

Aus der medizinischen Klinik IV Nephrologie und Endokrinologie  
der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Nachweis des gemischten Dinukleotid-Polyphosphats  
Adenosin-Guanosin-Triphosphat  
aus  
boviner Nebenniere

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Frank Meyer-Hilse  
aus  
Levallois-Perret/Paris

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. J. Jankowski  
2. Prof. Dr. med. K. Kisters  
3. Prof. Dr. med. R. Vetter

Datum der Promotion: 29.01.2010

---

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Bluthochdruck als Volkskrankheit .....	1
1.2. Sekundärer Bluthochdruck .....	3
1.3. Primärer (essentieller) Bluthochdruck .....	4
<b>2. Problemstellung</b> .....	<b>11</b>
<b>3. Methodik</b> .....	<b>12</b>
3.1. Gesamtübersicht .....	12
3.2. Isolierung des Adenosin-Guanosin-Triphosphats (Ap <sub>3</sub> G) .....	13
3.2.1. Mechanische Desintegration .....	13
3.2.2. Extraktion .....	13
3.2.3. Präparative Reversed-Phase-Chromatographie .....	13
3.2.4. Größenausschluss-Chromatographie.....	14
3.2.5. Affinitäts-Chromatographie .....	14
3.2.5.1. Herstellung des Phenylboronsäure Bio-Rex-70-Gels .....	14
3.2.5.2. Festphasenextraktion mit Phenylboronsäure Bio-Rex-70-Gel.....	14
3.2.6. Displacement-Chromatographie.....	14
3.2.7. Analytische Anionenaustausch-Chromatographie .....	15
3.2.8. Analytische Reversed-Phase Chromatographie .....	15
3.2.9. Matrix-Assistierte-Laser-Desorptions-/Ionisations (MALDI)- Massenspektrometrie.....	16
3.2.9.1. Matrix-Assistierte-Laser-Ionisations-Massenspektrometrie .....	16
3.2.9.2. PSD-Matrix-Assistierte-Laser-Ionisations-Massenspektrometrie .....	17
3.2.10. Retentionszeitenvergleich mittels Analytischer Reversed-Phase Chromatographie	17
3.2.11. UV-Spektroskopie .....	18
3.2.12. Enzymatische Spaltungen .....	18

---

3.2.12.1.	Enzymatische Spaltungen mit alkalischer Phosphatase .....	18
3.2.12.2.	Enzymatische Spaltung mit 5'-Nukleotidase .....	19
3.2.12.3.	Enzymatische Spaltung mit 3'-Nukleotidase .....	19
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>20</b>
4.1.	Gewinnung des Probenmaterials .....	20
4.2.	Präparative Reversed-Phase-Chromatographie .....	20
4.3.	Größenausschluss-Chromatographie .....	21
4.4.	Affinitäts-Chromatographie .....	23
4.5.	Displacement-Chromatographie .....	24
4.6.	Analytische Anionenaustausch-Chromatographie .....	25
4.7.	Analytische Reversed-Phase-Chromatographie .....	26
4.8.	Matrix-Assisted-Laser-Desorbition/Ionisation-Massen-Spektrometrie .....	27
4.9.	Post-Source-Decay-Maldi-MS .....	28
4.10.	Retentionszeitenvergleich mittels Analytischer Reversed-Phase-Chromatographie .....	28
4.11.	UV-Spektroskopie .....	29
4.12.	Enzymatische Spaltungen .....	29
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>33</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>40</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>41</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>53</b>
8.1.	Chemikalien .....	53
8.1.1.	Geräte .....	53
<b>9.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>57</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>59</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Bluthochdruck als Volkskrankheit

Das Morbiditäts- und Mortalitätsgeschehen in den Industrieländern wird durch Herz-Kreislauf-Krankheiten dominiert (Elliott, 2008). Der Bluthochdruck ist dabei die Hauptursache für Folgeerkrankungen der Herz-Kreislauf-Krankheiten wie Schlaganfall (Mancia, 2004), Herzinsuffizienz (Kannel, 1994), koronare Herzkrankheit einschließlich des Myokardinfarktes, Niereninsuffizienz und Tod (Bazzano, 2003) und ist daher von großer sozialmedizinischer Bedeutung (Lewington, 2002). Ca. 25% der Erdbevölkerung und über die Hälfte der über 50-jährigen Bevölkerung der Industrieländer entwickeln einen Bluthochdruck (Bonow, 2002).

Ein normaler Blutdruck ist definiert als ein Blutdruck unter 120 mmHg systolisch und 80 mmHg diastolisch. **Tabelle 1** zeigt die aktuelle Klassifikation des Bluthochdruckes der European Society of Hypertension (ESH, 2007, Leitlinien der Hypertonie, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften):

**Tabelle 1:** Klassifikation von Blutdruckbereichen in mmHg (European Society of Hypertension, 2007)

Klassifikation	systolischer Blutdruck (mmHg)	diastolischer Blutdruck (mmHg)
optimal	< 120	< 80
normal	120-129	80-84
noch normal	130-139	85-89
leichte Hypertonie (Schweregrad I)	140-159	90-99
mittelschwere Hypertonie (Schweregrad II)	160-179	100-109
schwere Hypertonie (Schweregrad III)	> 180	>110
isolierte systolische Hypertonie	> 140	<110

Das Lebensalter wird in der WHO-Definition nicht berücksichtigt. Die „Deutsche Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdrucks“ definiert hingegen als obere Normgrenze des Blutdrucks bei Erwachsenen für den systolischen Blutdruck 140 mmHg bis zum 40. Lebensjahr, 150 mmHg vom 40. bis zum 60. Lebensjahr und 160 mmHg ab dem 60. Lebensjahr. Für den diastolischen Blutdruck gilt in jedem Lebensjahr 90 mmHg als obere Normgrenze (Osterhues, 2000).

Der Blutdruck steigt an, wenn die Relation zwischen Blutvolumen und peripherem Gefäßwiderstand sich durch Verminderung des Gefäßlumens oder Verhärtung der Gefäßwand ändert. Vaso-konstriktive Substanzen verändern den Gefäßtonus und damit das Lumen sowie die Struktur und den Widerstand. Sie beeinflussen die Proliferation der glatten Muskelzellen der Gefäße, Apoptose, Thrombozytenaggregation, Monozyten- und Leukozyten-Adhäsion sowie die Gerinnung (Heitzer, 2001). Eine Erhöhung der Proliferationsrate glatter Gefäßmuskelzellen führt zur Erhöhung des peripheren Widerstandes (Touyz, 2000). Bluthochdruck führt letztendlich zu einer arteriosklerotischen Schädigung der Gefäße. Der Verlust an elastischen Fasern und die Zunahme von Kollagenfasern bewirkt eine verstärkte Rigidität der Gefäße. Dadurch kommt es zu einem weiteren Anstieg des Blutdruckes. Zusätzlich ist die Durchblutung der kleinsten Gefäße der Arteriolen vermindert, mit Folge einer Ischämie von Organen (Suresh, 2008), mit den Risiken des Schlaganfalls, des Herzinfarktes, der Niereninsuffizienz und peripherer Durchblutungsstörungen. Das Risiko, einen Herzinfarkt oder Schlaganfall zu erleiden, steigt mit zunehmendem Blutdruck (Stamler, 1993). An diesen Erkrankungen versterben mehr als 400.000 Menschen pro Jahr in den Industrieländern, davon sind 43% Männer und 57% Frauen (Oesingmann und Lampert, 1998). Nur 5-10% der Bluthochdruckerkrankungen haben eine erkennbare Ursache oder eine zugrunde liegende diagnostizierbare Erkrankung. Diese Bluthochdruckfälle werden als sekundärer Bluthochdruck bezeichnet. Primärer (essentieller) Bluthochdruck liegt bei 90% der Bluthochdruckerkrankungen vor. Hier ist die Ursache des Bluthochdruckes nicht bekannt (Wofford, 2000). Da der Bluthochdruck eine der Haupttodesursachen der westlichen Welt darstellt, ist seine Untersuchung bezüglich Genese und der möglichen Ursachenbekämpfung mittels einer intensiven Forschung essentiell.

**Tabelle 2:** Hypertonieformen und ihre Ursachen (Karow; Lang, 2005)

Hypertonieform	Ursache
Primärer (essentieller) Bluthochdruck (> 90% aller Fälle)	unbekannt
Sekundärer Bluthochdruck (5 – 10% aller Fälle)	bekannt renal: renoparenchymatös, renovaskulär endokrin: Cushing-, Conn-Syndrom, Phäochromozytom, Akromegalie, orale Kontrazeptiva Aortenisthmusstenose

## 1.2. Sekundärer Bluthochdruck

Der sekundäre Bluthochdruck ist Folge einer Erkrankung, die kardiovaskulär, renal, endokrin oder neurogen bedingt sein kann. Dabei ist an allen Bluthochdruckerkrankungen der renale Bluthochdruck zu 5% beteiligt, 3% entstehen durch endokrinologische Störungen und 1% ist kardiovaskulär und/oder neurogen bedingt (August, 2004). Der renale Bluthochdruck ist mit 5% aller Bluthochdruckfälle nach dem primären Bluthochdruck die zweithäufigste Bluthochdruckform.

Sekundäre Bluthochdruckformen haben eine oft behandelbare Ursache. Allerdings beginnt der Bluthochdruck meist schleichend, macht zunächst keine Beschwerden und bleibt daher lange unerkannt. Eine frühe Diagnose und Feststellung der Ursache für den erhöhten Blutdruck ist bedeutsam, da eine effektive und meistens auch durchführbare Therapie möglich ist (Harrisons, 2008).

So bewirkt die Nierenarterienstenose oder eine Glomerulonephritis eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS-Systems), bei der vermehrt Angiotensin ausgeschüttet wird. Angiotensin ist ein Hormon, das eine Vasokonstriktion bewirkt. Zusätzlich kommt es zu einer vermehr-

ten Wasserretention. Beide Mechanismen bewirken eine Erhöhung des Blutdruckes. Die Behebung der Nierenarterienstenose im Frühstadium führt zu einer Normalisierung des Blutdruckes.

Störungen im Hormonstoffwechsel können zu einem vermehrten Ausschütten von Kortikoiden oder Katecholaminen (John, 2004) führen, die über eine Wasserretention (Freel, 2004) und vermehrte Vasokonstriktion eine Blutdruckerhöhung bewirken. Eine Verminderung von Kalzium im Blut und aktives Vitamin D sowie eine erhöhte Konzentration von Phosphat stimulieren die Freisetzung des vasokonstriktorisch wirkenden Parathormons (PTH) mit konsekutivem Anstieg des Blutdruckes. Eine blutdrucksenkende Therapie mindert das kardiovaskuläre Risiko und verlängert die Lebenserwartung (ESH, 2007). Weitere Faktoren, die das kardiovaskuläre Risiko potenzieren, aber therapeutisch beeinflusst werden können, sind erhöhte Serum-Cholesterin- bzw. LDL-Cholesterin-Konzentration und erniedrigte HDL-Cholesterin-Konzentration, Diabetes mellitus sowie exogene Faktoren wie Nikotinkonsum, hoher Salzkonsum, Übergewicht, Bewegungsmangel und Stress (Schoen, 1999).

