1/15 M, pH 7.6) auf 1 ml aufgefüllt oder nach Zusatz von 100 μ l der Inhibitor-Stammlösung, welche je nach Inhibitor zwischen 0.1 und 1 μ mol enthält, auf 1 ml verdünnt. Man versetzt mit 2.5×10^{-2} units (5 μ l) Adenosin Desaminase in Phosphatpuffer und verfolgt die Abnahme von E_{260} in einer 1-cm-Quarzküvette. Die negative Steigung des linearen Bereiches (1. bis 2. Minute) der Messung ohne Inhibitor wird willkürlich gleich 100% gesetzt. Die Anfangssteigungen der Inhibitorversuche bezogen auf Adenosin sind in Tab. 3 aufgeführt.

Inhibition von Orotidin-5'-monophosphat Decarboxylase durch 27

Die relative Anfangsgeschwindigkeit der Decarboxylierungsreaktion von OMP durch OMP-DC in Anwesenheit von 27 wird ebenfalls optisch bestimmt. Dabei werden folgende Mengen eingesetzt: 0.1 μ mol OMP, 0.1 bzw. 0.73 μ mol 27, 10^{-3} units OMP-DC, Gesamtvolumen 1 ml Sörensen-Phosphatpuffer (1/15 M, pH 7.6). Der Verbrauch von OMP bei Raumtemperatur wird bei 285 nm 10 min lang gemessen. Die Steigung zwischen der 1. und 2. Minute wird als Anfangsgeschwindigkeit definiert und für eine Messung ohne Inhibitor gleich 100% gesetzt. Bei einem molaren Verhältnis Substrat/Inhibitor wie 1:1 beträgt der Wert 85%, bei einem molaren Verhältnis 1:7.3 beträgt er nur noch 35%.

Inhibition von Guanase sowie Xanthin Oxydase durch Xanthosin- und Guanosin-Derivate

Die Inhibition von Guanase und Xanthin Oxydase durch Xanthosin- und Guanosin-Derivate kann ebenfalls optisch bestimmt werden. Bei den Versuchen mit Guanase werden folgende Mengen eingesetzt: $0.1 \mu\text{mol}$ Guanin, $0.85 \mu\text{mol}$ Inhibitor, 5×10^{-3} units Guanase, Gesamtvolumen 1 ml Sörensen-Phosphatpuffer ($1/15 \text{ M}$, $\text{pH } 7.6$). Der Extinktionsabfall wird bei 246 nm verfolgt. Bei den Versuchen mit Xanthin Oxydase werden folgende Mengen eingesetzt: $0.1 \mu\text{mol}$ Xanthin, $1.6 \mu\text{mol}$ Inhibitor, 2×10^{-3} units Xanthin Oxydase ($5 \mu\text{l}$), Gesamtvolumen 1 ml Sörensen-Phosphatpuffer ($1/15 \text{ M}$, $\text{pH } 7.6$). Der Extinktionsabfall wird bei 267 nm verfolgt.

Die Ergebnisse beider Versuchsreihen sind in Tab. 4 aufgeführt.

Affinitätschromatographie von Adenosin Desaminase an den Polymeren 17a-c, 16a, 18 und 20 - Unspezifische Elution

Die Gele 17a-c, 16a, 18 und 20 werden sorgfältig mit Wasser gewaschen und 30 min entgast. Sie werden jeweils in eine thermostatierbare Säule ($20 \times 0.9 \text{ cm}$) eingefüllt und mit entgastem Sörensen-Phosphatpuffer ($1/15 \text{ M}$, $\text{pH } 7.6$) äquilibriert (drei Totvolumina). Angeschlossen an die Säule ist eine Leitfähigkeitsmeßzelle (Zellkonstante 12.6 cm^{-1} , WTW Instrumente, Weinheim). Die Fraktionierung erfolgt mittels eines UltraRac Fraktionssammlers (LKB, Schweden)

nach Extinktionsmessung mit einem Uvicord III Durchfluß-photometer (LKB, Schweden) bei 254 und 278 nm jeweils gegen eine Blindlösung. Durchflußgeschwindigkeiten werden mit einer Vario-Perpex-Pumpe (LKB, Schweden) fest eingestellt. Beide Extinktionssignale sowie das Leitfähigkeitssignal werden auf einem 6-Kanal-Schreiber (LKB, Schweden) kontinuierlich aufgezeichnet.

