

Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin  
Aus der Klinik für Endokrinologie und Nephrologie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Walter Zidek

---

**Isolierung und Identifizierung von  
Diadenosinhexaphosphat aus Nierengewebe**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der  
medizinischen Doktorwürde  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von  
Anna Ewa Cyrek  
aus Jelenia Gora

Referent: PD Dr. rer. nat. J. Jankowski

Korreferent: PD Dr. R. Vetter

Gedruckt mit Genehmigung der Charité-Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 08.05.2007

# **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>0 Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Hypertonie	1
1.2 Mechanismen der Blutdruckregulation	4
1.3 Theorien zur Ursache der essentiellen Hypertonie	7
1.4 Diadenosinpolyphosphate	13
1.5 Die Niere	14
1.6 Chromatographie	16
1.7 Die HPLC	17
1.7.1 Normalphasen und Umkehrphasen	17
1.7.2 Isokratische Elution	17
1.7.3 Gradientenelution	18
1.8 Displacementchromatographie	18
1.9 Festphasenextraktion	19
1.10 Massenspektrometrie	19
1.11 Post Source Decay-MALDI-Massenspektrometrie	20
<b>2 Problemstellung</b>	<b>21</b>
<b>3 Methodik</b>	<b>22</b>
3.1 Gesamtübersicht	22
3.2 Isolierung der gesuchten Substanz	23
3.2.1 Mechanische Desintegration	23
3.3 Extraktion mit PCA	23
3.4 Reversed-Phase-Chromatographie	23
3.5 Größenausschluss-Chromatographie	24
3.6 Affinitätschromatographie	24
3.6.1 Herstellung des Phenylboronsäure Bio-Rex-70-Gels	24
3.6.2 Festphasenextraktion mit PBA	25
3.7 UV-Spektroskopie	25
3.8 Displacementchromatographie	25
3.9 Anionenaustausch-Chromatographie	26
3.10 Reversed-Phase-Chromatographie	26
3.11 Analytik	27
3.11.1 MALDI-Massenspektrometrie	27
3.11.2 PSD-MALDI-Massenspektrumetrie	28
3.11.3 Vergleich der Retentionszeiten	28
3.11.4 Enzymatische Spaltungen	29

<b>4 Ergebnisse</b>	<b>30</b>
4.1 Die Chromatographieschritte zur Isolierung und Identifizierung von Diadenosinhexaphosphat (Ap <sub>6</sub> A)	30
4.1.1 Größenausschluss-Chromatographie	30
4.1.2 Affinitätschromatographie	31
4.1.3 Displacementchromatographie	33
4.1.4 Anionenaustausch-Chromatographie	34
4.1.5 Reversed-Phase-Chromatographie	35
4.2 Identifizierung der isolierten Substanz	37
4.2.1 MALDI-Massenspektrometrie	37
4.2.2 PSD-MALDI-Massenspektrometrie	39
4.2.3 Vergleich der Retentionszeiten	40
4.2.4 UV-Spektroskopie	43
4.2.5 Enzymatische Spaltungen	45
<b>5 Diskussion</b>	<b>47</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>59</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>60</b>
7.1 Materialien und Geräte	60
7.1.1 Chemikalien	60
7.1.2 Standards	
7.1.3 Geräte	61
<b>8 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>64</b>
<b>9 Literaturverzeichnis</b>	<b>66</b>
<b>10 Danksagung</b>	<b>85</b>
<b>11 Lebenslauf</b>	<b>86</b>
<b>12 Erklärung</b>	<b>88</b>

## 8. Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ADP	Adenosin-5‘-diphosphat
AMP	Adenosin-5‘-monophosphat
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
Ap <sub>2</sub> A	P1,P2- Di (adenosin-5‘) diphosphat
Ap <sub>3</sub> A	P1,P3- Di (adenosin-5‘) triphosphat
Ap <sub>4</sub> A	P1,P4- Di (adenosin-5‘) tetraphosphat
Ap <sub>5</sub> A	P1,P5- Di (adenosin-5‘) pentaphosphat
Ap <sub>6</sub> A	P1,P6- Di (adenosin-5‘) hexaphosphat
Ap <sub>7</sub> A	P1,P7- Di (adenosin-5‘) heptaphosphat
ATP	Adenosin-5‘-triphosphat
AU	Absorption Units
C <sub>18</sub>	Reversed-Phase Material mit Octadecylgruppen
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosin-5‘-monophosphat
Da	Dalton
DEAA	Diethylammoniummethyl
GDP	Guanosin-5‘-diphosphat
GMP	Guanosin-5‘-monophosphat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC	Liquid Chromatography
m	Masse
M	mol / l
MALDI-MS	Matrix-unterstützte-Laser-Desorption / Ionisations-Massenspektrometrie
MS	Massenspektrometrie
Na <sup>+</sup>	Natrium
nm	Nanometer
PBA	Phenylboronsäure
PCA	Perchlorsäure
PSD	Post Source Decay
RP	Reversed Phase

