

Aus der Med. Klinik (IV) mit Schwerpunkt Nephrologie und Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Isolierung des Uridinadenosintriphosphats
aus bovinem Nebennierengewebe

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité Universitätsmedizin Berlin

von

Alexandra Gittel
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. J. Jankowski
 2. Prof. Dr. med. W. Motz
 3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Vetter

Datum der Disputation: 10.06.2008

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
2	PROBLEMSTELLUNG	17
3	MATERIAL UND METHODEN.....	19
3.1	Allgemeiner Teil	19
3.1.1	<i>Chromatographische Verfahren</i>	<i>19</i>
3.1.2	<i>Reversed-Phase Chromatographie.....</i>	<i>20</i>
3.1.3	<i>Affinitätschromatographie.....</i>	<i>21</i>
3.1.4	<i>High Performance Liquid Chromatographie</i>	<i>22</i>
3.1.5	<i>Matrix-Associated Laser Desorption/Ionisation-Mass Spectrometrie.....</i>	<i>22</i>
3.2	Spezieller Teil.....	25
3.2.1	<i>Gesamtübersicht.....</i>	<i>25</i>
3.2.2	<i>Extraktion und Lyse.....</i>	<i>26</i>
3.2.3	<i>Denaturierung.....</i>	<i>27</i>
3.2.4	<i>Präparative Reversed-Phase-Chromatographie</i>	<i>27</i>
3.2.5	<i>Affinitätschromatographie.....</i>	<i>28</i>
3.2.6	<i>Analytische Reversed-Phase-Chromatographie</i>	<i>28</i>
3.2.7	<i>Effekt des Eluats der Reversed-Phase-Chromatographie auf den Perfusionsdruck an der isolierten, perfundierten Rattenniere</i>	<i>30</i>
3.2.8	<i>MALDI-Massenspektrometrie.....</i>	<i>31</i>
3.2.9	<i>MALDI-LIFT-TOF/TOF-Massenspektrometrie</i>	<i>32</i>
3.2.10	<i>Enzymatische Spaltungsversuche.....</i>	<i>32</i>
4	ERGEBNISSE.....	34

4.1	Isolierung des Uridinadenosintriphosphats aus bovinem Nebennierengewebe	34
	4.1.1 <i>Präparative Reversed-Phase-Chromatographie</i>	34
	4.1.2 <i>Affinitätschromatographie</i>	36
	4.1.3 <i>Analytische Reversed-Phase-Chromatographie</i>	37
4.2	Identifizierung des Up ₃ A	41
	4.2.1 <i>MALDI-Massenspektrometrie</i>	41
	4.2.2 <i>MALDI-LIFT-TOF/TOF-Massenspektrometrie</i>	42
	4.2.3 <i>Enzymatische Spaltungsversuche</i>	44
5	DISKUSSION	45
6	ZUSAMMENFASSUNG	55
7	LITERATURVERZEICHNIS	57
8	ANHANG	66
	8.1 Geräte und Chemikalien	66
	8.2 Abkürzungsverzeichnis	69
9	DANKSAGUNG	71
10	LEBENS LAUF	72
11	ERKLÄRUNG	73

1 Einleitung

Als Hypertonie werden chronisch erhöhte arterielle Blutdruckwerte bezeichnet. Nach den Richtlinien des Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC 2003) liegt bei Werten oberhalb von 140 mm Hg systolisch und 90 mm Hg diastolisch eine manifeste arterielle Hypertonie vor, ein systolischer Blutdruck von 120 bis 139 mm Hg und ein diastolischer Blutdruck von 80 bis 89 mm Hg wird prähypertensiv genannt (JNC 2003). Gemäß der Definition des JNC wird zwischen zwei Hypertonie-Stadien unterschieden, dem Stadium I von 140 bis 159 mm Hg systolisch und 90 bis 99 mm Hg diastolisch und dem Stadium II ab 160 mm Hg systolisch und 100 mm Hg diastolisch. Wenn systolischer und diastolischer Blutdruck in verschiedene Kategorien fallen, wird die höhere Kategorie zur Klassifizierung des individuellen Blutdrucks zugrunde gelegt. Große Bedeutung hat die Berücksichtigung weiterer Risikofaktoren und bereits eingetretener hypertonietyperischer Organschäden wie Linksherzhypertrophie, Herzinsuffizienz, Myocardinfarkt, Nephrosklerose, zerebrale Atherosklerose, periphere arterielle Verschlusskrankheit und Augenhintergrundveränderungen (JNC 2003).

In den westlichen Industrienationen zählt die arterielle Hypertonie zu den häufigsten Erkrankungen des Menschen (CARRETERO und OPARIL 2000). Die Prävalenz beträgt in den westlichen Industrienationen 20 %. Im Alter von 25 bis 74 Jahren liegt die Zahl der normotonen Männer unter 40 % und die der normotonen Frauen unter 60 % (GASSE et al. 2001).

Es wird prinzipiell zwischen der primären, essentiellen Hypertonie und den sekundären Hypertonieformen unterschieden. Die essentielle arterielle Hypertonie definiert sich als eine multifaktoriell bedingte Erhöhung der systolischen und

diastolischen Blutdruckwerte ohne erkennbare Ursache. Die essentielle Hypertonie macht 90-95 % aller Hypertonieformen aus (JNC 2003). Die Ätiologie ist ungeklärt, in 25-60 % der Fälle finden sich genetische Defekte (CARRETERO und OPARIL 2000).

Lebens- und Ernährungsgewohnheiten wie ein hoher Kochsalz-, Kaffee- und Alkoholkonsum, Nikotin, Stress, Übergewicht, pyknischer Konstitutionstyp und endokrine Faktoren stellen weitere begünstigende Faktoren dar (BHS 2004). Sehr häufig findet sich eine essentielle Hypertonie gemeinsam mit weiteren Erkrankungen des so genannten Metabolischen Syndroms wie Typ-II-Diabetes, Dyslipoproteinämie und Hyperurikämie (BHS 2004).

Die sekundäre arterielle Hypertonie ist eine Form mit bekannter organischer Ursache. Die häufigste sekundäre Hypertonieform ist die renale Hypertonie. So verursachen Nierenarterienstenosen, renoparenchymatöse Nierenerkrankungen und Nierentumoren einen pathologischen Anstieg des Blutdrucks (FISCHER 2002).

Die renoparenchymatöse Hypertonie ist die häufigste renale Hochdruckform. Zu dieser kann es bei allen diffusen Nierenerkrankungen mit Untergang parenchymatösen Gewebes wie zum Beispiel einer Glomerulonephritis, chronischen Pyelonephritis, interstitiellen Nephritis oder Zystenniere kommen. Pathogenetisch steht ein erhöhtes extrazelluläres Flüssigkeitsvolumen durch die reduzierte Ausscheidung von Natrium und Wasser bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz im Vordergrund (KUSKA 1983).

Die renovaskuläre Hypertonie entsteht durch die Stenosierung der Nierenarterien und der daraus resultierenden Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). In zwei Drittel der Fälle ist die Stenosierung arteriosklerotisch bedingt, in einem Drittel der Fälle, vor allem bei jungen Patienten,

handelt es sich um eine fibromuskuläre Stenose (FISCHER 2002). Durch die Minderperfusion der Niere kommt es bei einer Lumeneinengung von über 60 % zu einer vermehrten Bildung von Renin im juxtaglomerulären Apparat. Nach Freisetzung in den Blutkreislauf bewirkt es die Abspaltung von Angiotensin-I aus Angiotensinogen. Mit Hilfe des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) entsteht aus Angiotensin-I das vasokonstriktorisch wirksame Angiotensin-II, das zusätzlich die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde stimuliert. Aldosteron bewirkt eine erhöhte Natriumrückresorption in der Niere und somit eine erhöhte Wasserretention (FISCHER 2002).

Die seltener auftretenden endokrinen Hypertonien entstehen durch eine erhöhte Aktivität verschiedener Hormonsysteme (JNC 2003). Dabei können Tumoren oder Funktionsstörungen der endokrinen Organe, hauptsächlich der Nebenniere, ursächlich sein. In der Nebennierenrinde werden Steroidhormone wie Aldosteron, Kortisol und Androgene gebildet.

Beim *Conn-Syndrom* kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von Aldosteron und anderen Mineralokortikoiden. In 80 % der Fälle ist das Conn-Syndrom durch ein solitäres Nebennierenrinden-Adenom bedingt. In 20 % der Fälle liegt eine uni- oder bilaterale Hyperplasie der Nebennierenrinde vor. Die Leitsymptome des Conn-Syndroms sind Hypertonie, Hypernatriämie und Hypokaliämie (MORIOKA et al. 2000).

Das *Cushing-Syndrom* ist durch eine erhöhte Produktion von Glukokortikoiden, insbesondere von Kortisol, charakterisiert. Ursache ist oft ein Hypophysenvorderlappenhormon oder ein autonomes Adenom der Nebennierenrinde (NEWELL-PRICE et al. 1998). Des Weiteren kann es durch eine langfristige Glukokortikoidtherapie mit einer Dosierung oberhalb der so genannten Cushing-Schwelle zu einem medikamentös induzierten Cushing-Syndrom kommen. Bei einer Vielzahl der Patienten mit Cushing-Syndrom findet sich eine arterielle Hy-

pertonie (ORTH 1998). Pathogenetisch steht der mineralokortikoide Effekt des Kortisols im Vordergrund. Zusätzlich von Bedeutung für die Genese des Bluthochdrucks beim Cushing-Syndrom ist die Tatsache, dass die Glukokortikoide die vaskuläre Wirksamkeit der Katecholamine steigern (MUNCK et al. 1984).

Das Phäochromozytom ist ein katecholaminproduzierender Tumor, der vom chromaffinen Gewebe des Nebennierenmarks (80-95 %) und des Grenzstrangs (5-15 %) ausgeht (ROSENTHAL und CONEN 2000). 70 % der Phäochromozytome produzieren Adrenalin und Noradrenalin. In 90 % der Fälle handelt es sich um einen benignen, unilateral lokalisierten Tumor. Die vermehrt sezernierten Katecholamine wirken vasokonstriktorisch auf Arterien und Arteriolen und erhöhen den peripheren Gefäßwiderstand. Des Weiteren wirken sie positiv chronotrop, dromotrop und inotrop und führen somit zu einer Steigerung des Herzzeitvolumens. Beide Mechanismen bewirken einen Blutdruckanstieg (GIFFORD et al. 1994).

Kardiovaskuläre Hypertonieformen finden sich bei der Aortenisthmusstenose, bei arteriovenösen Fisteln und bei der Aortenklappeninsuffizienz. Wichtigste Form der kardiovaskulären Hypertonie ist die Aortenisthmusstenose. In einem Drittel der Fälle liegt neben der Aortenisthmusstenose eine weitere konnatale Fehlbildung des Herzens oder der großen Gefäße vor. Die Fehlbildung führt zu einer Blutdruckerhöhung im prästenotischen Bereich und zu einer Blutdrucksenkung und Minderdurchblutung im poststenotischen Bereich. Entscheidender Befund der Aortenisthmusstenose ist der Nachweis eines Druckgradienten in der Aorta bzw. einer Blutdruckdifferenz zwischen der oberen und der unteren Extremität (PEES et al. 1999).

Trotz zunehmender pathophysiologischer Erkenntnisse ist die Ätiologie der primären essentiellen arteriellen Hypertonie weiterhin unklar. Eine grundlegende Bedeutung für die Kontrolle des arteriellen Blutdrucks hat der periphere arteriel-

le Gefäßwiderstand. Dieser wird durch viele verschiedene Mechanismen beeinflusst. Die vasoaktiven Hormone und Neurotransmitter wirken als Vasokonstriktoren oder Vasodilatoren an den glatten Gefäßmuskelzellen und führen zu einer Verengung oder Erweiterung des Gefäßdurchmessers (LÜSCHER et al. 1992).

Das Katecholaminsystem wirkt über den Neurotransmitter Noradrenalin des sympathischen Nervensystems und das aus den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks freigesetzte Hormon Adrenalin abhängig von Konzentration und Rezeptorart der Gefäße des Erfolgsorgans vasokonstriktorisch oder vasodilatatorisch. Noradrenalin besitzt eine höhere Affinität zu α - als zu β -Adrenorezeptoren, bei Adrenalin verhält es sich umgekehrt. Dementsprechend bewirkt Noradrenalin in den arteriellen Blutgefäßen der Haut und Schleimhaut, die fast ausschließlich mit α -Rezeptoren ausgestattet sind, eine Vasokonstriktion und eine Erhöhung des peripheren Widerstands (LÜSCHER et al. 1992).

Die Präferenz, mit der Adrenalin β -Adrenorezeptoren stimuliert, führt in überwiegend mit β -Rezeptoren ausgestatteten Gefäßgebieten wie der Skelettmuskulatur, zu einer Vasodilatation und damit zu einer leichten Abnahme des peripheren Gefäßwiderstands. Dies gilt jedoch nur für physiologische Konzentrationen von Adrenalin. In hohen Konzentrationen kommt es zur so genannten Adrenalin-Umkehr, bei der die über α -Rezeptoren vermittelte Vasokonstriktion in der Summe aller Gefäßgebiete überwiegt und der Blutdruck deutlich ansteigt (LÜSCHER et al. 1992).

Auch strukturelle und funktionelle endotheliale Faktoren spielen eine wichtige Rolle in der Blutdruckregulation. Durch das Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen wird eine Mediahypertrophie verursacht, so dass es infolge dessen zu einer Zunahme des peripheren Widerstandes kommt (YANG et al. 2001). Bewirkt wird dieser Effekt durch Wachstums steigernde Substanzen wie dem „platelet deri-

ved growth factor" (PDGF) (SCHWARTZ und REIDY 1987, MEHTA und GRIENGLING 2007). Durch den von Endothelzellen freigesetzten Faktor Endothelin und eine verminderte Ansprechbarkeit der Gefäßmuskelzellen auf den „endothelium derived relaxing factor" (EDRF) kommt es zusätzlich zu einer Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes (YANG et al. 2001). Durch hormonelle Inaktivierung der Natrium-Kalium-ATPase steigt die intrazelluläre Natriumkonzentration. Aufgrund des veränderten Gleichgewichts strömen Na^+ -Ionen in den Extrazellulär- raum und Ca^{2+} -Ionen in die Zellen. Die erhöhte Ca^{2+} -Ionen-Konzentration steigert die Kontraktilität der glatten Muskelzellen, welche wiederum einen erhöhten peripheren Gefäßwiderstand bewirkt (HAMLYN et al. 1982). Dadurch ist auch eine Reaktionsbereitschaft gegenüber Katecholaminen und anderen vaso- konstriktorisch-wirkenden Substanzen erhöht.

Auch die Gefäß erweiternde Wirkung verschiedener Vasodilatoren wird zum Teil über Endothelzellen vermittelt, die ihrerseits Stickstoffmonoxid (NO) oder Prostaglandine (PGI_2 , PGE_2) freisetzen. NO sowie die Prostaglandine PGI_2 und PGE_2 lösen in den glatten Gefäßmuskelzellen eine Dilatation aus (ROBINSON et al. 1995, SARTORI et al. 2005, SMULYAN 2007).

