

5. Diskussion

Die essentielle Hypertonie wird durch eine Reihe noch nicht ausreichend geklärter Regelmechanismen beeinflusst. Einen hohen Stellenwert scheinen humorale vasoaktive Substanzen wie die Diadenosinpolyphosphate zu haben, die in der Vergangenheit aus verschiedenen Organen isoliert werden konnten (Schlüter et al., 1994 und 1996; Luo et al., 1999; Jankowski et al., 2001). Flodgaard und Klenow entdeckten 1982 Diadenosintetraphosphat (Ap₄A) in menschlichen Thrombozyten. Lüthje und Olgivie 1983 wiesen Diadenosintriphosphat (Ap₃A) ebenfalls in menschlichen Thrombozyten nach. 1994 wurden unbekannte, vasoaktiv wirkende Substanzen in menschlichen Thrombozyten von Schlüter als Diadenosinpentaphosphat (Ap₅A) und Diadenosinhexaphosphat (Ap₆A) identifiziert (Schlüter et al., 1994). Rodriguez del Castillo (1988) und Pintor (1992) berichteten über das Vorkommen von Ap₄A, Ap₅A und Ap₆A in chromaffinen Granula von bovinem Nebennierenmark. Die Beschreibung von Ap₄A und Ap₅A in den Synaptosomen des Mittelhirns (1992) und des Putamens (1993) von Ratten geht auf Pintor et al. zurück. Im Neostriatum von Ratten sind Ap₄A und Ap₅A zusammen mit ATP gespeichert und werden Ca²⁺-abhängig sezerniert (Pintor et al., 1995). Bei Untersuchungen an Herzgewebe wurden, im Gegensatz zu der Vielfalt der Diadenosinpolyphosphate in Thrombozyten, nur Ap₂A und Ap₃A identifiziert (Luo et al., 1999). Dies lässt auf eine gewebsspezifische Speicherung der Diadenosinpolyphosphate schließen.

Der Niere wird in der Entstehung der Hypertonie eine wichtige Bedeutung zugeschrieben (Kurokawa, 1996; Schmieder et al., 1997; Sanada et al., 1999). Ein Zusammenhang besteht möglicherweise darin, dass vasoaktive Dinukleotide in der Niere produziert werden. Zur Untersuchung dieses Zusammenhanges war die Isolierung von Diadenosinhexaphosphat aus Schweinenierengewebe Ziel der vorliegenden Arbeit. Das Diadenosinhexaphosphat könnte in diesem Fall durch endokrin-systemische oder lokal-parakrine Effekte zur Entwicklung der essentiellen Hypertonie beitragen.

Die Ergebnisse der Trennungsschritte werden nach der in der Abbildung 3 gezeigten Reihenfolge diskutiert.

Das gewählte Verfahren zu mechanischen Desintegration beruht auf der von Wheelock (Wheelock, 1991) vorgeschlagenen Methode. Eine derartige Vorgehensweise gewährleistete eine schonende Freisetzung der Substanz aus dem Gewebe und eine rasche Inaktivierung potentiell abbauender Enzyme. Unmittelbar nach Tod des Schweines wurde

grob zerkleinertes Nierengewebe tiefgefroren, um Zersetzungsreaktionen zu vermeiden. Nach Lyophilisation wird der Trockenrückstand unter Eiskühlung pulverisiert.

Die Entfernung von Proteinen wurde durch Zugabe von Perchlorsäure erreicht. Die anschließende Neutralisierung mit Kalilauge führt zur Ausfällung von Perchloraten als KClO_4 . Diese wurden durch Zentrifugieren und Abdekantieren des Überstandes entfernt. Die größtenteils aus den Zellmembranen stammenden Lipide wurden verseift und so in eine wasserlösliche Form gebracht.

Die Adenosinhexaphosphat (Ap_6A) besitzt hydrophile Anteile. Daher wurde eine präparative Reversed-Phase Säule zur Abtrennung wenig polarer Stoffe (insbesondere Lipide) und stark polarer Stoffe (z.B. Kohlenhydrate) verwendet. Sie adsorbiert die Probenmoleküle aufgrund hydrophober Wechselwirkungen. Mit Hilfe des Ionenpaarreagens Triethylammoniumacetat (TEAA) konnten die anionischen Anteile der Nukleotide maskiert werden, so dass die Anbindung der gesuchten hydrophilen Substanzen an die unpolare Säule gelang. Die Nukleotide konnten mit 30%igem Acetonitril (ACN) in Wasser eluiert werden, während sehr unpolare Stoffe stärker an die Säule binden und erst bei höheren ACN/ H_2O -Konzentrationen eluiert wurden. Auch stark polare Substanzen wurden auf diesem Weg abgetrennt. Sie durchlaufen die Säule ohne Retention durch die Gelmatrix. Bei Lyophilisieren des Eluats der präparativen Reversed-Phase-Chromatographie konnten Lösungsmittel, die beim nächsten Chromatographieschritt einen massiven Störfaktor dargestellt hätten, durch Sublimation entfernt werden.