TEAA	Triethylammoniumacetat
U	Umdrehung
u	units
UV	Ultraviolett
W	Watt
z	Ladung

## 9. Literaturverzeichnis

- 1) Agha A., Schlüter H., Konig S., Biel K., Tepel M., Zidek W. (1992):  
*A novel plateled-derived renal vasokonstrictor agent in normotensives and essential hypertensives.*  
J. Vasc. Res. 29, S.281
- 2) Alderson T. (1985):  
*Formaldehyde-induced mutagenesis: a novel mechanism for its action*  
Mutat. Res. 154, 101-110
- 3) Bachmann J., Schlüter H., Storkebaum W., Witzel H., Wessels F., Zidek W. (1991):  
*Effect of plasma from patients with essential hypertension on vascular resistance in the isolated perfused rat kidney.*  
Clin. Sci., 80(1):17-23
- 4) Bachmann J., Schlüter H., Storkebaum W., Witzel H., Wessels F., Zidek W. (1990):  
*Effect of plasma from essential hypertensives on vascular tone of aortic strips, isolated perfusemesentery and isolated perfused kidney.*  
Life Sci. 47(15): 1365-74
- 5) Baker J.C., Jacobson M.K. (1986):  
*Alteration of adenyl dinucleotide metabolism by environmental*  
Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 2350-2352
- 6) Barlassina C., Citterio L., Bernardi L., Buzzi L., Sciarrone T. et al. (1997):  
*Genetics of renal mechanisms of primary hypertension: the role of adducin*  
J. Hypertens. 15, 1567-1571
- 7) Blaustein M.P., Hamlyn J.M. (1984):  
*Sodium transport inhibition, cell calcium and hypertension. The natriuretic hormone/ Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-exchange/ hypertension hypothesis*  
Am. J. Med. 77, 44-59

- 8) Bobik A., Grooms A., Millar J.A., Mitchell A., Grinpukel S. (1989):  
*Growth factor activity of endothelin on vascular muscle cells.*  
Atherosclerosis. 78, S.225
- 9) Börjesson-Stoll R. (1994):  
*Untersuchungen zu einem blutdrucksteigernden Faktor im Blutplasma hypertoner Ratten.*  
Dissertation im Fachbereich Chemie der WWU Münster
- 10) Brandts B., Brandts A., Wellner-Kienitz M.C., Zidek W., Pott L. et al. (1998):  
*Non-receptor-mediated activation of IK(ATP) and inhibition of IK(ACh) by diadenosine polyphosphates in guinea-pig atrial myocytes*  
J. Physiol. 512, 407-420
- 11) Brown M.J., Macquin I. (1981):  
*Is adrenaline the cause of essential hypertension?*  
Lancet 2/8255, 1079-1082
- 12) Castro E., Torres M., Miras-Portugal M.T., Gonzalez M.P. (1990):  
*Effect of diadenosine polyphosphates on catecholamine secretion from isolated chromaffin cells*  
Br. J. Pharmacol. 100, 360-364
- 13) Chatziantoniou C., Ruan X., Arendshorst W.J. (1995):  
*Defective G protein activation of the cAMP pathway in rat kidney during genetic hypertension*  
Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 2924-2928
- 14) Chiang B., Perlmann L., Epstein F. (1969):  
*Overweight and hypertension. A Review*  
Circulation 39, 403-421

15) Cobb S., Rose R.M. (1973):

*Hypertension, peptic ulcer and diabetes in air traffic controllers*  
JAMA 244, 489-492

16) Cowley A.W. jr., Cushmann W.C., Quillen E.W., Skelton M.M., Langford H.C. (1981):

*Vasopressin elevation in essential hypertension and increased responsiveness to sodium intake.*  
Hypertension, 3, S.93

17) Craik K.M., McLennan A.G., Fisher M.J. (1993):

*Adenine dinucleotide-mediated activation of glycogen phosphorylase in isolated liver cells*  
Cell Signal 5, 89-96

18) Dahl L.K., Knutsen K.D., Iwai J. (1969):

*Humoral transmission of hypertension. Evidence from parabiosis*  
J. Circ. Reserch 24/25 Suppl. 1, 121-131