Ansätze zur Aufklärung der Pathogenese der essentiellen arteriellen Hypertonie entwickelten sich aus der Überlegung, dass bei der primären Hypertonie die absolute oder relative Wirkung der Vasokonstriktoren die Wirkung der Vasodilatoren zu überwiegen scheint und dieses Ungleichgewicht letztendlich zu dem erhöhten Gefäßtonus führen könnte (LÜSCHER et al. 1992, SARTORI et al. 2005). Erste Hinweise darauf beobachteten DAHL et al. im Jahre 1969. Mit Hilfe von Parabioseversuchen demonstrierten DAHL et al., dass Blut hypertoner Ratten bei normotonen Ratten einen Blutdruckanstieg bewirkt. Nach Transplantationen von Nieren spontan hypertoner Ratten auf normotone Ratten entwickelten die normotonen Ratten ebenfalls eine Hypertonie. Nach einer Übertragung von Nieren normotoner Ratten auf spontanhypertone Tiere normalisierte sich der Blutdruck der hypertonen Ratten (BIANCHI et al. 1974).

druck der hypertonen Ratten (BIANCHI et al. 1974). Ähnliche Ergebnisse wurden bei menschlichen Nierentransplantationen beobachtet (CURTIS et al. 1983).

Die Ergebnisse der Parabioseversuche von DAHL et al. (1969) konnten schon im Jahre 1985 anhand der Kreuzzirkulationsversuche von ZIDEK et al. bestätigt werden. Bei der Durchmischung der Blutkreisläufe einer normotonen und einer spontan-hypertonen Ratte zeigt sich ein signifikanter Blutdruckanstieg bei der normotonen Ratte, während der Blutdruck der spontan-hypertonen Ratte absinkt. Diese Versuche von ZIDEK et. al. lassen eine blutdrucksteigernde Substanz im Blut der hypertonen Tiere vermuten, die bei den normotonen Tieren nicht, beziehungsweise in deutlich geringerer Konzentration vorhanden ist (ZIDEK et al. 1985). Da bei den Plasmakonzentrationen der bekannten Vasokonstriktoren bisher keine signifikanten Unterschiede zwischen Hypertonikern und Normotonikern bestimmt werden können, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der übertragbaren blutdrucksteigernden Substanz um eine unbekannte Substanz handeln muss. ZIDEK et al. zeigten, dass sowohl die Nebennieren als auch die Nieren spontanhypertoner Ratten für die Sekretion dieser hypertensiven Substanz notwendig sind (ZIDEK et al. 1986). Auch im Plasma essentieller Hypertoner konnte eine unbekannte blutdrucksteigernde Substanz nachgewiesen werden, die im Plasma von Normotonikern in wesentlich geringerer Konzentration vorhanden war (ZIDEK et al. 1985, 1988).

Die vasokonstriktorische Wirkung dieser Substanz konnte an diversen Gefäßmodellen nachgewiesen werden. So zeigte sich eine Vasokonstriktion an isolierten Aortenstreifen der Ratte (ZIDEK et al. 1990), an isolierten perfundierten Mesenterien und an isolierten perfundierten Rattennieren (BACHMANN et al. 1990, 1991).

Nachdem AGHA et al. im Jahre 1992 erstmals unbekannte Vasokonstriktoren in menschlichen Thrombozyten gefunden hatten, gelang SCHLÜTER et al. im Jahre

1994 die Identifizierung dieser vasoaktiven Substanzen als Diadenosinpentaphosphat (Ap_5A) und Diadenosinhexaphosphat (Ap_6A). Diese Substanzen gehören zur Gruppe der Dinukleosidpolyphosphate und zählen wie ATP zu den purinergergen Transmittern. Dinukleosidpolyphosphate setzen sich nach der Formel Xp_nX zusammen. Sie bestehen aus zwei Nucleobasen, zwei Ribosen und einer variablen Anzahl von Phosphatgruppen. Nucleobase und Ribose sind N-glykosidisch zu einem Nucleosid verknüpft. Jeweils zwei Nucleoside werden von einer variablen Anzahl Phosphatgruppen über 5'-Phosphoesterbindungen zu einem Dinukleosidpolyphosphat verknüpft.

Nach der Identifizierung der Diadenosinpolyphosphate (Ap_nA , Nucleobase Adenin) Diadenosinpentaphosphat und Diadenosinhexaphosphat (SCHLÜTER et al. 1994) konnten als weitere Vertreter der Diadenosinpolyphosphate Diadenosinheptaphosphat (Ap_7A) (JANKOWSKI et al. 1999) und Diadenosindiphosphat (Ap_2A) (JANKOWSKI et al. 2001a) in menschlichen Thrombozyten nachgewiesen werden. Des Weiteren gelang die Isolierung des Diadenosindiphosphats (Ap_2A) und Diadenosintriphosphats (Ap_3A) aus menschlichem Herzmuskelgewebe (LUO et al. 1999). Auch in Plazentagewebe ließen sich Vertreter der Diadenosinpolyphosphate nachweisen (JANKOWSKI et al. 2001b). Ein weiterer Fortschritt gelang mit der Isolierung und Identifizierung der Adenosinguanosinpolyphosphate und Diguanosinpolyphosphate (Ap_nG und Gp_nG , Nucleobasen Adenin und Guanin) aus menschlichen Thrombozyten mit einer variierenden Phosphatgruppenzahl n zwischen 2 und 6 (JANKOWSKI et al. 2001a, SCHLÜTER et al. 1998).

Während Diadenosinpolyphosphate (Ap_nA) und Adenosinguanosinpolyphosphate (Ap_nG) sowohl vasokonstriktorische als auch proliferationssteigernde Wirkungen an glatten Gefäßmuskelzellen besitzen, kommt den Diguanosinpolyphosphaten (Gp_nG) ausschließlich ein proliferationssteigernder Effekt zu. Ausschlaggebend für die physiologische Wirkung der Diadenosinpolyphosphate auf den Tonus glatter Gefäßmuskelzellen sind die Anzahl der Phosphatgruppen im Molekül so-

wie das Vorhandensein von mindestens einer Adenin-Gruppe (VAN DER GIERT et al. 2001). Diadenosinpolyphosphate können in Blutgefäßen sowohl eine Vaso-
konstriktion als auch eine Vasodilatation auslösen. Dabei kommt dem Gefäßtyp
und dem Expressionsmuster der Purinozeptoren eine wichtige Bedeutung zu.
Die Gefäße der isolierten, perfundierten Niere werden von allen endogen vor-
kommenden Diadenosinpolyphosphaten A_{nA} kontrahiert. Dies erfolgt über die
 P_{2X} - und P_{2Y} -Rezeptoren und ihre Subtypen.

Eine Aktivierung der P_{2X} -Rezeptoren führt zum Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} in
die glatten Gefäßmuskelzellen. Die mit dem Einstrom der Kationen einherge-
hende Depolarisation bewirkt eine Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle,
wodurch die Konzentration der freien Ca^{2+} -Ionen intrazellulär steigt und sich
damit der Tonus der glatten Gefäßmuskelzelle erhöht (TEPEL et al. 1997). Der
 P_{2X} -Rezeptor wird hauptsächlich durch ATP und einige andere natürlich vor-
kommende Substanzen aktiviert (JACOBSON et al. 2000), daher ist es von be-
sonderer Bedeutung, dass Diadenosinpolyphosphate eine ähnlich starke Wir-
kung auf die P_{2X} -Rezeptorsubtypen haben wie das ATP (JANKOWSKI et al. 2003,
2007).

Eine Aktivierung der ebenfalls auf glatten Gefäßmuskelzellen lokalisierten P_{2Y} -
Rezeptoren führt zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die ihrerseits Ino-
sitoltriphosphat (IP_3) freisetzt. Inositoltriphosphat öffnet die Ca^{2+} -Kanäle der
intrazellulären Ca^{2+} -Speicher. Daraus resultiert ein Anstieg der intrazellulären
 Ca^{2+} -Konzentration (TEPEL et al. 1996).

Die beschriebenen Mononukleotidrezeptoren besitzen ein sehr unterschiedliches
pharmakologisches Profil. Sie werden entweder durch die adenin-, guanin- und
inosinenthaltenden Purin-Nukleotide oder durch die uridinenthaltenden Pyrimi-
din-Nukleotide aktiviert, oder aber auch durch beide Klassen von Mononukleoti-
den (JACOBSON et al. 2000). Einige P_{2Y} -Rezeptoren zeigen eine ausgeprägte Prä-

ferenz für Nukleosiddiphosphate, andere wiederum für Nukleosidtriphosphate. Aufgrund dieser variablen agonistischen Selektivität kommt der pharmakologischen Aktivität der Diadenosinpolyphosphate an diesen metabotropen Rezeptoren eine wichtige Bedeutung zu (JANKOWSKI et al. 2003, 2007).

Bei der vasokonstriktorisches Wirkung der Diadenosinpolyphosphate kann zwischen einer transienten und in einer permanenten Komponente unterschieden werden. Die transiente Wirkung erfolgt durch die Aktivierung des P_{2X1} -Rezeptors. Die permanente Wirkung wird von einem bisher unbekanntem Rezeptor vermittelt (VAN DER GIERT et al. 1999). Es handelt sich entweder um einen chimären P_{2X} -Rezeptor, der sich aus zwei bekannten Subtypen zusammensetzt, oder um eine Splicing-Variante bzw. einen Polymorphismus eines bekannten P_{2X} -Subtyp. Es sind bereits P_{2X} -Rezeptoren mit veränderten pharmakologischen Eigenschaften beschrieben worden; nach KOSHIMIZU et al. (1998) gewährleisten das alternative Splicing des P_{2X2} -Rezeptors und die Co-Expression des P_{2X2} - und des P_{2X2-2} -Rezeptors effektive Mechanismen zur Kontrolle des Kationeneinstroms. Die Zellen exprimieren nicht nur einen, sondern gleichzeitig mehrere Purinozeptorsubtypen (XIANG et al. 1998). Des Weiteren können Ectohydrolasen Mononukleotide wie ATP und Diadenosinpolyphosphate wie Diadenosinpentaphosphat hydrolysieren und die Hydrolyseprodukte können ihrerseits wiederum Purinozeptoren aktivieren. Dementsprechend erreicht das purinerge Hormonsystem durch seine Vielzahl endogener Agonisten und Rezeptoren eine hohe Komplexität.

Eine besondere Bedeutung für die Regulation des peripheren Widerstands und des arteriellen Blutdrucks kommt der Nebenniere zu. Sie ist bekanntermaßen Syntheseort verschiedener vasokonstringierend wirkender Hormone. Die Nebennierenrinde bildet Steroidhormone und wird in drei Schichten unterteilt. Die äußere Zona glomerulosa synthetisiert Mineralokortikoide wie das Aldosteron, die mittlere Zona fasciculata bildet Glukokortikoide wie das Kortisol und die in-

neren Zona reticularis ist Syntheseort der Androgene. Insbesondere das Aldosteron hat eine wichtige Funktion bei der Homöostase des Wasser- und Elektrolyt-haushaltes in Form einer Steigerung der Wasser- und Na^+ -Reabsorption.

Das Nebennierenmark geht entwicklungsgeschichtlich aus der Sympathikusanlage hervor, es ist also ektodermaler Herkunft. Es besteht aus feingranulierten, polygonalen Zellen, die ein loses Schwammwerk bilden. Die Markzellen werden als chromaffine Zellen bezeichnet, da sie sich in der histologischen Fixation mit Kaliumbichromat bräunlich verfärben. Für diese Verfärbung ist der hohe Gehalt der Zellen an Adrenalin und Noradrenalin verantwortlich, die bei der Fixation oxidieren. Adrenalin und Noradrenalin gehören zusammen mit ihrer Vorstufe Dopamin zu den Katecholaminen und werden aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert. Adrenalin und Noradrenalin sind innerhalb der Markzellen, in so genannten Granula, gespeichert (FEDERMAN 1997). Unter Ruhebedingungen sezernieren die adrenomedullären Zellen stets eine geringe Menge Adrenalin und Noradrenalin. Des Weiteren setzen sie wie das sympathische Nervensystem ATP als Cotransmitter zusammen mit Noradrenalin frei (OBERHAUSER et al. 1999).

In Untersuchungen der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass auch vaso-konstringierend wirkende Dinukleosidpolyphosphate im Nebennierenmark enthalten sind. Im Jahre 1991 konnten aus chromaffinen Zellen boviner Nebennieren Diadenosintetraphosphat (Ap_4A) und Diadenosinpentaphosphat (Ap_5A) isoliert werden (PINTOR et al. 1991). Im Jahre 1992 wurde aus diesen Zellen ebenfalls Diadenosindiphosphat (Ap_2A) isoliert und als vasoaktive Substanz charakterisiert (CASTILLO et al. 1992). Diadenosintetraphosphat (Ap_4A) wurde im Jahre 1994 in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks nachgewiesen und eine Beteiligung dieses Dinukleosidpolyphosphates bei der Blutdruckregulation angenommen (SILLERO et al. 1994). Im Jahre 2003 konnten JANKOWSKI et al. nachweisen, dass neben Diadenosinpolyphosphaten Ap_nA (mit $n=2-3$) ebenfalls Adenosinguanosinpolyphosphate Ap_nG und Diguanosinpolyphosphaten Gp_nG

(mit n=2-6) in chromaffinen Granula des Nebennierenmarks gespeichert sind und aktiv in den Blutkreislauf sezerniert werden (JANKOWSKI et al. 2003).

Ein bedeutsamer Fortschritt gelang JANKOWSKI et al. im Jahre 2005 mit der Isolierung und Identifizierung des ersten gemischten Dinukleotids, das neben dem Purin Adenin auch das Pyrimidin Uracil enthält. Uridinadenosintetraphosphat (Up₄A) konnte aus stimulierten humanen Endothelzellen isoliert und seine vaso-konstriktorische Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen im Perfusionstest an der isolierten perfundierten Rattenniere gezeigt werden. Up₄A konnte in physiologisch wirksamen Konzentrationen in humanem Plasma nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte eine aktive Freisetzung von Uridinadenosintetraphosphat aus Endothelzellen nachgewiesen werden. Eine Bedeutung des Uridinadenosintetraphosphat in der Regulation des Gefäßmuskeltonus ist daher wahrscheinlich (JANKOWSKI et al. 2005).

2 Problemstellung

Die Bedeutung der Dinukleosidpolyphosphate in der Herz-Kreislauf-Physiologie wird in den letzten Jahren zunehmend deutlich. Die bisherigen Nachweise von Dinukleosidpolyphosphaten in chromaffinen Zellen boviner Nebennieren und ihre Charakterisierung als vasoaktive Substanzen legen die Vermutung nahe, dass Dinukleosidpolyphosphate eine Bedeutung in der Blutdruckregulation haben und damit möglicherweise auch an der Pathogenese der primären essentiellen arteriellen Hypertonie beteiligt sind.

