

6 Diskussion

Die Ätiologie und Pathogenese der essentiellen Hypertonie stellt ein multifaktoriell verursachtes Geschehen dar, das in einer Erhöhung des peripheren Widerstandes mündet. Der periphere Widerstand kann sich sowohl durch Vasokonstriktion, als auch durch eine Verdickung der Gefäßwand erhöhen. Einen hohen Stellenwert in der Kreislaufphysiologie scheinen vasokonstringierend- und proliferationssteigernd-wirkende Substanzen wie Dinukleosidpolyphosphate zu haben. Diese Substanzklasse scheint sowohl hinsichtlich ihrer vasokonstringierenden als auch durch ihre proliferationssteigernden Wirkungen in der Kreislaufphysiologie eingebunden zu sein. Dabei zeigen die Diadeosinpolyphosphate und die Adenosininosinpolyphosphate eine vasokonstringierende und eine proliferationssteigernde Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen, während Diguanosinpolyphosphate als proliferationssteigernde Faktoren aktiv sind [38].

Das Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung der Dinukleosidpolyphosphate erfordert eine genaue Kenntnis der Synthese- und Speicherorte. Die Synthese der Dinukleosidpolyphosphate *in vivo* konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Die primäre Quelle der intrazellulären Dinukleosidpolyphosphate kann die Rückreaktion der Aminoacyl-Adenylase, mit einem Nukleotid-Akzeptor, katalysiert durch verschiedene Aminoacyl-tRNA Synthetasen sein. Die Addition eines Adenylats an ATP, ADP oder GDP führt zu Ap_4A , Ap_3A und Ap_3G . Weitere Dinukleosidpolyphosphate könnten auf einem modifizierten Reaktionsweg entstehen [68-70]. *In vitro* Studien zeigen Reaktionen die darauf hinweisen, daß in Gegenwart der Adenylase und Acyl-CoA-Synthetasen, die Dinukleosidpolyphosphat-Konzentration ansteigt [71, 72]. Inwieweit diese Reaktionen auch unter *in vivo* Bedingungen von Bedeutung sind bleibt gegenwärtig noch ungeklärt.

Die ATP-Konzentration in chromaffinen Granula beträgt 0,15 M, während die Katecholamin-Konzentration bei 0,6 M liegt [73]. Im Vergleich zum Cytosol (88%) enthalten chromaffine Granula einen relativ geringen intragranulären Wassergehalt von 66% [74]. In Thrombozytengranula finden sich noch höhere Mononukleotid-Konzentrationen, die Werte bis zu 0,5 M annehmen können. Die Lokalkonzentration des ATP könnte sogar noch höher sein, da ATP um osmotisch stabil zu sein aggregiert sein muss, um die Osmolarität zu reduzieren [75]. Demzufolge besteht die Möglichkeit, dass Dinukleosidpolyphosphate durch Dismutation und Kondensation von Mo-

nonukleotiden entstehen, die intragranulär in sehr hohen Konzentration bei geringem Wassergehalt vorliegen [76].

Bisher konnten Dinukleosidpolyphosphate aus unterschiedlichen Organen isoliert werden [37, 40, 48, 77-79]. Dinukleosidpolyphosphate sind in sezernierbaren Vesikeln in Thrombozyten [38, 40], in menschlichem Herzgewebe [39], in chromaffinen Granula des Nebennierenmarks [43, 80] sowie in Synaptosomen [45] gespeichert und können nach Aktivierung der verschiedenen Zellsysteme [46, 47] in den Blutkreislauf abgegeben bzw. in intrazelluläre Bereiche wie den postsynaptischen Spalt ausgeschüttet werden. Im Blut sind die Dinukleosidpolyphosphate nicht nur in Thrombozyten sondern auch in menschlichen Erythrozyten zu finden. Hier konnte die Existenz von Ap_6A nachgewiesen werden [48].