Nach der Konzentration der Nukleotide wurde aufgrund der Molekülgröße fraktioniert mittels der Größenausschluß-Chromatographie. Das poröse Gel der hier verwendeten S-100-Trennsäule besteht aus Sepharose, einem mit Acrylamid quervernetzten Dextranpolymer mit einem Trennbereich von 1 bis 100 kDa. Es zeichnet sich durch eine hohe mechanische Stabilität aus und gibt dadurch reproduzierbare Resultate.

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass ein Teil der Diadenosinpolyphosphate in der Probe wahrscheinlich nicht in freier Form vorliegt, sondern an Proteine gebunden ist, die sich auch nach Fällung und Zentrifugation noch in der Probe befindet. Aus diesem Grund wurde ATP zur Probe hinzugegeben. ATP soll mit den Diadenosinpolyphosphaten um die Proteinbindung konkurrieren. Durch den ATP-Überschuss sollten die Adenosinpolyphosphate aus der Proteinbindung verdrängt werden. EDTA komplexiert Calcium-Ionen, die bei vielen enzymatischen Reaktionen als Cofaktor benötigt werden. Durch Komplexierung der Calcium-Ionen mittels EDTA sollten die calciumabhängigen Enzyme

inaktiviert und dadurch enzymatische Abbaureaktionen minimiert werden. Der Probe wurde zusätzlich EDTA zugegeben.

Die Größenausschluß-Chromatographie fraktioniert das Gemisch nach Molekülgröße der einzelnen Substanzen. Die Elution erfolgt nach abnehmender Molekülgröße, da kleine Substanzen tiefer in die poröse Gelmatrix wandern und somit eine längere Zeitdauer zur Passage des chromatographischen Gels benötigen. Neben diesem Trennmechanismus nehmen auch noch andere Faktoren Einfluss auf die Elution der Moleküle. Dazu gehören Ionenausschlussmechanismus, Ionenaustausch, hydrophobe Wechselwirkungen und p - π -Wechselwirkungen. Ionenausschlussmechanismen sind beteiligt durch die Oberfläche des Gels, welches negative Ladungen trägt. Negativ geladene Probenmoleküle werden von der Oberfläche des Gels abgestoßen und können daher nicht in die Poren eindringen. Diese Moleküle erfahren eine Repulsion und eluieren früher. Sind die Probenmoleküle positiv geladen, werden sie verstärkt an die Oberfläche des Gels durch Ionenaustauschkraft gebunden. Dies führt zu einem verzögerten Transport der positiv geladenen Probenmoleküle durch die Säule und zu einer verlängerten Retentionszeit. Diese beiden Mechanismen lassen sich durch Zugabe von 0,3-0,5 M Puffer ausschalten. Die Änderung des pH-Wertes in der mobilen Phase reduziert die Ladungen der Probenmoleküle und der Säule und verhindert Ionenausschluss und Ionenaustausch (Dolan, 1990).

Zur Trennung der Dinukleosidpolyphosphate von den Mononukleosidpolyphosphaten wurde die Affinitäts-Chromatographie mit einer PBA-Säule durchgeführt. Phenylboronsäuregele sind in der Lage, sterisch günstig stehende OH-Gruppen, wie sie in 1,2- oder 1,3-Diolen vorkommen, an sich zu binden.