### **1.3. Primärer (essentieller) Bluthochdruck**

Dem primären Bluthochdruck liegen keine erkennbaren Erkrankungen zugrunde. Umfangreiche Untersuchungen wurden durchgeführt, um Ursachen aufzudecken, die einen primären Bluthochdruck entwickeln. Der primäre Bluthochdruck ist eine polygenetische und heterogene Erkrankung, die mögliche Ursachen in genetischen und/oder in anderen Bedingungen haben kann, die Herzminutenvolumen und Gefäßwiderstand beeinflussen. Verschiedene synergistische Effekte oder Polymorphismen an verschiedenen Genloci beeinflussen den Blutdruck (Hingorani, 1996). Es gilt als sicher, dass genetische Faktoren mitverantwortlich für den Bluthochdruck sind. Erkrankungen an einzelnen Genen verursachen eher sehr seltene Formen des primären Bluthochdruckes, z. B. Gendefekte in Enzymen, die den Aldosteronmetabolismus verändern oder Mutationen in Proteinen, die die Salzadsorption verändern (James, 2002). Genveränderungen bewirken eine Veränderung des Renin-Angiotensin-Systems am Angiotensinogenlocus und des Angiotensin-II Typ 1 Rezeptors (Barlassina, 2002).

Das Gefäßendothel hat Einfluss auf die Blutdruckregulation. Das Gefäßendothel ist eines der komplexesten Organe des Körpers und ist eines der größten Gewebe mit sekretorischer Funktion (Gibbons, 1997; Bacchetti, 2000). Das Gefäßendothel bildet eine mechanische Barriere zwischen

Blut und Gefäßwand und wird als endokrines Organ angesehen mit einer großen Anzahl von Regulationsmechanismen. Es stellt damit einen der Hauptregulationsfaktoren für den Gefäßtonus dar. Von Gefäßzellen stammende Mediatoren (endothelium derived mediators) haben eine wichtige Funktion in der Gefäßregulation. So kann Bluthochdruck, Arteriosklerose und Herzinsuffizienz durch eine Fehlfunktion von Gefäßstruktur und Hämostase entstehen, ausgelöst durch Substanzen, die den Gefäßtonus regulieren (Gibbons, 1997). Einer der ersten Hinweise für die Funktion des Gefäßendothels in der Blutdruckregulation waren Untersuchungen von Furchgott und Zawadzki (Furchgott, 1980). Sie wiesen einen Gefäßendothel-relaxierenden Faktor nach Stimulation von Endothelzellen nach, der später als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert wurde (Furchgott, 1999). Stickstoffmonoxid ist an der neuronalen Übertragung der Immunreaktion und Gefäßregulation neben seiner Wirkung in der Modulation der Funktion beteiligt. Stickstoffmonoxid dringt zum einen in die Zelle ein, um sich dann im Zellinnern an spezielle Rezeptoren zu binden. Es wurde nachgewiesen, dass Stickstoffmonoxid zum anderen spezielle Rezeptoren der Zellwand, eine lösliche Guanylcyclase, erreicht und seine Wirkung dort sehr viel schneller entfalten kann, als über den Weg der löslichen Rezeptoren in der Zelle (Zabel, 2002). Veränderungen des Stickstoffmonoxidstoffwechsels könnten ein Grund für komplexe dynamische und hämostatische Störungen sein. Stickstoffmonoxid wird synthetisiert durch eine Stickstoffmonoxidsynthetase. Drei unterschiedliche Isoenzyme sind bekannt. Zwei kalzium-/ calmodulinabhängige Stickstoffmonoxidsynthetase-Isoenzyme, hauptsächlich im Gehirn und Endothel vorkommend sowie eine kalziumunabhängige Stickstoffmonoxidsynthetase, induziert durch Zytokine. Stickstoffmonoxid inhibiert das Wachstum glatter Muskelzellen der Gefäße, die zytokin-induzierte Endothelexpression von Adhäsionsmolekülen und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Eine genügende Produktion von Stickstoffmonoxid im Gefäßendothel ist essentiell für die Regelung eines normalen Blutdruckes (Huang, 2003). Defekte in der Produktion und der Wirkung von Stickstoffmonoxid sind nahe liegend mitverantwortlich für einen primären Bluthochdruck (Aiello, 1998).

Das Gefäßendothel produziert einen weiteren Faktor mit starken gefäßerweiternden Eigenschaften durch Hyperpolarisation glatter Gefäßmuskelzellen. Dieser Faktor wird „Endothel hyperpolarisierender Faktor“ (EDHF) genannt (Feletou, 1999). Weitere Substanzen, die aus dem Gefäßendothel stammen, werden beschrieben. Hierzu gehört auch das Peptid Endothelin (Yanagisawa, 1988), das eine Rolle in der Endorganschädigung bei Herz-Kreislaufkrankungen spielen soll. Endothelin ist ein 21-Amino-peptid mit starken vasokonstriktorisches Eigenschaften (Yanagisawa, 1988) und wachstumsstimulierenden Eigenschaften (Bobik, 1999). Endothelin wird von den Gefäßendothel-

zellen sezerniert (Quaschnig, 2000) und gehört so zu den aus dem Gefäßendothel stammenden kontraktile Faktoren (Endothel-derived contractile factor (EDCF) (Lee, 2006). Es wird vermutet, dass Endothelin ein endogener Modulator der elektrischen spannungsabhängigen Kalziumionenkanäle ist. Es wird angenommen, dass die Regulation des Blutflusses in den Mikrogefäßen durch die Produktion von Endothelin reguliert wird (Bergler-Klein, 2002).

Endothelin-1 stimuliert die Freisetzung von Stickstoffmonoxid, zum anderen wirkt es selber gefäßverengend (Quaschnig, 2007). Endothelin-1 wird durch Angiotensin II und Vasopressin freigesetzt. Endothelin vermittelt seine Effekte über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Huggins, 1993), die Endothelinrezeptoren. Derzeit sind 2 Rezeptorsubtypen des Endothelinrezeptors bekannt, die als ETA (Arai, 1990) und ETB (Sakurai, 1990) bezeichnet werden. ETA-Rezeptoren können unter anderem in glatten Muskelzellen der Blutgefäße gefunden werden, wo sie für die durch Endothelin-1 verursachte Vasokonstriktion verantwortlich sind. ETB-Rezeptoren hingegen sind auf Endothelzellen, Epithelzellen (ET-B<sub>1</sub>) und glatten Muskelzellen (ET-B<sub>2</sub>) nachweisbar. Eine Aktivierung endothelialer ETB-Rezeptoren durch Endothelin-1 oder Endothelin-2 kann sowohl eine Vasodilatation (ET-B<sub>1</sub> über eine Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO)) als auch eine Vasokonstriktion (ET-B<sub>2</sub>), zur Folge haben. Vasokonstriktive Substanzen (EDCF) gehören unterschiedlichen Substanzklassen an, die im Einzelnen noch weiter untersucht werden (Dhein, 1997).

Neben der Endothelinfreisetzung kann auch eine Regulierung des Gefäßmuskeltonus durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffgruppen (Miyachi, 2004), Arachidonsäurederivate wie Thromboxane oder Prostacyclin (Alanko, 2003) oder Nukleotide wie Adenosintriphosphat (ATP), erfolgen (Li, 2003). Angiotensin II ist ein Oktapeptid (Skurk, 2001) mit vasokonstriktorisches und wachstumsstimulierenden Eigenschaften (Varagic, 2002). Es ist das Endprodukt des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) (Perros, 2008). Angiotensin II wird aus Angiotensin I gebildet durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), das sich an der luminalen Seite des Gefäßendothels befindet. Angiotensin I wird durch Konvertierung von Angiotensinogen, in der Leber, durch Renin gebildet. Die Wirkungen des Angiotensin II werden hauptsächlich durch den Angiotensin-1-Rezeptor (AT1-Rezeptor) vermittelt. Die Stimulierung des AT1-Rezeptors führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Haller, 1994). Das RAS ist ein wichtiger Bestandteil in der Regulation des Blutdruck-, Elektrolyt- und Volumenhaushaltes (Li, 2002). Hauptsächlichlicher Trigger ist hierbei das Renin, das im juxtaglomerulären Apparat des Nephrons produziert wird. Patien-

ten mit höherem Reninspiegel im Blut haben ein erhöhtes Risiko, einen Schlaganfall oder Myokardinfarkt zu erleiden, als die Patienten mit einem niedrigen Reninspiegel (New, 2002).

Mononukleare Leukozyten üben ihre Hauptfunktion im Immunsystem aus. Sie haben aber auch Einfluss auf Gefäße durch ihre Aufgabe in der Regulation von Entzündungsreaktionen. Die Leukozyten differenzieren sich in Granulozyten (basophile, eosinophile, neutrophile Granulozyten) und in nicht granularhaltige Zellen, die Lymphozyten und Monozyten. Untersuchungen zeigen eine enge Beziehung zwischen Entzündungsreaktion und Arteriosklerose (Galle, 2004). Neben der bekannten Funktion im Immunsystem mit der Freisetzung von Substanzen zur Antikörperbildung, Modulation der Immunreaktion und Chemotaxis, werden auch andere Substanzen von Leukozyten freigesetzt, die offensichtlich vasokonstriktorische Eigenschaften haben. Die Pathophysiologie des primären Bluthochdruckes beinhaltet u. a. eine Fehlregulation des Kreislaufes aufgrund verschiedenster Faktoren, wie z.B. einer gesteigerten Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems, einer veränderten Nierenfunktion, einer gesteigerten sympathischen Aktivität, Abnormalitäten der Volumenregulation und endotheliale Dysfunktion mit verstärkter Vasokonstriktion. Dabei mehren sich die Hinweise auf immunologische Veränderungen bei Bluthochdruck. Berichtet wird von erhöhten Serum-Immunglobulinspiegeln, Alterationen der zellulären Immunfunktion und Abnormalitäten des Komplementsystems (Luther, 1997).

Autoimmune Mechanismen sind offensichtlich an der Pathogenese des primären Bluthochdruckes beteiligt. Bei diastolischen Blutdruckwerten über 140 mmHg, der maligne Bluthochdruck, fand Hilme spezifische Autoantikörper (Hilme, 1993). Agonistische Autoantikörper gegen den alpha-1-adrenergen Rezeptor vom IgM Typ sind bei Patienten mit primärem, sekundärem sowie malignem Bluthochdruck in höherem Prozentsatz beschrieben (Luther, 1997). Wallukat und Homuth beschrieben Autoantikörper gegen den Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 im Serum von Patientinnen mit Präeklampsie (Wallukat, 1999). Homuth und Fu belegten, dass diese Antikörper auch bei Patienten mit malignem Bluthochdruck nachweisbar sind (Homuth, 2001). AT1-AK stimulieren die AT1-Rezeptoren und initiieren eine Signalkaskade, die zur Expression von „Tissue Factor“ in den glatten Muskelzellen von Koronararterien und auf Monozyten führt (Dechend, 2000). Die zirkulierenden Antikörper sind vom IgG Typ. Sie wirken agonistisch an den vaskulären AT1-Rezeptoren. Dabei scheinen sie, durch Protein-Kinase-C vermittelt, bei Präeklampsie für den Blutdruckanstieg und die Endorganschäden verantwortlich zu sein (Dechend, 2006). Eine immunsuppressive Behandlung mit Glukokortikoiden vermindert die vaskulären Schäden im Tiermodell (Homuth, 2001). Um die Bedeutung dieser agonistischen Antikörper in der Pathogenese des Bluthochdruckes zu

verstehen, wurde ihr Einfluss auf die Adhäsionsmoleküle auf Monozyten untersucht. In einer Subpopulation von Ratten-Monozyten wurde die Expression von Renin nachgewiesen, humane Monozyten arteriosklerotischer Plaques enthalten große Mengen von Angiotensin (Potter, 1998). Monozyten stellen somit ein potentiell Reservoir für Renin und Angiotensin im Gewebe dar und verfügen über AT1-Rezeptoren (Dörrfel, 2003), was eine lokale Bildung und Wirkung von Angiotensin ermöglicht (Lang, 2000). Die Identifizierung der vasokonstriktorisches Substanzen, die von Leukozyten freigesetzt werden, ist für die Untersuchung der Bluthochdruck-Genese von großer Bedeutung.