19) Dahl L.K. (1972):

*Salt and hypertension*  
Am. J. Clin. Nutr. 25, 231-244

20) Dahl L.K. (1977):

*Salt intake and hypertension* in: Genest J., Koiv E., Kuchel O. (eds.):  
*Hypertension: physiopathology and treatment*  
Mc Graw Hill 257

21) Deetjen P., Speckmann E.J. (1994):

Kapitel *Niere*, 357-395, in: *Physiologie*  
2. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore

- 22) DeThe H., Devynck M.A., Rosenfeld J.B., Pernolla M.G., Elghov J.L. et al. (1984):  
*Plasma sodium pump inhibition in essential hypertension and normotensive subjects with hypertensive heredity*  
J. Cardiovasc. Pharmacol. 6, 49-54
- 23) DeWardener H.E., Mac Gregor G.A. (1982):  
*The natriuretic hormone and hypertension*  
Lancet 1, 1450-1454
- 24) DeWardener H.E., Clarkson E.M. (1985):  
*Concept of natriuretic hormone*  
Physiolog. Rev. 65, 658-759
- 25) Edgecombe M., Craddock H.S., Smith D.C., McLennan A.G., Fisher M.J. (1997):  
*Diadenosine polyphosphate-stimulated gluconeogenesis in isolated rat proximal tubules*  
Biochem. J. 323, 451-456
- 26) Entwistle G., Apostolides A.T., Hebel J.R., Henderson M.M. (1977):  
*Target organ damage in black hypertension*  
Hypertension 55, 792
- 27) Erlinge D., You J., Vahlestedt C., Edvinsson L. (1995):  
*Characterization of an ATP receptor mediating mitogenesis in vascular smooth muscle cells*  
Eur. J. Pharmacol. 289, 135-149
- 28) Feinleib M. (1977):  
*Genetics and familial aggregation of blood pressure* in: Onesti G., Klimt C.R. (eds.): *Hypertension: determinants, complications and intervention*  
5<sup>th</sup> Hanemann int. symposium hypertension, Grune and Stratton, New York,  
35-48

29) Feng, J.J. (1997):

*Calcium-signaling mechanism in vascular responses to vasopresin*  
Hypertension 30 (5), S.1223

30) Flores N.A., Stavrou B.M., Sheridan D.J. (1999):

*The effects of diadenosine polyphosphates on the cardiovascular system*  
Cardiovasc. Res. 42, 15-26

31) Folkow B. (1982):

*Physiological aspects of primary hypertension*  
Physiological reviews 62, 348-479

32) Fujiwara Y., Ochi S., Izumi M., Yokosama K., Arai M., Ando A. et al. (1992):

*Mesangial cell growth in genetically hypertensive rats and effect of calcium antagonists upon this growth*  
Blood Press. Suppl. 3, 22-26

33) Goebbel H., Wagner J. (1992):

Kapitel *Arterielle Hypertonie*, 155-181, in: *Innere Medizin*  
de Gruyter Verlag Berlin / New York

34) Gross R., Schölmerich P., Gerok W. (Hrsg.) (1996):

*Lehrbuch der inneren Medizin.*  
9. Auflage, Stuttgart-New York, Schattauer

35) Hagel L., Lundström H., Andersson T. et al. (1989):

*Properties in theory and practice of novel gel filtration: media for standard liquid chromatography*  
Journal Chem. 476, 329-344

36) Harrison (1995):

*Innere Medizin 1, 2. 13. Auflage, Deutsche Ausgabe, K.J.G. Schmailzl,  
K.J. Isselbacher, McGraw Hill, Libri Italia, S.1314, S.2166*

37) Havlik R.J., Feinleib M. (1982):

*Epidemiology and genetics of hypertension*  
Hypertension 4, 121

38) Heckmann U., Zidek W., Schurek H.J. (1989):

*Sodium reabsorption in the isolated perfused kidney of normotensive and spontaneously hypertensive rats.*  
J. Hypertens Suppl. 7(6) : 172-3

39) Heidenreich S., Tepel M., Lang D., Rahn K.H., Zidek W. (1994):

*Differential effects of insulin-like growth factor I and platelet-derived growth factor on growth response, matrix formation, and cytosolic free calcium of glomerular mesangial cells of spontaneously hypertensive and normotensive rats.*  
Nephron 68(4): 481-8

40) Heidenreich S., Tepel M., Schlüter H., Harrach B., Zidek W. (1995):

