

## 1 Einleitung

Die primäre Hypertonie ist durch eine Fehlregulation des Herz-Kreislaufsystems zugunsten zu hoher Blutdruckwerte gekennzeichnet.

Von der arteriellen Hypertonie sind mehr als 10% der Bevölkerung der Industrienationen betroffen. Wie Langzeitstudien beweisen, sinkt die durchschnittliche Lebenserwartung bei Männern und Frauen in allen Altersgruppen mit steigenden Blutdruckwerten ab (Kannel und Sorlie, 1975). Zwischen erhöhten Blutdruckwerten und dem Auftreten der kardiovaskulären Krankheiten, wie zum Beispiel Herzinfarkt oder Schlaganfall, lässt sich eine direkte Korrelation festmachen (Rose, 1981). Es gilt als unbestritten, dass bei Patienten mit primärer Hypertonie der periphere Widerstand der Gefäße zunimmt (Messerli et al., 1978). Der erhöhten peripheren Vasokonstriktion folgt frühzeitig eine strukturelle Veränderung der Gefäßwand (Folkow, 1982).

Es ist bis heute nicht gelungen, die Ursache der primären Hypertonie zu finden. Durch Parabioseversuche wurden Hinweise auf die Existenz humoraler Faktoren gefunden, die den Blutdruck beeinflussen. Dabei wurde gezeigt, dass das Blut von hypertonen Ratten bei normotonen Ratten einen Blutdruckanstieg bewirkt (Dahl et al., 1969). Durch Transplantationen von Nieren spontan hypertensiver auf normotone Ratten ließ sich die Hypertonie auf normotone Tiere übertragen. Die Übertragung von Nieren normotoner auf spontan hypertensive Ratten normalisierte den Blutdruck der hypertonen Tiere (Bianchi et al., 1974). Ähnliche Beobachtungen wurden bei menschlichen Nierentransplantationen gemacht (Curtis et al., 1983).

Infolge dieser Hinweise auf einen im Blut zirkulierenden Wirkstoff, der an der Hypertoniegenese beteiligt sein könnte, entstand die Arbeitshypothese der Forschungsgruppe, die einen direkten Mechanismus der Hypertonieentstehung annimmt. Demnach soll der gesteigerte Blutdruck bei Patienten mit essentieller Hypertonie durch eine erhöhte Konzentration eines vasopressorischen Faktors verursacht werden (Zidek und Vetter, 1987a, b; Michaelakis et al., 1975; Bloom et al., 1976).

Als Bestätigung dieses Modells können die Kreuzzirkulationsversuche betrachtet werden, mit deren Hilfe es Zidek gelang, die Hypertonie von spontan hypertensiven auf normotone Ratten zu übertragen (Zidek et al., 1985a; Zidek et al., 1989a).

Diese Versuche wurden an 54 Paaren von spontan hypertensiven und normotonen Ratten durchgeführt. Das Blut wurde durch zwei Anastomosen zwischen den Arterien carotis und den externen Jugularvenen gepumpt, mit der gleichen Flussrate in dem großen und dem kleinen Kreislauf. Dabei stieg der arterielle Blutdruck der normotonen Ratten, deren Blutsystem mit dem der unbehandelten spontan hypertensiven Ratten zusammengeschlossen worden war, signifikant an, während der Blutdruck der hypertonen Tiere abfiel.

Diese Versuchsergebnisse erlaubten der Arbeitsgruppe die Hypothese aufzustellen, dass in dem Blut von Patienten mit essentieller Hypertonie blutdrucksteigernde Faktoren zirkulieren, deren Konzentration im Vergleich zu Personen mit einem normalen Blutdruck erhöht ist. Da sich die Konzentrationen der heutzutage bekannten Vasokonstriktoren bzw. Wachstumsfaktoren bei Normo- und Hypertonikern nicht signifikant unterscheiden, zieht man die Schlussfolgerung, dass es sich bei den Vasokonstriktoren bzw. Wachstumsfaktoren, die bei Hypertonikern in ihrer Konzentration signifikant erhöht sind, um unbekannte Faktoren handeln muss.