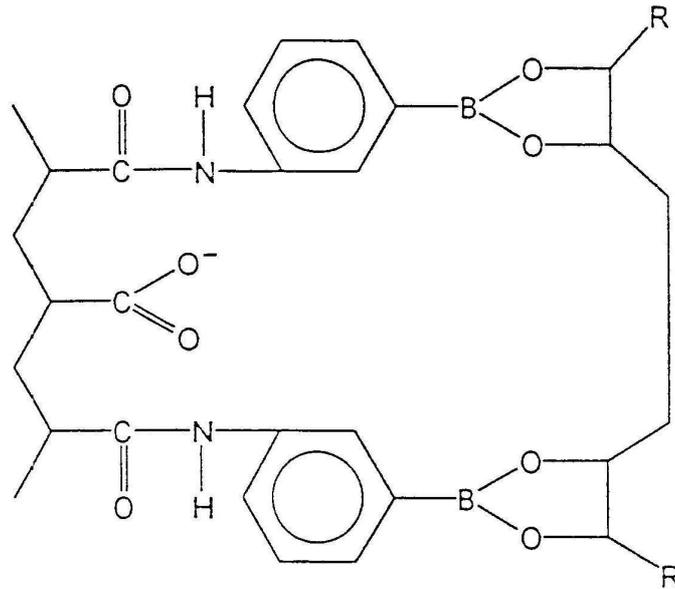


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Bindung eines Moleküls mit zwei cis-Diolgruppen an das PBA-Gel

Nukleotidgruppen werden von den negativ geladenen, alkalischen Austauschergruppen des Kationenaustauschers elektrostatisch abgestoßen. Dieses wird durch die Verwendung von Ammoniumacetatpuffer kompensiert. Der Kompensationsmechanismus reicht jedoch nicht aus, um Mononukleotide an die Phenylboronsäure zu binden. Enthält die Substanz 2-cis-Diol-Gruppen, so kann sie an das PBA-BioRex-Gel binden, da dann die Bindungskraft der Phenylboronsäure größer als die Abstoßungskraft des Kationenaustauschers ist.

Die Bindungscharakteristik der Phenylboronsäure steht in Abhängigkeit zum pH-Wert. Bei einem pH-Wert unter 9,5 tritt eine hydrolytische Spaltung der cis-Diol-Gruppen ein und es wird keine Bindung eingegangen. Dieses wurde bei der Elution der gebundenen Substanzen ausgenutzt, die Elutionslösung bestand aus einer 10 mM HCL-Lösung. Die Senkung des pH-Wertes führte zu einer hydrolytischen Spaltung der Bindungen zwischen cis-Diol-Gruppen und Phenylboronsäure. Durch die niedrigere Salzkonzentration konnten die Abstoßungskräfte durch den Puffer wieder verstärkt zum Tragen kommen. Aufgrund dieser beiden Mechanismen eluieren die gebundenen Substanzen wieder.

Der Nachweis des Adenosinhexaphosphats (Ap_6A) lieferten die Charakterisierungsschritte: die MALDI-Massenspektroskopie detektierte einen Peak mit der Masse 997 Da (Abb. 9, 10), der Retentionszeitvergleich eluierte die Substanz zum gleichen Zeitpunkt wie in den

Vorversuchen (Abb.13, 14), das UV-Spektrum wies auf ein Adenosinderivat (Abb. 15, 16, 17) und die PSD-MALDI-MS lieferte ein Fragmentspektrum ähnlich dem Vorversuche (Abb.11).

Als nächster Isolierungsschritt wurde eine Displacement-Chromatographie durchgeführt (Abb. 6). Bei der Displacement-Chromatographie werden Probenmoleküle, die auf der stationären Phase gebunden sind, durch eine Substanz (Displacer) mit einer höheren Affinität zum Säulengel von ihren Bindungsstellen verdrängt. Dabei werden die Komponenten während der Displacement-Chromatographie nicht wie bei der Elutionschromatographie verdünnt, sondern konzentriert. Als stationäre Phase wurde ein mit C18-Ketten modifiziertes Silicagel verwendet, das irreversible Proteinbindungen verhindern soll (Regnier, 1987). Als Displacer-Lösung wurde n-Butanol eingesetzt. Dieser Alkohol hat eine höhere Affinität zu den adsorptiven Bindungszentren der stationären Phase als sämtliche Probensubstanzen und verdrängt sie auf diese Weise.