Auch die Nebennieren sind Bestandteil der Blutdruckregulation. Die Nebennieren sind paarig angelegt mit jeweils zwei endokrinen Drüsen unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft und verschiedenartiger Funktion (Fritsch, Kühnel, 2005), die kappenartig auf den Nierenpolen aufsitzen. Anatomisch und von der Funktion her werden zwei Bereiche unterschieden: das innere Nebennierenmark und die äußere Nebennierenrinde. Im Nebennierenmark werden die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin gebildet (Benninghoff, Drenckhahn, 2003). Das Nebennierenmark besteht aus Zellen, die sich durch ihren hohen Gehalt an Adrenalin und Noradrenalin bei der Fixierung mit Kaliumbichromat bräunlich verfärben und daher als chromaffine Zellen bezeichnet werden.

Das Nebennierenmark ist ektodermaler Herkunft und geht aus der Sympathikusanlage hervor. Das Nebennierenmark wird zur Ausschüttung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin durch direkte Stimulation durch präganglionäre Nervenfasern vom sympathischen Nervensystem stimuliert. An der Sekretion ist das Enzym N-Methyltransferase beteiligt, das durch Kortisol induziert wird (Tai, 2002). Kortisol wird von der Nebennierenrinde an das Nebennierenmark abgegeben. So wird die Nebennierenmarkfunktion von der Nebennierenrinde mit moduliert. Die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin üben durch Besetzung von  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2- sowie  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2- Rezeptoren unterschiedliche Wirkungen aus. Abhängig von der Verteilung dieser Rezeptoren auf Zelloberflächen verschiedener Organe ist die unterschiedliche Wirkung. Adrenalin bewirkt eine Vasokonstriktion im Splanchnikusgebiet über  $\alpha$ -Rezeptoren und eine Vasodilatation über  $\beta$ -Rezeptoren in der Skelettmuskulatur. Noradrenalin führt zu einer Vasokonstriktion in allen Gefäßgebieten außer den Koronargefäßen. Beide Katecholamine bewirken eine Beschleunigung der Herzfrequenz und eine verstärkte Pumpaktion. In der Lunge führen beide zu einer Tonusminderung der Bronchialmuskulatur und so zu einer Verminderung des Atemwiderstandes (Thews-Vaupel, 2005).

Die Nebennierenrinde produziert auch Steroidhormone wie Glukokortikoide und Mineralokortikoide. Katecholamine und Steroidhormone sind bekannte Substanzen mit starken vasokonstriktiven Eigenschaften (DeLano, 2004). Zwei weitere vasokonstriktiv wirkende Substanzen der Nebennieren wurden nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um Diadenosin-Polyphosphate. Es sind im besonderen Diadenosinpentaphosphat ( $Ap_5A$ ) (Pintor, 1991) und Diadenosinhexaphosphat ( $Ap_6A$ ) (Pintor, 1992).

Dahl und Greenberg gelang der Nachweis, dass zirkulierende Substanzen Bluthochdruck normotensiver Ratten induzieren (Dahl, 1969; Greenberg, 1981). Hinweise für die Existenz eines humoralen Faktors, der für die Bluthochdruckentstehung relevant sein könnte, ließen Parabioseversuche von Dahl mit normalen und salzempfindlichen Ratten vermuten. Hirata gelang durch Injektionen von Serum hypertensiver Tiere in normotensive Tiere die Übertragung des Bluthochdruckes von hypertonen auf normotone Ratten (Hirata, 1984). Kreuzzirkulationsversuche von Zidek bekräftigten diese Theorie (Zidek, 1986; Zidek, 1989). In diesen Versuchen wurden die Blutkreisläufe normotoner und spontan-hypertoner Ratten gekreuzt. Bei den normotonen Ratten zeigte sich ein Blutdruckanstieg, bei den hypertensiven Ratten ein Blutdruckabfall. Es wurde von der Gruppe der hypertensiven Ratten ein Faktor isoliert, der wesentlich stärker vasokonstriktorisch wirkte, als die entsprechende Fraktion aus dem Blutplasma normotoner Ratten. Schlüter und Jankowski gelang es, diese aus Thrombozyten isolierten vasokonstriktiven Substanzen als Diadenosin-Polyphosphate zu identifizieren. Diadenosin-Polyphosphate ( $Ap_nA$ ,  $n= 2-6$ ) bestehen aus zwei Adenosinmolekülen, die über 2-6 Phosphatgruppen miteinander verbunden sind. Schlüter und Jankowski isolierten  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  (Schlüter, 1996) sowie  $Ap_7A$  (Jankowski, 1999) aus Thrombozyten. In weiteren Untersuchungen ist es gelungen, sowohl aus menschlichem Blutplasma als auch aus Blutbestandteilen aus verschiedenen Zellen der Niere und Nebenniere von Rindern und Schweinen, Schweineherzen und menschlicher Plazenta (Jankowski, 2001) eine Reihe von vasokonstriktiven Mediatoren zu isolieren. Adenosin-Polyphosphate der Thrombozyten haben unterschiedliche biologische und pharmakologische Eigenschaften. Neben vasokonstriktiven und vasodilatativen Eigenschaften haben sie eine Wirkung bei der Thrombozytenaggregation. Es wurde bereits beschrieben, dass der Adenosin-Polyphosphatgehalt erhöht in pathophysiologischen Situationen wie der Niereninsuffizienz nachzuweisen ist, wodurch die vermehrte Produktion dieser Substanzen zu einem erhöhten Blutdruck führen kann (Jankowski, 2001).

Auch in menschlichen Herzmuskelzellen wurden Diadenosin-Polyphosphate nachgewiesen. Das menschliche Herz besitzt endokrine Eigenschaften und es scheint nicht nur aus Muskelzellen zu bestehen. Das Renin-Angiotensin-System und der Nachweis von Angiotensinrezeptoren in der Herzmuskelzelle ist ein Zeichen für die autokrine oder parakrine Aktivität des Herzens als endokrines Organ (Curie, 1984). Die Rezeptoren des Herzmuskels agieren unabhängig vom Angiotensin II, dessen Ursprung aus dem Kreislauf stammt (Thone-Reineke, 2004; Suzuki, 2003). Angiotensin II reguliert den Gefäßtonus und das Zellenwachstum abhängig von der physiologischen oder pathophysiologischen Entwicklung. Die Anwesenheit und Wirkung auf den Herzmuskel und die Herzgefäße von Diadenosin-Polyphosphaten, Adenosin-Adenosin-Diphosphat ( $Ap_2A$ ) und Adenosin-Adenosin-Triphosphat ( $Ap_3A$ ), in spezifischen in Herzmuskelzellen vorkommenden Granula wurde nachgewiesen (Luo, 1999). Dies weist auf eine autogene Funktion der Diadenosin-Polyphosphate des Herzens zur Regulierung der Herzmuskelfunktion und Koronarperfusion hin.  $Ap_2A$  und  $Ap_3A$  beeinflussen Herzauswurfleistung und dadurch den Blutdruck (Gabriels, 2002). Ein erhöhtes Herzauswurfvolumen ist eine der häufigsten hämodynamischen Veränderungen, hervorgerufen durch eine erhöhte linksventrikuläre Auswurffraktion und Schlagfrequenz (Rosenthal, 1992). Ein erhöhtes linksventrikuläres Auswurfvolumen ist Folge einer vermehrten Freisetzung von Neurotransmittern, Hormonen oder vasokonstriktorisches Substanzen, die einen direkten Effekt auf die Herzmuskelzelle und Vasokonstriktion haben (Dzau, 1999; Katz, 1994).

Es wurde bereits beschrieben, dass  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  auch in den chromaffinen Zellen bovinen Nebennierenmarks nachgewiesen wurden (Pintor, 1992). Bei diesen Nukleotid(5')-oligophospho(5')-Nukleotiden wurde zunächst Adenosin als Nukleotid identifiziert (Lüthje, 1983). Weitere Analysen zeigten, dass auch andere Nukleotide vorhanden sind. Hierbei handelt es sich um Adenosin-Guanosin-Polyphosphate ( $Ap_nG$ ) oder Guanosin-Guanosin-Polyphosphate ( $Gp_nG$ ). Diese Substanzen wurden zunächst in menschlichen Thrombozyten nachgewiesen (Jankowski, 1998). Es wurde eine zellproliferierende Eigenschaft und eine gefäßmodulierende Eigenschaft beschrieben (Jankowski, 1998). Im Jahr 1998 konnte von der Arbeitsgruppe Zidek et al.  $Ap_3G$ ,  $Ap_4G$ ,  $Ap_5G$  und  $Ap_6G$  in verschiedenen Organen nachgewiesen werden (Zidek, 1998). Durch den Nachweis der Sekretion von Adenosin-Guanosin-Triphosphat in der Rindernebenniere kann eine weitere endokrine Funktion in der Regulierung des Blutdrucks erklärt werden. Mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie kann die Molekularmasse des Adenosin-Guanosin-Triphosphats bestimmt werden, damit auch der Nachweis in der Rindernebenniere.