Aus diesem Grund sucht die Arbeitsgruppe nach neuen, bisher unbekanntem vasokonstringierenden Substanzen.

Diese Suche findet im Blut und Organen statt. Zu diesem Zweck wird das Untersuchungsgut homogenisiert und mit verschiedenen chromatographischen Methoden fraktioniert. Das Aufspüren von Fraktionen mit vasokonstringierender Wirkung wird mit dem System der isolierten, perfundierten Niere durchgeführt (Schlüter et al., 1993).

Im Jahre 1985 hat die Suche nach bislang unbekanntem vasoaktiven Wirkstoffen begonnen. Damals ist es gelungen, vasokonstringierend wirkende Substanzen in höheren Konzentrationen im Blutplasma von spontan hypertensiven Ratten nachzuweisen. Eine Fraktion aus solchem Rattenplasma enthielt Substanzen mit dem Molekulargewicht zwischen 1000 und 2000 Da, die innerhalb von zehn Minuten nach deren intravenöser Injektion den Blutdruck von normotonen Ratten um  $16.3 \pm 8.2$  mmHg steigerten (Zidek et al., 1985).

Als problematisch erwies sich bei diesen Versuchen die Tatsache, dass man nur sehr begrenzte Mengen an Rattenblut zur Verfügung hatte. Aus diesem Grunde wurde die Suche nach blutdrucksteigernden Faktoren im menschlichen Plasma fortgesetzt. Dort konnten im Laufe der Jahre weitere vasoaktive Fraktionen isoliert und näher beschrieben werden (Bachmann et al., 1990; Zidek et al., 1990; Bachmann et al., 1991).

Da das Blutplasma sehr viele verschiedene Substanzen enthält, war die Isolierung von homogenen vasokonstringierend wirkenden Fraktionen sehr schwierig. So ist man zu der Suche nach vasoaktiven Substanzen in menschlichen Thrombozyten übergegangen. Nach der Einführung einer Matrix zur Bestimmung der Molekülmassen von Nukleotiden mit der MALDI-MS konnten die blutdrucksteigernden Substanzen, die 1992 aus den menschlichen Thrombozyten isoliert und näher charakterisiert worden sind (Agha et al., 1992), als die Diadenosinphosphate  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  identifiziert werden. Mit dieser Arbeit ist die Existenz dieser Wirkstoffe erstmals beim Menschen nachgewiesen worden (Schlüter et al., 1994).

Später wurde festgestellt, dass das Coenzym A-Glutathion-Disulfid (CoASSG) in Nebennieren von Rindern eine vasokonstringierende Wirkung hat (Schlüter et al., 1995). Außer für CoASSG gibt es erste Hinweise für die Existenz von Dinukleosidpolyphosphaten in menschlichen Nebenschilddrüsen.

Nach der Entdeckung der Diadenosinphosphate in den menschlichen Thrombozyten stellte sich die Frage, ob die blutdrucksteigernden Wirkstoffe auch in anderen humanen Zellen vorkommen. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Organe (Herz, Niere, Nebenniere, Nebenschilddrüse, Hirn, Placenta, Plasma, Lymphozyten, Endothelzellen) untersucht.

Zum Nachweis von Dinukleotiden in Organen wurde das zu untersuchende Material zuerst homogenisiert. Dann wurde mit Hilfe einer präparativen Säule (Reversed-Phase Chromatographie) ein Konzentrat gewonnen, in dem Nukleotide vorhanden waren. Im nächsten Schritt wurde das Konzentrat mit einer Anionenaustauscher-Säule bearbeitet. Die resultierenden Fraktionen wurden mit der Reversed-Phase HPLC getrennt und die hiernach erhaltenen Fraktionen mit einer deutlichen  $UV_{254nm}$ -Absorption massenspektrometrisch untersucht.