Für jeden chromatographischen Versuch werden 0.2 E₂₇₈-Einheiten Adenosin Desaminase (100 µl = 0.5 mg) auf die jeweilige Säule aufgegeben, wobei die Temperatur mittels eines Thermostaten auf 25°C festgelegt wird.

Zur Bestimmung der minimalen NaCl-Desorptionskonzentration, die zur Elution des Enzyms vom jeweiligen Gel erforderlich ist, eluiert man stufenweise in 0.05M NaCl-Schritten mit 2-ml-Fraktionierung. Unterhalb der Desorptionskonzentration kann das Enzym nicht innerhalb von 35 Totvolumina eluiert werden. Oberhalb der Desorptionskonzentration bricht es quantitativ mit dem ersten Totvolumen durch. Die minimalen NaCl-Desorptionskonzentrationen für die verschiedenen Gele sind in Tab. 8 aufgeführt.

Gel	minimale NaCl-Desorptionskonzentration (mM)	K _M bzw. K _I der Nucleosidliganden
<u>18</u>	150	-
<u>17a</u>	300	16 x 10 ⁻⁵ M
<u>16a</u>	900	3.1 x 10 ⁻⁵ M
<u>20</u>	1400	0.88 x 10 ⁻⁵ M
<u>17b</u>	200	-
<u>17c</u>	200	-

Tab. 8: Minimale Desorptionskonzentrationen (NaCl) der Affinitätsgele 18, 17a-c, 16a und 20 sowie K_M/K_I der jeweiligen Nucleosidliganden.

Zur Bestimmung der Durchbruchskapazität für das Polymer 17a werden 0.8 E_{278} -Einheiten Adenosin Desaminase auf eine Säule (20 x 0.9 cm) mit äquilibriertem 17a aufgegeben (25°C, Durchflußgeschwindigkeit: 80 ml/h). 0.1 E_{278} -Einheit Adenosin Desaminase wird dabei bereits mit dem Totvolumen des Aufgabepuffers (Sörensen, 1/15 M, pH 7.6) eluiert. Bei Elution mit 0.5M NaCl werden 0.705 E_{278} -Einheiten eluiert. Daraus läßt sich die Säulenkapazität zu 337 µg ADA/g Gel 17a (10.9 nmol/g 17a) errechnen.

Auf entsprechende Weise läßt sich die Durchbruchskapazität bei 15°C zu 10.7 nmol/g 17a und bei 35°C zu 9.1 nmol/g 17a bestimmen.

0.4 E_{278} -Einheiten Adenosin Desaminase werden mit 0.4 E_{278} -Einheiten Alkohol Dehydrogenase bzw. Guanase gemischt und an 17a sowie 16a chromatographiert (Sörensen, 1/15 M, pH 7.6, 25°C, 80 ml/h). Die letzteren Enzyme werden mit einem Totvolumen des Aufgabepuffers eluiert und enthalten keine Desaminase-Aktivität, was durch Inkubation der entsprechenden Fraktionen mit Adenosin und anschließender Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, LS C) qualitativ gezeigt werden kann. Adenosin Desaminase wird von 17a mit einer 0.5M NaCl-Lösung eluiert, während es von 16a erst mit einer 1M NaCl-Lösung eluiert werden kann. Die ADA-enhaltenden Fraktionen werden gesammelt, und je 100 µl dieser Lösungen werden mit 900 µl einer Adenosin-Stamm-lösung (10 µg/ml) versetzt. Innerhalb einer Minute ist eine vollständige Umwandlung des Adenosins in Inosin erfolgt. ΔE_{265} und ΔE_{245} (vor und nach Zugabe der Enzym-lösung) betragen - 0.254 und + 0.083.