Bisher wurden überwiegend Dinukleosidpolyphosphate mit den Nucleobasen Adenin und Guanin untersucht. Die vasokonstriktorische und mitunter auch proliferationssteigernde Wirkung dieser Substanzklasse konnte hinreichend nachgewiesen werden.

Nachdem JANKOWSKI et al. die Isolierung und Identifizierung des ersten gemischten Dinukleotids Uridinadenosintetraphosphat (Up_4A) und dessen Charakterisierung als vasokonstriktorische Substanz gelang, stellt sich die Frage nach der Bedeutung, die dieser bisher unbekanntem Substanzklasse in der Pathogenese der primären essentiellen arteriellen Hypertonie möglicherweise zukommt.

Die Tatsache, dass einige P_{2Y} -Rezeptoren nicht nur durch die Purin-Nucleotide Adenosin- und Guanosinpolyphosphat, sondern ebenso oder ausschließlich durch die Pyrimidin-Nucleotide wie Up_4A aktiviert werden können, unterstreicht die Bedeutung dieser uridinhaltigen gemischten Dinukleotide in der Regulation des Gefäßmuskeltonus.

Nachdem PINTOR et al., CASTILLO et al. und JANKOWSKI et al. Diadenosinpolyphosphate (Ap_nA), Adenosin-guanosinpolyphosphate (Ap_nG) und Diguanosin-

polyphosphate (Gp_nG) aus sezernierbaren Granula des Nebennierenmarks isoliert haben, kann eine Sekretion in den Blutkreislauf und somit eine systemische Wirkung dieser Substanzklassen angenommen werden. Aus diesem Grunde erscheinen die Granula des Nebennierenmarks als potentieller Syntheseort von Dinukleosidpolyphosphaten mit Pyrimidin-Nukleotiden als wahrscheinlich.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Frage nachgegangen werden, ob als Vertreter der Substanzklasse das Uridinadenosintriphosphat (Up_3A) in chromaffinen Zellen boviner Nebennieren nachweisbar ist, und inwiefern dieser Mediator ebenfalls einen vasokonstriktorisches Effekt auf glatte Gefäßmuskelzellen hat.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeiner Teil

3.1.1 Chromatographische Verfahren

Chromatographische Verfahren dienen zur Trennung und Aufreinigung komplexer Mischungen und beruhen auf der unterschiedlichen Affinität der zu trennenden Stoffe zu einer stationären und einer mobilen Phase. Die stationäre Phase ist an einen festen Träger gebunden, die andere Phase ist in Bewegung und wird deshalb als mobile Phase bezeichnet. Die mobile Phase enthält das zu trennende Substanzgemisch.

Bei allen Chromatographie-Methoden basiert die Trennung auf physikochemischen Wechselwirkungen der Substanzen der mobilen Phase mit der stationären Phase. Die einzelnen Substanzen des Gemisches werden dabei verschieden stark von der stationären Phase retentiert. Daraus resultiert eine unterschiedlich lange Verweildauer auf der stationären Phase und somit eine zeitlich unterschiedliche Elution.

Je nach Art der Kräfte, die zur Chromatographie ausgenutzt werden, lassen sich Adsorptions-, Größenausschluss-, Ionenaustausch- und Verteilungschromatographie unterscheiden, nach der Anordnung des Trägermaterials Dünnschicht- und Säulenchromatographie. Die stationäre Phase kann fest oder flüs-

sig, die mobile Phase gasförmig (Gaschromatographie) oder flüssig (Flüssigkeitschromatographie) sein (JONES und THORNTON 1996).

3.1.2 Reversed-Phase Chromatographie

Bei der Flüssigkeits-Chromatographie wird die stationäre Phase in Normalphase und Umkehrphase (Reversed-Phase) unterteilt. Bei der Normalphasen-Chromatographie ist die stationäre Phase hydrophil und die mobile Phase hydrophob. Im Gegensatz dazu ist bei der Umkehrphasen-Chromatographie die stationäre Phase hydrophob und die mobile Phase hydrophil.

Als Träger der stationären Phase werden häufig C8- (Octyl-) und C18- (Octadecyl-) Phasen verwendet, bei denen hydrophobe Ketten mit 8 bzw. 18 CH₂-Gruppen kovalent an eine Kieselgelmatrix gebunden sind. Die mobile Phase besteht im Allgemeinen aus einem wässrigen Puffersystem, häufig 40 mM Triethylenammoniumacetat oder 0,1 % Trifluoressigsäure. Ionische Probenmoleküle können mit gegensätzlich geladenen organischen Ionen des Ionenpaarreagens ein Ionenpaar bilden. Dieses Ionenpaar ist bezüglich seiner Ladung und Polarität nach außen neutral, es lässt sich daher auf der stationären Umkehrphase adsorbieren und mit einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel wie Acetonitril oder Methanol eluieren.

Die einfachste Möglichkeit zur Elution der von dem Gel retentierten Substanzen stellt die isokratische Elution dar. Dabei wird während der chromatographischen Trennung die Zusammensetzung der mobilen Phase nicht verändert. Komplexe Substanzgemische sind jedoch mit dieser Art der Elution nicht ausreichend trennbar.

Eine höhere Auflösung bzw. Trennleistung wird jedoch im Allgemeinen bei der Gradientenelution erreicht. Hierbei wird die Zusammensetzung der mobilen Phase im Laufe der Chromatographie verändert, also die Konzentration des organischen Lösungsmittels kontinuierlich erhöht. Hydrophile Substanzen, die nur geringe Mengen des organischen Lösungsmittels zur Elution benötigen, eluieren daher zu Beginn der Chromatographie. Hydrophobere Substanzen verweilen dementsprechend länger in der stationären Phase und können nur mit höheren Konzentrationen des organischen Lösungsmittels eluiert werden. Daraus resultieren zeitlich verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten der im zu trennenden Stoffgemisch enthaltenen Substanzen durch die Säule.

3.1.3 Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen Adsorption eines Moleküls der mobilen Phase durch ein Molekül der stationären Phase. Es binden nur die Substanzen eines Stoffgemisches, die aufgrund charakteristischer funktioneller Gruppen eine hohe Affinität zu dem spezifischen, in der inneren Matrix der stationären Phase fixierten Molekül haben.

Bei der Chromatographie eines Stoffgemisches, das die gesuchte Substanz enthält, wird allein diese reversibel an die Matrix gebunden und kann anschließend durch Elution mit einem entsprechenden Lösungsmittel zurück gewonnen werden. Die Affinitätschromatographie zeichnet sich durch hohe Selektivität und Spezifität aus.

3.1.4 High Performance Liquid Chromatographie

Die High Performance Liquid Chromatography (=HPLC, Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie) stellt eine methodische Weiterentwicklung der Flüssigkeitschromatographie dar.

Die Vorteile dieser Methode sind ihre hohe Auflösung und Empfindlichkeit und die Möglichkeit der Applikation großer Probenmengen. Um die Oberfläche und dadurch die Trennleistung der stationären Phase zu vergrößern, werden Feststoffteilchen mit geringem Korndurchmesser verwendet. Je nach Säule besitzen die Kieselpartikel einen Durchmesser zwischen 1 und 10 µm und weisen Poren mit einer Größe von 100 bis 300 Å auf. Bei einer Flussrate von 0,1 ml/min bis 1 ml/min und einem Korndurchmesser von 1 µm kann eine Trennleistung von bis zu 150.000 Trennstufen pro Meter erreicht werden. Wegen der sehr kleinen Teilchengröße ist ein hoher Druck erforderlich, um die mobile Phase durch die Säule zu pumpen.

3.1.5 Matrix-Associated Laser Desorption/Ionisation-Mass Spectrometry

Die Matrix-Associated Laser Desorption/Ionisation-Mass Spectrometry (=MALDI, Matrix-unterstützte Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie) ist durch eine hohe Nachweisempfindlichkeit charakterisiert. Bereits Probenmengen von 10^{-5} - 10^{-6} M können analysiert werden (KARAS und GIESSMANN 1982). Die Probe wird mit einer definierten Matrix kristallisiert und im Vakuum des Massenspektrometers für wenige Nanosekunden einem intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung ausgesetzt. Die Energie dieser Laserstrahlung wird

in Form von Schwingungsenergie auf die Moleküle der Desorptionsmatrix übertragen. Dadurch wird die in den Matrixmolekülen deponierte Anregungsenergie in das Gitter des Festkörpers relaxiert und bewirkt so eine Aufweitung des Gitters. Es kommt zu einem Phasenübergang weit außerhalb des thermischen Gleichgewichts, wobei Matrix- und Probenmoleküle freigesetzt werden und in die Gasphase übergehen.

Die Matrix hat ebenfalls eine große Bedeutung bei der Ionisation der Probenmoleküle. Dabei bewirken photoionisierte Matrixmoleküle durch Protonentransfer eine hohe Ausbeute positiv geladener Probenmoleküle (KARAS und GIESSMANN 1982). Die Probenionen werden mittels eines elektrostatischen Feldes in Richtung des Analysators beschleunigt. Die Massenbestimmung erfolgt über die Messung der Flugzeit zwischen der Desorption der Ionen bis zum Eintreffen am Detektor. Nach Beschleunigung durch einige keV durchlaufen sie eine feldfreie Driftstrecke von 0,5-2 m Länge. Da Ionen unterschiedlicher Masse bei gleicher kinetischer Energie ($E_{\text{kin}}=0.5 m v^2$; m =Masse; v =Geschwindigkeit) unterschiedliche Flugzeiten haben, kann nach Kalibrierung mit bekannten Referenzmassen aus der jeweils gemessenen Flugzeit die Masse des Probenmoleküls errechnet werden. Diese Massenbestimmung besitzt eine Genauigkeit von $\pm 0,5$ Da. Da die Probenmoleküle bei der Ionisation protoniert werden, ist das tatsächliche Molekulargewicht um 1 Da geringer als das mit der MALDI-Spektrometrie ermittelte.

Die Post-Source-Decay-MALDI-Massenspektrometrie (PSD-MALDI-Massenspektrometrie) stellt eine Weiterentwicklung der MALDI-Massenspektrometrie dar. Auf ihrer Flugstrecke zum Analysator fragmentieren einige der nach dem Laserbeschuss desorbierenden Probenionen. Die für diese Fragmentation (so genannter „post source decay“) benötigte Aktivierungsenergie erhalten die Probenionen durch die zahlreichen Kollisionen sowohl mit Matrixmolekülen während der Freisetzung und Beschleunigung, als auch mit in der feldfreien Driftstrecke

vorhandenen Gasmolekülen (KAUFMANN et al. 1994). Die PSD-MALDI-Massenspektrometrie ermöglicht eine Detektion dieser Fragmente (KAUFMANN et al. 1994).

Eine Weiterentwicklung stellt die MALDI-Time-of-Flight/Time-of-Flight Massenspektrometrie (MALDI LIFT-TOF/TOF MS) dar. Sie zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität aus (SUCKAU et al. 2003).

MALDI-TOF/TOF Instrumente sind charakterisiert durch eine kolineare Anordnung von zwei TOF-Massenanalytoren, jeweils ausgestattet mit einer Ionenquelle (Ion Source), die die Beschleunigung und Fokussierung der Ionen ermöglicht. Im TOF1 werden die Analytionen beschleunigt und Vorläuferionen selektiert und fragmentiert. Fragmentationen können dann zur TOF2-Source übergehen, wo sie beschleunigt und ihre Massen analysiert werden.

Ein Anheben der Strom-Spannung (potential lift) ist die Kernfunktion dieser Technologie. Dieser Teil des Gerätes besteht aus drei Zellen, die zwischen vier Gittern angeordnet sind. Sobald die Ionen diesen Teil erreicht haben, wird die Spannung zwischen den beiden, die erste Zelle begrenzenden Gittern, rapide auf 19 kV verstärkt. Die zweite Zelle besteht aus einem die Geschwindigkeit der Ionen modulierenden Fokussierungselement. Die Spannung des dritten Gitters wird nun um 2-3 kV reduziert, sodass die Ionen gegen die dritte Zelle beschleunigt werden. In der dritten Zelle werden die Ionen dann zu ihrer vollen Geschwindigkeit beschleunigt und auf den Detektor eingestellt (SUCKAU et al. 2003).

3.2 Spezieller Teil

3.2.1 Gesamtübersicht

Die Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Arbeitsschritte.

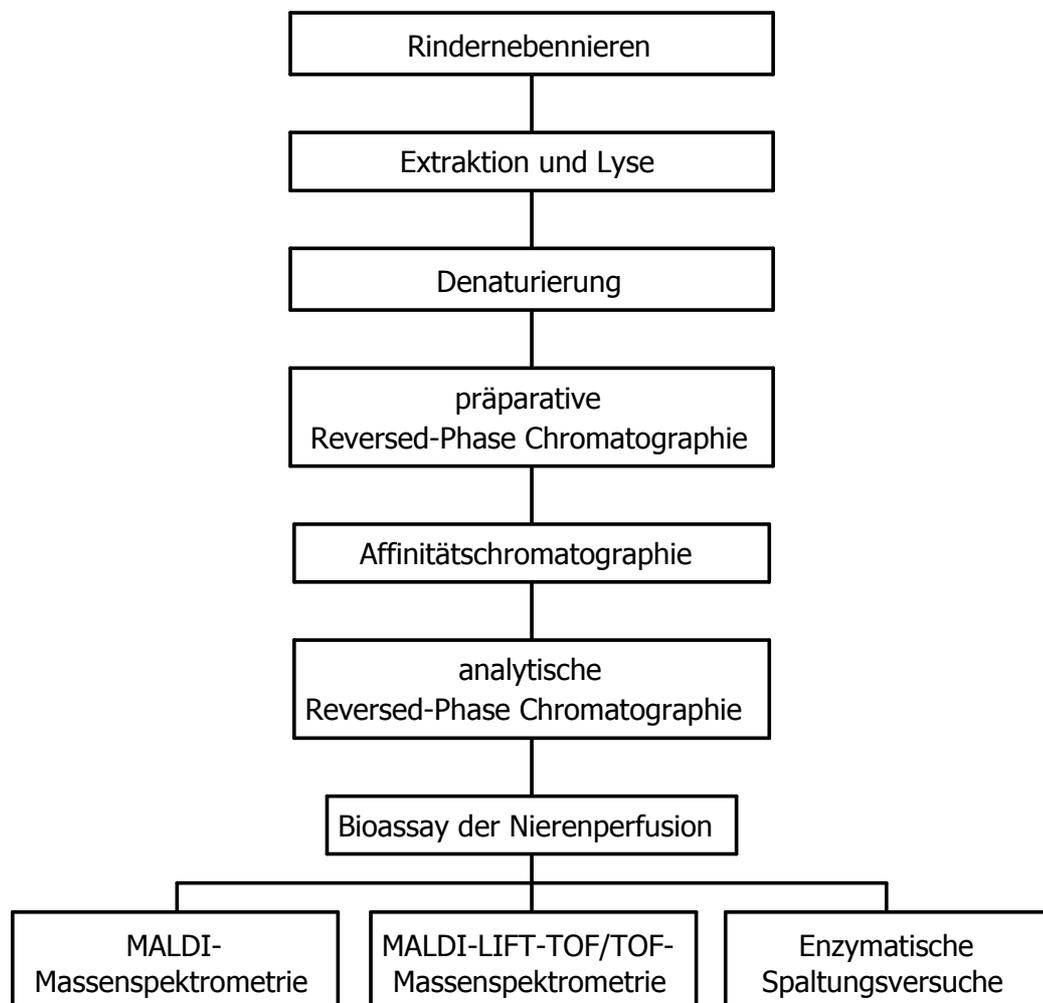


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Isolierungs- und Charakterisierungsschritte von Up₃A aus der Nebenniere

3.2.2 Extraktion und Lyse

Es wurden 600 g Nebennieren von Rindern aus dem regionalen Schlachthof in Golzig bezogen. Nach der Freipräparierung auf dem Schlachthof wurden sie zunächst in 0,9 %iger wässriger NaCl-Lösung auf Eis gelagert. Die Trennung des Nebennierenmarks von der Nebennierenrinde und die weitere Freipräparierung des Nebennierenmarks erfolgten im Kühlraum bei 4 °C.