Die massenspektrometrische Analyse wurde mit Hilfe der MALDI-MS durchgeführt.

Die Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) wurde gegen Ende der 80-er entwickelt und konnte die Suche und den Nachweis von vasokonstringierenden Substanzen wesentlich erleichtern. Dieses Verfahren hat sich mittlerweile zu einer der wichtigsten biochemischen Analysemethoden entwickelt. Mit Hilfe von MALDI-MS kann man Informationen über das Molekulargewicht und die Struktur einer Substanz erhalten.

Zur Zeit stellt die MALDI-Massenspektrometrie die einzige Methode zum Nachweis von Diadenosinpolyphosphaten im unteren  $\mu\text{g}$ -Bereich dar.

Die Methode der MALDI-Massenspektrometrie hat aber auch Grenzen bezüglich ihrer analytischen Möglichkeiten. Die praktische Nachweisgrenze der MALDI-MS liegt bei 10 ng Gesamtmenge im Bezug auf die Dinukleotidmenge.

Einen weiteren Nachteil stellt die Tatsache dar, dass die Information über das Molekulargewicht einer Substanz noch kein eindeutiger Beweis für die Identität dieser Substanz ist. Die Frage nach der Stereochemie läßt sich mit Hilfe von MALDI-Daten in der Regel auch nicht beantworten; auch Konstitutionsisomeren lassen sich auf diesem Wege nicht klären. Zum Beispiel kann im Falle einer Substanz mit der Strukturformel  $\text{Ap}_3\text{A}$  nicht bestimmt werden, ob eine 3'- oder eine 5'-Phosphoesterbindung mit der Ribose vorliegt, d.h. ob das Nukleosid mit dem dritten oder dem fünften C-Atom der Ribose verknüpft ist.

Um zusätzliche Auskünfte über die Zusammensetzung von Molekülen zu erhalten, kann man die PSD-MALDI-MS heranziehen. Die Fragment-Ionen, die bei der Messung entstehen, werden bei dieser Methode sichtbar gemacht. Sie entsprechen einzelnen „Bausteinen“, aus denen sich die Substanz zusammensetzt. Bei Nukleotiden erhält man über die PSD-MALDI-MS Informationen über die vorhandenen Basen, Zucker und Phosphate sowie Anhaltspunkte über die Verknüpfung der Bausteine. Zum Beispiel zerfällt das  $\text{Ap}_6\text{G}$  zu dem  $\text{Ap}_5$  und dem GMP. Anschließend erfolgt der Vergleich des gewonnenen Bausteinmusters mit dem von authentischen Diadenosinpolyphosphaten.

Die PSD-MALDI-Massenspektrometrie erlaubt es zwar, die über die MALDI-MS erhaltenen Informationen weitgehend zu präzisieren, jedoch sind bei einer ursprünglich unbekanntem

Substanz oft nur Auskünfte über die Molekulargewichte der einzelnen Substanzbausteine zu erhalten.

Um einen zweifelsfreien Nachweis von 5',-5'-Diadenosinpolyphosphaten zu gewährleisten, muss eine biochemisch-analytische Methode angewandt werden, die Aufschlüsse über die Stereochemie der Dinukleotide geben kann, also über die Frage danach, ob eine 3'- oder eine 5'-Phosphoesterbindung mit der Ribose vorliegt.

Bisher erfolgte der Nukleotidnachweis über die Kopplung der enzymatischen Analytik mit HPLC-Verfahren. Die Methode der enzymatischen Analytik beruht auf der hohen Substratspezifität eines Enzyms. Zum Beispiel besitzt die 5'-Nukleotidase, die aus *Crotalus durissus* isolierbar ist, eine Spezifität für Phosphoesterbindungen mit der 5'-Hydroxylgruppe der Ribose. Enthält also eine Substanz eine solche Bindung, und inkubiert man sie mit der 5'-Nukleotidase, so wird diese Bindung gespalten. So kann zum Beispiel das Ap<sub>6</sub>G nach der Inkubation mit der 5'-Nukleotidase zu dem AMP und dem Gp<sub>5</sub> oder zu dem GMP und dem Ap<sub>5</sub> gespalten werden.