Affinitätschromatographie von Orotidin-5'-monophosphat
Decarboxylase an den Polymeren 34 und 35 - Unspezifische
Elution

Die Gele 34 bzw. 35 werden sorgfältig mit Wasser gewaschen und entgast. Anschließend werden sie in auf 10°C thermostatisierte Säulen (10 x 0.9 cm) eingefüllt und mit entgastem Sörensen-Phosphatpuffer (1/15 M, pH 7.6) äquibriert (drei Totvolumina). Fraktionierung, kontinuierliche Extinktionsmessung (254 und 278 nm), Leitfähigkeitsmessung sowie Einstellung der Durchflußgeschwindigkeit erfolgt wie oben beschrieben.

Zu jedem chromatographischen Experiment werden 1 mg OMP-DC/Omp-PP (Mixed Enzymes, Sigma, U.S.A.), gelöst in 200 µl Sörensen-Phosphatpuffer, auf eine Säule mit 34 oder 35 aufgegeben.

Omp-PP wird in jedem Fall mit einem Totvolumen des Aufgabepuffers eluiert und enthält keine Decarboxylase-Aktivität. Letzteres kann durch qualitative Dünnschichtchromatographie nach Inkubation von OMP mit den entsprechenden Fraktionen (1 h, 37°C, Sörensen-Phosphatpuffer) nachgewiesen werden. OMP-DC kann vom Produktgel 34 mit einem Totvolumen einer 0.5M NaCl-Lösung eluiert werden, während zur Elution der Decarboxylase vom Inhibitor gel 35 eine 1M NaCl-Lösung (ein Totvolumen) benötigt wird (Abb. 22).

Affinitätschromatographie von Guanase an 21c und immobilisiertem Guanosin

1 mg Guanase (100 μ l Sörensen-Phosphatpuffer, 1/15 M, pH 7.6) wird an den Polymeren 21c und immobilisiertem Guanosin chromatographiert. Alle weiteren Mengenangaben, sowie technische Angaben entsprechen denen auf S.124 . Mit einem Totvolumen des Aufgabepuffers wird von beiden Gelen eine Vorzone eluiert, die eine hohe Leitfähigkeit besitzt und keine Desaminase-Aktivität zeigt (DC, Kieselgel, LS C). Von 21c wird mit einer 0.5M NaCl-Lösung eine weitere Zone eluiert, die Desaminase-Aktivität aufweist. Von immobilisiertem Guanosin kann erst mit einer 1M NaCl-Lösung diese zweite Zone eluiert werden (Abb. 20).

Affinitätschromatographie von Xanthin Oxydase an 21c

1 mg Xanthin Oxydase (100 μ l Sörensen-Phosphatpuffer, 1/15 M, pH 7.6) wird am Polymer 21c chromatographiert. Alle weiteren Mengenangaben sowie technische Angaben entsprechen denen auf S.124 . Mit einem Totvolumen des Aufgabepuffers wird eine Vorzone eluiert, die keine Oxydase-Aktivität besitzt. Mit einer 0.5M NaCl-Lösung wird eine Hauptzone eluiert, deren Inhalt nach Inkubation mit Xanthin und anschließender Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, LS C) als Xanthin Oxydase identifiziert werden kann (Abb. 21).

Aufreinigung von Adenosin Desaminase aus Kälberdarm an 17a

1. Stufe:

5 kg frischer Kälberdarm wird mit Wasser gewaschen und in ca. 5 - 10 cm lange Stücke zerschnitten. Der Darm wird in einer Mühle homogenisiert und anschließend in einer Zentrifuge bei 13000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der flüssige Überstand wird gesammelt, mit demgleichen Volumen Sörensen-Phosphatpuffer, 1/15 M, pH 7.6 versetzt. Diese Lösung verliert innerhalb von 2 d alle Desaminase-Aktivität. Sie wird daher sofort mit dem vierfachen Volumen Aceton versetzt, wobei alle Proteine ausfallen. Der Niederschlag wird filtriert und wieder in 1 l Sörensen-Puffer aufgenommen. Es wird erneut durch Zugabe von 4 l Aceton gefällt und filtriert. Der Niederschlag wird im Exsiccator getrocknet und bei -18°C aufbewahrt. In diesem Zustand ist innerhalb mehrerer Monate ein nur geringfügiger Aktivitätsverlust an Adenosin Desaminase zu beobachten.