*Regulation of rat mesangial cell growth by diadenosine phosphates*  
J. Clin. Invest. 95, 2862-2867

41) Hillenkamp F., Karas M., Ingendoh A., Stahl B. (1990):

*In: Burlingame Al. (Hrsg.), Biological Mass Spectrometry*  
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

42) Hillenkamp F., Karas M. (1990):

*Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix assisted ultraviolet laser desorption ionisation*  
Methods in Enzymology 193, 263-279

43) Hillenkamp F., Karas M., Ingendoh A., Stahl B., Cramer R., Nordhoff E., Overberg A., Crain P.F. (1992):

*Matrix assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry of nucleic acids with wavelength in the ultraviolet and infrared.*

Rapid Commun Mass Spectrum 6, (12), S.771

44) Hingirani, A.D. (1995):

*Renin-Angiotensin system gene polymorphisms influence bloodpressure and the response to angiotensin convertine enzym inhibition.*

J. Hypertens. 13, S.1602

45) Hirata Y., Tobian L., Simon G., Iwan J. (1984):

*Hypertension-producing factor in serum of hypertensive Dahl salt-sensitives rats*  
Hypertension 6, 709-716

46) Hohage H., Reibhardt C., Borucki U., Enck G., Schlüter H., Zidek W. et al. (1996):

*Effects of diadenosine polyphosphates on renal function and blood pressure in anesthetized Wistar rats*

J. Am. Soc. Nephrol. 7, 1216-1222

47) Hoyle C.H., Postorino A., Burnstock G. (1995):

*Pre- and postjunctional effects of diadenosine polyphosphates in the guinea pig vas deferens.*

J. Pharm. Pharmacol. 47(11), 926-31

48) Ikeda M., Kohno M., Takeda T. (1995):

*Endothelin production in cultured mesangial cells of spontaneously hypertensive rats*  
Hypertension 25, 1196-1201

49) Inscho E.W., Mitchell K.D., Navar L.G. (1994):

*Extracellular ATP in the regulation of renal microvascular function.*  
FASEB J. 8(3), 319-28

- 50) Jankowski J., Potthoff W., Zidek W., Schlüter H. (1998):  
*Purification of chemically synthesised dinucleoside synthesised dinucleoside (5', 5') polyphosphates by displacement chromatography.*  
J. Chromatogr B Biomed Sci Appl 719(1-2): 63-70
- 51) Jankowski J., Tepel M., van der Giet M., Tente I.M., Henning L. et al. (1999):  
*Identification and characterization of Ap<sub>7</sub>A from human platelets.*  
J. Biol. Chem. 274, 23926-23931
- 52) Jankowski J., Stephan N., Knobloch M., Fischer S., Schmaltz D., Zidek W., Schlüter H. (2001):  
*Mass-spectrometry-linked screening of protein fractions for enzymatic activities- a tool for functional genomics.*  
Anal Biochem. 290(2): 324-9
- 53) Jankowski J., Hagemann J., Yoon MS., Van der Giet M., Stephan N., Zidek W., Schlüter H., Tepel M. (2001):  
*Increased vascular growth in hemodialysis patients induced by platelet-derived diadenosine polyphosphates.*  
Kidney Int. 59(3):1134-41
- 54) Johansson B., Gustavsson J. (1988):  
*Elution behaviour of some proteins on fresh, acid or base treated Sephadex S 200 HR.*  
Journal Chem. 457, 205-213
- 55) Jovanovic A., Alekseev A.E., Terzic A. (1997):  
*Intracellular diadenosine polyphosphates: a novel family of inhibitory ligands of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel.*  
Biochem. Pharmacol. 54, 219-225
- 56) Kannel W.B., Brand N., Skinner J.J., Dawber P.R., McNamara P.M. (1967):  
*The relation of adiposity to blood pressure and development of hypertension.*  
Ann. Intern. Med. 67, 48-59

57) Karas M., Giessmann U. (1992):

*Matrix unterstützte Laserdesorptions-Massenspektrometrie.*

Labor 2000, Bioanalytik, 71-83

58) Kaufmann R., Kirsch D., Spengler B. (1994):

*Sequencing of peptides in a time-of-flight mass spectrometer: evaluation of postsource decay following matrix assisted laser desorption ionisation.*

Intern. Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 131, 355-385

59) Kleta R., Hirsch S., Heidenreich S., Schlüter H., Zidek W., Schlatter E. (1995):

*Effects of diadenosine polyphosphates, ATP and angiotensinII on membrane voltage and membrane conductances of rat mesangial cells.*