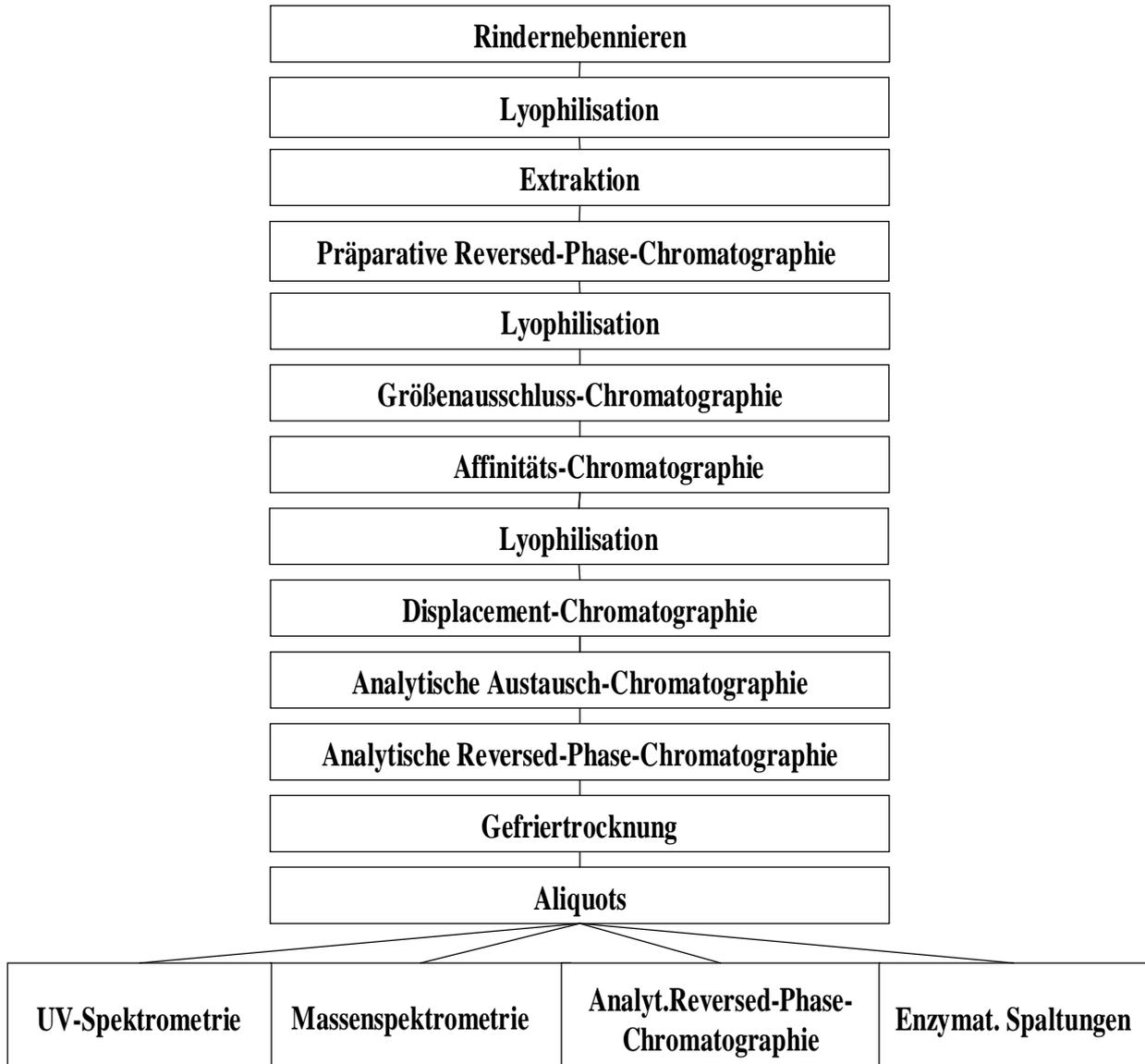
## 2. Problemstellung

Die Ursachen für den erhöhten Blutdruck sind größtenteils unbekannt. Zur Klärung der Genese des Bluthochdrucks bestehen intensive Untersuchungen. Sicher ist, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Von entscheidender Bedeutung ist die Blutdruckregulation über den totalen peripheren Widerstand. Dieser wird durch die Vasokonstriktion und Vasodilatation verändert. Die Vasokonstriktion und Vasodilatation wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. Zum einen über neuronale Stimulation, andererseits durch endokrinologische Funktion der Hormone. Neuere Substanzen wurden charakterisiert, die einen vasokonstriktiven Effekt ausüben. Zu diesen neueren Substanzen gehören die Dinukleotide sowie die gemischten Dinukleotide, die Adenosin-Guanosin-Polyphosphate. Das Vorkommen der Dinukleotide und der gemischten Dinukleotide ist in Thrombozyten, der Plazenta und den Nebennieren nachgewiesen worden. Zusätzlich zu den vasokonstriktischen Effekten haben diese Substanzen auch einen vasoproliferativen Effekt. Einer der charakteristischen Vertreter der gemischten Dinukleotide ist das Adenosin-Guanosin-Triphosphat ( $Ap_3G$ ). Ziel dieser Arbeit ist es, Adenosin-Guanosin-Triphosphat aus der Nebenniere zu isolieren, da die Nebenniere als sekretorisch wirksames Organ wesentlich zur Blutdruckregulation beiträgt. Könnte Adenosin-Guanosin-Triphosphat in der Nebenniere nachgewiesen werden, wäre der Beweis erbracht, dass die Nebenniere neben vasokonstriktischen Mediatoren auch proliferativ wirksame Mediatoren sezerniert.

### 3. Methodik

#### 3.1. Gesamtübersicht

In der **Abbildung 1** ist das Aufarbeitungsschema zur Isolierung von Adenosin-Guanosin-Triphosphat ( $Ap_3G$ ) aus Rindernebennierenengewebe aufgeführt:



**Abbildung 1:** Isolierungs- und Charakterisierungsschritte zur Isolierung des  $Ap_3G$  aus Rindernebennierenengewebe

## **3.2. Isolierung des Adenosin-Guanosin-Triphosphats (Ap<sub>3</sub>G)**

### **3.2.1. Mechanische Desintegration**

Nebennieren von frisch geschlachteten Rindern des Schlachthofes Lünen wurden für die Isolierung der Substanz Adenosin-Guanosin-Triphosphat verwendet. Zur mechanischen Desintegration der Rinder-Nebennieren fand die von Wheelock beschriebene Methode Anwendung (Wheelock, 1991). Das Nebennierengewebe wurde zerkleinert und zur Vermeidung enzymatischen Abbaus in flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend folgte eine Lyophilisation. Die lyophilisierten Gewebestücke wurden unter Kühlung pulverisiert.

### **3.2.2. Extraktion**

Zur Extraktion wurden 20 g des Nebennierengewebe-Pulvers mit 200 ml eiskalter 0,6 mM Perchlorsäure (Endkonzentration) versetzt, und mit einem Ultra-Turrax-Mixer unter Eiskühlung in 10 Intervallen von je 30 sec mit je 1 min Pause bei 1.200 Umdrehungen/sec homogenisiert. Die Eiskühlung sollte eine Temperatursteigerung über 4 °C und dadurch einsetzende Abbaureaktionen minimieren. Das Homogenat wurde mit 100.000 g bei 4 °C für 90 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abdekantiert, zusammengefasst und mit KOH-Lösung auf einen pH-Wert von 9 eingestellt. Danach erfolgte erneutes Zentrifugieren mit 4.000 g bei 4 °C für 10 min zur Entfernung der ausgefällten Perchlorate. Der Überstand wurde abdekantiert, bei -30 °C gefroren und der präparativen Reversed-Phase-Chromatographie zugeführt.

### **3.2.3. Präparative Reversed-Phase-Chromatographie**

Eine kommerziell verfügbare Reversed-Phase C18 Säule (310 x 25 mm, Korngröße 40 - 63 µm, LiChroprep, Fa. Merck) wurde mit 200 ml Azetonitril (ACN) konditioniert und mit 40 mM wässriger Triethylammoniumazetat-Lösung (TEAA) äquilibriert. Das nach dem Auftauen auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellte und in 40 mM wässriger TEAA-Lösung aufgenommene Perchlorsäure-Extrakt wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 ml/min auf die Chromatographiesäule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 200 ml 40 mM wässriger TEAA-Lösung gespült. Als Elutionsmittel wurden 200 ml 30% ige wässrige Azetonitrillösung verwendet. Das Eluat wurde lyophilisiert und bei -80 °C gefroren.

### **3.2.4. Größenausschluss-Chromatographie**

Entgastes Sephacryl-100-High Resolution Gel (Fa. Amersham-Pharmacia, Schweden) wurde in eine Glassäule (100 cm x 2 cm) gefüllt. Die Säule wurde mit dem 5-fachen ihres Volumens mit Wasser als Elutionsmittel äquilibriert. Der Elutionsmittelüberstand des Gels wurde abpipettiert und die Probe aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Die UV-Absorption bei 254 nm und die Leitfähigkeit wurden fortlaufend gemessen. Die Fraktionsgröße betrug 10 ml. Die Fraktionen wurden zusammengefasst, eingefroren und bei -30 °C gelagert.

### **3.2.5. Affinitäts-Chromatographie**

#### **3.2.5.1. Herstellung des Phenylboronsäure Bio-Rex-70-Gels**

100 g m-Amino-Phenylboronsäure wurden an den Kationenaustauscher Bio-Rex-70-Gel (Acrylmatrix, Korngröße 70 - 150 µm, Fa. Bio Rad Laboratories, USA) angelagert.

#### **3.2.5.2. Festphasenextraktion mit Phenylboronsäure Bio-Rex-70-Gel**

Nach dem Spülen des Gels mit 200 ml destilliertem Wasser wurden zum Äquilibrieren 200 ml einer 1M Ammoniumacetatlösung (pH 9,5) mit einem Fluss von 3 ml/min über die Säule gepumpt. Die Probe wurde nach pH-Einstellung auf 9,5 mit einem Fluss von 2 ml/min aufgetragen. Nach Erreichen der Basislinie wurden die retendierten Substanzen mit 10 mM HCl eluiert. Während der Festphasenextraktion wurde die UV-Absorption bei 254 nm und die Leitfähigkeit detektiert.

### **3.2.6. Displacement-Chromatographie**

Zur Displacement-Chromatographie wurde die Probe in 3 ml wässriger TEAA-Lösung (40 mM) gelöst und bei einem Fluss von 200 µl/min auf die Trennsäule aufgetragen. Bei der Trennsäule handelte es sich um eine 300 mm x 4,2 mm Lichrospher 60 RP-Select Säule (Fa. Merck, Deutschland) mit einer Korngröße von 5 µm und einer Porengröße von 6 nm. Trägersubstanz war wässrige 40 mM TEAA-Lösung. Anschließend erfolgte der Auftrag von 160 mM n-Butanol in 40 mM TEAA-Wasser als Displacer mit einem Fluss von 100 µl/min. UV-Absorption und Leitfähigkeit wurden detektiert. Das Volumen der Fraktionsgröße betrug 1 ml.