2. Stufe:

288 mg des Proteinniederschlages werden in 250 ml Sörensen-Phosphatpuffer gelöst (4 - 5 h schütteln) und filtriert (G 3 Fritte). 100 μl der Lösung werden - wie auf S. 97 beschrieben - für eine ADA-Bestimmung eingesetzt. Es ergeben sich 13.75 units/250 ml. Eine Lowry-Bestimmung ergibt den Gesamtproteingehalt. Aus beiden Werten wird eine Aktivität von 0.0434 units/mg errechnet.

Die Protein-Lösung wird an einer Säule mit 17a chromatographiert (0.9 x 10 cm, 9.54 ml Gelvolumen, 10°C , 24 ml/h, Ligandenkonzentration am Gel 10.8 $\mu\text{mol/g}$ feuchtes 17a).

Anschließend wird die Säule mit 250 ml Sörensen-Phosphatpuffer gewaschen, wobei die Hauptmenge des Proteins eluiert wird. Mit einer 0.5M NaCl-Lösung wird eine zweite Zone eluiert, die Adenosin Desaminase enthält. Das Gesamtvolumen der zweiten Zone beträgt 36 ml. Diese Lösung enthält 7.2 units ADA und 14 mg Protein (57.6%), woraus sich eine spezifische Aktivität von 0.514 units/mg ergibt.

Der Trennfaktor β des chromatographischen Prozesses beträgt:
 $0.514 \text{ units/mg} / 0.0434 \text{ units/mg} = 12.$

Eine nochmalige Chromatographie der Proteinlösung (36 ml) ergibt unter denselben Bedingungen wie oben eine Lösung der spezifischen ADA-Aktivität 0.86 units/mg. Damit erhöht sich der Trennfaktor bei einer Ausbeute von 100% auf 20.

Aufreinigung von Adenosin Desaminase aus Kälberdarm an 16a

200 mg der Proteintrockensubstanz werden mit 50 ml Sörensen-Phosphatpuffer 4 - 5 h extrahiert und anschließend filtriert (G 3 Fritte). Man erhält eine Lösung (43 ml), die 9.5 units ADA enthält und eine Aktivität von 0.072 units/mg besitzt.

Die gesamte Lösung wird an 16a chromatographiert (0.9 x 8 cm, Gelvolumen 5,4 ml, 10°C, 24 ml/h, Ligandenkonzentration am Gel 10.35 $\mu\text{mol/g}$ feuchtes 16a). Die Säule wird mit 250 ml Sörensen-Puffer gewaschen, wobei die Hauptmenge des Proteins eluiert wird. Anschließend wird mit 250 ml 0.5M NaCl-Lösung eluiert, wobei sich drei Zonen ergeben, von denen keine Adenosin Desaminase enthält. Durch Elution mit

200 ml 1M NaCl-Lösung wird eine weitere Zone eluiert, die ADA-Aktivität aufweist (7.5 units, 79%). Die Aktivität beträgt 2 units/mg, sodaß sich ein Aufreinigungsfaktor β von $7.5 \text{ units/mg} / 0.072 \text{ units/mg} = 104$ ergibt (Abb. 11).

Trennung eines Gemisches Adenosin Desaminase/Rinderserum-Albumin an 16a

200.0 mg Albumin (aus Rinderblut) sowie 50 units (50 μ l) Adenosin Desaminase werden in 500 ml Sörensen-Phosphatpuffer gelöst. Die Aktivität der Lösung ergibt sich zu 0.25 units/mg. 290 ml dieser Lösung (29 units/116 mg Protein) werden an 16a chromatographiert (0.9 x 8 cm, Gelvolumen 5.4 ml, 10°C, 24 ml/h, Ligandenkonzentration am Gel 10.35 μ mol/g feuchtes 16a). Es wird mit 500 ml Sörensen-Puffer gewaschen, wobei die Hauptmenge des Albumins eluiert wird. Anschließend eluiert man mit 200 ml 1M NaCl-Lösung, wodurch eine Zone isoliert werden kann, die ADA-Aktivität aufweist (30 units, ca. 100%). Die ADA-enthaltenden Fraktionen werden gesammelt und die Aktivität der Lösung bestimmt: 115.4 units/mg. Der Trennfaktor β ergibt sich zu: $115.4 \text{ units/mg} / 0.25 \text{ units/mg} = 462$.