In dem sich dabei ausbildenden Displacementrain eluieren die Probenmoleküle mit zunehmender Affinität zur stationären Phase in Rechteckbanden. Die entstehenden Banden werden durch den kontinuierlich nachfließenden Displacer langsam durch die Säule geschoben. Da die Banden weiterhin der ständigen Konkurrenz der Probenmoleküle untereinander um die Bindungsplätze unterliegen, schärfen sie sich im Laufe des chromatographischen Prozesses. Die Konzentration des Displacers ist abhängig von dem Trennziel. Niedrige Displacerkonzentrationen verbreitern die Produktbanden. Der Gewinn an reinem Produkt ist dementsprechend größer. Eine Verkürzung der Trennzeiten wird mit höheren Konzentrationen erreicht. Die auftrennbare Probenmenge richtet sich nach der Bindungskapazität der Säule. Sie ist bei der Displacement-Chromatographie bei gegebener Säulendimension bis zu zehnmal größer als bei der Elutionschromatographie (Schlüter et al., 1993). Mit Hilfe der Vakuumzentrifuge gelang die Entfernung von TEAA aus der Probe. Das flüchtige Ionenpaarreagenz hätte ansonsten die späteren Messungen beeinträchtigt.

Für die nachfolgende Trennung wurde eine Anionenaustausch-HPLC-Säule verwendet (Abb.7). Die Nukleotide zeigen unterschiedliche Affinitäten zum Anionenaustauschergel. Anionenaustauschergel sind durch positiv geladene Gruppen charakterisiert, die kovalent an einer Polymermatrix gebunden sind. Über diese Gruppen erfolgt die Bindung anionischer Substanzen aus der mobilen Phase durch elektrostatische Wechselwirkungen. Durch Gradientenelution wurden mit steigender Konzentration von Chloridionen in der mobilen Phase die anionischen Substanzen von der stationären Phase verdrängt und eluiert.

Die Reihenfolge der Elution richtet sich dabei nach Anzahl und Stärke der Ladungen. Je niedriger die Elutionszeit, desto geringer die Anzahl bzw. die Stärke der negativen Ladungen. Bei Nukleotiden ist die Anzahl der Phosphatgruppen maßgebend. Die hier zur Chromatographie verwendete Säule ermöglichte außerdem die Trennung aufgrund unterschiedlicher Hydrophobizität. Nukleotide, die die Base Adenin enthalten, eluieren früher als Guanosin-Derivate.

Die Fraktionen der Anionenaustausch-HPLC wurden mittels einer Reversed-Phase-Chromatographie von hydrophilen Nebenbestandteilen getrennt (Abb.8). Die apolare stationäre Phase der Reversed-Phase-Säule bindet Substanzen aufgrund hydrophober Wechselwirkungen umso stärker, je unpolarer sie sind. Damit die polaren Nukleotide an die unpolare stationäre Phase adsorbieren konnten, wurde den Fraktionen das Ionenpaarreagenz Triethylammoniumacetat (TEAA) zugefügt. Die Elution erfolgte durch Verwendung von Acetonitril. Durch Vorversuche mit einem Gemisch von Ap₂A-Ap₆A konnte festgestellt werden, dass die Diadensinpolyphosphate bei Wahl eines flachen Elutionsgradienten mit höher Auflösung aufgetrennt werden konnten. Die Massenbestimmung aller Fraktionen der vorangegangenen analytischen RP-Chromatographie (Abb.8) sollte Aufschluss darüber geben, dass Diadenosinhexaphosphat (Ap₆A) in den Proben zu finden ist. Zur Identifizierung der Nukleotide wurden die einzelnen Fraktionen mit der Matrix-unterstützten-Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie untersucht. Die untersuchten Fraktionen enthielten Substanzen der Masse 997 Da. Dabei handelt es sich um die Masse des Diadenosinhexaphosphats Ap₆A. Die weiteren Peaks in den Massenspektren sind durch Desorption von Matrixmolekülen bedingt.

Vorteil dieses Verfahrens ist neben der niedrigen Nachweisgrenze die Schnelligkeit des Verfahrens. Geringste Probenmengen mit Konzentrationen von 10⁻⁵-10⁻⁶ mol/l können mit dieser Methode analysiert werden (Hillenkamp und Karas, 1990).

Um weiteren Aufschluss über die Struktur der Substanz zu bekommen, wurde mittels PSD-MALDI-MS Fragmentspektrum erstellt (Abb.11). Während der MALDI-MS zerfällt ein Teil der Moleküle während des Fluges durch die feldfreie Driftstrecke in Untereinheiten. Diese Fragmentationen haben die gleiche Geschwindigkeit wie das Ursprungmolekül und erreichen den Reflektor zur gleichen Zeit, jedoch mit unterschiedlicher, d.h. geringerer kinetischer Energie. Die Fragmente dringen nicht so weit in das Verzögerungsfeld ein und werden früher reflektiert und erreichen zeitlich eher den Detektor. Die Sequenzierung der isolierten Substanzen mit der Masse 997 Da ergab Signale, denen Fragmente den

Diadenosinpolyphosphaten zugeordnet werden können (Tabelle 6). In Referenzspektren authentischer Substanzen wurden diese Fragmente ebenfalls detektiert. Dieser Analyseschritt bestätigte die Annahme, dass es sich bei den isolierten Substanzen um Diadenosinpolyphosphate handeln könnte.