Die alkalische Phosphatase spaltet endständige Phosphatgruppen ab. Inkubiert man zum Beispiel das Coenzym A mit der alkalischen Phosphatase, resultieren aus dieser Reaktion das dephospho-Coenzym A und ein anorganischer Phosphatrest. Ap<sub>5</sub>A würde von der alkalischen Phosphatase nicht in seiner Struktur verändert, da dieses Nukleotid lediglich über innenverknüpfte Phosphatgruppen verfügt.

Die enzymatische Analytik kann man auch zur Sequenzierung von Peptiden nutzen. Bei der Inkubation eines Peptids mit der entsprechenden Exopeptidase erfolgt eine sukzessive Abspaltung von Aminosäuren. Zum Beispiel spaltet die Pyroglutamat-Aminopeptidase ausschließlich die N-terminal gelegenen Pyroglutamat-Reste von einem Peptid ab. Inkubiert man ein Peptid mit einer entsprechenden Endopeptidase, so wird das Molekül dort gespalten, wo bestimmte Aminosäuren enthalten sind. Zum Beispiel spaltet die Endopeptidase Trypsin Peptide, die die benachbarten Aminosäuren Arginin und Lysin enthalten. Das Chymotrypsin hydrolysiert alle Peptide mit den benachbarten Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan.

Die Arbeitsgruppe nutzt die enzymatische Analytik dazu, Erkenntnisse über den strukturellen Aufbau der zu untersuchenden Wirkstoffe zu gewinnen. Vermutet man eine bestimmte funktionelle Gruppe als Strukturelement einer Substanz, so inkubiert man diese Substanz gezielt mit einem entsprechenden Enzym, das diesen Molekülteil substratspezifisch spaltet. Anschließend werden die Reaktionsprodukte mit der HPLC-Analytik bzw. mit der MALDI-MS nachgewiesen. Ist die Ausgangssubstanz im Laufe der Inkubation gespalten worden, gilt als nachgewiesen, dass die vermutete funktionelle Gruppe am Aufbau dieser Substanz beteiligt ist. Können dagegen nach der Reaktion keine Spaltprodukte, sondern nur der zu untersuchende Wirkstoff selbst nachgewiesen werden, wird davon ausgegangen, dass die funktionelle Gruppe im Molekül nicht vorhanden ist.

Die entscheidenden Nachteile des Nachweises der Reaktionsprodukte über die HPLC-Analytik im Vergleich zu dem Nachweis der Produkte über die MALDI-MS sind zum einen die Tatsache, dass hierbei wesentlich größere Substanzmengen, und zum anderen ein bedeutend größerer Arbeits- und Zeitaufwand erforderlich sind.

Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt, bei dem die Reaktionsprodukte der enzymatischen Analytik mit der MALDI-MS nachgewiesen werden.

Als besonderes Problem erweist sich bei diesem Nachweis, dass die Nachweisgrenze bei dieser Methode mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,0949 tangentialer eintritt. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Nachweis bei einer Konzentration von 0,003 T

Es gibt eine große Vielfalt an Reagenzien, die zur Aktivierung von Affinitätschromatographiegelen dienen. Dazu werden Gele über ihre Amino-, Hydroxy- oder Thiolgruppen an die Aktivierungsreagenzien gekoppelt. Zum Beispiel können die freien Hydroxylgruppen des Trägermaterials mit Bromcyan zu Isozyanatgruppen aktiviert werden:



Aktivierung

Die Affinitätschromatographie wird zum Beispiel zur Antigenimmobilisation mit der anschließenden Antikörperreinigung eingesetzt. Ein anderer Anwendungsbereich für diese Trennmethode ist die Reinigung von Koagulationsproteinen; dazu wird immobilisiertes Heparin verwendet.