Affinitätschromatographie von Adenosin Desaminase an 17a - Spezifische Elution durch Adenosin

100 units ADA (100 μ l) werden auf eine Säule mit 17a aufgegeben (Aufgabepuffer: Sörensen-Puffer/Dioxan, 9:1, Säulen-

abmessungen: 0.9 x 10 cm, Gelvolumen 6.4 ml, 16 ml/h, Ligandenkonzentration am Gel 10.0 μ mol/g feuchtes 17a). Man wäscht mit 50 ml des Aufgabepuffers und eluiert dann mit einem linearen Adenosin-Gradienten (50 ml 10mM Adenosin in Sörensen-Puffer/Dioxan, 9:1, gegen 50 ml Sörensen-Puffer/Dioxan, 9:1). Das Totvolumen beträgt 7.5 ml, die Temperaturen betragen 0, 5, 12, 20 bzw. 30°C, und die Fraktionierung erfolgt in 3 ml-Schritten. In jeder Fraktion wird eine Lowry-Bestimmung durchgeführt (5 ml Gebrauchslösung, 0.5 ml Reagenslösung) und anschließend die Extinktion bei 620 nm gegen eine Blindlösung in 1-cm-Quarzküvetten bestimmt. Eine Auftragung der Extinktion gegen die Fraktionsnummer ergibt das Elutionsprofil des chromatographischen Prozesses (Abb. 13).

Affinitätschromatographie von Adenosin Desaminase an 17a - Spezifische Elution durch Inosin

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben wird eine Chromatographie von Adenosin Desaminase an 17a bei 20°C durchgeführt. Die Elution erfolgt mit einem linearen Gradienten aus 50 ml 40 mM Inosin in Sörensen-Puffer/Dioxan, 9:1, gegen 50 ml Sörensen-Puffer/Dioxan, 9:1. Das Totvolumen beträgt 6.5 ml. Das Elutionsprofil (E_{620} gegen Fraktionsnummer) ist in Abb. 17 abgebildet.

7. Literaturverzeichnis

- 1) G. Manecke, *Chimia* 28, 467 (1974).
- 2) K. Mosbach, *FEBS Lett.* 62, Suppl., E 80 (1976).
- 3) R. Berger, *Z. Chem.* 16, 386 (1974).
- 4) R. B. Merrifield, *Endeavour* 24, 3 (1965).
- 5) A. Marglin und R. B. Merrifield, *Annu. Rev. Biochem.* 39, 841 (1970).
- 6) C. C. Leznoff, *Chem. Soc. Rev.* 3, 65 (1974).
- 7) A. Patchornik und M. A. Kraus, *Pure Appl. Chem.* 43, 503 (1975).
- 8) H. Guilford, *Chem. Soc. Rev.* 2, 249 (1973).
- 9) C. R. Lowe und P. D. G. Dean, *Affinity Chromatography*, Wiley, London, 1975.
- 10) M. Wilchek und C. S. Hexter, *Methods Biochem. Anal.* 23 348 (1976).
- 11) G. G. Allan, J. W. Beer, M. J. Cousin, W. J. Mc Connall, J. C. Powell und A. Yahiaoni, *Polymeric Drug for Plants in: Polymeric Drugs*, Ed.: L. G. Donaruma, Otto Vogl, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1978, 185 ff.
- 12) H. Ringsdorf, *J. Polym. Sci., Polym. Symp.*, no. 51, 135 (1975).
- 13) P. Cuatrecasas, M. Wilchek und C. R. Anfinsen, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 61, 636 (1968).
- 14) M. Ziegler (Riedel-de Haen AG), *Dt. Offenlegungsschrift* 2.213.381 (4.10.73).
- 15) P. V. Sundaram, *J. Solid-Phase Biochem.* 1, 101 (1976).