Ausschließlich die in den massenspektrometrischen Untersuchungen (Abb. 9, 10) ermittelten Fraktionen mit Nukleotiden von etwa 997 Da wurden zur weiteren Isolierung und Identifizierung ausgewählt. Der anschließend durchgeführte Aufreinigungsschritt sollte den Bereich der zu untersuchenden Fraktionen eingrenzen. Daher wurden diejenigen Fraktionen, die Nukleotide mit dem Molekulargewicht 997 Da enthielten, einer RP-HPLC unterzogen (Abb.8).

Die gewählte Säule zeichnet sich durch besonders große Poren (6.000-8.000 Angstrom) in den Partikeln des Füllmaterials aus. Bei ausreichend hoher Fließgeschwindigkeit wandern die zu trennenden Substanzen mit der mobilen Phase durch die Partikel hindurch, statt von außen in diese hinein. Im Gegensatz zu herkömmlichen Säulen kann dadurch mit erheblich höheren Flussraten gearbeitet werden, ohne dass eine Reduzierung der Auflösung bei der Trennung in Kauf genommen werden muss. Proben und Eluent wurden vor der Trennung mit Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAHSO₄) versetzt. Das kationische Ionenpaarreagenz ermöglicht die Adsorption von Nukleotiden an die Säule durch Maskierung anionischer Bestandteile.

Bei dem Vergleich der Retention eluierte die Substanz zwischen den Retentionszeiten von Ap₅A und Ap₆A. Der Retentionszeitenvergleich mit Hilfe der Reversed-Phase-Chromatographie (Abb.13, 14) zeigte im Vergleich mit dem Gemisch von den bekannten Dinukleotiden, dass die Retentionszeit der Substanz mit der Molmasse 997 Da übereinstimmt.

Bei den bekannten Diadenosinpolyphosphaten lassen sich zwei verschiedene Verknüpfungen der Phosphate an der Ribose unterscheiden. Einerseits können Phosphate an der 5'-Position, andererseits auch an der 3'-Position gebunden werden. Eine Unterscheidung dieser beiden isomeren Moleküle durch die MALDI-Massenspektrometrie ist nicht möglich, da in beiden Fällen die gleiche molekulare Masse erhalten wird. Mit Hilfe des Retentionszeitenvergleiches auf einer Reversed-Phase-Säule gelingt ebenfalls die Unterscheidung nicht, da trotz verschiedener Geometrie die Polaritäten der beiden Moleküle sehr ähnlich sind. Deshalb wurden enzymatische Spaltungsversuche mit 5'-

Nukleotidase, 3'-Nukleotidase und alkalischer Phosphatase durchgeführt. 5'-Nukleotidase spaltet Dinukleosidpolyphosphate, die eine 5'-Phosphoesterbindung aufweisen, 3'-Nukleotidase spaltet Moleküle mit einer 3'-Phosphoesterbindung, während die alkalische Phosphatase terminale Phosphoester hydrolysiert. Falls es sich bei den untersuchten Substanzen um 5',5'-Diadenosinpolyphosphate handelt, werden die 5'-Phosphoesterbindungen durch die 5'-Nukleotidase gespalten.

Ein Aliquot der isolierten Substanz wurde über eine Anionenaustauschsäule chromatographiert, weitere Aliquots mit Enzymen inkubiert und anschließend chromatographiert. Die Substanz wurde durch 3'-Nukleotidase und alkalische Phosphatase nicht gespalten, die Inkubation mit 5'-Nukleotidase ergab eine Spaltungsreaktion. Die enzymatischen Spaltungsversuche zeigen, dass die Substanz je zwei Adenosingruppen enthält, die über sechs Phosphatgruppen in 5'-Position an der Ribose gebunden sind. Durch diese Ergebnisse kann die Annahme bestätigt werden, dass es sich bei der untersuchten Substanz um die Diadenosinhexaphosphat Ap_6A handelt, das erstmalig aus Nierengewebe isoliert werden konnte.