Pflügers Arch. 430(5), 713-20

60) Korte H.B. (1996):

*Aufreinigung und Identifizierung einer vasoaktiven Substanz aus humanen Plasma als Diadenosinhexasphat.*

Dissertation der inneren Medizin der WWU Münster

61) Kunin C.M., McCormack R.C. (1968):

*An epidemiologic study of bacteriurea and blood pressure among nuns and working women.*

New Engl. J. Med. 278, 635-642

62) Kurokawa K. (1996):

*Kidney, salt and hypertension: how and why.*

Kidney Int. Suppl. 55, 46-51

63) Kurokawa K., Okuda T. (1998):

*Genetic and non-genetic basis of essential hypertension: maladaptation of human civilization to high salt intake.*

Hypertens. Res. 21, 67-71

64) Kurtz TW. (1993):

*Genetics of essential hypertension.*

Am J Med 1993; 94:77

65) Lee H.C., Walseth T.F., Bratt G.T., Hayes R.N., Clapper D.L. (1989):

*Structural determination of a cyclic metabolite of NAD<sup>+</sup> with intracellular Ca<sup>2+</sup>-mobilizing activity.*

J. Biol. Chem. 164(3), 1608-15

66) Limura O. (1996):

*The role of renal dopaminergic activity in the pathophysiology of essential hypertension.*

Jpn. Heart J. 37, 815-828

67) Löffler G., Petrides P.E. (1997):

*Biochemie und Pathobiochemie*

6.Auflage, Springer

68) Lucas C.P., Holzwarth G.J., Ocobock R.W., Sozen T., Stem M.P. et al. (1974):

*Disturbed relationship of plasmarenin to blood pressure in hypertension.*

Lancet 2, 1337-1339

69) Lüthje J. (1989):

*Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in blood.*

Klein. Wochenschr. 67, 317-327

70) Luo J., Jankowski J., Tepel M., van der Giet M., Zidek W., Schlüter H. (1999):

*Identification of diadenosine hexaphosphate in human erythrocytes.*

Hypertension 34, 872-875

71) Malam-Souley R., Capman M., Gadeau A.P., Desgranges C. (1993):

*Exogenous ATP induces a limited cell cycle progression of arterial smooth muscle cells.*

Am. J. Physiol. 264(4PT1), C783-88

72) Manger W., Page J. (1986):

*Zur Pathogenese und Pathophysiologie der essentiellen Hypertonie.*

in Rosenthal J. (Hrsg.): *Art. Hypertonie*, 3. Aufl., Springer Verlag Berlin u.a.

73) Manunta P., Cerutti R., Bernardi L., Stella P., Bianchi G. (1997):

*Renal genetic mechanisms of essential hypertension.*

Journal of Nephrology 10, 172-178

74) McCumbee W.D., Wright G.L. (1985):

*Partial purification of a hypertensive substance from rat erythrocytes.*

Can. J. Physiol. Pharmacol. 63, 1321-1326

75) McGregor G.A., Markandu M.D., Best F.E., Elder D.M., Cain J.M. et al. (1982):

*Double blind randomized crossover trial of moderate sodium restriction in essential hypertension.*

Lancet, 351-354

76) Miall W.E., Oldham P.D. (1963):

*The hereditary factor in arterial blood pressure.*

Brit. Med. J. 1, 75

77) Muirhead E.E., Jones J., Graham P. (1953):

*Hypertension in bilateral nephrectomized in the absence of exogenous sodium excess.*

Arch. Path. 56, 286-292

78) Muirhead E.E., Germani G., Leach B., Pitcock J.A., Stephenson P. et al. (1972):

*Production of renomedullary prostaglandines by renomedullary interstitial cells grown in tissue culture.*

Circ. Re. 30,31, Supp. II, 161-172

79) Muirhead E.E. (1977):

*The antihypertensive function of the renal medulla* in: Davies J.O., Laragh J.H., Selwyn A. (eds.): *Hypertension: mechanisms, diagnostics and management*. H.P. Publishing C.O., New York

80) Muirhead E.E. (1981):

*Antihypertensive function of the kidney*  
in: The third Arther C. Corcoran memorial lecture  
Hypertension 2, 444-446

81) Naftilan A.J., Pratt R.E., Lin H.L., Dzau V.J. (1989):

*Angiotensin II induces a c-fos mRNA expression in vascular muscle cell via transcriptional control*  
Hypertension 13, 706-711

82) Nakagawa K., Ueda S., Kida H., Sawamura M., Ikeda K., Yamori Y. (1999):