Zur weiteren Aufarbeitung wurde das Nebennierenmark in einer 0,32 M Sacharose-Lösung suspendiert und anschließend mit einem Ultra-Turrax Mixer unter Eiskühlung bei 7.500 U/min für 15 Minuten homogenisiert. Das Homogenat wurde für weitere 15 Minuten bei 800 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 20 Minuten bei 10.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vom Niederschlag dekantiert und in ein Ultrazentrifugenröhrchen mit 1,6 M wässriger Sacharose-Lösung gegeben. Die Lösung wurde für 90 Minuten bei 100.000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand und die weiße Schicht über dem Pellet wurden verworfen und das Pellet bis zur weiteren Aufarbeitung bei 40 °C gelagert. Das Pellet (5 g) der Ultrazentrifugation wurde in 15 ml 30 µM Tween-20 gelöst und die Nebennierengranula durch fünfmaliges Einfrieren und Auftauen lysiert. Das Lysat ergab ein Gesamtvolumen von 17 ml.

3.2.3 Denaturierung

Das Lysat wurde mit konzentrierter Perchlorsäure versetzt und eine Konzentration von 0,6 M Perchlorsäure eingestellt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 4.000 U/min bei 4 °C. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit konzentrierter KOH auf einen pH-Wert von 9,25 eingestellt. Die Probe wurde für 18 Stunden bei –20 °C gelagert.

3.2.4 Präparative Reversed-Phase-Chromatographie

Das ausgefallene Perchlorat wurde 5 Minuten bei 4.000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1 M Triethylenammoniumacetat (TEAA) auf eine Endkonzentration von 40 mM TEAA und einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. Die verwendete präparative RP-Säule (Lobar Fertigsäule Lichroprep RP-18, Korngröße 40-63 µm, 310x25 mm, Firma Merck/VWR) wurde mit 40 mM wässriger TEAA-Lösung äquilibriert. Anschließend wurde die Probe mit 40 mM wässriger TEAA-Lösung und einer Flussrate von 2,5 ml/min aufgetragen. Die Säule wurde mit 100 % der 40 mM wässrigen TEAA-Lösung gewaschen, die Elution der retendierten Substanzen erfolgte mit 20 % Acetonitril (ACN). Die Fließgeschwindigkeit betrug 2,5 ml/min. Die Chromatographie wurde mit einem UV-Detektor bei 254 nm überwacht. Als Chromatographie-System diente eine Pharmacia LKB Gradient Pump 2249 HPLC-Anlage. Das Eluat wurde gesammelt und für die weitere Aufarbeitung lyophilisiert.

3.2.5 Affinitätschromatographie

Das lyophilisierte Eluat der Reversed-Phase-Chromatographie wurde in 5 ml 1 M Ammoniumacetat (NH_4Ac) gelöst und auf einen pH-Wert von 9,5 eingestellt. Das verwendete Phenylboronsäure-Gel wurde nach BARNES et al. hergestellt (1985).

Die Chromatographie erfolgte an einer Pharmacia LKB Gradient Pump 2249 HPLC-Anlage. Die Säule wurde mit 1 M wässriger Ammoniumacetatlösung äquiliert und die Probe über eine Probenschleife mit einer Flussrate von 4 ml/min aufgetragen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit 1 M wässriger Ammoniumacetatlösung gespült. Die retendierten Substanzen wurden mit 10 mM wässriger Salzsäure (HCl) eluiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 4 ml/min. Es wurde die UV-Absorption bei 254 nm detektiert. Die nicht retendierten Substanzen und das Eluat wurden gesammelt.

3.2.6 Analytische Reversed-Phase-Chromatographie

Das Efluat der Affinitätschromatographie wurde mit 1 M TEAA-Lösung auf eine Konzentration von 40 mM TEAA und einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. Die Entsalzung wurde mittels einer Reversed-Phase-Säule (Lobar Fertigsäule Lichroprep RP-18, Korngröße 40-63 μm , 310x25 mm, Firma Merck/VWR) auf einer Merck Hitachi L-6200 Intelligent Pump HPLC-Anlage durchgeführt. Die Säule wurde mit 40 mM wässriger TEAA-Lösung äquiliert. Die einzelnen Fraktionen wurden mit 40 mM wässriger TEAA-Lösung in mehreren Schritten über eine Probenschleife mit einer Flussrate von 4 ml/min aufgetragen. Die Entsal-

zung erfolgte mit 40 mM wässriger TEAA-Lösung, die anschließende Elution der retendierten Substanzen mit 20 % Acetonitril. Die Fließgeschwindigkeit betrug 4 ml/min. Das Eluat wurde bei 254 nm detektiert, gesammelt und für die weitere Aufarbeitung lyophilisiert.

Das Eluat der Affinitätschromatographie wurde mit 1 M TEAA-Lösung auf eine Konzentration von 40 mM TEAA und einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. Die Entsalzung wurde mittels zwei Chromolith-Säulen (Chromolith Performance RP-18e, Porengröße 2 µm/13 nm, 100x4,6 mm, Firma Merck/VWR) auf einer Merck Hitachi L-6200 Intelligent Pump HPLC-Anlage durchgeführt. Die Säule wurde mit 40 mM wässriger TEAA-Lösung äquilibriert. Dann wurde die Probe mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Chromolith-Säulen aufgetragen. Der Auftrag und die Entsalzung erfolgten mit 40 mM wässriger TEAA-Lösung und die anschließende Elution mit 20 % Acetonitril. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Das Eluat wurde bei 254 nm detektiert, gesammelt und für die weitere Aufarbeitung lyophilisiert.

Die gefriergetrockneten Eluate wurden in 1 ml 40 mM wässriger TEAA-Lösung gelöst. Zunächst wurde eine Quantifizierung durchgeführt, dazu wurde 1 µl der Probe abgenommen und auf eine Chromolith-Säule (Chromolith Performance RP-18e, Porengröße 2 µm/13 nm, 100x4,6 mm, Firma Merck/VWR) mit einem Fluss von 1 ml/min aufgetragen. Die Trennung erfolgte auf einer Amersham Pharmacia Biotech Äkta Purifier HPLC-Anlage.

Die mobile Phase A bestand aus 40 mM wässriger TEAA-Lösung, die mobile Phase B aus 80 % Acetonitril, die Flussrate betrug 1 ml/min. Es wurde der in Tabelle 1 aufgeführte Gradient gewählt. Die Quantifizierung wurde mit synthetischen Diadenosinpolyphosphaten (Ap₃A, Ap₄A, Ap₅A, Ap₆A je 2 µg) durchgeführt. Die Probe wurde in zwei Schritten auf die Säule aufgetragen, peakfraktioniert aufgefangen und anschließend in der SpeedVac getrocknet.

Tabelle 1 : Gradient der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie (Säule: Chromolith Performance RP-18e, 100x4,6 mm, Merck, Eluent A: 40 mM TEAA, Eluent B: 80 % ACN, Fluss: 1 ml/min)

t (min)	Konzentration B (%)
0	0
30	35
33	100
48	100

3.2.7 Effekt des Eluats der Reversed-Phase-Chromatographie auf den Perfusionsdruck an der isolierten, perfundierten Rattenniere

Die Wirkung der getrockneten Proben der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie auf den Gefäßtonus wurde mittels eines Nierenperfusionstests bestimmt. Dazu wurde die Niere einer Ratte entnommen und an ein Perfusionsystem angeschlossen.

Der Perfusionsdruck wurde kontinuierlich durch einen Transducer (Statham P23 GB, Siemens) mit Brückenverstärker (Hugo Sachs) überwacht. Das Perfusionsverfahren verlief nach einer Beschreibung von VAN DER GIET et al. (1997). Die Niere wurde mittels einer peristaltischen Pumpe in einem Einzeldurchflusssystem mit einer Lösung perfundiert, die sich aus 115 mmol/l NaCl, 4,6 mmol/l KCl, 1 mmol/l CaCl₂, 1,2 mmol/l MgSO₄, 1,2 mmol/l NaH₂PO₄, 22 mmol/l NaH-

CO₃, 49 mmol/l Glucose und 35 g Gelatine/l (Behringwerke) zusammensetzte. Die Equilibrierung erfolgte mit 95 % O₂ und 5 % CO₂. Der Perfusionsfluss betrug konstant 8 ml/min. Die Niere und die Perfusionslösung wurden bei einer Temperatur von 37 °C gehalten.

3.2.8 MALDI-Massenspektrometrie

Die Proben wurden mittels Matrix-unterstütztem Laserdesorptions-Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) massenspektrometrisch analysiert. Die Fraktionen der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie wurden in 10 µl H₂O gelöst. 5 µl der Probe wurden mit Kationenaustauscher (Bio-Rex 70 Resin, 100-200 mesh sodium form, Firma BioRad) versetzt. Es wurden jeweils 1 µl Probe und 1 µl der UV-absorbierenden Desorptionsmatrix 3-Hydroxypicolinsäure (HPA) auf einen metallischen Probenhalter aufgetragen. Die Probe wurde getrocknet und über die Vakuumschleuse in das MALDI-Massenspektrometer (MALDI-Reflex III, Firma Bruker Daltonic) eingesetzt. Die Desorption der Probenionen erfolgte durch Beschuss der Probe mit einem Stickstoff-Laserstrahl bei einer Wellenlänge von 337 nm und mit einer Energie von 10⁶-10⁷ W/cm². Das Bestrahlungsfeld war kreisförmig und hatte einen Durchmesser von 50-100 µm.

3.2.9 MALDI-LIFT-TOF/TOF-Massenspektrometrie

Nach der MALDI-Massenspektrometrie erfolgte eine Sequenzierung mittels der MALDI-LIFT-Time-Of-Flight/Time-Of-Flight-Massenspektrometrie (MALDI-LIFT-TOF/TOF-MS, Firma Bruker Daltonic). Die Probenvorbereitung ist identisch mit der Probenvorbereitung der MALDI-MS. Es wurden jeweils 1 µl Probe und 1 µl der UV-absorbierenden Desorptionsmatrix 3-Hydroxypicolinsäure (HPA [50 ng/ml]) auf einen metallischen Probenhalter aufgetragen. Die Probe wurde getrocknet und mit einem Stickstofflaser bei einer Wellenlänge von 337 nm ionisiert. Die Sequenzierung erfolgte an einem Bruker Ultraflex TOF/TOF Massenspektrometer (Firma Bruker Daltonic). Die Fragment-Ionen-Spektren wurden mit der LIFT-Option des Gerätes aufgenommen. Es wurden 200 Spektren aufsummiert.

3.2.10 Enzymatische Spaltungsversuche

Nach der Massenspektrometrie wurden 5´Phosphodiesterase (3 mU, *Crotalus durissus*, EC 3.1.15.1, Boehringer Mannheim), 3´Phosphodiesterase (1 mU, bovine Milz, EC 3.1.16.1, Boehringer Mannheim) und alkalische Phosphatase (1 mU, bovine intestinale Mucosa, EC 3.1.3.1, Boehringer Mannheim) jeweils mit 50 µl NaHCO₃ und aktivierten CNBr-Sepharose 6 MB beads (Amersham Pharmacia Biotech) vermischt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte ein dreimaliges Auswaschen der beads mit doppelt destilliertem Wasser. Das Aliquot der Fraktion der vierzehnten Minute der analytischen Re-

versed-Phase-Chromatographie wurde mit diesen Enzym-beads über 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und mittels MALDI-Massenspektrometrie analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung von Dinukleosidpolyphosphaten aus bovinem Nebennierengewebe

Die Darstellung der Ergebnisse zur Isolierung und Identifizierung des Up₃A aus der Nebenniere gliedert sich in Arbeitsschritte zur Isolierung der Substanz und zur Identifizierung der molekularen Struktur. Die Isolierung von Up₃A aus der Nebenniere erfolgte mittels präparativen beziehungsweise analytischen Chromatographie-Methoden.

4.1.1 Präparative Reversed-Phase-Chromatographie

Nach Extraktion und Lyse der Rindernebennieren wurde das entstandene Lysat einer Denaturierung mit Perchlorsäure unterzogen. Anschließend wurde die Probe einer Präparativen Reversed-Phase-Chromatographie zugeführt. Das resultierende Chromatogramm zeigte dabei den in Abbildung 2 dargestellten Verlauf.

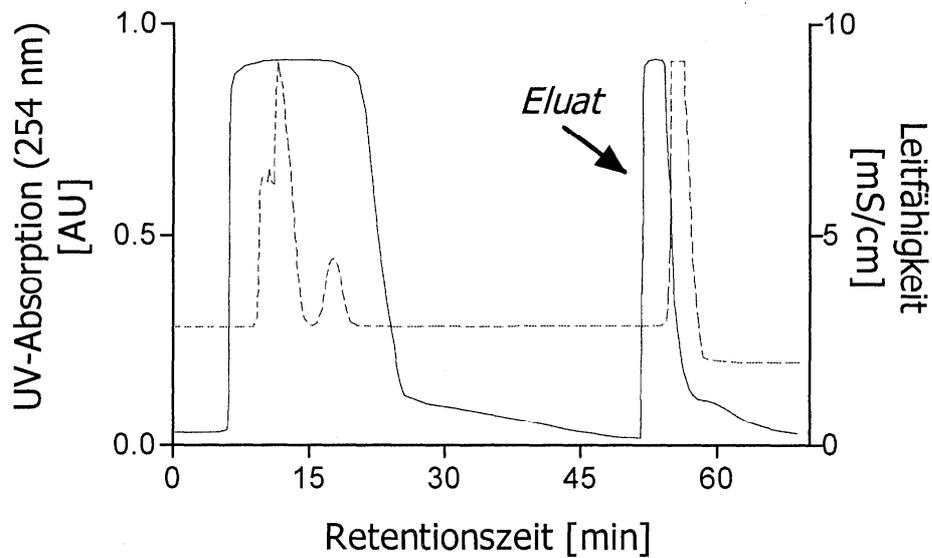


Abbildung 2: Präparative Reversed-Phase-Chromatographie

Probe:	Deproteinierteres bovines Nebennierenextrakt
Säule:	Lobar Fertigsäule Lichroprep RP-18, Korngröße 40-63 μm , 310x25 mm, Firma Merck/VWR
Eluent A:	40 mM wässrige Triethylenammoniumacetat- Lösung
Eluent B:	20 % wässrige Acetonitril-Lösung
UV-Absorption:	254 nm
Fluss:	2,5 ml/min
————	254 nm
.....	Leitfähigkeit

Die UV-Absorption bei 254 nm zeigt zwei deutlich voneinander getrennte UV-Absorptionspeaks. Der erste Peak eluiert zwischen der fünften und fünfundzwanzigsten Minute und enthält die nicht an die Trennsäule retendierten Substanzen. Nach Erreichen der UV-Basislinie erscheint zwischen der zweiundfünfzigsten und sechzigsten Minute ein zweiter, schmalerer Peak. Dieser Peak, der der Absorption des Eluats entsprach, wurde aufgefangen und lyophilisiert.