Bis heute sind eine Vielzahl physiologischer Wirkungen der Diadenosinpolyphosphate beschrieben worden. Hierzu zählen Wirkungen auf Stoffwechselfunktionen wie der Gluconeogenese und der Insulin-Sekretion [81, 82], Beeinflussung des Immunsystems [83], des Nervensystems [84], der Nierenfunktionen [85], der Thrombozytenaggregation [40, 86], des Zellwachstums [59] sowie der Zelldifferenzierung und der Apoptose [87]. Bisher konnte jedoch noch kein Organ identifiziert werden, dass Diguanosinhexaphosphat aktiv in den Körperkreislauf sezerniert.

Da das vermehrte Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen von besonderer Bedeutung für die Genese der Atherosklerose und damit der arteriellen Hypertonie ist, kommt im Besonderen den Diguanosinpolyphosphaten als proliferationssteigernde Faktoren eine besondere Bedeutung zu. Im Besonderen zeichnet sich das Gp_6G durch seine proliferationssteigernden Eigenschaften aus [38].

Obwohl die physiologische Wirkung des Gp_6G offenbar über einen $P2Y$ -Rezeptor vermittelt wird, konnte bisher noch keine relevante vasokonstringierende Wirkung des Gp_6G beschrieben werden [88]. Offenbar ist das Vorhandensein zumindest einer Adenosingruppe für eine signifikante vasokonstringierende Wirkung des resultierenden Dinukleosidpolyphosphats notwendig [88]. So konnte in früheren Studien belegt werden, dass im Gegensatz zu den Ap_nA und Ap_nG ($n=2-6$) von dem Gp_6G keine vasokonstriktorische Wirkung an dem biologischen Modell der isolierten perfundierten Niere nachweisbar ist [88]. Inwieweit der bisher fehlende Nachweis der vasokonstringierenden Wirkung des Gp_6G auf das verwendete biologische Modell zurückzuführen ist,

kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht geklärt werden und bedarf der Untersuchung der physiologischen Wirkung des Gp₆G an alternativen Modellen.

Nachdem in Nebennieren bereits Diadenosinpolyphosphate (Ap_nA mit n = 2 – 6) nachgewiesen werden konnten [43, 46, 47, 89], erschien Nebennierengewebe als geeigneter Kandidat, um nach weiteren Vertretern der proliferationssteigernde Diguanosinpolyphosphate, die bisher in humanen Thrombozyten nachgewiesen wurden [38, 41]. Es konnte gezeigt werden, dass humanes Plasma Diadenosinpolyphosphate in physiologisch relevanten Konzentrationen enthält. Zudem waren die Konzentrationen im Plasma aus Nebennierenvenen signifikant höher als in der infrarenalen und suprarenalen Vena cava. Somit ist die Nebenniere möglicherweise ein Sekretionsort für Dinukleosidpolyphosphate [78].

Da aus ethischen und dadurch bedingt auch aus praktischen Gründen kein Nebennierengewebe eines gesunden Probanden in ausreichender Menge zur vollständigen Identifizierung der Diguanosinhexaphosphate zur Verfügung stehen, wurde in der vorliegenden Arbeit mit bovinem Nebennierengewebe gearbeitet. Das bovine Nebennierengewebe konnte über kommerzielle Schlachthöfe in fast uneingeschränkter Menge bezogen werden. Darüberhinaus konnte durch die Verwendung von bovinem Nebennierengewebe gewährleistet werden, dass die Entnahme der Nebennieren unter für die Isolierung des Diguanosinhexaphosphates idealen Bedingungen erfolgte.

Aufgrund der chemischen Eigenschaften der Dinukleosidpolyphosphate können diese Moleküle nicht mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Das übliche Verfahren zur mechanischen Desintegration von Organen besteht aus Isolierung, Pulverisierung und Homogenisierung des Untersuchungsgutes im Extraktionsmittel. Die Vorteile dieses Verfahrens liegen in seiner Einfachheit und Kostengünstigkeit. Nachteilig an diesem Verfahren ist die Tatsache, dass es überaus aufwendig ist, grössere Mengen eines Organgemisches zu verarbeiten. Zudem besteht die grosse Gefahr von Zersetzungen der Inhaltsstoffe durch oxidative und enzymatische Abbauprozesse. Aufgrund dieser Nachteile wurde die von Wheelock beschriebene Methode [66] angewandt. Dabei wurde das Untersuchungsgut grob zerkleinert, in flüssigem Stickstoff gefroren und anschliessend gefriergetrocknet. Unter ständiger Kühlung erfolgte dann die Pulverisierung des Lyophilisats. Die Methode von Wheelock bietet dabei den Vorteil, dass der Zeitaufwand für die mechanische Desintegration minimiert werden kann. Somit ist der Abbau der Inhaltsstoffe des