Der Metabolismus der Diadenosinpolyphosphate ist bisher nur unzureichend geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass Ap_3A und Ap_4A in menschlichem Plasma von Hydrolasen gespalten werden. Die direkten Abbauprodukte sind AMP und ADP bei Ap_3A und ATP und AMP bei Ap_4A (Lüthje und Ogilvie, 1985). Die hydrolysierenden Enzyme sind unter anderem auch in den Endothelzellen der Aorta und in Mesangialzellen der Niere zu finden (Schulze-Lohoff et al., 1995). Verglichen mit den Mononukleotiden verläuft der Abbau der Diadenosinpolyphosphate im Plasma relativ langsam. Die Abbauprodukte von Ap_3A und Ap_4A werden schneller weiter zu Adenosin abgebaut (Ogilvie et al., 1989). Der Abbauweg von Ap_6A ist bisher noch nicht beschrieben worden.

Diadenosinpolyphosphate sind Regulatoren des Gefäßtonus (Schlüter et al., 1994). Es können sowohl Vasokonstriktionen als auch Vasodilatationen ausgelöst werden. Die jeweilige Wirkung hängt von der Anzahl der Phosphatgruppen im Molekül, vom Gefäßtyp und von den aktivierten Purinozeptoren ab (Ralev et al., 1995).

Diadenosinpolyphosphate mit drei oder weniger Phosphatgruppen (Ap_2A , Ap_3A) wirken gefäßerweiternd und Diadenosinpolyphosphate mit fünf oder mehr Phosphatgruppen (Ap_5A , Ap_6A) gefäßverengend.

Vahlensiek beschrieb im Jahr 1996, dass das Diadenosinhexaphosphat (Ap_6A) an isolierten, spontan schlagenden rechten Vorhöfen von Meerschweinchen negativ chronotrop wirkt. Die Frequenz wurde um 35% gesenkt. Eine um maximal 23%

verminderte Kontraktionskraft konnte an isolierten, spontan schlagenden linken Vorhöfen von Meerschweinchen nach Inkubation mit Ap_6A beobachtet werden. Ebenso ließ sich eine negativ inotrope Wirkung von Ap_6A an Ventrikelpräparationen, deren Kontraktionskraft durch Isoprenalin gesteigert worden war, feststellen. Alle Wirkungen von Ap_6A konnten durch den A_1 -Antagonisten DPCPX (Dipropylcyclopropyl-Xanthin) aufgehoben werden. Die Annahme, dass die beschriebenen Wirkungen durch Ap_6A verursacht wurden, konnte in Versuchen mit einer Adenosin-Deaminase bestätigt werden (Vahlensiek et al., 1996).

Vasoaktive Wirkungen der Diadenosinpolyphosphate an der Niere (Schlüter et al., 1994) führten zu der Überlegung, dass diese Substanzgruppe auch auf Nierenfunktionen Einfluss nehmen könnte. In diesbezüglichen Experimenten mit Ratten erhöhte Ap_6A sowohl den Urinfluss als auch die renale Na^+ -Ausscheidung. Ap_4A und Ap_5A bewirkten keine Veränderung der untersuchten Parameter. In höheren Konzentrationen hingegen verringerten Ap_3A und Ap_4A den Urinfluss. Die Beobachtung, dass die durch Ap_6A erzielten Effekte nicht mit Suramin (P_2 -Rezeptorantagonist) aufzuheben waren, lässt einen bisher nicht identifizierten purinergen Rezeptor vermuten. Bosentan (ein Endothelin-Rezeptorantagonist) hingegen hob die renalen Wirkungen von Ap_6A auf. Mit Indomethacin vorbehandelte Ratten blieben ebenfalls von Ap_6A unbeeinflusst. Die Vermutung, dass Ap_6A seine Wirkung auf renale Funktionen über Endothelin und natriuretische Prostaglandine ausübt, liegt nahe (Hohage et al., 1996).

Ap_5A und Ap_6A stimulieren die Proteinbiosynthese von Mesangialzellen, die RNA-Synthese wird nur geringfügig beeinflusst. Schulze-Lohoff et al. (1995) beschrieb, dass Ap_3A , Ap_4A , Ap_5A und Ap_6A eine synergistische Wirkung mit Epidermal growth factor (EGF) und Serotonin haben und die Expression des Early growth response Gens (Egr-1) verstärken. Die Wirkung vom Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) erfährt keine Potenzierung. Indessen konnte ein synergistischer Effekt von Ap_5A und Ap_6A auf die Wirkung von Platelet-derived growth factor (PDGF) belegt werden.