4.1.2 Affinitätschromatographie

Das lyophilisierte Eluat der präparativen Reversed-Phase-Chromatographie wurde mittels einer Affinitätschromatographie aufgereinigt. Das verwendete Phenylboronsäure-Gel wurde nach BARNES et al. (1985) hergestellt. Die Chromatographie ergab den in Abbildung 3 dargestellten Verlauf.

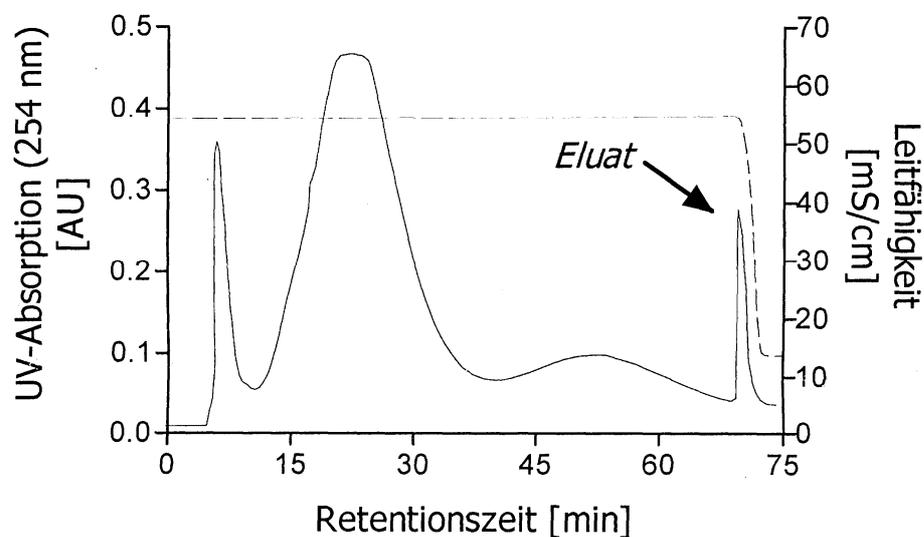


Abbildung 3: Affinitätschromatographie

Probe:	lyophilisiertes Eluat der präparativen Reversed-Phase-Chromatographie
Säule:	Phenylboronsäure-Gel nach BARNES et al. (1985)
Eluent A:	1 M wässrige Ammoniumacetatlösung
Eluent B:	10 mM wässrige Salzsäurelösung
UV-Absorption:	254 nm
Fluss:	4 ml/min
————	254 nm
.....	Leitfähigkeit

Das Chromatogramm zeigt drei voneinander getrennte UV-Absorptionspeaks. Der erste Peak eluiert zwischen der fünften und zehnten Minute. Der zweite, breitere Peak wird zwischen der fünfzehnten und fünfunddreißigsten Minute detektiert. Diese beiden UV-Absorptionspeaks werden durch Substanzen bedingt, die nicht durch das Gel retendiert werden. Nach siebzig Minuten wurde mit wässriger 10 mM Salzsäurelösung der dritte, etwas kleinere Peak eluiert. Dieses Salzsäure-Eluat wurde bis zum Erreichen der UV-Basislinie gesammelt.

4.1.3 Analytische Reversed-Phase-Chromatographie

Das Eluat der Affinitätschromatographie wurde mit Hilfe einer analytischen Reversed-Phase-Chromatographie entsalzen und fraktioniert. Das Chromatogramm zeigte den in Abbildung 4 dargestellten Verlauf. Im Chromatogramm zeigt sich ein einzelner großer, doppelgipfelter UV-Absorptionspeak zwischen der sechszehnten und achtzehnten Minute. Diese Fraktion wurde gesammelt und lyophilisiert.

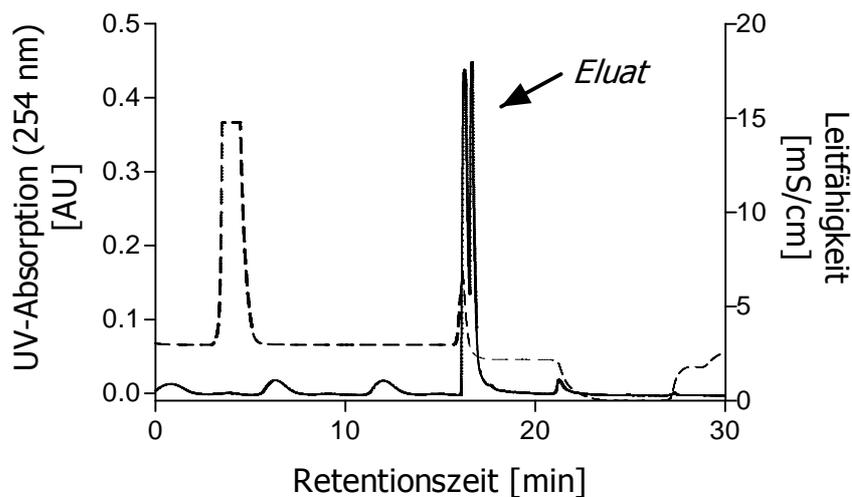


Abbildung 4: Analytische Reversed-Phase-Chromatographie

Probe:	Salzsäure-Eluat der Affinitätschromatographie
Säule:	Chromolith Performance RP-18e, Porengröße 2 $\mu\text{m}/13\text{nm}$, 100x4,6mm, Firma Merck/VWR
Eluent A:	40 mM wässrige Triethylenammoniumacetat- Lösung
Eluent B:	20 % Acetonitril
UV-Absorption:	254 nm
Fluss:	1 ml/min
————	254 nm
.....	Leitfähigkeit

Das lyophilisierte Eluat der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie wurde anschließend zunächst einer Quantifizierung mit authentischen Diadenosinpolyphosphaten (Ap_3A , Ap_4A , Ap_5A , Ap_6A je 2 μg) unterzogen. Daraufhin wurde die Probe geteilt und in zwei Schritten der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie zugeführt. Die Chromatographie ergab den in Abbildung 5 dargestellten Verlauf.

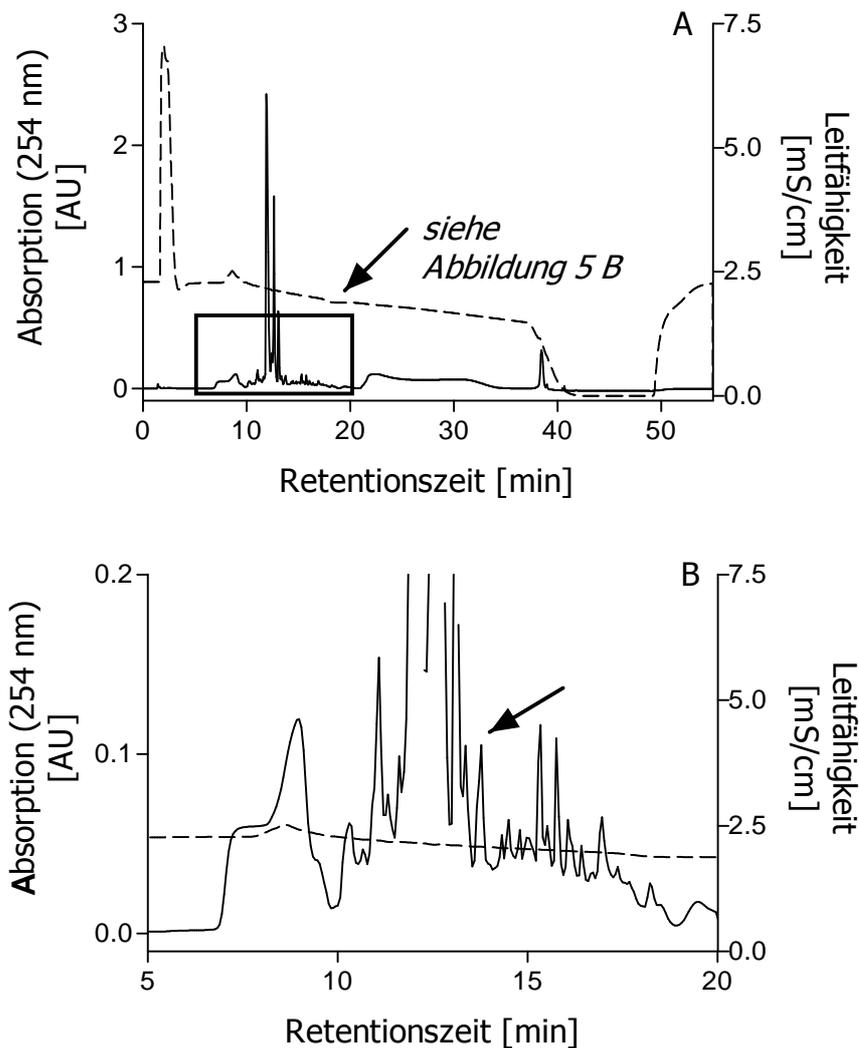


Abbildung 5: Analytische Reversed-Phase-Chromatographie

Probe: lyophilisiertes Eluat der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie

Säule: Chromolith Performance RP-18e, Porengröße 2 μ m/13nm, 100x4,6 mm, Firma Merck/VWR

Eluent A: 40 mM wässrige Triethylenammoniumacetat-Lösung

Eluent B: 20 % Acetonitril

Fortsetzung der Legende auf nächster Seite

Fortsetzung der Legende von Abbildung 5 (Seite 39):

Gradient:	0-30 min	0-35 % B
	30-33 min	35-100 % B
	33-48 min	100 % B
UV-Absorption:	254nm	
Fluss:	1 ml/min	
————	254 nm	
.....	Leitfähigkeit	

Abbildung 5A zeigt eine Gesamtübersicht der Chromatographie. Die UV-Absorption bleibt bis zur achten Minute im Bereich der UV-Basislinie. Zwischen der achten und zweiundzwanzigsten Minute zeigen sich zahlreiche, verschieden große UV-Absorptionspeaks. Zwischen der zweiundzwanzigsten und achtunddreißigsten Minute erreicht die UV-Absorption wieder nahezu das Niveau der Basislinie. Der letzte, kleinere Peak erscheint in der achtunddreißigsten Minute, also etwa fünf Minuten nach Anstieg des Gradienten auf 80 % Acetonitril. Die Chromatographie wurde peakfraktioniert gesammelt und anschließend in der SpeedVak getrocknet.

Abbildung 5B zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Bereiches zwischen der fünften und zwanzigsten Minute. Der Peak in der vierzehnten Minute ist hier besonders herauszustellen und in Abbildung 5B mit einem Pfeil gekennzeichnet. Dieser Peak wurde bei den folgenden Charakterisierungsschritten weiter untersucht.

4.2 Identifizierung des Up₃A

Die Identifizierung der molekularen Struktur des Up₃A erfolgte mit Hilfe massenspektrometrischer Analytik.

4.2.1 MALDI-Massenspektrometrie

Die lyophilisierte Fraktion der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie wurde der MALDI-Massenspektrometrie zugeführt. In dieser Fraktion, die in der vierzehnten Minute der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie eluierte (in Abbildung 5 mit einem Pfeil gekennzeichnet), wurde das in Abbildung 6 dargestellte Massenspektrum ermittelt. Dieses MALDI-Spektrum (Abbildung 6) zeigt, dass in dieser Fraktion der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie eine Substanz mit der molekularen Masse von 736 Da enthalten ist. Diese molekulare Masse entspricht der molekularen Masse von Up₃A.

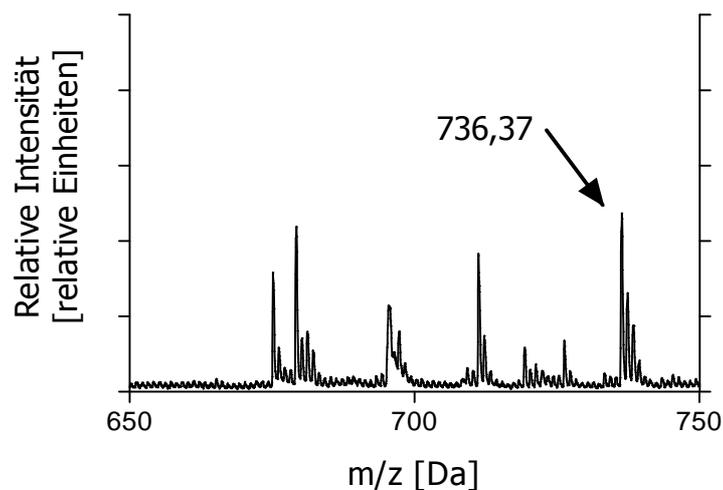


Abbildung 6: MALDI-MS der Fraktion, die in der vierzehnten Minute der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie eluierte (Abbildung 5)

Ordinate: Relative Intensität

Abszisse: Massenzahl pro Ladung

4.2.2 MALDI-LIFT-TOF/TOF-Massenspektrometrie

Zur weiteren Identifizierung der zugrunde liegenden Substanz erfolgte eine MALDI-LIFT-TOF/TOF-Massenspektrometrie der Fraktion der vierzehnten Minute der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie (in Abbildung 5 mit einem Pfeil gekennzeichnet). Es wurden die in Abbildung 7 dargestellten Fragmentspektren ermittelt.