### 3.2.7. Analytische Anionenaustausch-Chromatographie

Die Probe wurde mit Hilfe eines Anionenaustauschers nach Ladung und Hydrophobizität getrennt. Als Anionenaustauschersäule diente eine Uno-Q-HR-5/5-Säule (Fa. Amersham-Pharmacia, Schweden). Als Trägermaterial wurde das hydrophobe Harz MonoBeads benutzt, das auf einer Polystyren-/Divinylbenzen-Matrix basiert. Als Laufmittel wurde eine wässrige 10 mM  $K_2HPO_4$ -Lösung (Laufmittel A) mit einem pH-Wert von 8 verwendet. Die Probe wurde in 1 ml Laufmittel A gelöst, auf die Säule aufgetragen und von dieser nach Ladung und Hydrophobizität getrennt. Als Elutionsmittel diente eine wässrige 50 mM  $K_2HPO_4$ -/1 M NaCl-Lösung (Laufmittel B), die mit einem Fluss von 0,5 ml/min über die Säule gepumpt wurde. Die Elutionsdetektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei 254 nm und einem Leitfähigkeitsdetektor. Folgender Gradient mit kontinuierlichen Übergängen wurde verwendet:

**Tabelle 3:** Gradient der Anionenaustausch-Chromatographie; Fluss: 0,5 ml/min;  
Säule: Uno-Q-HR-5/5-Säule (Fa. Amersham-Pharmacia, Schweden)  
Laufmittel A: 10 mM  $K_2HPO_4$  in Wasser, pH 8  
Laufmittel B: 50 mM  $K_2HPO_4$ -/1M NaCl-Lösung in Wasser

Zeit (min)	0	10	100	105	110	115
Gehalt Laufmittel B (%)	0	5	35	40	100	100

### 3.2.8. Analytische Reversed-Phase Chromatographie

Die Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie wurden mit wässriger 1 M TEAA-Lösung (40 mM) versetzt und mit verdünnter HCl auf einen pH-Wert von 6,5 titriert. Anschließend wurden die Fraktionen über eine Superspher 100  $C_{18}$  Säule (250 mm x 4 mm, mittlere Korngröße 4  $\mu$ m, mittlere Porengröße 10 nm; Fa. Knauer, Deutschland) gepumpt. Als Laufmittel diente 40 mM TEAA in Wasser (Laufmittel A), als Elutionsmittel 100 %iges ACN (Laufmittel B). Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min, die Fraktionsgröße 1 ml. Die UV-Detektion erfolgte bei 254 nm. Die Fraktionen mit UV-Absorption bei 254 nm wurden in einer Vakuumzentrifuge eingedampft und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Folgender Gradient wurde zur Elution gewählt:

**Tabelle 4:** Gradient der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie:  
 Fluss 0.5 ml/min;  
 Säule: Superspher 100 C18 Säule (250 mm x 4 mm, mittlere Korngröße 4µm, mittlere Porengröße 10 nm; Fa. Knauer, Deutschland)  
 Laufmittel A: 40 mM TEAA in Wasser  
 Laufmittel B: ACN-Lösung (100%)

Zeit (min)	0	4	79	85	86	90
Gehalt Laufmittel B (%)	0	2	7	60	80	80

### 3.2.9. Matrix-Assistierte-Laser-Desorptions-/Ionisations (MALDI)-Massenspektrometrie

#### 3.2.9.1. Matrix-Assistierte-Laser-Ionisations-Massenspektrometrie

Das Massenspektrum einer Molekülverbindung kommt durch Ionisation der Moleküle und nachfolgender Bestimmung der Molekülmasse der beim Ionisationsprozess gebildeten primären Ionen und deren Zerfallsprodukten im Hochvakuum zustande. Ionenquelle ist die Matrix-Assistierte-Laser-Desorption-/Ionisation. Aliquots der isolierten Substanz der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie wurden in 10 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Probe wurde mit einigen Kügelchen des Kationenaustauschers (AG 50 W-X12, Bio-Rad-Laboratories, USA) in protonierter Form (H<sup>+</sup>) entsalz, um die Bildung von Natrium- oder Kalium-Addukt-Ionen zu minimieren, die aufgrund einer Peakverbreiterung zu höheren m/z-Werten und zu einer Abschwächung der Intensität des M+H<sup>+</sup>-Signals führen. Anschließend wurden 0,5 µl der UV-absorbierenden Desorptionsmatrix (3-Hydroxypicolinsäure, 50 mg/ml) auf die Oberfläche eines metallenen Proben Tellers pipettiert und dort mit 1 µl der Proben-Lösung versetzt. Die Probe wurde eingetrocknet und der Proben teller über die Vakuumschleuse in das Massenspektrometer eingesetzt. Für die Massenanalyse wurde ein MALDI-TOF-Massenspektrometer mit zweistufiger Reflektion zur Ionentrennung benutzt. Die Desorption/Ionisation der Probe erfolgte mit einem Stickstofflaser. Die Probe wurde mit einer Wellenlänge von 337 nm mit einer Pulsdauer von 5 ns mit einer kreisförmigen Bestrahlungsfläche von 20-100 µm beschossen. Die Energie betrug 10<sup>6</sup>- 10<sup>7</sup> W/cm<sup>2</sup>. Die Matrixmoleküle absorbieren diese Energie des Lasers. Die Gitterstruktur der Matrixmoleküle wird

aufgeweitet und zerstört. Gasförmige Matrix und Probenmoleküle werden freigesetzt und durch den Laserstrahl ionisiert. In einem elektrischen Feld wurden die ionisierten Moleküle in Richtung des Detektors zum Ionennachweis beschleunigt. Hierzu wurde eine Beschleunigungsspannung von  $U_{\text{acc}}$  10 kV angelegt und mit einem Druck von  $6 - 8 \times 10^{-7}$  bar gearbeitet. Als Detektor für den Ionennachweis wurde ein Bruker-Reflex III-Matrix-Assistierte-Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometer verwendet. Zur Massenbestimmung erfolgte eine elektronische Messung der Zeit, die zwischen Desorption der Ionen bis zum Eintreffen am Detektor vergeht. Die Länge der feldfreien Driftstrecke betrug 0,5 bis 2 Meter. Ionen unterschiedlicher Masse haben bei gleicher kinetischer Energie unterschiedliche Flugzeiten. Ionen mit leichter Masse sind schneller als schwere Ionen, sie haben eine kürzere Flugzeit (Time Of Flight, TOF). Es wurden 50 Spektren akkumuliert. Die gemessene Flugzeit wird mit bekannten Referenzmassen verglichen, so wird die Masse des Probenmoleküls ermittelt. Die Spektren wurden mit einem Le Croy 9400 Transientenrecorder aufgenommen.

### **3.2.9.2. PSD-Matrix-Assistierte-Laser-Ionisations-Massenspektrometrie**

Es folgte Sequenzierung im PSD-MALDI. Zur Detektion der beim Laserbeschuss freigesetzten Molekülfragmente wird die PSD-Matrix-Assistierte-Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie verwendet. PSD ist die Post-Source-Decay-MALDI. Molekülionen, die in der feldfreien Driftstrecke zerfallen, können durch stufenweises Absinken des Reflektorpotentials detektiert werden. Die PSD-MALDI liefert Information über die Struktur eines Moleküls.

Es wurden 100 Spektren akkumuliert. Verwendet wurde ein Bruker Reflex III Matrix-Assistierte-Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometer zur Detektion der Spektren.

### **3.2.10. Retentionszeitenvergleich mittels analytischer Reversed-Phase Chromatographie**

Zum Vergleich der ermittelten Retentionszeiten mit Standardwerten und die anschließende quantitative Auswertung der einzelnen Peakflächen wurde eine Poros R2/H-Säule und Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBA-HSO<sub>4</sub>) als Ionenpaarreagenz verwendet. Der Säulentyp (RP-Perfusionssäule) ist durch besonders große Poren (6000 – 8000 Å) in den Partikeln des Säulenfüllmaterials charakterisiert.

Die Poros R2/H-Säule (100 mm x 2,1 mm, Fa. Amersham- Pharmacia, Schweden) wurde mit einer wässrigen 2 mM TBAHSO<sub>4</sub>- und einer 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung (Laufmittel A) bei einem Fluss

von 300  $\mu\text{l}/\text{min}$  äquilibriert. Aliquots der isolierten Substanz der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie wurden in dem gleichen Lösungsmittel aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Eluiert wurde mit wässriger ACN-Lösung 80 % (Laufmittel B) mit dem in **Tabelle 5** aufgeführten Gradienten. Die UV-Absorptionsbestimmung erfolgte bei 254 nm. Die Größe der einzelnen Peakflächen wurde bestimmt.

**Tabelle 5:** Gradient Retentionszeitenvergleich; Fluss 300  $\mu\text{l}/\text{min}$ ;  
Säule: Poros R2/H-Säule (100 mm x 2,1 mm, Fa. Amersham-Pharmacia, Schweden)  
Laufmittel A: 2 mM TBAHSO<sub>4</sub>-/10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung in Wasser  
Laufmittel B: wässrige ACN-Lösung (80%)

Zeit (min)	0	4	16	17	19
Gehalt Laufmittel B (%)	0	10	22	50	50

### 3.2.11. UV-Spektroskopie

Für die UV-spektroskopischen Untersuchungen wurde ein UV-Spektrometer der Fa. Beckmann (UV/Vis-Spectrophotometer, DU-600) benutzt. Die Quarzküvetten hatten ein Volumen von 60  $\mu\text{l}$ . Die Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 200 - 450 nm aufgenommen. Das Lösungsmittel der Probe, H<sub>2</sub>O, diente als Referenz. Die Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie wurden entsalzt und lyophilisiert. 100 ml der Probe wurden bei einem pH-Wert von 3, 7, und 9 in 900  $\mu\text{l}$  Wasser gelöst. Der betreffende pH-Wert wurde mittels 1M NaOH bzw. 1 M HCl eingestellt. Anschließend wurde die gelöste Probe in die Quarzküvette pipettiert. Die UV-Absorption wurde mit einer Scan-Geschwindigkeit von 400 nm/min gemessen.

### 3.2.12. Enzymatische Spaltungen

#### 3.2.12.1. Enzymatische Spaltungen mit alkalischer Phosphatase

Zur Spaltung mit alkalischer Phosphatase wurden Aliquots der isolierten Substanz der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie in 10  $\mu\text{l}$  Wasser gelöst. 1  $\mu\text{l}$  Lösung und 1  $\mu\text{l}$  alkalische Phosphatase (Lösung 0.01 U/ml) wurden gemischt und bei 37 °C für 5 min inkubiert. Das Enzym wurde durch Zentrifugieren mit einem Zentrifugen-Filter entfernt (Ausschluss-Grenze: 10 kDa). Die Probe wurde mit der Anionenaustausch-Chromatographie (Uno-Q HR 5/2, Amersham-

Pharmacia, Schweden) auf Spaltungsreaktionen hin untersucht. Als Laufmittel wurde eine wässrige 20 mM  $K_2HPO_4$  Lösung (Laufmittel A) mit einem pH-Wert von 8, als Elutionsmittel 20 mM  $K_2HPO_4$ /1 M NaCl-Lösung (Laufmittel B) mit einem pH-Wert von 8 verwendet, die mit einem Fluss von 300  $\mu$ l/min auf die Säule aufgetragen wurden. Die Fraktionsgröße betrug 1 ml. Die Elutions-Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei 254 nm und einem Leitfähigkeitsdetektor. Folgender Gradient mit kontinuierlichen Übergängen wurde verwendet:

**Tabelle 6:** Gradient der Anionenaustausch-Chromatographie; Fluss 300  $\mu$ l/min  
 Säule: Uno-Q HR 5/2, (Fa. Amersham-Pharmacia, Schweden)  
 Laufmittel A: 20 mM  $K_2HPO_4$  in Wasser  
 Laufmittel B: 20 mM  $K_2HPO_4$ / 1M NaCl-Lösung in Wasser

Zeit (min)	0	2	22	22,5	23,5
Gehalt Laufmittel B (%)	0	5	40	100	100

### 3.2.12.2. Enzymatische Spaltung mit 5'-Nukleotidase

Zur Spaltung mit 5'-Nukleotidase wurden Aliquots der isolierten Substanz der Reversed-Phase-Chromatographie in 10  $\mu$ l Wasser gelöst. 1  $\mu$ l Lösung wurde mit 1  $\mu$ l 5'-Nukleotidase (Lösung 0.01 U/ml) gemischt und bei 37 °C für 5 min inkubiert. Danach wurde die Lösung durch einen Zentrifugen-Filter (Ausschluss-Grenze: 10 kDa) zentrifugiert und über eine Anionenaustausch-Chromatographie (Uno-Q HR 5/2) unter den oben genannten Bedingungen (siehe **Tabelle 6**) chromatographiert.