Diese Eigenschaften des Adenosinhexaphosphats (Ap_6A) könnten bei der Pathogenese glomerulärer Erkrankungen wie der Glomerulonephritis oder Glomerulosklerose eine Rolle spielen (Heidenreich et al., 1995). Aufgrund der geschilderten Wirkungen von Diadenosinpolyphosphaten wird dieser Substanzklasse bei der Erforschung der Herz-Kreislauf-Regulation immer mehr Beachtung geschenkt. Besonders die vaso-konstringierenden und wachstumsstimulierenden Eigenschaften von Adenosinhexaphosphat (Ap_6A) lassen die Vermutung zu, dass Nukleotide an der Hypertonie-

Entstehung und der Pathogenese der Arteriosklerose beteiligt sind.

Adenosinhexaphosphat (Ap_6A) löst in Mesenterialgefäßen von Ratten eine Vasokonstriktion aus (Ralevic et al., 1995). Neely et al. (1996) wies nach, dass Ap_5A auch an Blutgefäßen der Lunge vasokonstringierend wirkt. Bei Versuchen an isolierter perfundierter Rattenniere zeigte sich, dass die mit Ap_5A erzeugte Gefäßverengung durch die nahezu ausschließliche Bindung an P2X-Rezeptoren zustande kommt, wohingegen dies bei Adenosinhexaphosphat (Ap_6A) nicht vollständig zutrifft. Hier wird die Vasokonstriktion nicht ausschließlich über P2X-Rezeptoren vermittelt, sondern zu einem geringen Teil über einen weiteren Rezeptor.

Während jedoch eine Stimulation der P2Y-Rezeptoren eine Endothel-vermittelte Vasodilatation verursacht, kontrahieren P2X-Rezeptoren die glatten Gefäßmuskelzellen direkt (Inscho et al., 1994). Die durch Adenosinhexaphosphat (Ap_6A) induzierte Kontraktion der Gefäßmuskulatur wird über den second messenger Ca^{2+} vermittelt. Der Anstieg der intrazellulären freien Calciumkonzentration kommt durch den Einstieg extrazellulärer Calcium-Ionen ins Cytosol über einen spannungsabhängigen Calciumkanal zustande (Kleta et al., 1995; Schlüter et al., 1996) und führt zu einer Erhöhung des Gefäßmuskeltonus in den glatten Muskelzellen (Tepel et al., 1996).

Durch die Isolierung der Diadenosinpolyphosphate aus Nierengewebe ist zu vermuten, dass diese Substanzen möglicherweise in den systemischen Kreislauf sezerniert werden und durch gefäßregulatorische Eigenschaften bei der Pathogenese der Hypertonie eine Rolle spielen. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass Zidek bereits 1986 die Niere als Bildungsort eines für die Hypertoniegenese bedeutenden humoralen Faktors vermutete (Zidek et al., 1986).

Manunta zeigte, dass durch Nierentransplantation von primär hypertensiven auf normotensive Ratten bei einem gewissen Teil der Ratten die Hypertonie übertragbar war, so dass eine renale Produktion und Sekretion eines hypertensiven Faktors wahrscheinlich ist (Manunta et al., 1997). Konzentrationsbestimmungen von Diadenosinpolyphosphaten im arteriellen und venösen Nierenblut würden beispielweise Hinweise dafür geben. Eine erhöhte Konzentration im venösen im Vergleich zum arteriellen Blut ist für eine Produktion und Sekretion von Diadenosinpolyphosphaten in der Niere verantwortlich.

Diadenosinpolyphosphate haben neben ihrer Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System auch mitogene Potenz. Insbesondere die proliferativen Eigenschaften von Adenosinhexaphosphat (Ap_6A) fanden im Laufe der letzten Jahre verstärkt Beachtung. So

kann eine stimulierende Wirkung auf das Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen schon in nanomolaren Konzentrationen beobachtet werden. Verglichen mit ATP oder UTP wird die maximale wachstumsstimulierende Wirkung bereits in 10fach geringerer Konzentration erzielt. Auf die wachstumsstimulierende Rolle der Diadenosinpolyphosphate machten Flodgaard und Klenow schon 1982 aufmerksam (Flodgaard und Klenow, 1982).