Organgemisches durch enzymatische Abbaureaktionen, die ihr Temperaturoptimum bei circa 37 °C haben, als auch durch oxidative Prozesse und Reaktionen im Rahmen des Gewebeunterganges auf ein Minimum reduziert.

Die anschliessende Homogenisierung mittels Ultra-Turrax-Mixer erfolgte in Intervallen mit zwischenzeitlichen Pausen unter ständiger Eiskühlung. Mit dieser Technik wurde die Temperatur des Gemisches zur schonenden Aufarbeitung unter 4 °C gehalten, um Abbaureaktionen zu minimieren. Mit Hilfe einer Ultrazentrifugation wurden die im Homogenat enthaltenen Feststoffe entfernt. Die im Nebennierengewebe enthaltenen Proteine konnten durch Senkung des pH-Wertes mit Perchlorsäure zur Ausfällung gebracht werden. Die Perchlorate wurden durch die Zugabe von Kalilauge als KClO_4 gefällt. Durch mehrmaliges Zentrifugieren konnten Proteine und Salze aus dem Substanzgemisch entfernt werden. Die in der Probe enthaltenen Lipide wurden durch Verseifung in eine wasserlösliche Form gebracht. Der Überstand der Zentrifugation enthielt die zu identifizierenden Dinukleosidpolyphosphate. Zur Identifikation dieser Moleküle mussten sie zunächst bis zur Homogenität aufgereinigt werden, um dann mit Hilfe physiko-chemischer Methoden Informationen über die Molekularstruktur zu erhalten.

Zunächst mussten die in der Probe in grosser Menge enthaltenen, kleinen sehr hydrophoben und sehr hydrophilen Substanzen von den Dinukleosidpolyphosphaten getrennt werden. Daher erfolgte eine präparative Chromatographie mit einem Reversed-Phase-Gel als stationärer Phase. Die apolare stationäre Phase der Reversed-Phase-Säule bindet Substanzen aufgrund hydrophober Wechselwirkungen 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 aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zu ermöglichen, wurde als Ionenpaarreagenz Triethylammoniumacetat hinzugegeben. Durch dieses kationische Ionenpaarreagenz werden die anionischen Gruppen des Diguanosinhexaphosphats maskiert, die Moleküle damit unpolarer. Aus Vorversuchen war bekannt, dass Dinukleosidpolyphosphate bei der Wahl eines flachen Elutionsgradienten besonders gut getrennt werden. Die Elution der zu isolierenden Dinukleosidpolyphosphate erfolgte bereits bei der Verwendung eines 20 %-igen Acetonitril-Wassergemisches. Stark polare

Substanzen, wie zum Beispiel Salze und Kohlenhydrate, besitzen die geringste Affinität zur Gelmatrix und eluieren daher im Durchfluss. Dabei ist die Abtrennung von polaren Kohlenhydraten von besonderer Bedeutung, da sie ähnlich den Dinukleosidpolyphosphaten cis-diol-Gruppen besitzen und somit die während der weiteren Aufarbeitung folgenden Affinitätschromatographie mit dem PBA-BioRex-Gel an diesem ebenfalls retentiert würden. Den wahrscheinlich im Vergleich zu den Kohlenhydraten wesentlich geringer konzentrierten Dinukleosidpolyphosphaten würden in Folge nicht genügend Adsorptionsstellen am Gelmaterial zur Verfügung stehen. Somit könnten die Dinukleosidpolyphosphate mit Hilfe der Affinitätschromatographie nicht effektiv von den in der Probe enthaltenen Kohlenhydraten getrennt werden.