*Effects of cytosolic  $Ca^{2+}$  on membrane voltage and conductance of cultured mesangial cells from stroke-prone spont. hypertensive rats and WKY rats*  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 256, 273-277

83) Nasjletti A., Malik K.U. (1979):

*Relationship between the kallikrein-kinin and prostaglandin systems*  
Life Sci. 25, 99-110

84) Neely C.F., Matot I., Batra V.K., Bo X. (1996):

*P2X-purinoceptors in the feline pulmonary vascular bed: distribution and selective in vivo pharmacological probes.*  
Am. J. Physiol. 270(6PT1), L889-97

85) Neves L.A., Almeida A.P., Khosla M.C., Santos R.A. (1995):

*Metabolism of angiotensin in isolated rat hearts. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors.*  
Biochem. Pharmacol. 50, S.1451

86) Padfield P.L., Brown J.J., Lever A.F., Morton J.J., Robertson J.I.S. (1981):

*Blood pressure in acute and chronic vasopressin excess: studies of malignant hypertension and the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion.*  
New. Engl. J. Med. 304, 1067

87) Parfrey P., Vanderburg M., Wright P. (1981):

*Blood pressure and hormonal changes following alteration in dietary sodium and potassium in mild hypertension.*

Lancet, 59-63

88) Peterson E.A., Torres A.R. (1984):

*Displacement chromatography of proteins.*

Methods in Enzymology 104, 113-133

89) Pharmacia / LKB (1988):

Sephacryl high resolution size exclusion gel (technical data sheet)

90) Pintor J., Rottlan P., Torres M., Miras-Portugal M.T. (1992):

*Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release.*

Anal. Biochem. 200, 296-300

91) Pintor J., Miras-Portugal M. T. (1995b) :

*P2 purinergic receptors for diadenosine polyphosphates in the nervous system.*

Gen. Pharmacol. 26(2), 229-35

92) Pravenec M., Zidek V., Landa V., Kostka V., Musilova A., Kazdova L., Fucikova A., Krenova D., Bila V., Kren V. (2000):

*Genetic analysis of cardiovascular risk factor clustering in spontaneous hypertension.*

Folia Biol 46(6): 233-40

93) Ralevic V., Hoyle C.H., Burnstock G. (1995):

*Pivotal role of phosphate chain length in vasoconstrictor versus vasodilator actions of adenine dinucleotides in rat mesenteric arteries.*

J. Physiol. 484, 703-713

94) Ralevic V., Burnstock G. (1996):

*Discrimination by PPADS between endothelial P<sub>2Y</sub> and P<sub>2U</sub> purinoceptors in the isolated mesenteric arterial bed.*

Br. J. Pharmacol. 118(2), 428-34

95) Raymond J.R., Hnatowich M., Lefkowitz R.J., Caron M.G. (1990):

*Adrenergic receptors: models of signal transduction processes.*

Hypertension 15, 119-131

96) Regnier F.E. (1987):

*Chromatography of complex protein mixtures.*

J. Chromatogr. 418, 115-143

97) Reisin E., Abel R., Modan M., Silverberg D.S., Eliahou H.E., Modan B. (1978):

*Effect of weight loss without salt restriction on the reduction of blood pressure in overweight hypertensive patients.*

New Engl. J. 298, 1-6

98) Riede U.N., Schäfer H.E. (1993):

*Arterielle Hypertonie. In: Allgemeine und spezielle Pathologie*

Thieme Verlag Stuttgart, 3.Auflage, S.396

99) Rieger G. (1994):

*Primäre arterielle Hypertonie. In: Classen, Diehl, Kochsiek (Hrsg.)*

Innere Medizin. Urban & Schwarzenberg Verlag, 3.Auflage, S.1186

100) Ripoll C., Martin F., Manuel Rovira J., Pintor J., Soria B. et al. (1996):

*Diadonsine polyphosphates. A novel class of glucose-induced intracellular messengers in the pancreatic beta-cell.*