- 16) P. Brodelius, P.-O. Larsson und K. Mosbach, Eur. J. Biochem. 47, 81 (1974).
- 17) G. I. Tesser, H. U. Fisch und R. Schwyzer, FEBS Lett. 23, 56 (1972).
- 18) R. Lamed, Y. Levin und M. Wilchek, Biochem. Biophys. Acta 304, 231 (1973).
- 19) I. P. Trayer, H. R. Trayer, D. A. P. Small und R. C. Bottomley, Biochem. J. 139, 609 (1974).
- 20) W. B. Jakoby und M. Wilchek, Methods Enzymol. 34, 475 (1974).
- 21) M. Wilchek und T. Miron, Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 108 (1976).
- 22) Z. Er-el, Y. Zaidenzaig und S. Shaltiel, *ibid.* 49, 383 (1972).
- 23) C. R. Lowe, Eur. J. Biochem. 73, 265 (1977).
- 24) M. C. Hipwell, M. J. Harwey und P. D. G. Dean, FEBS Lett. 42, 355 (1974).
- 25) W. L. Dill jr., J. A. Beavo, P. J. Bechtel, K. R. Myers L. J. Sakai und E. G. Krebs, Biochemistry 15, 3724 (1976).
- 26) H.-A. Arfmann und S. Shaltiel, Eur. J. Biochem. 70, 269 (1976).
- 27) S. Shaltiel, FEBS Proc. 40, 117 (1975).
- 28) S. Shaltiel, S. P. Adler, D. Purich, C. Caban, P. Senior und E. Stadtman, Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 3397 (1976).
- 29) F. Seela und F. Cramer, Chem. Ber. 108, 1329 (1975).
- 30) H. Rosemeyer und F. Seela, Carbohydrate Res. 62, 155 (1978).
- 31) J. B. Stothers, Carbon-13 NMR Spectroscopy, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1972.
- 32) D. Adamiak, M. Noltemeyer, W. Saenger und F. Seela, Z. Naturforsch. c 33, 169 (1978).

- 33) M. Sundaralingam in Chemistry, Biology and Clinical Uses of Nucleosid Analogs, Ann. of the New York Academy of Sciences
- 34) L. Dudycz, R. Stolarski, R. Pless und D. Shugar, Z. Naturforsch. c 34, 359 (1979).
- 35) O. Roeder, H. D. Lüdemann, E. von Goldammer, Eur. J. Biochem. 53, 517 (1975).
- 36) F. Seela, J. Ott und H. Rosemeyer, Z. Naturforsch. c 34, 350 (1979).
- 37) Autorenkollektiv Organikum, VEB, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1974.
- 38) J. Ott, Diplomarbeit, Paderborn 1978.
- 39) A. N. Belder, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 34, 179 (1977).
- 40) R. C. Jones, J. Amer. Chem. Soc. 77, 4069 (1955).
- 41) P. S. Chen, T. Y. Toribara und H. Warner, Analyt. Chem. 28, 1756 (1956).
- 42) F. Seela und S. Waldek, Nucleic Acid Res. 2, 2343 (1975).
- 43) H. Rosemeyer und F. Seela, Carbohydrate Res. 74, 117 (1979).
- 44) S. Suzuki und S. Marumo, J. Antibiot., Serie A, 13, 360 (1960).
- 45) R. L. Tolman, R. K. Robins und L. B. Townsend, J. Amer. Chem. Soc. 91, 2102 (1969).
- 46) L. H. Ehrenberg, H. Hedström, N. Løfgren und B. Takman, Sven. Kem. Tidskr. 50, 645 (1946).
- 47) J. J. Fox, I. Wempen, A. Hampton und I. L. Doerr, J. Amer. Chem. Soc. 80, 1669 (1958).
- 48) G. W. Kenner in: The Chemistry and Biology of Purins, Ed.: G. E. W. Wolstenholme und C. M. o'Connor, a Ciba Symposium, Boston, Mass., Little, Brown & Co., 312 ff.