Vor dem nächsten Aufarbeitungsschritt, der Grössenausschluss-Chromatographie, wurde die Probe bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und lyophilisiert, um das bei der präparativen Reversed-Phase-Chromatographie verwendete Ionpaarreaganz Triethylammoniumacetat und das Lösungsmittel Acetonitril sowie Wasser durch Sublimation zu entfernen.

Um die in der Probe enthaltenen Substanzen nach ihrer Molekülgrösse aufzutrennen, erfolgte eine Gelfiltration. Das poröse Grössenaustauschgel der verwendeten S100-Trennsäule besteht aus einem kreuzvernetzten Copolymer des Allyl-Dextrans und N,N'-Methylen-Bisacrylamid mit einem Trennbereich von 1 bis 100 kDa. Es zeichnet sich durch eine hohe mechanische Stabilität aus und verschafft hierdurch reproduzierbare Ergebnisse. Die Grössenausschlusschromatographie trennt das Substanzgemisch nach Molekülgrösse. Da kleinere Moleküle tiefer in die poröse Gelmatrix hinein diffundieren können und somit eine längere Zeitdauer zur Passage des chromatographischen Systems benötigen als grössere Moleküle, erfolgt die Elution nach abnehmender Molekülgrösse. Weil Dinukleosidpolyphosphate sehr kleine Moleküle sind, würde man eine Elution zu Beginn des Elutionsvorganges erwarten. Da jedoch bei der Grössenausschlusschromatographie auch Abstossungskräfte aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen wirksam sind, diffundieren Dinukleosidpolyphosphate nicht so tief in die Gelmatrix hinein und eluieren bereits zu Anfang des Elutionsvorganges [90].

Das Dinukleosidpolyphosphate enthaltende Eluat der Grössenausschlusschromatographie wurde im Anschluss einer Affinitätschromatographie zugeführt. Ziel der Affinitätschromatographie war

es, zum einen Mononukleotide von der Probe abzutrennen und zum anderen Dinukleosidpolyphosphate zu konzentrieren.

Als Säulenmaterial kam ein PBA-BioRex-Gel zur Anwendung, das auf dem Kationenaustauscher Bio-Rex-70-Gel basiert, das mit m-Aminophenylboronsäure derivatisiert worden war. Die an das Gel angelagerte m-Aminophenylboronsäure bindet selektiv Moleküle, die zwei OH-Gruppen in sterisch günstiger Anordnung zueinander enthalten (1,2- oder 1,3-Diole), wobei sich vor allem cis-ständige diol-Gruppen für kovalente Bindungen eignen. Dinukleosidpolyphosphate besitzen zwei Ribosen, die je eine cis-ständige diol-Gruppe enthalten. Zugleich erfolgt die Verknüpfung der Dinukleosidpolyphosphate über Phosphatgruppen, die einen starken anionischen Charakter haben. Die zwei cis-ständigen diol-Gruppen der Ribosen und die Phenylboronsäure üben aufeinander eine Anziehungskraft aus. Dieser Anziehungskraft wirkt die elektrostatische Abstossungskraft des negativ geladenen Kationenaustauschers und den ebenfalls negativ geladenen Phosphatgruppen der Dinukleosidpolyphosphate entgegen.

Diese Abstossungskräfte wurden durch die Zugabe des Ammoniumacetat-Puffers teilweise kompensiert. Da Mononukleotide nur eine cis-ständige diol-Gruppe besitzen reicht diese Kompensation nicht zur Bindung von Mononukleotiden an die Phenylboronsäure aus. Enthalten Substanzen zwei cis-ständige diol-Gruppen gehen beide cis-diol Gruppen eine Bindung mit der Phenylboronsäure ein. Der abstossende Effekt des Kationenaustauschers wird dadurch kompensiert. Darüberhinaus kann der abstossende Effekt des Kationenaustauschers durch die Ionenstärke des eingesetzten Puffers, den chromatographischen Bedingungen angepasst werden. Für Substanzen, die zwei cis-ständige diol-Gruppen enthalten, übersteigt das Bindungsvermögen der Phenylboronsäure zusammen mit der Kompensation der elektrostatischen Abstossungskräfte durch den Ammoniumacetat-Puffers die elektrostatische Abstossungskraft des Kationenaustauschers. Dinukleosidpolyphosphate werden selektiv an die Säule gebunden und eine Trennung der Mononukleotide von Dinukleosidpolyphosphaten mit zwei cis-ständigen diol-Gruppen ermöglicht [91].