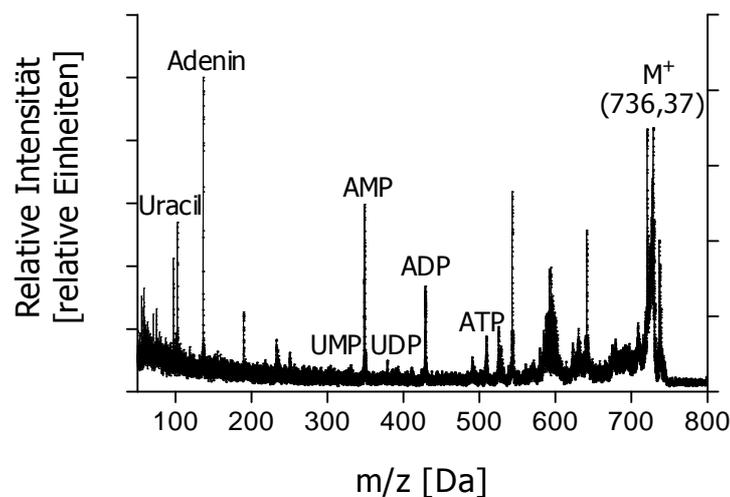


Abbildung 7: MALDI-LIFT-TOF/TOF-MS der Fraktion, die in der vierzehnten Minute der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie eluierte (Abbildung 5)

Ordinate: Relative Intensität

Abszisse: Massenzahl pro Ladung

Das Spektrum in Abbildung 7 zeigt die molekulare Masse von Adenin (136 Da), Adenosinmonophosphat (348 Da), Adenosindiphosphat (428 Da), Adenosintriphosphat (428 Da), Uracil (113 Da), Uracilmonophosphat (323 Da), Uracildiphosphat (405 Da) sowie das Mutterion (736 Da). Abbildung 8 zeigt die Molekularstruktur des Up₃A.

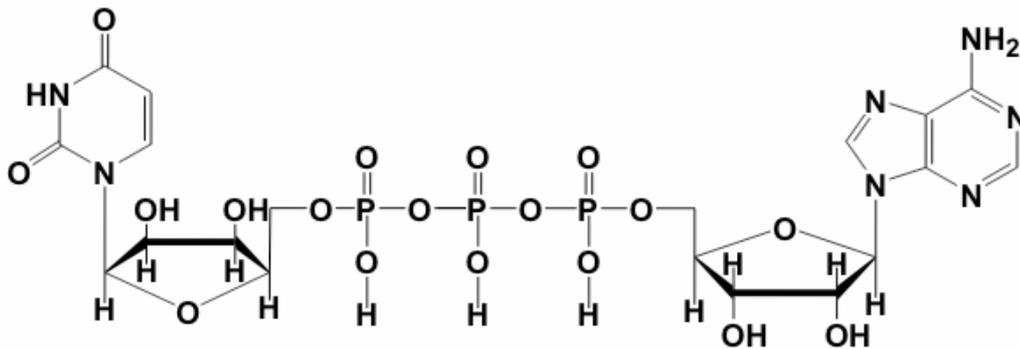


Abbildung 8: Molekularstruktur des Up₃A

4.2.3 Enzymatische Spaltungsversuche

Zur Bestimmung der Bindungsstelle der Phosphatgruppen wurden die isolierten Substanzen mit alkalischer Phosphatase, 3´Phosphodiesterase und 5´Phosphodiesterase inkubiert und einer weiteren MALDI-Massenspektrometrie zugeführt. Nach Inkubation von Up₃A mit alkalischer Phosphatase sowie mit 3´Phosphodiesterase zeigt sich im jeweils resultierenden Massenspektrum weiterhin der vorbestehende Peak bei 736 Dalton. Nach Inkubation mit 5´Phosphodiesterase ist dieser Peak nicht mehr vorhanden.

5 Diskussion

Die Ätiologie und Pathogenese der primären, essentiellen arteriellen Hypertonie stellen ein multifaktoriell verursachtes Geschehen dar. Einen hohen Stellenwert scheinen humorale vasoaktive Substanzen zu haben, die zu einer Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstands führen. Die Substanzklasse der Dinukleotide scheint sowohl hinsichtlich ihrer vasokonstriktorischen als auch ihrer proliferationssteigernden Wirkung in der Kreislaufphysiologie eingebunden zu sein. In der Vergangenheit konnten vor allem Vertreter der purinenthaltenden Dinukleosidpolyphosphate (Ap_nA , Ap_nG , Gp_nG) aus verschiedenen Organen isoliert und ihre blutdrucksteigernde Wirkung hinreichend bewiesen werden. Da erstmalig auch das pyrimidinenthaltende Dinukleotid Uridinadenosintetraphosphat (Up_4A) als vasokonstriktorische Substanz charakterisiert und darüber hinaus in physiologisch wirksamer Konzentration in humanem Plasma nachgewiesen wurde, ist eine aktive Sekretion dieser Substanz in den Blutkreislauf und somit eine Bedeutung in der Regulation des Gefäßtonus anzunehmen (JANKOWSKI et al. 2005). Da das Uridinadenosintetraphosphat bisher jedoch ausschließlich aus humanen Endothelzellen isoliert werden konnte, stellte sich die Frage nach möglichen weiteren Synthese- und Speicherorten sowie weiteren Vertretern dieser Substanzklasse. Nachdem bereits Diadenosinpolyphosphate ($Ap_nA; n=2-3$), Adenosin-guanosinpolyphosphate ($Ap_nG; n=2-6$) und Diguanosinpolyphosphate ($Gp_nG; n=2-6$) erfolgreich aus sezernierbaren Granula des Nebennierenmarks isoliert werden konnten (JANKOWSKI et al. 2003), erschienen die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks als potentieller Syntheseort möglicher weiterer Vertreter der Uridinadenosinpolyphosphate (Up_nA) als möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit bovinem Nebennierengewebe gearbeitet, da aus ethischen und praktischen Gründen das Nebennierengewebe nicht in ausreichender Menge von gesunden Probanden hätte gewonnen werden können. Die bovinen Nebennieren waren über kommerzielle Schlachthöfe in fast uneingeschränkter Menge zu beziehen. Darüber hinaus konnte durch die Verwendung des bovinen Nebennierengewebes gewährleistet werden, dass die Entnahme der Nebennieren unter für die Isolierung der Dinukleosidpolyphosphate idealen Bedingungen erfolgte.

Die Vorgehensweise zur Isolierung des Uridinadenosintriphosphates (Up_3A) aus Rindernebenieren orientierte sich an den bisher bekannten Eigenschaften der Dinukleosidpolyphosphate. Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften können diese Moleküle nicht mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Nach der Isolierung der Nebennieren und der Freipräparierung des Nebennierenmarks unter ständiger Eiskühlung erfolgte die Homogenisierung des Gewebes mittels Ultra-Turrax-Mixer. Die Temperatur des Gemisches wurde zur schonenden Aufarbeitung unter 4 °C gehalten, um Abbaureaktionen zu minimieren. Mit Hilfe der Ultrazentrifugation wurden die im Homogenat enthaltenen Feststoffe entfernt und das entstehende rosa-farbende Pellet durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen lysiert. Die im Nebennierengewebe vorhandenen Proteine wurden durch Perchlorsäure denaturiert und konnten durch mehrmaliges Zentrifugieren von der Probe getrennt werden. Um die Ausfällung überschüssiger Perchlorate als $KClO_4$ zu gewährleisten, wurde der resultierende Überstand mit Kalilauge neutralisiert. Dadurch wurden auch die in der Probe enthaltenen Lipide verseift und in eine wasserlösliche Form gebracht. Der Überstand der Zentrifugation enthielt die zu identifizierenden Dinukleosidpolyphosphate.

In der weiteren Aufarbeitung mussten zunächst sehr hydrophile und sehr hydrophobe Substanzen von den Dinukleosidpolyphosphaten getrennt werden. Dazu erfolgte eine präparative Reversed-Phase-Chromatographie (Abbildung 2). Die

apolare stationäre Phase der Reversed-Phase-Säule bindet aufgrund hydrophober Wechselwirkungen Substanzen umso stärker, je unpolarer sie sind. Entsprechend eluieren unpolare Substanzen erst bei höheren Konzentrationen des hydrophoben Elutionsmittels. Dinukleosidpolyphosphate besitzen sowohl anionische als auch kationische Gruppen und sind daher nur mäßig hydrophob. Um dennoch eine Adsorption an das unpolare Gelmaterial der Säule zu ermöglichen, wurde als Ionenpaarreagenz Triethylammoniumacetat zugegeben. Durch dieses kationische Ionenpaarreagenz werden die anionischen Gruppen der Dinukleosidpolyphosphate maskiert und die Moleküle somit unpolarer. Die Elution der zu isolierenden Dinukleosidpolyphosphate erfolgte bei Anwendung eines 20%igen Acetonitril-Wassergemisches. Insbesondere wichtig für den nächsten Schritt der weiteren Aufreinigung war die Abtrennung der Kohlenhydrate vom Substanzgemisch, da diese ähnlich den Dinukleosidpolyphosphaten cis-diol-Gruppen besitzen und daher ebenfalls von dem während der Affinitätschromatographie verwendeten PBA-Gel retendiert würden. Die Adsorptionsstellen am Gelmaterial wären demnach von den wahrscheinlich wesentlich höher konzentrierten Kohlenhydraten besetzt und die Dinukleosidpolyphosphate könnten nicht ausreichend retendiert werden. Da Kohlenhydrate stark polare Substanzen sind, besitzen sie eine sehr geringe Affinität zur apolaren stationären Phase der Reversed-Phase-Säule und eluieren daher im Durchfluss.

In der anschließenden Affinitäts-Chromatographie kam ein auf dem Kationenaustauscher Bio-Rex-70-Gel basierendes PBA-Bio-Rex-Gel zur Anwendung (Abbildung 3). Nukleosidgruppen erfahren durch die negativ geladenen, alkalischen Gruppen des Kationenaustauschers elektrostatische Abstoßungskräfte, die durch den wässrigen 1 M Ammoniumacetat-Puffer teilweise kompensiert werden. Moleküle, die zwei OH-Gruppen (1,2- oder 1,3-Diole) in sterisch günstiger Anordnung zueinander enthalten, werden an die Phenylboronsäure kovalent gebunden. In diesem Falle übersteigt das Adsorptionsvermögen der Phe-

nylboronsäure und die Kompensationskraft des Ammoniumacetat-Puffers die elektrostatischen Abstoßungskräfte des Kationenaustauschers. Mononukleotide mit nur einer cis-Diol-Gruppe und negativer Ladung binden hingegen nicht an der Gelmatrix. Uridinadenosintriphosphat enthält zwei Ribosen, die je eine cis-ständige Diol-Gruppe enthalten, durch die es an der Phenylboronsäure gebunden werden kann. Ziel der Affinitätschromatographie war es, die Dinukleosidpolyphosphate zu konzentrieren und Mononukleotide von den Dinukleotiden zu trennen. Die Bindungskapazität der Phenylboronsäure ist abhängig vom pH-Wert. Wird HCl auf die Säule aufgetragen, sinkt die Salzkonzentration. Dadurch werden die elektrostatischen Abstoßungskräfte des Kationenaustauschers durch den Ammoniumacetat-Puffer nicht mehr kompensiert. Zusätzlich sinkt der pH-Wert, wodurch es zu einer hydrolytischen Spaltung der Bindung zwischen den cis-Diol-Gruppen und der Phenylboronsäure kommt. Aufgrund dieser beiden Mechanismen eluiert das Uridinadenosintriphosphat wieder.

Nach der Konzentrierung der Dinukleosidpolyphosphate in der Affinitäts-Chromatographie wurde das Eluat mit Hilfe einer Reversed-Phase-Chromatographie entsalzt (Abbildung 4). Der folgende Schritt zur Quantifizierung und Fraktionierung des Probengemisches erfolgte ebenfalls mittels einer Reversed-Phase-Chromatographie. Bei der Auftrennung der hydrophilen Nukleosidpolyphosphate hat sich bisher ein flacher Gradientenverlauf bewährt (SCHLÜTER 1996). Durch die unpolare stationäre Phase der Reversed-Phase-Säule werden Substanzen umso stärker gebunden, je unpolarer sie sind. Um die polaren Dinukleotide an die Reversed-Phase-Oberfläche zu binden, wurde ein Ionenpaar-reagenz hinzugefügt. Es wurde das flüchtige TEAA verwendet, da es sich nach der Chromatographie durch Vakuumzentrifugation von den aufgereinigten Fraktionen entfernen lässt.

Die Fraktion der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie (Abbildung 5) wurde im Nierenperfusionstest auf ihre vasokonstriktorische Aktivität getestet.

An der isolierten, perfundierten Rattenniere zeigte die Substanz, die in der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie in Minute Vierzehn (in Abbildung 5b mit einem Pfeil gekennzeichnet) eluierte, eine deutliche vasokonstriktorische Potenz.

Anschließend wurde diese Fraktion der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie mit der MALDI-Massenspektrometrie untersucht. Das Ionenpaarreagenz wurde über eine Vakuumzentrifugation entfernt, da es Salz an den Molekülen bindet und die MALDI-Massenspektrometrie beeinträchtigen würde. In der oben genannten Fraktion der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie wurde ein Molekül mit der Masse 736 Dalton detektiert (Abbildung 6). Diese Masse entspricht der molekularen Masse von Uridinadenosintriphosphat. Zur Untermauerung der Annahme, dass es sich bei der isolierten Substanz tatsächlich um Uridinadenosintriphosphat handelt, wurde eine MALDI-LIFT-TOF/TOF-Massenspektrometrie durchgeführt. Die Sequenzierung der isolierten Substanz mit der Masse von 736 Dalton ergab Massensignale, deren Fragmente eindeutig dem Uridinadenosintriphosphat zugeordnet werden konnten (Abbildung 7).

Zur weiteren Identifizierung der isolierten Substanz wurden enzymatische Spaltungsversuche mit alkalischer Phosphatase, 3´Phosphodiesterase und 5´Phosphodiesterase durchgeführt. Die alkalische Phosphatase hydrolysiert terminale Phosphatgruppen, die 3´Phosphodiesterase spaltet Phosphoesterbindungen, die sich an der 3´Position des Nukleotids und somit außerhalb der Phosphatkette befinden, und die 5´Phosphodiesterase spaltet Phosphoesterbindungen, die sich an der 5´Position des Nukleotids und somit innerhalb der Phosphatkette befinden. Um Aufschluss über die Verknüpfung der Phosphate mit der Ribose des isolierten Uridinadenosintriphosphat zu erhalten, wurde die Probe mit alkalischer Phosphatase, 3´Phosphodiesterase und 5´Phosphodiesterase inkubiert. Anschließend erfolgte jeweils eine MALDI-Massenspektroskopie. Durch alkali-

sche Phosphatase und 3'Phosphodiesterase wurde die Substanz nicht gespalten, wodurch belegt wurde, dass die isolierte Substanz weder Phosphoesterbindungen in 3'Position noch terminale Phosphatgruppen enthält. Das Massenspektrum nach Inkubation mit 5'Phosphodiesterase hingegen zeigte eine Spaltungsreaktion.

Durch die MALDI-Massenspektrometrie und MALDI-LIFT-TOF/TOF-Massenspektrometrie konnte eine Zuordnung der Massen zu dem Dinukleosidpolyphosphat Uridinadenosintriphosphat (Up_3A) erfolgen. Die Ergebnisse der enzymatischen Spaltungsversuche zeigen, dass innerhalb der isolierten Substanz die Adeningruppe und die Uridingruppe über Phosphatgruppen in 5'-Position mit der Ribose verbunden sind. Insgesamt bestätigt sich somit die Annahme, dass es sich bei der isolierten Substanz tatsächlich um Uridinadenosintriphosphat handelt.

Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Vorgehensweise gelang erstmalig die Isolierung und Identifizierung eines weiteren gemischten Dinukleotids. Uridinadenosintriphosphat (Up_3A) ist, wie sich im Nierenperfusionstest zeigte, eine vaskokonstringierende Substanz. Da dieses Dinukleotid in sezernierbaren Granula des Nebennierenmarks gespeichert wird, kann von einer aktiven Sekretion dieser Substanz in den Blutkreislauf und somit von einer systemischen Wirkung ausgegangen werden. Dies wirft die Frage nach den Wirkmechanismen und Angriffspunkten auf, die zu einem erhöhten Tonus in der glatten Gefäßmuskulatur führen könnten.

Die Wirkung extrazellulärer Dinukleosidpolyphosphate wird durch die P_2 -Rezeptorfamilie vermittelt (JANKOWSKI et al. 2003). Es werden zwei Subtypen von P_2 -Rezeptoren unterschieden. Die ionotropen P_{2X} -Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die über einen Na^+ - und Ca^{2+} - Einstrom die intrazelluläre Ca^{2+} - Konzentration und damit den Tonus der Gefäßmuskelzelle erhö-

hen (TEPEL et al. 1997), während die metabotropen P_{2Y} -Rezeptoren G-Proteingekoppelte Rezeptoren sind, die über die Aktivierung der Phospholipase C und Inositoltriphosphat zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen (TEPEL et al. 1996).

Es stellt sich die Frage, welche dieser Rezeptoren den vasokonstriktorisches Effekt des Uridinadenosintriphosphats übermitteln. Für die Gruppe der Uridinadenosinpolyphosphate (Up_nA) konnte bereits gezeigt werden, dass der selektive P_{2X1} - und P_{2X3} -Rezeptorblocker α,β -Methyl-ATP zu einer deutlichen Inhibition der Up_nA -vermittelten Vasokonstriktion führte (JANKOWSKI et al. 2005).

In glatten Gefäßmuskelzellen ist der P_{2X1} -Rezeptor der dominante P_{2X} -Rezeptorsubtyp (BO et al. 1998, KUNAPULI und DANIEL 1998, WANG et al. 2002, LAMONT et al. 2006), obwohl auch P_{2X2} -, P_{2X3} -, P_{2X4} - und P_{2X5} -Subtypen gefunden werden konnten (NORI et al. 1998, PULVIRENTI et al. 2000, TURNER et al. 2003). Der starke inhibitorische Effekt des α,β -Methyl-ATP lässt jedoch einen Hauptbeitrag anderer als der P_{2X1} - und P_{2X3} -Subtypen sehr unwahrscheinlich erscheinen (JANKOWSKI et al. 2005). Obwohl bisher kein idealer Hemmstoff zur Unterscheidung zwischen P_{2X1} - und P_{2X3} -Subtypen bekannt ist, konnte mit Substanzen mit unterschiedlicher Affinität zu diesen beiden Subtypen (KING et al. 1999, NORTH 2002) gezeigt werden, dass der P_{2X1} -Rezeptorsubtyp hauptsächlich für den vasokonstriktiven Effekt der Uridinadenosinpolyphosphate verantwortlich ist (JANKOWSKI et al. 2005). Diese Annahme steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen, die in P_{2X1} -Rezeptor-Knockout-Mäusen gezeigt haben, dass durch das Fehlen dieses P_{2X} -Subtyps in Arterien der vasokonstriktive Effekt von ATP aufgehoben war (VIAL und EVANS 2002). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich die Aktivität der Uridinadenosinpolyphosphate von Dinukleotiden unterscheidet, die ausschließlich Purine enthalten. Der Uridinteil im Uridinadenosintriphosphat könnte also eine Affinität zu den P_{2Y} -Rezeptorsubtypen bedin-

gen, so wie es schon von den uridinenthaltenden Mononukleotiden bekannt ist (JANKOWSKI et al. 2005). Diese Tatsache deutet möglicherweise daraufhin, dass die Uridinadenosinpolyphosphate ebenfalls diese P_{2Y2^-} und P_{2Y4^-} -Rezeptoren aktivieren. Somit könnten sich die Uridinadenosinpolyphosphate nicht nur als Modulatoren akuter Gefäßprozesse wie der Vasokonstriktion erweisen, sondern auch als Modulatoren anderer langfristiger Effekte auf die Wandstruktur, da P_{2Y2^-} und P_{2Y4^-} -Rezeptoren eine Vielzahl verschiedener Effekte inklusive Zellproliferation und Differenzierung vermitteln (BURNSTOCK 2002).

Es ist anzunehmen, dass auch das Uridinadenosintriphosphat (Up_3A) seine Wirkung über die oben beschriebenen Rezeptoren entfaltet. Hauptsächlich vermittelt Uridinadenosintriphosphat demnach vermutlich einen kurzfristigen, akuten vasokonstriktiven Effekt über den P_{2X1} -Rezeptor. Darüber hinaus verursacht es möglicherweise langfristige Wandveränderungen an den glatten Gefäßmuskelzellen über P_{2Y2^-} und P_{2Y4^-} -Rezeptoren. Dafür spricht auch die Tatsache, dass gerade die P_{2Y2^-} , P_{2Y4^-} und P_{2Y11} -Rezeptorsubtypen eine besonders ausgeprägte Aktivität bei Nukleosidtriphosphaten zeigen (JANKOWSKI et al. 2005).

Um des Weiteren auszuschließen, dass der vasokonstriktive Effekt der Uridinadenosinpolyphosphate durch seine Abbauprodukte bedingt ist, wurde im Nierenperfusionstest die konzentrationsabhängige vasokonstriktorische Antwort der Uridinadenosinpolyphosphate mit denen von ATP und UTP verglichen. ATP und UTP beeinflussten den Gefäßtonus weitaus weniger, woraus zu schließen ist, dass diese Abbauprodukte allenfalls einen geringen Anteil an der Wirkung der Uridinadenosinpolyphosphate haben (JANKOWSKI et al. 2005). Da Endothelzellen ATP über verschiedene Stimuli freisetzen (BURNSTOCK 1999), könnte also auch das Uridinadenosintriphosphat ein Stimulator dieser ATP-Freisetzung sein. Dieser indirekte Effekt könnte neben den direkten Effekten eine weitere Komponente der Uridinadenosintriphosphat-Wirkungen sein.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch im Tierorganismus eine Beeinflussung des Gefäßtonus durch Uridinadenosinpolyphosphate möglich ist. Darüber hinaus war die vasoaktive Potenz der Uridinadenosinpolyphosphate vergleichbar mit der von Noradrenalin. Beide erhöhten den mittleren arteriellen Druck nach intraaortaler Injektion in den Organismus einer anästhesierten Ratte. Während Noradrenalin einen scharfen, kurz andauernden Anstieg des Blutdrucks verursachte, zeigte die gleiche Menge an Uridinadenosinpolyphosphaten einen verlängerten Effekt auf den Blutdruck (JANKOWSKI et al. 2005).

Des Weiteren wurden die Mechanismen der endothelialen Uridinadenosinpolyphosphat-Freisetzung untersucht. Dabei zeigte sich, dass Acetylcholin, Endothelin, A23187, mechanischer Stress, und auch ATP und UTP die Freisetzung der Uridinadenosinpolyphosphate aus humanen Endothelzellen stimulieren. Da Endothelin also ein Stimulator der Uridinadenosinpolyphosphat-Freisetzung ist, könnte somit diese Freisetzung einen Anteil an der bekannten endothelinvermittelten Vasokonstriktion haben (JANKOWSKI et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig nachgewiesen, dass in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks neben den Purin-Dinukleotiden auch ein Vertreter der Pyrimidin-Dinukleotide, nämlich das uridinenthaltende Dinukleotid Uridinadenosintriphosphat (Up_3A) enthalten ist. Die Tatsache, dass dieses vasoconstriktorisch wirksame Dinukleotid in sezernierbaren Granula des Nebennierenmarks gespeichert wird, lässt eine systemische Wirkung dieser Substanz und damit eine Bedeutung im Rahmen der Blutdruckregulation vermuten.

Die Isolierung eines solchen gemischten Dinukleotids gelang bisher ausschließlich aus humanen Endothelzellen. Es ist davon auszugehen, dass die oben für die Gruppe der Uridinadenosinpolyphosphate (Up_nA) beschriebenen vasoconstriktorischen Wirkungen und Eigenschaften mit großer Wahrscheinlichkeit auch für das Uridinadenosintriphosphat (Up_3A) zutreffend sind. Dementspre-

chend kann weiterhin angenommen werden, dass weitere vasokonstriktorische Vertreter dieser Substanzklasse in chromaffinen Zellen der Nebenniere enthalten sind. Diese Annahmen könnten Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen sein.

6 Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist die Bedeutung der Dinukleosidpolyphosphate in der Herz-Kreislauf-Physiologie zunehmend deutlich geworden. Diese Substanzklasse zeichnet sich durch ihre proliferationssteigernde und vor allem vasokonstriktorische Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen aus. Ihr Nachweis in sezernierbaren Granula im Mark boviner Nebennieren legt die Vermutung nahe, dass Dinukleosidpolyphosphate eine Bedeutung in der Blutdruckregulation haben und somit möglicherweise an der Pathogenese der primären essentiellen arteriellen Hypertonie beteiligt sind. Bisher konnten ausschließlich Purin-Dinukleotide mit den Nucleobasen Adenin und Guanin aus bovinem Nebennierengewebe isoliert werden. Der Nachweis eines vasokonstriktorischen Pyrimidin-Dinukleotids mit den Nucleobasen Adenin und Uracil ist bisher einzig in humanen Endothelzellen gelungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, ob als Vertreter der Substanzklasse das Uridinadenosintriphosphat (Up_3A) in chromaffinen Zellen boviner Nebennieren nachweisbar ist, und inwiefern diesem Mediator damit ebenfalls eine Funktion in der Blutdruckregulation zukommt.

Zur Isolierung des Uridinadenosintriphosphats wurde bovines Nebennierengewebe gefriergetrocknet, deproteinisiert und einer präparativen Reversed-Phase-Chromatographie zugeführt. Nach der Konzentrierung der Dinukleosidpolyphosphate in der Affinitäts-Chromatographie wurde die Probe mit Hilfe der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie entsalzt, quantifiziert und fraktioniert. Im anschließenden Nierenperfusionstest konnte die vasokonstriktorische Aktivität der Probensubstanz gezeigt werden. In der MALDI-Massenspektrometrie wurde ein molekulares Gewicht von 736 Dalton bestimmt.

Die Sequenzierung mittels MALDI-LIFT-TOF/TOF-Massenspektrometrie ergab Massensignale, deren Fragmente eindeutig dem Uridinadenosintriphosphat (Up_3A) zugeordnet werden konnten. Zur weiteren Identifizierung der molekularen Struktur wurden enzymatische Spaltungsversuche durchgeführt, die eine 5'-Phosphodiesterbindung zwischen der Phosphatkette und den Ribosen des Uridinadenosintriphosphats zeigten.

In der vorliegenden Arbeit wurde somit erstmalig nachgewiesen, dass in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks neben den Purin-Dinukleotiden auch Pyrimidin-Dinukleotide enthalten sind, die bisher einzig aus humanen Endothelzellen isoliert werden konnten. Da das vasokonstriktorisch wirksame Pyrimidin-Dinukleotid Uridinadenosintriphosphat (Up_3A) im Nebennierenmark in sezernierbaren Granula gespeichert wird, kann von einer aktiven Sekretion dieser Substanz in den Blutkreislauf und somit von einer systemischen Wirkung und einer Bedeutung in der Kreislaufregulation ausgegangen werden.

7 Literaturverzeichnis

- Agha A, Schlüter H, König S, et al.: A novel platelet-derived renal vasoconstrictor agent in normotensives and essential hypertensives. *J Vasc Res* 1992; 29: 281-289
- Bachmann J, Schlüter H, Storkebaum W, et al.: Effect of plasma from essential hypertensives on vascular tone of aortic strips, isolated perfused mesentery and isolated perfused kidney. *Life Sci* 1990; 47: 1365-1374
- Bachmann J, Schlüter H, Storkebaum W, et al.: Effect of plasma from patients with essential hypertension on vascular resistance in the isolated perfused rat kidney. *Clin Sci* 1991; 80: 17-23
- Barnes LD, Robinson AK, Mumford CH, et al.: Assay of diadenosine tetraphosphate hydrolytic enzymes by boronate chromatography. *Anal Biochem* 1985; 144: 296-304
- Bianchi G, Fox U, Di Francesco GF, Giovanetti AM, Pagetti D: Blood pressure changes produced by kidney cross-transplantation between spontaneously hypertensive rats and normotensive rats. *Clin Sci Mol Med* 1974; 47: 435-448
- Bo X, Sexton A, Xiang Z, et al.: Pharmacological and histochemical evidence for P2X receptors in human umbilical vessels. *Eur J Pharmacol* 1998; 353: 59-65
- British Hypertension Society (BHS-IV): Guidelines for hypertension management. Summary. *BMJ* 2004; 328: 634-640

- Burnstock G: Release of vasoactive substances from endothelial cells by shear stress and purinergic mechanosensory transduction. *J Anat* 1999; 194: 335–342
- Burnstock G: Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 364–373
- Carretero OA, Oparil S: Essential hypertension. Part I: Definition and etiology. *Circulation* 2000; 101: 329-335
- Castillo CJ, Moro MA, Del Valle M, et al.: Diadenosine tetraphosphate is co-released with ATP and catecholamines from bovine adrenal medulla. *J Neurochem* 1992; 59: 723-732
- Curtis JJ, Luke RG, Dustan HP, et al.: Remission of essential hypertension after renal transplantation. *N Engl J Med* 1983; 309: 1009
- Dahl LK, Knudsen KD, Iwai J: Humoral transmission of hypertension: Evidence from parabiosis. *Circ Res* 1969; 24: 21-33
- Federman, D: Adrenal gland. In: Dale DC, Federman D (eds.). *Scientific American Medicine*. Scientific American Inc, New York 1997, 1-17
- Fischer A: Renovaskuläre Erkrankung. *Epidemiologie, Diagnostik und Therapie*. *Cardiovasc* 2002; 6: 26-33
- Gasse C, Hense H, Stieber J, Doring A, Liese AD, Keil U: Assessing hypertension management in the community – Trends of prevalence, detection, treatment, and control of hypertension in the MONICA Project Augsburg 1984-1995. *J Hum Hypertens* 2001; 15: 27-36
- Gifford RW, Manger WM, Bravo EL: Phäochromocytoma. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994; 23: 387-404