### 3.2.12.3. Enzymatische Spaltung mit 3'-Nukleotidase

Zur Spaltung mit einer 3'-Nukleotidase wurden Aliquots der isolierten Substanz der Reversed-Phase-Chromatographie in 10  $\mu$ l Wasser gelöst. 1  $\mu$ l Lösung wurde mit 1  $\mu$ l 3'-Nukleotidase (Lösung 0.01 U/ml) gemischt und bei 37 °C für 5 min inkubiert. Danach wurde die Lösung durch einen Zentrifugen-Filter (Ausschluss-Grenze: 10 kDa) zentrifugiert und über eine Anionenaustausch-Chromatographie (Uno-Q HR 5/2) unter den oben genannten Bedingungen (siehe **Tabelle 6**) chromatographiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Gewinnung des Probenmaterials

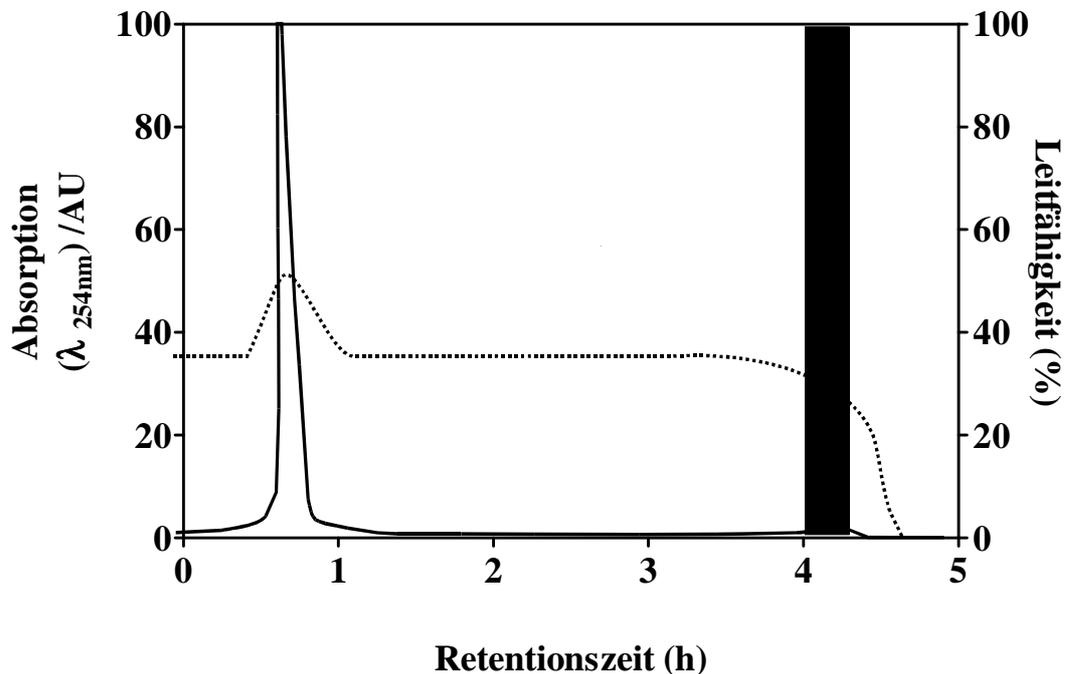
Von der Schlachtereier wurden frische Rindernebenieren bezogen. Die Nebenieren wurden zermörsert und homogenisiert. Nach der anschließenden Lyophilisation erfolgte die Extraktion. Im Folgenden wird die chromatographische Isolierung und primär massenspektrometrische Identifizierung des Ap<sub>3</sub>G beschrieben. Die Ergebnisse der einzelnen Arbeitsschritte werden im Folgenden dargestellt.

### 4.2. Präparative Reversed-Phase-Chromatographie

Nachdem die Proteine mit Perchlorsäure denaturiert und der Überstand neutralisiert worden war, wurde das resultierende Extrakt lyophilisiert und mittels der präparativen Reversed-Phase-Chromatographie fraktioniert. Die **Abbildung 2** zeigt ein charakteristisches Chromatogramm dieser präparativen Reversed-Phase-Chromatographie. Bei einer Retentionszeit von 4 Stunden und 1 Minute bis 4 Stunden und 15 Minuten wurde das charakteristische Absorptionsmaximum bei 254 nm für Dinukleotide detektiert. Der Balken kennzeichnet die Fraktionen, die gesammelt wurden.

Die UV-Absorption wird hier, wie auch in den übrigen Chromatogrammen, in dimensionslosen Absorptionseinheiten (AU) angegeben. Die gestrichelte Kurve stellt die Leitfähigkeit dar. Die durchgezogene Kurve stellt die UV-Absorption dar. Die Balken zeigen die Fraktionen, die weiter chromatographiert wurden.

*Abbildung auf der nächsten Seite*

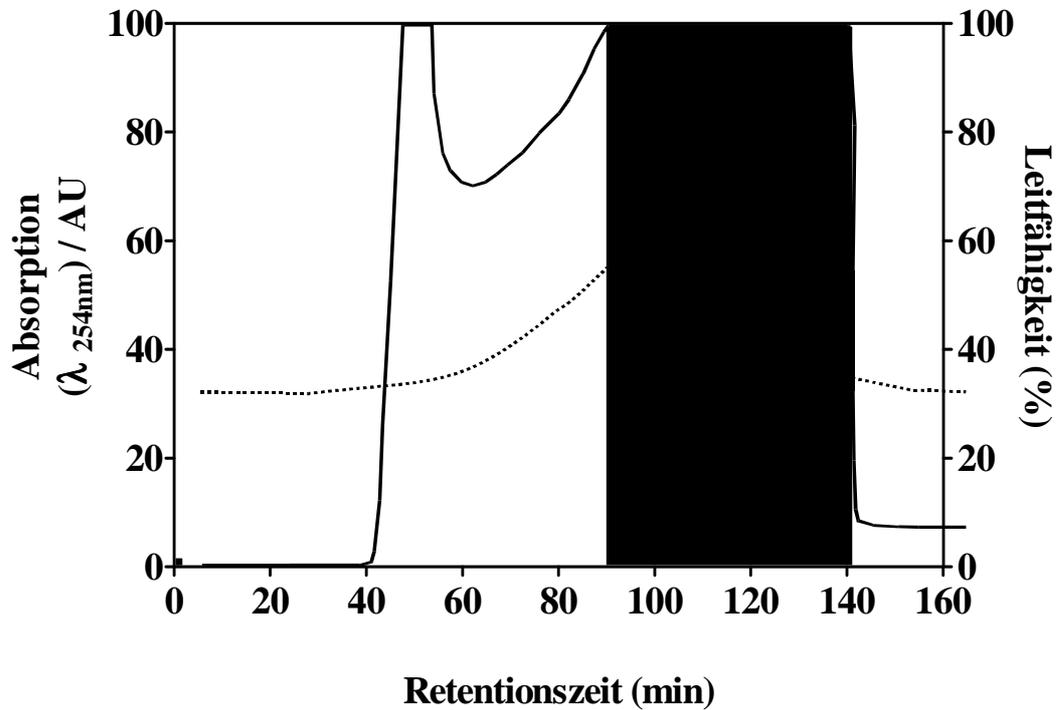


**Abbildung 2:** Präparative Reversed-Phase Chromatographie

Probe:	Extrakt der Rindernebenniere nach Lyophilisation
Säule:	Reversed-Phase C18 Säule (310 mm x 25 mm, Korngröße 40-63 $\mu\text{m}$ , Merck, Deutschland)
Laufmittel A:	40 mM TEAA in Wasser
Laufmittel B:	30 Vol % Azetonitril in Wasser
Flussrate:	5 ml/min
UV-Detektion:	254 nm
—:	UV-Absorption
····:	Leitfähigkeit (in %)
█ :	Retentionszeitbereich, in dem das Eluat für weitere Fraktionierungen gesammelt wurde

### 4.3. Größenausschluss-Chromatographie

Das Eluat der Reversed-Phase-Chromatographie (**Abbildung 2** mit dem Balken gekennzeichnet) wurde lyophilisiert und mittels einer Größenausschluss-Chromatographie weiter fraktioniert. **Abbildung 3** zeigt die resultierende Größenausschluss-Chromatographie. Bei der Größenausschluss-Chromatographie erfolgt die Trennung aufgrund der molekularen Größe. Der entsprechende Retentionszeitenbereich von 90 min bis 142 min ist in **Abbildung 3** durch den Balken markiert.

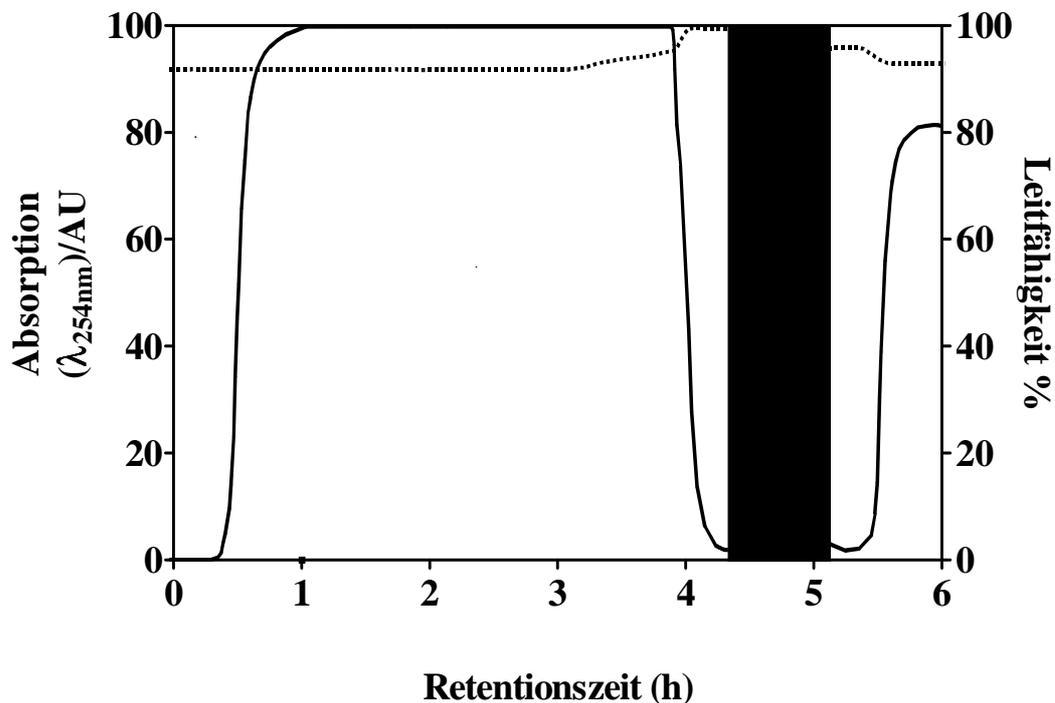


**Abbildung 3:** Größenausschluss-Chromatographie

Probe:	Eluat der präparativen-Reversed-Phase-Chromatographie (in Abbildung 2 mit einem Balken gekennzeichnet)
Säule:	Glassäule 100 cm x 2 cm mit Sephacryl-100-High-Resolution Gel S-100 Sepharose (Amersham, Pharmacia/ Biosciences, Deutschland)
Laufmittel:	Wasser
Flussgeschwindigkeit:	1 ml/min
UV-Detektion:	254 nm
—: :	UV-Absorption
- - -: :	Leitfähigkeit
 : :	Retentionszeitbereich, in dem das Eluat für weitere Fraktionierungen gesammelt wurde

#### 4.4. Affinitäts-Chromatographie

Das Eluat der Größenausschluss-Chromatographie wurde der Affinitätschromatographie zugeführt. Bei dieser Chromatographie werden Substanzen mit 2 cis-diol-Gruppen retendiert. **Abbildung 4** zeigt das resultierende Chromatogramm. Im Bereich der hohen UV-Absorption zwischen 4,4 und 5,1 Stunden, gekennzeichnet mit dem Balken, wurde das Eluat gesammelt und weiter fraktioniert.