Die Bindung zwischen m-Aminophenylboronsäure und cis-ständigen diol-Gruppen erfolgt pH-abhängig. Bei einem pH-Wert von 9,5 werden keine Bindungen mehr eingegangen beziehungsweise die bestehenden Bindungen hydrolysiert. Bei der Elution der an die Säule gebundenen Substanzen wurden diese Eigenschaften genutzt. Durch den Einsatz von HCl anstatt von Ammo-

niumacetat sank die Ionenstärke des Eluenten. Hierdurch wurden die elektrostatischen Abstosungskräfte des Kationenaustauschers nicht mehr kompensiert. Da Mononukleotide nur eine cis-diol-Gruppe besitzen und daher nicht ans Gelmaterial binden, eluierten sie vor den Dinukleosidpolyphosphaten. Als Eluent wurde eine HCl-Lösung verwendet, wodurch der pH-Wert im chromatographischen System gesenkt wurde und die Bindungen zwischen m-Aminophenylboronsäure und den cis-ständigen diol-Gruppen hydrolytisch gespalten wurden.

Die nach der Trennung im Eluat vorhandenen Puffersalze wurden mittels einer Reversed-Phase-Chromatographie entfernt. Zur Auswahl der Dimensionen der Trennsäule für die folgende Reversed-Phase-Displacement-Chromatographie erfolgte eine photometrische Bestimmung der Nukleosidpolyphosphat-Konzentration beziehungsweise Menge der Probe. Dazu wurde die UV-Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 254 nm bestimmt und die Konzentration anhand einer Referenzkurve ermittelt. Als Referenzsubstanz diente ATP, von dem bekannt ist, dass es ebenso wie Dinukleosidpolyphosphate bei einer Wellenlänge von 254 nm sein UV-Absorptionsmaximum zeigt.

Bei der Reversed-Phase-Displacement-Chromatographie ist eine effiziente Fraktionierung möglich, wenn die Adsorptionskapazität der Oberfläche des Säulenmaterials zu 80 % von Probensubstanzen genutzt wird [92]. Im Vergleich zur herkömmlichen Elutionschromatographie ermöglicht die Reversed-Phase-Displacement-Chromatographie die Fraktionierung von bis zu 10-fach höheren Probenmengen bei gleichen Säulendimensionen und ermöglicht somit eine kostengünstige und effektive Aufreinigung.

Als stationäre Phase wurde ein mit C18-Ketten modifiziertes Silicagel verwendet. Die Modifikation mit C18-Ketten soll die Ausbildung irreversibler Proteinbindungen verhindern [93]. Als Displacer-Lösung diente Butanol, da dieser Alkohol eine höhere Affinität zu den adsorptiven Bindungszentren der stationären Phase als die identifizierenden Dinukleosidpolyphosphate hat und sie von der Säule verdrängt. Während der Trennung bildet sich entlang der Säule ein Displacement-Train aus. Der Displacement-Train besteht aus einzelnen Banden, in denen die Probensubstanzen in hoher Reinheit und Konzentration vorliegen. Die Banden eluieren in der Reihenfolge ihrer Ausbildung und stellen sich im Chromatogramm als stufenartige UV-Absorptionspeaks dar.