- Hamlyn JM, Ringel R, Schaeffer J, Levinson PD, Hamilton BP, Kowarski AA, Blaustein MP: A circulating inhibitor of (Na⁺ + K⁺) ATPase associated with essential hypertension. *Nature* 1982; 300: 650-652
- Jacobson KA, BF King G, Burnstock G: Pharmacological characterization of P2 (nucleotide) receptors. *Celltransmissions* 2000; 16: 3-16
- Jankowski J, Hagemann J, Tepel M, et al.: Dinucleotides as growth-promoting extracellular mediators. Presence of dinucleoside diphosphates Ap₂A, Ap₂G, and Gp₂G in releasable granules of platelets. *J Biol Chem* 2001a; 276: 8904-8909
- Jankowski J, Jankowski V, Seibt B, et al.: Identification of dinucleoside polyphosphates in adrenal glands. *Biochem Biophys Research Com* 2003; 304: 365–370
- Jankowski V, Karadogan S, Vanholder R, et al.: Paracrine stimulation of vascular smooth muscle proliferation by diadenosine polyphosphates released from proximal tubule epithelial cells. *Kidney Int* 2007; 71: 994-1000
- Jankowski J, Tepel M, van der Giet M, et al.: Identification and characterization of P(1), P(7)-Di(adenosine-5')- heptaphosphate from human platelets. *J Biol Chem* 1999; 274: 23926-23931
- Jankowski V, Tölle M, Vanholder R, et al.: Uridine adenosine tetraphosphate: A novel endothelial-derived vasoconstrictive factor. *Nat Med* 2005; 11: 223-227
- Jankowski J, Yoon MS, Stephan N, et al.: Vasoactive diadenosine polyphosphates in human placenta: Possible candidates in the pathophysiology of pre-eclampsia? *J Hypertens* 2001b; 19: 567-573

- Joint National Committee (JNC): The Seventh Report of the Joint National Committee on prevention; detection, evaluation, and treatment of high blood pressure (JNC VII). *J Am Assoc* 2003; 289: 2560-2571
- Jones S, Thornton JM: Principles of protein-protein interactions. *Proc Nat Acad Sci* 1996; 93: 13-20
- Karas M, Giessmann U: Matrix unterstützte Laserdesorptions-Massenspektrometrie. *Labor* 2000 1982; *Bioanalytik*, 71-83
- Kaufmann R, Kirsch D, Spengler B: Sequencing of peptides in a time-of-flight mass spectrometer: Evaluation of postsorce decay following matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI). *Int J Mass Spectrom Ion* 1994; 131: 355-357
- King BF, et al.: Diinosine pentaphosphate (Ip₅I) is a potent antagonist at recombinant rat P2X1 receptors. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 981-988
- Koshimizu T, Tomic M, van Goor F, et al.: Functional role of alternative splicing in pituitary P2X2 receptor-channel activation and desensitization. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 901-913
- Kunapuli SP, Daniel JL: P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem J* 1998; 336: 513-523
- Kuska, J: Arterial hypertension in renal parenchyma diseases. *Mater Med Pol* 1983; 15: 87-91
- Lamont C, Vial C, Evans RJ, Wier WG: P2X1 receptors mediate sympathetic postjunctional Ca²⁺ transients in mesenteric small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H3106-H3113

- Lüscher TF, Boulanger CM, Dohi Y, Yang ZH: Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 1992; 19: 117-130
- Luo J, Jankowski J, Knobloch M, et al.: Identification and characterization of diadenosine 5',5'''-P₁,P₂ - diphosphate and diadenosine 5',5'''-P₁,P₃-triphosphate in human myocardial tissue. *Faseb J* 1999; 13: 695-705
- Mehta PK, Griendling KK: Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C82-C97
- Morioka M, Kobayashi T, Sone A, Furukawa Y, Tonaka H: Primary aldosteronism due to unilateral adrenal hyperplasia: Report of two cases and review of the literature. *Endocr J* 2000; 47: 443-449
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ: Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 1984; 5: 25-44
- Newell-Price J, Trainer P, Besser M, Grossman A: The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's Syndrome and Pseudo-Cushing's states. *Endocr Rev* 1998; 5: 647-672
- Nori S, Fumagalli L, Bo X, et al.: Coexpression of mRNAs for P₂X₁, P₂X₂ and P₂X₄ receptors in rat vascular smooth muscle: An in situ hybridization and RT-PCR study. *J Vasc Res* 1998; 35: 179-185
- North RA: Molecular physiology of P₂X receptors. *Physiol Rev* 2002; 82: 1013-1067

- Oberhauser V, Vonend O, Rump LC: Neuropeptide Y and ATP interact to control renovascular resistance in the rat. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1179-1185
- Orth DN: Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 1995; 332: 791-803
- Pees C, Haas NA, Lange PE: The clinical diagnosis of aortic isthmus stenosis. *Dtsch Med Wochenschr* 1999; 124: 1329-1334
- Pintor J, Torres M, Miras-Portugal MT: Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates- Ap₄A and Ap₅A- from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells. *Life Sci* 1991; 48: 2317-2324
- Pulvirenti TJ, et al.: P2X (purinergic) receptor redistribution in rabbit aorta following injury to endothelial cells and cholesterol feeding. *J Neurocytol* 2000; 29: 623-631
- Robinson J, Haefeli W, Linder L, et al.: Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 1995; 91: 1314-1319
- Rosenthal R, Conen D: Phäochromozytom: Diagnose und Therapie. *Schweiz Med Wochenschr* 2000; 130: 298-304
- Sartori C, Lepori M, Scherrer U: Interaction between nitric oxide and the cholinergic and sympathetic nervous system in cardiovascular control in humans. *Pharmacol Ther* 2005; 106: 209-220
- Schlüter H: Suche, Identifizierung und Charakterisierung unbekannter vasokonstringierender Hormone. Habilschr., Univ. Münster 1996

- Schlüter H, Gross I, Bachmann J, et al.: Adenosine(5') oligophospho-(5') guanosines and guanosine(5') oligophospho-(5') guanosines in human platelets. *J Clin Invest* 1998; 01: 682-688
- Schlüter H, Offers E, Brüggemann G, et al.: Diadenosine phosphates and the physiological control of blood pressure. *Nature* 1994; 367: 186-188
- Schwartz SM, Reidy MA: Common mechanisms of proliferation of smooth muscle in atherosclerosis and hypertension. *Hum Pathol* 1987; 18: 240-247
- Sillero MA, Del Valle M, Zaera E, et al.: Diadenosine 5',5''-P₁,P₄-tetrphosphate (Ap₄A), ATP and catecholamine content in bovine adrenal medulla, chromaffin granules and chromaffin cells. *Biochim* 1994; 76: 404-409
- Smulyan H. Nitrates, arterial function, wave reflections and coronary heart disease. *Adv Cardiol* 2007; 44: 302-314
- Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M: A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* 2003; 376: 952-965
- Tepel M, Jankowski J, Schlüter H, et al.: Diadenosine polyphosphates' action on calcium and vessel contraction. *Am J Hypertens* 1997; 10: 1404-1410
- Tepel M, Lowe S, Nofer JR, et al.: Diadenosine polyphosphates regulate cytosolic calcium in human fibroblast cells by interaction with P₂X purinoceptors coupled to phospholipase C. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1312: 145-150
- Turner CM, Vonend O, Chan C, et al.: The pattern of distribution of selected ATP-sensitive P₂ receptor subtypes in normal rat kidney: An immunohistological study. *Cell Tissue Org* 2003; 175: 105-117

- van der Giet M, Cinkilic O, Jankowski J, et al.: Evidence for two different P2X-receptors mediating vasoconstriction of Ap₅A and Ap₆A in the isolated perfused rat kidney. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 1463-1469
- van der Giet M, Khattab M, Borgel J, et al.: Differential effects of diadenosine phosphates on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 1453-1460
- van der Giet M, Westhoff T, Cinkilic O, et al.: The critical role of adenosine and guanosine in the affinity of dinucleoside polyphosphates to P(2X)-receptors in the isolated perfused rat kidney. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 467-474
- Vial C, Evans RJ: P2X(1) receptor-deficient mice establish the native P2X receptor and a P2Y₆-like receptor in arteries. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 1438–1445
- Wang L, et al.: P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 40: 841–853
- Xiang Z, Bo X, Burnstock G: Localization of ATP-gated P2X receptor immunoreactivity in rat sensory and sympathetic ganglia. *Neurosci Lett* 1998; 256: 105-108
- Yang Z, Huerlimann DA, Viswambharan H, Lüscher TF: Phorbol ester downregulates PDGFbeta receptor via PKCbeta1 in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 372-375
- Zidek W, Bachmann J, Schlüter H, et al.: Effect of plasma from essential hypertensives on tension of aortic strips. *Clin Exp Hypertens* 1990; 12: 365-381

Zidek W, Heckmann U, Lange-Asschenfeldt H, et al.: Humoral factors in the pathogenesis of primary hypertension. *Klin Wochenschr* 1985; 63: 94-96

Zidek W, Heckmann U, Losse H, et al.: Effects on blood pressure of cross circulation between spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Clin Exp Hypertens* 1986; 8: 347-354

Zidek W, Sachinidis A, Spieker C, et al.: Effect of plasma from hypertensive subjects on Ca^{2+} transport in permeabilized human neutrophils. *Clin Sci* 1988; 74: 53-56

8 Anhang

8.1 Geräte und Chemikalien

Geräte

Anionenaustauschersäule:

UnoQ-1-Säule, 7 * 35 mm, Firma BioRad

Aufbereitungsanlage für HPLC- H₂O:

Milli-Q, Water purification-System, Firma Millipore

Destillationsanlage für H₂O:

Firma Köttermann

Fraktionssammler:

Frac-100, Firma LBK

HPLC Pumpen:

Gradient Pump 2249, Firma Pharmacia/LKB

Hitachi L-6200 Intelligent Pump, Firma Merck

Äkta Purifier, Firma Amersham Pharmacia

HPLC UV-Monitor:

Lambda Max 81

HPLC-Zubehör:

Firma Latek

Leitfähigkeitsmessgeräte:

LF 39, Firma WTW

LF 196, Microprocessor Conductivity Meter, Firma WTW

LF 42, Firma WTW

Lyophilisationsanlage:

Freezemobil 12, Firma Virtis

Massenspektrometer:

MALDI-Reflex III, Firma Bruker Daltonic

Ultraflex III TOF/TOF Massenspektrometer, Firma Bruker Daltonic

pH-Meter:

Typ 27, Firma Knick

Reversed-Phase-Chromatographiesäulen:

Lobar Fertigsäule Lichroprep RP-18, Korngröße 40-63 μ m, 310x25 mm, Firma Merck/VWR

Chromolith Performance RP-18e, Porengröße 2 μ m/13nm, 100x4,6mm, Firma Merck/VWR

Schlauchpumpe:

Motor IP 21, Steuergerät IP 53, Mehrkanalpumpenkopf 751900 mit Aufsätzen 751950, Firma Masterflex

Schreiber:

Thermodrucker C-R 3A, Shimadzu 2210 Recorder, Firma Amersham-Pharmacia

Transducer:

Statham P23 GB, Firma Siemens

UV-Detektoren:

Unicord S II, Firma Amersham-Pharmacia

Econo UV-Monitor, Firma Bio Rad

Vakuumpumpe:

VacuBrand R 6-A, Firma Brand

Vakuumzentrifuge:

Speed Vac Concentrator SVC 100 H, Firma Savant

Zentrifugen:

3 E-1, Firma Sigma-Aldrich

Eppendorf 3200, Firma Eppendorf

101 M, Firma Sigma-Aldrich

Chemikalien

Acetonitril	Firma Merck
Ammoniumacetat	Firma Sigma-Aldrich
Bio-Rex 70 Cation Exchange Resin, 100-200 mesh sodium form	Firma BioRad
HCl	Firma Sigma-Aldrich
K ₂ HPO ₄	Firma Sigma-Aldrich
KOH	Firma Sigma-Aldrich
m-Aminophenylboronsäurehemisulfat	Firma Bio-Rad
NaOH	Firma Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Firma Sigma-Aldrich
Perchlorsäure 70 %	Firma Sigma-Aldrich
Tetrabutylammoniumhydrogensulfat	Firma Merck
Triethylammoniumacetat 1 M	Firma Sigma-Aldrich

8.2 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
AT	Angiotensin
ATP	Adenosintriphosphat
Ap ₍₂₋₇₎ A	Diadenosin (-di-, -tri-, -tetra-, -penta-, -hexa-, -septa-) phosphat
Ap ₍₂₋₆₎ G	Adenosinguanosin (-di-, -tri-, -tetra-, -penta-, -hexa-) phosphat
AU	Absorptionsunit
C	Kohlenstoffatom oder Celsius
C18	Reversed-Phase Material mit Octadecylgruppen
Ca ²⁺	Kalzium
Cl	Chlor
Da	Dalton
e	elektron
EDRF	endothelium derived relaxing factor
Gp ₍₂₋₆₎ G	Diguanosin (-di-, -tri-, -tetra-, -penta-, -hexa-) phosphat
H	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
Hg	Quecksilbersäule
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HPA	3-Hydroxypicolinsäure
IGF-1	Insuline-like-Growth-Factor 1
IP3	Inositoltriphosphat
K ⁺	Kalium
M	mol/l
m	Masse

MALDI	Matrixunterstützte UV-Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie
Mg	Magnesium
mm	Millimeter
Na ⁺	Natrium
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
P	Phosphat
PBA	Phenylboronsäure
PDGF	Platelet-derived-Growth-Factor
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PLC	Phospholipase C
PSD	Post Source Decay
TEAA	Triethylammoniumacetat
TOF	Time of Flight
Up ₃ A	Uridinadenosintriphosphat
Up ₄ A	Uridinadenosintetraphosphat
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolett
V	Volt
WHO	World Health Organisation
z	Ladung

9 Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. W. Zidek für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Dissertation in der Klinik für Nephrologie und Endokrinologie der Universitätsmedizin Berlin Campus Benjamin Franklin.

Mein besonderer Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. rer. nat. Joachim Jankowski für die Überlassung des Themas, die methodische Anleitung sowie die jederzeit freundliche und überaus geduldige Hilfestellung bei der experimentellen Laborarbeit und der Erstellung des Manuskripts.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dipl. biochem. Lars Henning für die Einführung in die Arbeitstechniken des Labors, die intensive Unterstützung im Laboralltag sowie seine geduldige und zuverlässige Hilfe bei technischen Fragen und Problemen bedanken.

Meinem Vater und meiner Familie gilt mein herzlichster Dank für ihr stetiges wohlwollendes Interesse an meiner Arbeit, den motivierenden Zuspruch in schwierigen Phasen und insbesondere für die Unterstützung während des gesamten Studiums, die mir eine Ausbildung nach meinen Wünschen ermöglicht hat.

Alex danke ich von Herzen für die gedankliche Anteilnahme, seine unverzichtbare emotionale Unterstützung und dafür, dass er immer für mich da ist.

10 Lebenslauf

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

11 Erklärung

Ich, Alexandra Gittel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

**Isolierung des Uridinadenosintriphosphats aus bovinem
Nebennierengewebe**

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.

Datum

Unterschrift