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Nutzungsmöglichkeiten der aktivierten Affinitätschromatographiegelen zur Immobilisation von Enzymen zu testen. Als aktiviertes Gel wurde dabei eine CNBr-aktivierte Sepharose verwendet. Die Sepharose ist ein perlenartiges Agarosegel. Die Hydroxylgruppen ihrer Zuckerreste können zum kovalenten Andocken von Liganden eingesetzt werden. Die mit dem Bromcyan aktivierte Sepharose ermöglicht es, Liganden mit einer primären Aminogruppe durch eine spontane Reaktion schonend, einfach und schnell zu immobilisieren.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifizierung der Verknüpfung der Phosphoribose erster Bindung eines Trinukleotids, das im Laufe der vorausgegangenen Versuche der Arbeitsgruppe mehrfach aus der bovinen Nebenniere isoliert wurde. Es wurde in einer vorangegangenen Arbeit mit dem Titel „Isolierung und Identifizierung von Isomeren des Trinukleotids GCC aus der bovinen Nebenniere“ beschrieben. Diese Dissertation, die 1999 von Stefanie Ebbert der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum vorgelegt wurde, befasste sich mit der Suche nach Nukleotiden in der Nebenniere des Rindes, mit dem Ziel, die Struktur der Nukleotide zu entschlüsseln. In dieser Arbeit konnte in dem lyophilisierten und aufgereinigten Extrakt der Nebenniere ein Signal mit der Masse von 975,0 Da MALDI-massenspektrometrisch registriert werden. Das Molekulargewicht dieser Substanz betrug somit 974,0 Da, da während des Desorptionsvorgangs der MALDI-

Massenspektrometrie vorrangig einfach protonierte Molekölionen,  $[M + H]^+$ , gebildet werden (siehe Abschnitt 2.3.3). Folglich muss von dem gemessenen Signal die Masse eines Protons (1 Da) subtrahiert werden.

Die zusätzlich herangezogene PSD-MALDI-MS nach der Substanzbehandlung mit der alkalischen Phosphatase bestätigte damals die nukleotidische Natur dieser Substanz und zeigte außerdem ihre Fragmentationen auf. Unter den Bestandteilen des untersuchten Nukleotids befanden sich Cytosin, Guanin und Cytidin. Außerdem konnten die Schlussfolgerungen des Spaltungsversuchs mit der alkalischen Phosphatase insofern ausgeweitet werden, als dass sie die Annahme einer 3'-5'-Bindung innerhalb des Trinukleotids stützten (siehe Diskussionsteil der zitierten Doktorarbeit).

Unter Berücksichtigung der PSD-MALDI-MS-Fragmente ergaben sich die in der Tabelle 9 vorgestellten möglichen Strukturen für das Trinukleotid GCC der Masse 973 Da.





In den von Ebbert untersuchten Proben ließen sich jedoch nicht alle der sechs theoretisch möglichen Isomere des Trinukleotids mit der Masse 973 Da nachweisen. Da die PSD-MALDI-massenspektrometrisch untersuchten HPLC-Fractionen entweder die Fragmente M – Guanosin + H<sub>2</sub>O, M – GMP oder M – GDP aufwiesen, konnte die Schlussfolgerung gemacht werden, dass in der Strukturformel der untersuchten Substanz eine Randständigkeit von Guanosin, GMP oder GDP bestehen muss. Daher sind Isomere dieses Trinukleotids mit der Basensequenz CGC sehr unwahrscheinlich. Somit entfallen die Strukturvorschläge 3 und 4 der Tabelle 9. Weitere Ausschlüsse der möglichen Isomere des Trinukleotids mit der Gesamtformel GCC konnten in der Dissertation „Isolierung und Identifizierung von Isomeren des Trinukleotids GCC aus der bovinen Nebenniere“ aufgrund der untersuchten HPLC-Fractionen nicht gemacht werden.