Die folgende Anionenaustausch-Chromatographie diente zur Trennung der anionischen Dinukleosidpolyphosphate nach der Zahl der sie verbindenden Phosphatgruppen. Die Ausprägung ihrer anionischen Eigenschaften begründet eine unterschiedliche Affinität zum Anionenaustauscher. Dinukleosidpolyphosphate sind umso anionischer, je grösser die Zahl der enthaltenen negativen Phosphatgruppen ist. Als stationäre Phase diente eine Polymermatrix mit kovalent gebundenen kationischen Gruppen. Bei diesen kationischen Gruppen handelte es sich um quartäre Amine, welche aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen anionische Probenbestandteile binden. Als mobile Phase wurde eine stark anionische wässrige 20 mM K_2HPO_4 mit 1 M NaCl – Lösung verwendet, deren anionischer Charakter stärker als der sämtlicher Probenbestandteile ist. Die Elution der gebundenen Probensubstanzen erfolgte im Gradientenmodus. Es eluierten zunächst bei geringer Anionenkonzentration relativ schwach gebundene Substanzen. Bei Steigerung der Anionenkonzentration erfolgt die Elution immer stärker gebundener Probenbestandteile.

Die Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie wurden im nächsten Chromatographieschritt mit Hilfe einer Reversed-Phase-Chromatographie entsalzt, da die in der Probe enthaltenen Salze die folgenden massenspektrometrischen Untersuchungen negativ beeinflussen würden. Durch Anlagerung von Kationen an das Diguanosinhexaphosphat kommt es zu einer Vergrößerung des Molekulargewicht und damit resultierend zu einer geringeren Signalintensität des Massensignals.

Die Identifizierung des Diguanosinhexaphosphats erfolgte mittels Massenbestimmung mit der Matrix-unterstützten Laser-Desorptions-/ Ionisations-Massenspektrometrie der zugehörigen Fraktionen, des in Abbildung 9 mit einem Pfeil markierten UV-Absorptionspeaks. Dabei konnten zwei Massensignale bei einem m/z-Werte von 1029 Dalton und bei 1068 Dalton detektiert werden. Die Massenzahl von 1029 Dalton konnte anhand von Referenzspektren dem Diguanosinhexaphosphat zugeordnet werden. Das Massensignal bei 1068 Dalton ist durch die Anlagerung des ubiquitär vorkommenden Kaliums (MW 39 Dalton) an Diguanosinhexaphosphat bedingt.

Theoretisch kann eine Massenzahl von 1029 Dalton unterschiedlichen Substanzen zugeordnet werden, so dass die Massenzahl allein es nicht erlaubt, die Molekularstruktur der Substanz zu bestimmen. Die Bestimmung der Massenzahlen der einzelnen Fragmente eines Moleküls erlaubt

eine genauere Zuordnung zur Ursprungssubstanz. Fragmentspektren werden mit der Post-Source-Decay Matrix-unterstützten Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie aufgezeichnet. Bei der Matrix-unterstützten Laser-Desorptions-/ Ionisations-Massenspektrometrie wird ein grosser Teil der desorbierten Analytionen während des Fluges zum Analysator fragmentiert. Bei der Fragmentierung der Moleküle bleibt die Struktur der Untereinheiten erhalten und kann detektiert werden [94].

Die Sequenzierung der isolierten Substanz mit der Masse 1029 Dalton ergab Massensignale, denen Fragmente von Diguanosinhexaphosphat zugeordnet werden konnten. Diese Zuordnung ist in Tabelle 4 dargestellt. Diese Fragmente konnten ebenfalls in Referenzspektren authentischer Substanzen detektiert werden. Die Zuordnung der detektierten Massenzahlen der Untereinheiten der Ursprungssubstanz lieferte somit einen weiteren Beleg, dass es sich bei der isolierten Substanz um Diguanosinhexaphosphat handelt.

Nachdem die Untereinheiten bekannt waren, wurde mit Hilfe enzymatischer Spaltversuche noch ermittelt, wie diese miteinander verknüpft sind. Es wurde ein Aliquot der isolierten Substanz nativ chromatographiert und drei weitere Aliquots jeweils nach Inkubation mit einer 5'-, einer 3'-Phosphodiesterase und einer alkalischen Phosphatase chromatographiert. Das Chromatogramm nach Inkubation mit 5'-Phosphodiesterase zeigte eine Spaltungsreaktion. Die Spaltprodukte konnten anhand eines Retentionszeitvergleiches mit authentischen Substanzen als Guanosinmonophosphat und Guanosinpentaphosphat identifiziert werden. Die Chromatogramme nach Inkubation mit 3'-Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase zeigten keine Spaltungsreaktion.