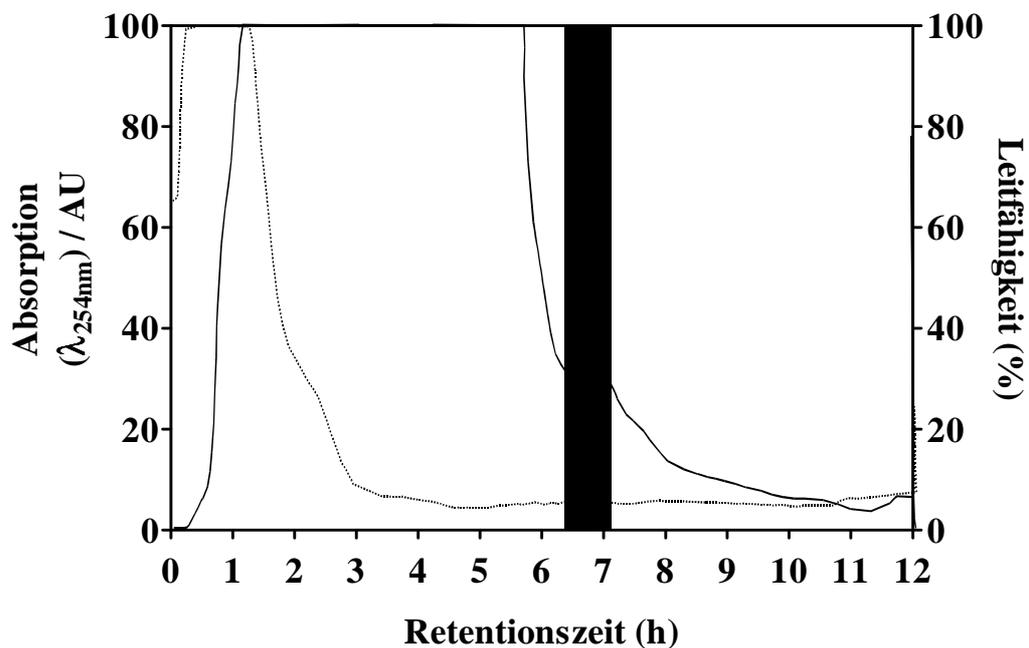


**Abbildung 4:** Affinitätschromatographie

Probe:	Eluat aus der Größenausschlusschromatographie mit Balken gekennzeichnet
Chromatographie-Gel:	m-Amino-Phenylboronsäure (Acrylmatrix, Korngröße 70-150 $\mu\text{m}$ , Hersteller: Biorad, Deutschland)
Laufmittel A:	1 M Ammoniumazetat in Wasser
Laufmittel B:	10 mM HCl in Wasser
Fluss:	2 ml/min
UV-Detektion:	254 nm
— :	UV-Absorption
- - - :	Leitfähigkeit
■ :	Retentionszeitbereich, in dem das Eluat für weitere Fraktionierung gesammelt wurde

#### 4.5. Displacement-Chromatographie

Das Eluat der Affinitätschromatographie wurde auf zwei in Serie geschalteten Reversed-Phase Chromatographiesäulen im Displacement-Modus weiter fraktioniert. **Abbildung 5** zeigt das resultierende Chromatogramm. In dem Chromatogramm ist das UV-Absorptionsmaximum dargestellt. In der Zeit von 6 Stunden und 20 Minuten bis bis 7 Stunden und 5 Minuten wurde das Eluat gesammelt.

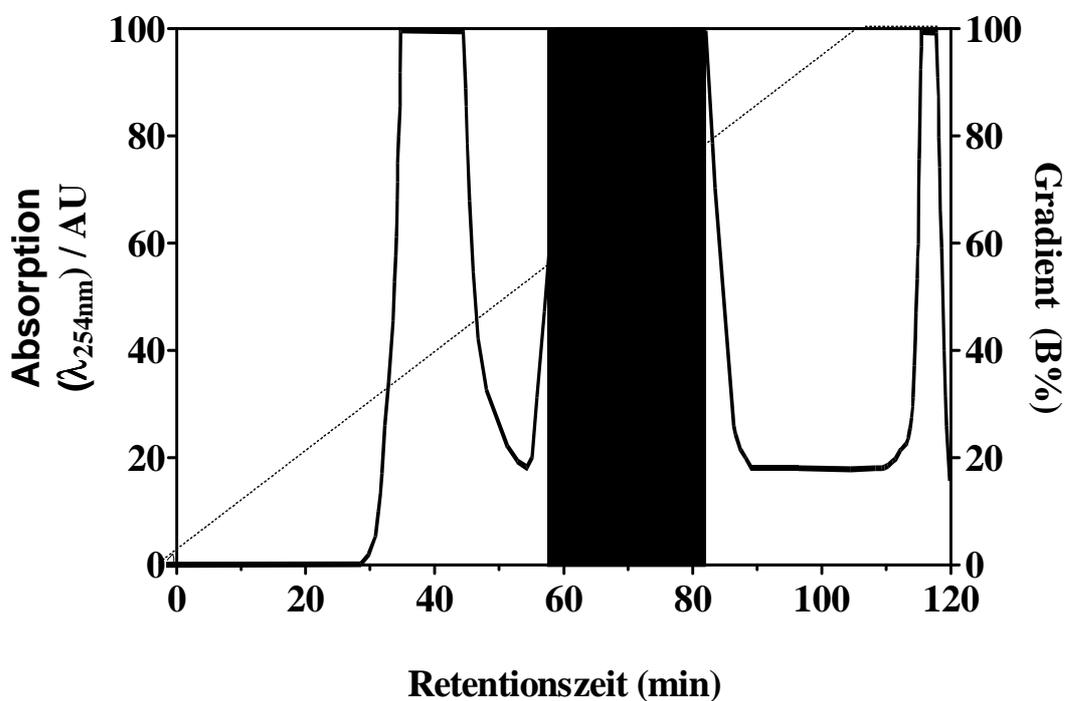


**Abbildung 5:** Displacement-Chromatographie

Probe:	Eluat der Affinitäts-Chromatographie
Säule:	zwei in Serie geschaltete Reversed Phase Chromatographien (Merck, Deutschland)
Laufmittel:	40 mM TEAA-Wasser
Displacer:	160 mM n-Butanol in 40 mM TEAA in Wasser
Flussrate:	0,1ml/min
UV-Detektion:	254 nm
—: :	UV-Absorption
- - -: :	Leitfähigkeit
■: :	Retentionszeitbereich, in dem das Eluat für weitere Fraktionierungen gesammelt wurde

#### 4.6. Analytische Anionenaustausch-Chromatographie

Das Eluat der Displacement-Chromatographie wurde gesammelt und mittels einer Anionenaustausch-Chromatographie über eine Anionenaustauscher-Säule chromatographiert. Die Fraktionierung erfolgte hierbei durch die unterschiedlich starke anionische Ladung. **Abbildung 6** zeigt das resultierende Chromatogramm. Im Absorptionsmaximum zwischen der 58. und der 82. Minute wurde das Eluat gesammelt, im Chromatogramm gekennzeichnet durch einen Balken.

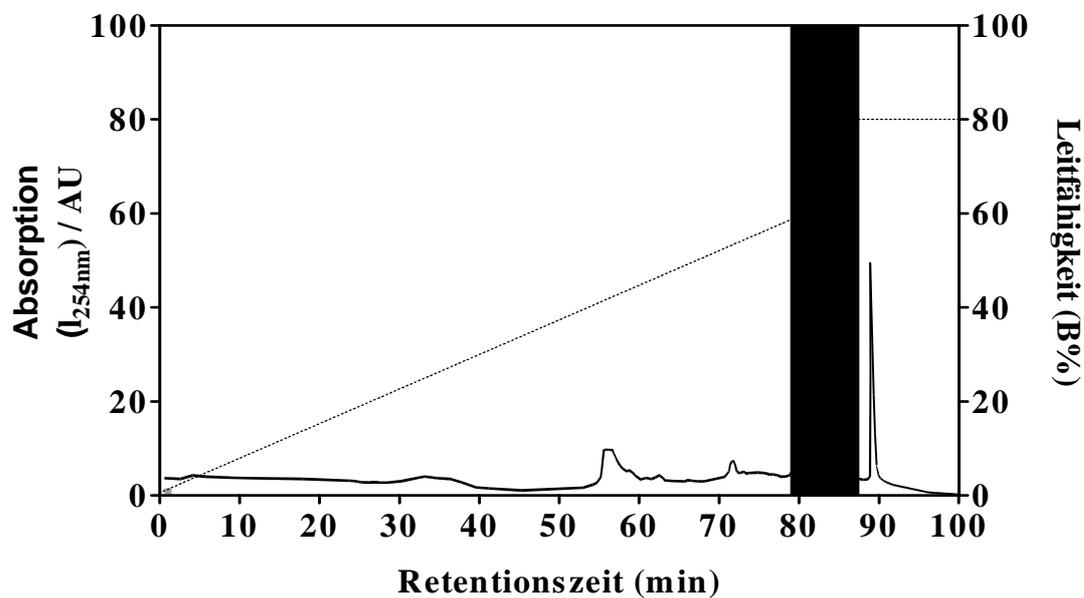


**Abbildung 6** Analytische Anionenaustausch-Chromatographie

Probe:	Eluat der Displacement-Chromatographie
Säule:	Anionenaustauscher Uno-Q-1 (Pharmacia, Schweden)
Laufmittel A:	10 mM $K_2HPO_4$ in Wasser, pH 8
Laufmittel B:	50 mM $K_2HPO_4$ und 1M NaCl-Lösung in Wasser; 0 min: 0% B; 0-10 min: 0-5% B; 10-100 min: 5-35% B; 100-105 min: 35-40% B; 105-115 min: 40-100% B
Fluss:	0,5 ml/min
UV-Detektion:	254 nm
— :	UV-Absorption
..... :	Leitfähigkeit
■ :	Retentionszeitbereich, in dem das Eluat für weitere Fraktionierungen gesammelt wurde

#### 4.7. Analytische Reversed-Phase-Chromatographie

Die Fraktionen Anionenaustausch-Chromatographie, gekennzeichnet durch den Balken, wurden mittels einer analytischen Reversed-Phase-Chromatographie weiter fraktioniert. Das resultierende Reversed-Phase-Chromatogramm ist in **Abbildung 7** gezeigt. In dem Chromatogramm sind in der 79. und 87. Minute Absorptionsmaxima. Im Chromatogramm, gekennzeichnet durch einen Balken, wurden die den Absorptionsmaxima zugrunde liegenden Substanzen pur isoliert gesammelt.