Diabetes 45, 1431-1434

- 101) Rodriguez Pascual F., Torres M., Rotllan P., Miras-Portugal M.T. (1992) :  
*Extracellular hydrolysis of diadenosine polyphosphates, Ap<sub>n</sub>A, by bovine chromaffin cells in culture.*  
Arch. Biochem. Biophys. 297(1), 176-83
- 102) Rosskopf D., Düsing R., Siffert W.(1993):  
*Membrane sodium-proton exchange and primary hypertension.*  
Hypertension 1993; 21:607
- 103) Sachinides A. (1987):  
*Nachweis und Charakterisierung einer bei essentieller Hypertonie im Plasma auftretenden Substanz mit blutdrucksteigernder Wirkung.*  
Diss.:Westfälische Wilhelms Universität zu Münster, Institut für Biochemie
- 104) Sanada H., Jose P.A., Hazen-Martin D., Yu P.Y., Xu J., Bruns D.E. et al. (1999):  
*Dopamine-1 receptor coupling defect in renal proximal tubule cells in hypertension.*  
Hypertension 33, 1036-1042
- 105) Schiebler T.H., Schmidt W. (1991):  
Kapitel *Niere*, 608-617 in: *Anatomie*  
Schiebler T.H., Schmidt W. (Hrsg.), 5.Auflage, Springer Verlag, Berlin
- 106) Schlatter E., Ankorina I., Haxelmans S., Kleta R. (1995):  
*Effects of diadenosine polyphosphates, ATP and angiotensin II on cytosolic Ca<sup>2+</sup> activity and contraction of rat mesangial cells.*  
Pflugers Arch. 430, 721-728
- 107) Schlüter H., Klostermann A., Kluth B., Hürster A., Zidek W. (1993):  
*Displacementchromatographie von Biomolekülen. Würzburger Kolloquium: Kapillarelektrophorese, Chromatographie. Fortschrittsberichte '93.*  
Bertsch-Verlag  
Straubing 1993

108) Schlüter H., Zidek W. (1993):

*Application of non-size-related separation effects to the purification of biologically active substances with a size-exclusion gel.*

J. Chr. 639, 17-22

109) Schlüter H., Offers E., Zidek W. et al. (1994):

*Diadenosine polyphosphates and the physiological control of blood pressure.*

Nature 367, 186-188

110) Schlüter H., Tepel M., Zidek W. (1996):

*Vascular actions of diadenosine phosphates.*

J. Auton. Pharmacol. 16, 357-362

111) Schlüter H., Jankowski J. (2000):

*Displacement Chromatography* in: *Protein Liquid Chromatography*.

505-522, ed. M.Kastner, Elsevier Amsterdam, The Netherlands

112) Schmidt R.F., Thews G. (Hrsg.) (1997):

*Physiologie des Menschen, 27.Auflage*

Springer-Verlag

113) Schmieder R.E., Langenfeld M.R., Hilgers K.F. (1997):

*Endogenous erythropoietin correlates with blood pressure in essential hypertension.*

Am. J. Kidney Dis. 29, 376-382

114) Schulze-Lohoff E., Zanner S., Ogilvie A., Sterzel R.B. (1995):

*Vasoactive diadenosine polyphosphates promote growth of cultured renal mesangial cells.*

Hypertension 26(6PT1), 899-904

115) Sharma AM., Schorr U., Distler A. (1993):

*Insulin resistance in young saltsensitive normotensives subjects.*

Hypertension 1993; 21:273

- 116) Silbernagl S., Despopoulos A. (1991):  
Taschenatlas der Physiologie, 4.Aufl. , Thieme Verlag Stuttgart, 120-153
- 117) Stryer L. (1991):  
*Biochemie.*  
Spektrum Akademischer Verlag  
Heidelberg Berlin 1991
- 118) Tepel M., Heidenreich S., Zhu Z., Walter M., Nofer J.R., Zidek W. (1994):  
*Captopril inhibits the agonist-induced increase of cytosolic free  $Ca^{2+}$  in glomerular mesangial cells.*  
Kidney Int. Sup 46(3): 696-702
- 119) Tepel M., Bachmann J., Schlüter H., Zidek W. (1996):  
*Diadenosine polyphosphates increase cytosolic calcium and attenuate angiotensin-II induced change of calcium in vascular smooth muscle cells.*  
J. Vasc. Res. 33, S.132
- 120) Tepel M., Heidenreich S., Schlüter H., Beinlich A., Nofer J.R., Walter M., Assman G., Zidek W. (1996b):  
*Diadenosine phosphates induce transplasmamembrane calcium influx in cultured glomerular mesangial cells.*  
Eur. J. Clin. Invest. 26(12), 1077-84
- 121) Tepel M., Jankowski J., Schlüter H., Bachmann J., van der Giet et al. (1997):  
*Diadenosine polyphosphates` action on calcium and vessel contraction.*  
Am. J. Hypertens. 10, 1404-1410
- 122) Tepel M., Heidenreich S., Zidek W. (1998):  
*Transgenic hypertensive rats show a reduced angiotensin II induced  $[Ca^{2+}]_i$  response in glomerular mesangial cells.*  
Life Sci. 62(1): 69-76