- 49) T. G. Brady, *Biochem. J.* 36, 478 (1942).
- 50) P. Andrews, *ibid.* 96, 595 (1965).
- 51) R. Wolfenden, *J. Biol. Chem.* 242, 4711 (1967).
- 52) J. G. Cory und R. J. Suhadolnik, *Biochemistry* 4, 1733 (1965).
- 53) B. M. Chassy und R. J. Suhadolnik, *J. Biol. Chem.* 242, 3655 (1967).
- 54) J. G. Cory und R. J. Suhadolnik, *Biochemistry* 4, 1729 (1965).
- 55) G. L. Tritesch, *Arch. Biochem. Biophys.* 161, 698 (1974).
- 56) M Ohno, N. Yagisawa, S. Shibahara, S. Kondo, K. Maeda, und H. Umezawa, *J. Amer. Chem. Soc.* 96, 4326 (1974).
- 57) S. Cha, R. P. Agarwal und R. E. Parks jr., *Biochem. Pharmacol.* 24, 2187 (1975).
- 58) B. Evans und R. Wolfenden, *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 4751 (1970).
- 59) R. Wolfenden, *Acc. Chem. Res.* 5, 10 (1972).
- 60) G. R. Nathan, D. Chang und T. F. Deuel, *Methodes Enzymol.* 51, 497 (1978).
- 61) I. Mikailopulo, H. Wiedner und F. Cramer, in Vorbereitung.
- 62) C. L. Zielke und C. H. Shuelter, *The Enzymes*, Band 4 Ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, London, 1971.
- 63) U. K. Ogilvie, L. Slotin und P. Rheault, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 297 (1971).
- 64) A. Hampton, P. J. Harper und T. Sasaki, *Biochemistry* 11, 4736 (1977).
- 65) M. Rosinova, A. Holy und E. Zelinkova, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 43, 2330 (1978).
- 66) P. Cuatrecasas, *J. Biol. Chem.* 245, 3059 (1970).

- 67) C. Araki, Bull. Chem. Soc. Jpn. 29, 543 (1956).
- 68) S. Arnott, A. Fulmer, W. E. Scott, I. C. M. Dea, R. Moothouse und D. A. Rees, J. Mol. Biol. 90, 269 (1974).
- 69) A. Amsterdam, I. Er-El und S. Shaltiel, Arch. Biochem. Biophys. 171, 673 (1975).
- 70) R. Axen, J. Porath und S. Ernback, Nature 214, 1302 (1967).
- 71) J. Porath, R. Axen und S. Ernback, Nature 215, 1491 (1967).
- 72) J. K. Inman und H. M. Dintzis, Biochemistry 8, 4074 (1969).
- 73) D. Failla und D. V. Santi, Anal. Biochem. 52, 363 (1973).
- 74) H.-D. Jakubke und L. Lange, FEBS Lett. 43, 281 (1974).
- 75) H. Kalckar, J. Biol. Chem. 167, 445 (1947).
- 76) P. O'Carra, S. Barry und T. Griffin, Methods Enzymol. 34, 108 (1974).
- 77) R. Bock, Methoden der Analytischen Chemie, Band 1, Verlag Chemie, Weinheim, 1974.
- 78) A. J. P. Martin und R. L. M. Synge, Biochem. J. 35, 1358 (1941).
- 79) H. Hrapia und E. Leipnitz, Z. physik. Chem. 217, 273 (1961).
- 80) F. von der Haar, Methods Enzymol. 34, 163 (1974).
- 81) B. M. Dunn und I. M. Chaiken, Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 2382 (1974).
- 82) S. Kumar, V. Josan, K. C. S. Sanger, K. K. Tewari und P. S. Krishnan, Biochem. J. 102, 691 (1967).
- 83) F. Seela und H. Rosemeyer, Z. Naturforsch. c 33, 56 (1977).

- 84) H. Rosemeyer und F. Seela, J. Med. Chem., im Druck.
- 85) S. H. Appel, J. Biol. Chem. 243, 3924 (1968).
- 86) W. A. Creasey und R. E. Handschuhmacher, J. Biol. Chem. 236, 2058 (1961).
- 87) R. E. Handschuhmacher, J. Biol. Chem. 235, 2917 (1960).
- 88) I. Janku, M. Krsiak, L. Volicer, R. Capek, R. Smetana und J. Novotny, Biochem. Pharmacol. 14, 1525 (1965).
- 89) J. Novotny, R. Smetana und H. Roskova, Biochem. Pharmacol. 14, 1537 (1965).
- 90) P. Beak und B. Siegel, J. Amer. Chem. Soc. 98, 3601 (1976).
- 91) A. Yoshimoto, K. Umezu, K. Kobayashi und K. Tomita, Methods Enzymol. 51, 74 (1978).
- 92) D. H. Metz und G. L. Brown, Biochemistry 8, 2312 (1969).