Zur Identifizierung der Bindung der Phosphatgruppen an das Guanosin innerhalb des Moleküls wurde die Substanz, bei der es sich nach den Ergebnissen der massenspektrometrischen Untersuchungen sehr wahrscheinlich um Diguanosinhexaphosphat handelte, mit einer 5'-, einer 3'-Phosphodiesterase und einer alkalischer Phosphatase inkubiert. Anschliessend wurde jeweils eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt, um die Spaltungsreaktionen darzustellen. Die 5'-Phosphodiesterase spaltet Substanzen, die eine 5'-Phosphodiesterbindung aufweisen, 3'-Phosphodiesterase spaltet Substanzen mit einer 3'-Phosphodiesterbindung, und die alkalische Phosphatase hydrolysiert terminale Phosphatgruppen. Die beiden Guanosingruppen des Gp₆G sind über 5'-Positionen der Ribosen miteinander verknüpft. Diese 5'-Phosphodiesterbindungen

würden durch eine 5'-Phosphodiesterase gespalten werden. Da das Diguanosinhexaphosphat weder Phosphoesterbindungen in 3'-Position noch terminale Phosphatgruppen enthält, würden durch 3'-Phosphodiesterase und alkalische Phosphatase keine Spaltungsreaktion erfolgen.

Die Ergebnisse der enzymatischen Spaltungsversuche zeigen, dass es sich bei der isolierten Substanz um ein Molekül handelt, das zwei Guanosingruppen enthält, die über 5'-Phosphodiesterbindungen an den Ribosen verknüpft sind. Gemeinsam mit den massenspektrometrischen Untersuchungen bestätigen diese Ergebnisse die Annahme, dass es sich bei der isolierten Substanz um Diguanosinhexaphosphat handelt. Somit konnte mit dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit erarbeiteten Aufarbeitungsschema erstmals Diguanosinhexaphosphat aus Nebennierengewebe nachgewiesen werden. Die Abbildung 16 zeigt die molekulare Struktur von Diguanosinhexaphosphat.

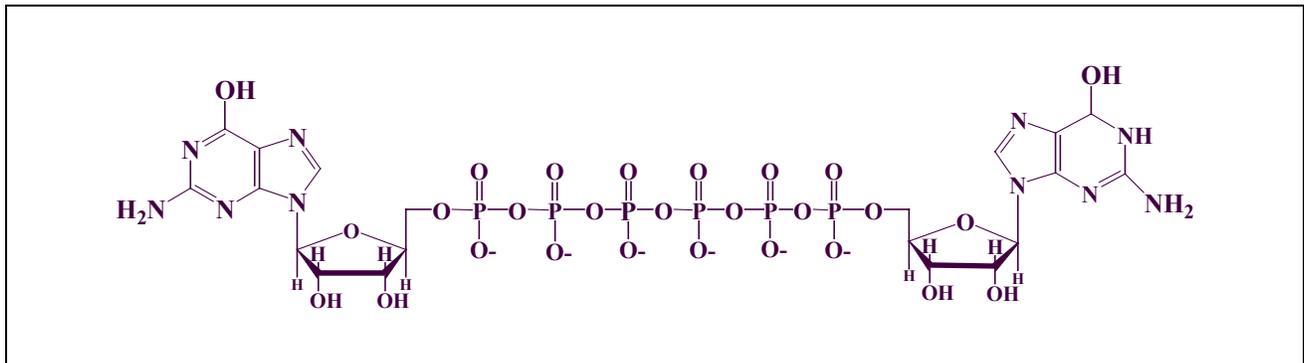


Abbildung 16: Molekulare Struktur von Diguanosinhexaphosphat

Die Wirkung extrazellulärer Dinukleosidpolyphosphate wird durch die P2-Rezeptorfamilie vermittelt. Es werden bei der Mononukleotid P2-Rezeptorfamilie zwei Subtypen unterschieden. Die ionotropen P2X-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle und die metabotropen P2Y-Rezeptoren sind ligandengesteuerte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren [95]. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Mitglieder jeder Unterfamilie deutlich auf Diadenosinpolyphosphate reagieren [96-99].

