

Aus der Med. Klinik IV
Endokrinologie und Nephrologie
des Universitätsklinikums Benjamin-Franklin
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. W. Zidek

**Versuche zur Identifizierung
eines aus der bovinen Nebenniere
isolierten Trinukleotids**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von: **Anna Spanier**
aus : Odessa

Referent: PD. Dr. rer. nat. H. Schlüter

Koreferent: PD. Dr. Ch. Harteneck

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 12.12.2003

Abstract

Im Laufe der Forschungen zu der Ätiologie und Pathogenese der primären Hypertonie wurde die blutdrucksteigernde Rolle von vasoaktiven Nukleotiden entdeckt. Auf der Suche nach jenen vasokonstringierend wirkenden Substanzen in endokrinen Geweben und Zellen wurde ein Nukleotid unbekannter chemischer Struktur aus der bovinen Nebenniere isoliert. Ziel der vorliegenden Arbeit war die vollständige Identifizierung dieses Nukleotids, dem in vorangegangenen Untersuchungen die Molekülmasse von 973 Da und die Bausteine Guanosinphosphat sowie zwei Cytidinphosphat-Moleküle zugeordnet werden konnten.

Für die Identifizierung der Substanz wurde eine neue biochemisch-analytische Methodenkombination angewandt. Hierzu wurden die zu analysierenden Substanzen mit immobilisierten Enzymen mit bekannter Substratspezifität inkubiert und die Reaktionsprodukte mit der MALDI-Massenspektrometrie nachgewiesen. Als Enzyme wurden alkalische Phosphatase, 3'-Phosphodiesterase und 5'-Phosphodiesterase eingesetzt. Es konnte festgestellt werden, dass das untersuchte Trinukleotid eine randständige Phosphatgruppe sowie 3'- und 5'- Phosphoesterbindungen besitzt. Da sich im Verlauf der durchgeführten Untersuchungen vier Isomere als theoretisch mögliche Strukturformeln des gesuchten Trinukleotids erwiesen, liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei nicht um eine reine Substanz, sondern um ein Isomerengemisch handelt. Um eine endgültige Identifizierung des betreffenden Trinukleotids zu erreichen, sollten neue, verbesserte Methoden der Substanzreinigung erarbeitet werden.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung	6
2 Methoden	16
2.1 Die enzymatische Analytik	16
2.1.1 Aktivierung von Affinitätschromatographiegelen.....	16
2.1.2 Die enzymatische Spaltung	17
2.2 Identifizierung von Dinukleosidpolyphosphaten	19
2.2.1 Die MALDI-Massenspektrometrie	19
2.2.2 Aufbau eines linearen Massenspektrometers	20
2.2.3 Der Desorptionsprozess	22
2.2.4 Das Reflektorflugzeit-Massenspektrometer	24
2.2.5 Die Probenpräparation	25
2.2.6 Das Messen der Proben	26
2.3 Material	27
2.3.1 Verwendete Chemikalien	27
2.3.2 Verwendete Geräte	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Versuch zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von immobilisierter alkalischer Phosphatase	29
3.2 Versuch zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von immobilisierter NADase	33
3.3 Versuch zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von immobilisierter 3'-Nukleotidase	38
3.4 Versuch zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von immobilisierter 5'-Nukleotidase.....	41
3.5 MALDI-MS des zu identifizierenden Trinukleotids.....	44

4	Diskussion	59
5	Zusammenfassung	72
6	Literaturverzeichnis	73

Danksagung

Ich danke

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

Herrn PD Dr. H. Schlüter für die Themenstellung, für die technische Anleitung und freundliche Betreuung, für seine fachlichen Anregungen und stete Diskussionsbereitschaft sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts;

Herrn Dr. W. Kirsten, Frau C. Feder und Frau S. Woitschutzke für ihr engagiertes Korrekturlesen;

meiner Mutter und meinem Vater, die mir das Studium und die Promotion ermöglichten.