Dank

Herrn Prof. Dr. Frank Seela danke ich für die überaus interessante Themenstellung und die aufmerksame Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Cramer danke ich für die Übernahme des Korreferates, sowie für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit zu einem großen Teil in seiner Abteilung am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen, durchführen zu können. Allen seinen Mitarbeitern, sowie den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Dr. F. Eckstein, danke ich sehr für die freundliche Aufnahme in ihrer Mitte für mehr als zwei Jahre.

Ich danke Herrn B. Seeger für die Aufnahme der NMR-Spektren, Frä. Sabine Rannenbergl und Frä. I. Bartels für die geschickte Mitarbeit bei vielen Experimenten, sowie allen anderen technischen Mitarbeitern des Hauses.

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Schlimme danke ich besonders für die Übernahme des zweiten Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Johann Ott für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft, sowie allen meinen Mitarbeitern an der Universität Paderborn für freundliche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Masuch, Paderborn, danke ich für die Aufnahme der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen und Frau B. Seela für die sorgfältigen photographischen Arbeiten.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren Ziegler, Hilsch, Glemser, Wagner, Troe, Nölting, Brockmann, Jost, Roesky, Flammersfeld, Bingel, Lüttke, Pirson, Schöllkopf, de Meijere und Spitteller.

Veröffentlichungen, die in Zusammenhang mit der vorgelegten Arbeit stehen

1. Immobilisierung von Cytidin und Uridin über 0-2',3'-cyclische Acetalderivate an Agarose,
F. Seela und H. Rosemeyer, Z. Naturforsch. 33c, 56 (1977).
2. Substrate- And Product-Affinity Resins For Adenosine Deaminase Obtained By Immobilisation Of Adenosine And Inosine Via 2',3'-Cyclic Acetal Derivatives,
H. Rosemeyer and F. Seela, Carbohydrate Res. 62, 155 (1978).
3. Immobilisation Of Tubercidin And Nebularine Via Ribose-2',3'-Cyclic Acetals - Biospecific And Nonspecific Interaction Of Affinity Resins To Adenosine Deaminase,
H. Rosemeyer and F. Seela, Carbohydrate Res. 74, 117 (1979).
4. Polymer Linked 6-Azauridine-5'-Monophosphate - A Resin Of High Bioaffinity To Orotidine-5'-Monophosphate Decarboxylase,
H. Rosemeyer and F. Seela, J. Med. Chem., 22, 1545 (1979)
5. Immobilisierung von Adenosinacetalen mit variablem Alkylidenrest - Die Funktion des Spacers bei enzymatischer Desaminierung,
F. Seela, J. Ott und H. Rosemeyer, Z. Naturforsch. 34c, 350 (1979).

Abstract

**Synthese und Affinität polymergebundener Ribonucleosid-
O-2',3'-Acetale,**

**F. Seela und H. Rosemeyer, Chemiedozententagung, Berlin,
April 1978.**

Lebenslauf

1. 9. 1951 geboren in Herford als Sohn des Sparkassenbeamten Ludwig Rosemeyer und seiner Ehefrau Klara, geb. Hempelmann
- Ostern 1958 Einschulung in die Volksschule Bad Salzufflen
- Ostern 1962 Übergang an das Naturwissenschaftliche Gymnasium für Jungen in Bad Salzufflen
3. 6. 1970 Reifeprüfung
1. 7. 1970 - 14. 8. 1970 Grundwehrdienst
- Wintersemester 1970/71 Beginn des Chemiestudiums an der Georg-August-Universität, Göttingen
5. 2. 1975 Diplom-Chemiker-Vorprüfung
- Feb. 1975 - Juni 1976 Diplomarbeit am Institut für Anorganische Chemie der Universität Göttingen bei Prof. Dr. M. Ziegler
3. 6. 1976 Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
- Aug. 1976 Beginn der Dissertation bei Prof. Dr. F. Seela, zunächst als Gast am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Chemie (Direktor: Prof. Dr. F. Cramer)
- Nov. 1978 Übergang an die Universität Paderborn und Fortführung der Dissertation bei Prof. Dr. F. Seela.