P2X ligandengesteuerte Ionenkanäle werden durch Adenosintriphosphat und sehr wenige andere natürlich vorkommende Substanzen aktiviert [100]. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass Diadenosinpolyphosphate an vielen P2X-Rezeptor-Subtypen eine vergleichbare Potenz wie Adenosintriphosphat zeigen. Zudem wurden bereits fünf verschiedene P2Y-Rezeptor-Subtypen (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11) aus humanen cDNA-Bibliotheken isoliert [101].

Diese P2Y-Rezeptor-Subtypen zeigen eine grosse Variabilität ihres pharmakologischen Profils. Sie werden durch Purinnukleotide (Adenin, Guanin, Inosin) oder Pyrimidinnukleotide (Uridin) [100] aktiviert. Einige P2Y-Rezeptor-Subtypen zeigen eine besonders ausgeprägte Affinität zu Nukleosiddiphosphaten (P2Y1 und P2Y6) andere zu Nukleosidtriphosphaten (P2Y2, P2Y4 und P2Y11). Vor dem Hintergrund dieser grossen Variabilität der Substratspezifität ist es bemerkenswert, dass Diadenosinpolyphosphate eine pharmakologische Aktivität an diesen metabotropen Rezeptoren entfalten.

Einige Widersprüche der von den Dinukleosidpolyphosphaten und durch Mononukleotide bedingten zellulären Effekten, die durch purinerge Rezeptoren vermittelt werden, führten zu der Hypothese von der Existenz unbekannter Subtypen von Rezeptoren, die durch Dinukleosidpolyphosphate stimuliert werden. Diese werden durch Mononukleotide entweder stimuliert (P2D) oder nicht stimuliert (P4) [89, 102, 103]. Die Klassifikation der P2D-Rezeptoren entstand durch Bindungsstudien von mit Radioisotopen markierten Substanzen. Dabei zeigten Dinukleosidpolyphosphate und P2-Rezeptoragonisten pharmakologische Profile, die keinem bekannten P2-Rezeptor-Subtyp zugeordnet werden konnten [47, 104]. Bisher gibt es keine bekannten klonierten Rezeptoren, die dem pharmakologischen Profil des P2D-Rezeptors entsprechen. Die Mechanismen der Signaltransduktion sind nur durch funktionelle Studien untersucht worden. Basierend auf Untersuchungen an chromaffinen Zellen, welche eine Ca^{2+} -Mobilisierung aus intrazellulären Speichern [89] sowie eine Aktivierung der Proteinkinase C zeigen [102], wird angenommen, dass P2D-Rezeptoren zur Familie der metabotrop vermittelten Rezeptoren zählen [104]. Sowohl chromaffine Zellen als auch Synaptosomen im Gehirn exprimieren Rezeptoren mit hoher Affinität zu Dinukleosidpolyphosphaten [47, 104].

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Diguanosinhexaphosphat in der Nebenniere gespeichert wird. Frühere Untersuchungen zeigten neben ihrer Struktur den Effekt auf die Proliferation von glatten

Gefäßmuskelzellen. Die Nebenniere enthält neben Diadenosinpolyphosphaten auch Diguanosinpolyphosphate. Da die Diguanosinpolyphosphate in der Nebenniere gefunden wurden, kann man davon ausgehen, dass sie nicht nur lokale sondern auch systemische Wirkungen entfalten. Zusammenfassend ist durch den Nachweis von Diguanosinhexaphosphat ein deutlicher Hinweis dafür gefunden, dass es in der Nebenniere gespeichert wird und möglicherweise von dort in den Körperkreislauf sezerniert wird.