- 123) Urata H., Tanabe Y., Kionaga A., Ikeda M., Arakawa K. (1987):  
*Antihypertensive and volume-depleting effects of mild exercise on essential hypertension.*  
Hypertension 9, 245-252
- 124) Vahlensieck U., Boknik P., Knapp J., Linck B., Müller F.U. et al. (1996):  
*Negative chronotropic and inotropic effects exerted by Ap<sub>6</sub>A via A1- adenosine receptors.*  
Br. J. Pharmacol. 119, 835-844
- 125) Van der Giet M., Khattab M., Borgel J., Schlüter H., Zidek W. (1997):  
*Differential effects of diadenosine polyphosphates on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney.*  
Br. J. Pharmacol. 120, 1453-1460
- 126) Van der Giet M., Cinkilic O., Jankowski J., Tepel M., Zidek W., Schlüter H. (1999):  
*Evidence for two different P2X-receptors mediating vasoconstriction of Ap<sub>5</sub>A and Ap<sub>6</sub>A in the isolated perfused rat kidney.*  
Br. J. Pharmacol. 127, 1463-1469
- 127) Van der Giet M., Schmidt S., Tolle M., Jankowski J., Schlüter H., Zidek W., Tepel M. (2002):  
*Effects of dinucleotide polyphosphates on regulation of coronary vascular tone.*  
Eur J Pharmacol. 448(2-3) : 207-13
- 128) Warner A.H., Huang F.L. (1974):  
*Biosynthesis of diguanosine nucleotides. II. Mechanism of action of GTP: GTP guanylyltransferase on nucleotide metabolism in brine shrimp embryos.*  
Can. J. Biochem. 52, 241-251
- 129) Wheelock G.D., Sieber K.P., Hagedorn H.H. (1991):  
*Rapid isolation of a neurohormone from mosquito heads by HPLC.*  
J. Chromatogr. 542, 508 ff.

130) Wright G.L., Fish S., Johnson P., McCumbee W.D. (1988):

*An endogenous peptide that induces long-term blood pressure.*

Life Sci. 43, 111-116

131) Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Koboyashi M. (1988):

*A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.*

Nature 31, 411-415

132) Zidek W., Losse H., Dorst K.G., Zumkley H., Vetter H. (1982):

*Intracellular sodium and calcium in essential hypertension.*

Klin. Wochenschr. 60, 859-862

133) Zidek W., Sachinides A., Schmidt W. et al. (1985):

Klin. Wochenschrift 63 Suppl. 3, 113-116

134) Zidek W., Heckmann U., Losse H. et al. (1986):

*Effects on blood pressure of cross circulation between spontaneously hypertensive rats.*

Clinical Exp. Hypert. Art. 8, 347-354

135) Zidek W., Krefting E.R., Kisters K., Spieker C., Rahn K.H. (1989):

*Electrone-probe x-ray microanalysis of sodium ion content in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive and normotensive rats.*

J. Hypert. Suppl. 6, 150-151

## **10. Danksagung**

Ich danke

Herrn Prof. Dr. Walter Zidek für die Möglichkeit in seiner Forschungsgruppe mitzuarbeiten und für die Bereitstellung von Räumlichkeiten, Geräten und Arbeitsmitteln.

Herrn Privatdozent Dr. Joachim Jankowski für die Vergabe des Themas, für die freundliche Unterstützung bei der experimentellen Arbeit, für die Geduld, mit der er mir bei allen Problemen, die sich im Rahmen dieser Arbeit ergaben, geholfen hat sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Nina Stephan, Simone Kathemann, Dominik Schmaltz und Lars Henning für die freundliche und hilfreiche Zusammenarbeit.

Andreas Friebe für das Korrekturlesen der Arbeit.

Arkadius Pacha für die geduldige und mentale Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit sowie für die Hilfe bei plötzlich auftretenden Computerproblemen. Ohne Dich hätte die Fertigstellung dieser Arbeit sicher mehr Zeit und Nerven gekostet.

Meinen Eltern, die mir das Studium überhaupt ermöglicht haben. Sie hatten immer Verständnis und gaben mir die nötige Sicherheit, meine Ausbildung meinen Vorstellungen entsprechend gestalten zu können.

## **11. Lebenslauf**

**Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.**



**12. Erklärung**

Ich, Anna Ewa Cyrek, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Isolierung und Identifizierung von Diadenosinhexaphosphat aus Nierengewebe“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

06.11.2006

---

Anna Ewa Cyrek