Intrazelluläre Diadenosinpolyphosphate treten in Stresssituationen vermehrt auf. Sie warnen als Signalmoleküle die Zelle vor dem Einsetzen metabolischen Stresses und werden daher als „Alarmone“ bezeichnet (Bonaventura et al., 1992).

Im Jahr 1984 beobachteten Bochner et al. eine Konzentrationserhöhung der Diadenosinpolyphosphate bei *Salmonella typhimurium* nach Zugabe von oxidierenden Substanzen. Da Diadenosinpolyphosphate auch in Prokaryonten vorkommen, ist anzunehmen, dass sie schon früh in der Entwicklungsgeschichte die Funktion von Botenstoffen hatten.

In Säugetierzellen konnte auch eine Konzentrationserhöhung von Ap_4A nachgewiesen werden, nachdem die Zellen Bedingungen ausgesetzt waren, die die Synthese von Stressproteinen veranlasst (Baker et al., 1986). Es konnte ein Konzentrationsanstieg von Dinukleotiden und ein Anstieg der DNA-Synthese in Nierenzellen von Affen nach einer viralen Infektion nachgewiesen werden (Johnston et al., 1990). Diadenosinpolyphosphate Ap_nA mit $n=3-6$ wirken auch als Cotransmitter der Katecholamine (Castillo et al., 1992), so dass davon auszugehen ist, dass sie bis heute die Aufgabe von Alarmonen beibehalten haben.

Diadenosinpolyphosphate haben auch Wirkungen auf weitere Organsysteme. Diadenosinpolyphosphate scheinen in der Regulation von Stoffwechsel und Durchblutung der Leber involviert zu sein. In der isolierten, perfundierten Rattenleber erhöhen sie den Druck in der Portalvene (Busshardt et al., 1989), in einer Hepatozytensuspension aktivieren sie Glykogenphosphorylase (Craik et al., 1993). Das lässt auf eine Beteiligung der Substanzen am Energiestoffwechsel schließen. Nach intravenöser Applikation von Ap_6A zeigt sich ein Anstieg von renalem Urinfluss und Na^+ -Exkretion (Hohage et al., 1996). In isolierten proximalen Tubuluszellen von Rattennieren bewirkt eine Inkubation mit Diadenosinpolyphosphaten eine Induktion der Gluconeogenese. Es wurde auch beschrieben, dass Ap_nA Inhibitoren ATP-sensitiver K^+ -Kanäle darstellen. Der Einfluss der Diadenosinpolyphosphate auf die Membranerregbarkeit durch Bindung an ATP-sensitive K^+ -Kanäle wurde zuerst bei Herzmuskelzellen beschrieben. Neben dem direkten Antagonismus der Diadenosinpolyphosphate zu dem Kanalöffner ATP, scheint jedoch ein

indirekter Effekt die Ionenleitfähigkeit zu verändern. Es stellte sich heraus, dass $A_{p_n}A$ die Adenylatkinase hemmen (Jovanovic et al., 1996; 1997).

Da Diadenosinpolyphosphate in vielfältiger Weise in den Funktions- und Proliferationsstoffwechsel von Organsystemen eingreifen, kann vermutet werden, dass die Substanzen in der Niere Veränderungen bewirken, durch die eine Alteration des Blutdrucks hervorgerufen wird.

Auf diese Weise sind auch Wirkungen von Diadenosinpolyphosphaten auf die Mesangiumzellen beschrieben. Sie induzieren eine Zellproliferation (Heidenreich et al., 1995) und verursachen eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der Kontraktilität (Schlatter et al., 1995). Die Isolation von Diadenosinpolyphosphaten aus Nierengewebe lässt vermuten, dass diese Substanzen in der Niere produziert werden und eventuell auf die benachbarten Mesangiumzellen wirken. Außerdem scheinen die Veränderungen der Mesangiumzellen eine Rolle in der Pathogenese der essentiellen Hypertonie zu spielen (Nakagawa et al., 1999).

Eine endgültige Aussage über Wirkungsweise der Diadenosinpolyphosphate aus der Niere kann an dieser Stelle nicht getroffen werden. Die Isolation aus verschiedenen Organen, der Nachweis der Substanzen im Blut und die bekannten mesangialen Wirkungen lassen vermuten, dass Diadenosinpolyphosphate aus der Niere sowohl durch endokrinsystemische als auch durch parakrin-renale Effekte in der Hypertoniegenese eine entscheidende Bedeutung haben.