**Abbildung 7:** Analytische Reversed-Phase-Chromatographie

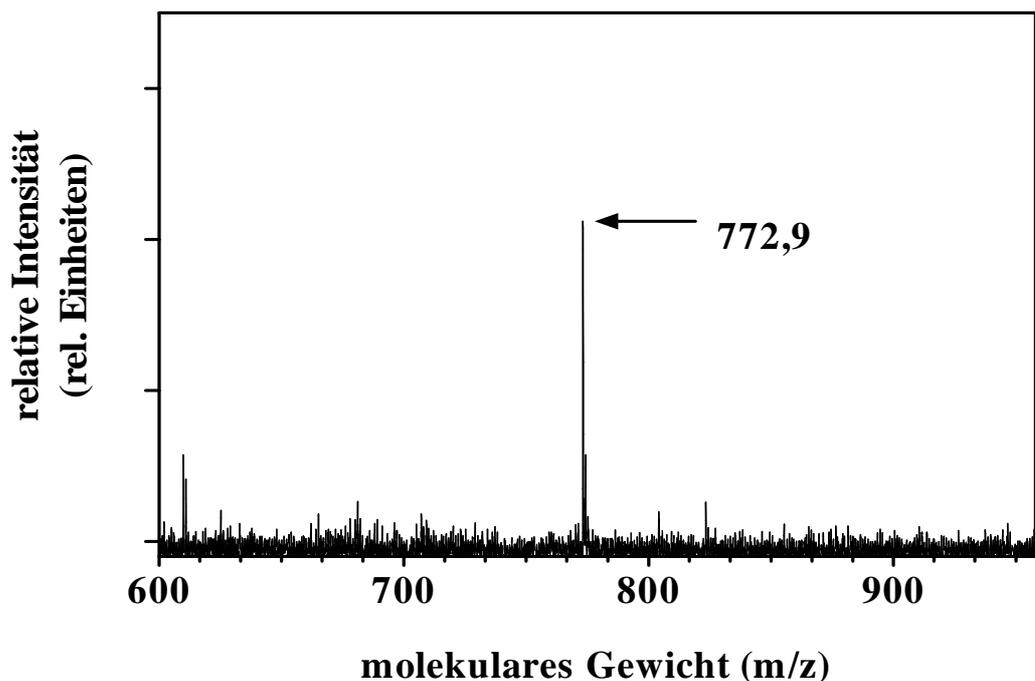
Probe:	Eluat der Anionenaustausch-Chromatographie gesammelt in
Säule:	analytische Reversed-Phase-Chromatographie (Superspher 100 C18 endc., 250 mm x 4 mm, Merck, Deutschland)
Laufmittel A:	40 mM TEAA-Wasser
Laufmittel B:	100%iges Azetonitril
Fluss:	0 min: 0% B; 0-4 min: 0-2% B; 4-79 min: 2-7% B; 80-85 min: 7-60% B; 86-90 min: 60-80% B; 90-100 min: 80% B
UV-Detektion:	0,5 ml/min
_____:	254 nm
_____:	UV-Absorption
-----:	Leitfähigkeit
█ :	Retentionszeitbereich, in dem das Eluat für weitere Fraktio- nierungen gesammelt wurde

Die Retentionszeit der in der **Abbildung 7** markierten Fraktion entsprach der Retentionszeit synthetisch hergestellten  $\text{Ap}_3\text{G}$ .

#### 4.8. Matrix-Assisted-Laser-Desorbition/Ionisation-Massen-Spektrometrie

Das lyophilisierte Eluat der Reversed-Phase-Chromatographie, in **Abbildung 7** gekennzeichnet mit dem Balken, wurde mit Hydroxypicolinsäure auf einen MALDI-Probenteller pipettiert und in der Matrix-Assistierte-Laser-Desorbitions-/Ionisations-Massenspektrometrie analysiert. **Abbildung 8** zeigt das resultierende MALDI-Massenspektrum der isolierten Substanz.

In der isolierten Fraktion wurde in der MALDI-Massenspektrometrie eine Masse von 772,9 Da bestimmt. Auf Grund bekannter Massenspektrometriedaten von synthetisch hergestelltem Adenosin-Guanosin-Triphosphat, die zum Vergleich verwendet wurden, konnte die zugrunde liegende Substanz als Adenosin-Guanosin-Triphosphat identifiziert werden.



**Abbildung 8:** Massenspektrum der Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie

Probe:	lyophilisierte Fraktion der Reversed-Phase-Chromatographie
Matrix:	Hydroxypicolinsäure, 50mg/ml
Abszisse:	Masse
Ordinate:	relative Intensität

#### 4.9. Post-Source-Decay-Maldi-MS

Zur exakten Identifizierung der untersuchten Substanz folgte im Anschluss eine Post-Source-Decay-MALDI-MS von dem Eluat, das in **Abbildung 7** mit dem Balken gekennzeichnet ist. In der rechten Spalte sind die Fragment-Massen der PSD-MALDI-Massenspektrometrie aufgeführt. In der linken Spalte sind die Massen den entsprechenden Fragment-Ionen zugeordnet.

**Tabelle 7:** Molekulare PSD-Fragment-Massen der isolierten Substanz Adenosin-Guanosin-triphosphat. Abkürzungen: M<sup>+</sup> = Mutterion; G' = Guanin; G = Guanosin; A' = Adenin; A = Adenosin; p = Phosphatgruppe, z. B. Ap<sub>1</sub> = AMP

Fragment-Ionen	Ap <sub>3</sub> G (Da)
A'	136
G'	152
A - 2 H <sub>2</sub> O	235
G - 2 H <sub>2</sub> O	252
Gp <sub>1</sub>	357
Ap <sub>2</sub> - H <sub>2</sub> O	409
Ap <sub>2</sub>	428
Gp <sub>2</sub>	447
M - Gp <sub>2</sub>	330
M - Gp <sub>1</sub>	410
M - G + H <sub>2</sub> O	609
M - G'	622
M - A'	635
M	773

#### 4.10. Retentionszeitenvergleich mittels Analytischer Reversed-Phase-Chromatographie

Die Retentionszeit der isolierten Substanz aus der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie wurde mit Retentionszeiten von synthetisch hergestelltem Adenosin-Guanosin-Triphosphat

verglichen. Die Retentionszeit der isolierten Substanz entsprach der Retentionszeit von synthetisch hergestelltem Adenosin-Guanosin-Triphosphat.

#### 4.11. UV-Spektroskopie

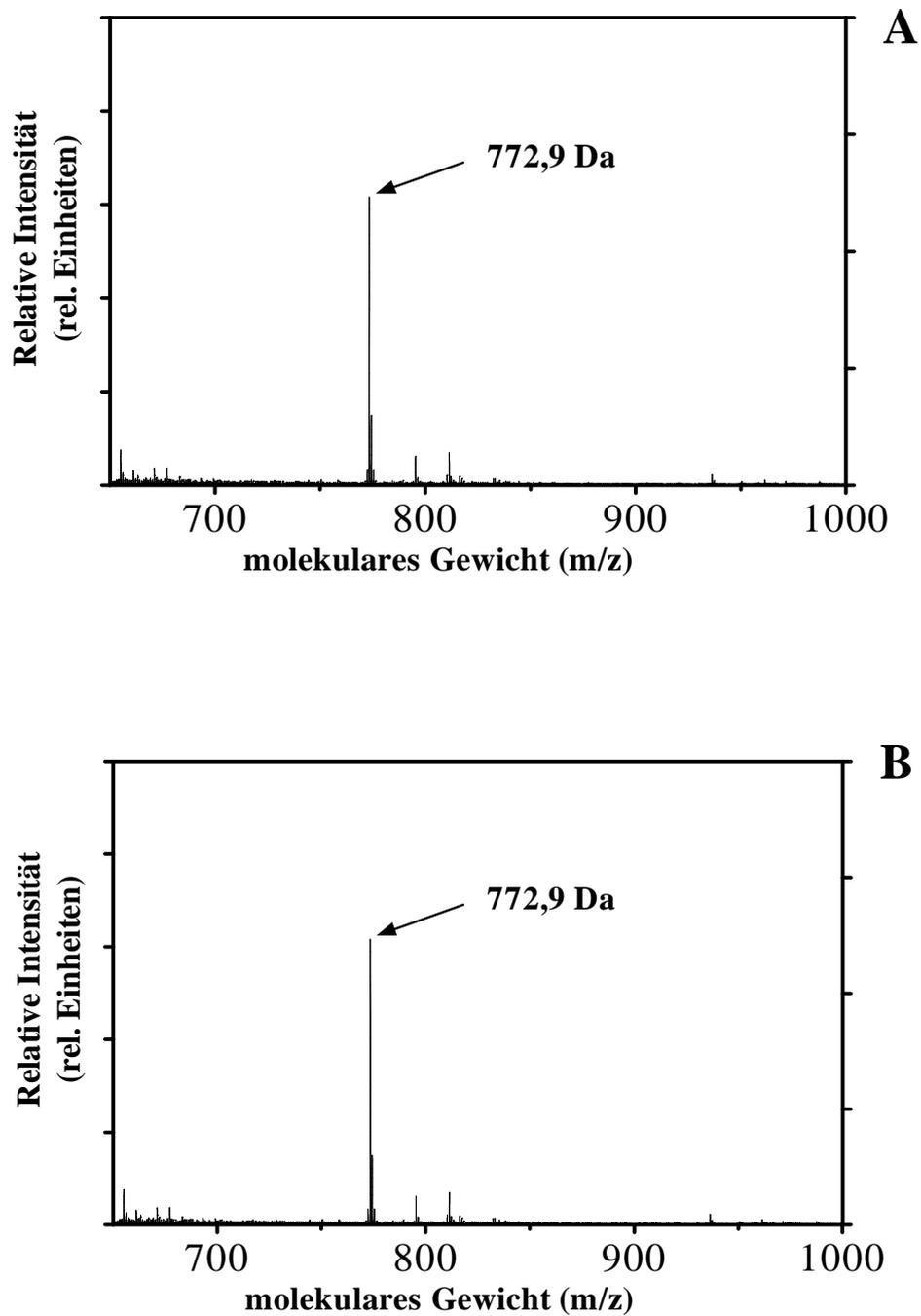
Zur weiteren Klärung ob es sich bei der isolierten Substanz um Adenosin-Guanosin-Triphosphat handelt, wurden UV-spektroskopische Untersuchungen bei einem Absorptionsmaximum von 200 bis 300 nm und einem pH von 3, 7 und 9 zur Bestimmung der Substanzklassen der isolierten Substanz durchgeführt. Die entsprechenden Absorptionsspektren wurden aufgenommen. Verwendet wurden die Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie, gekennzeichnet mit einem Balken in **Abbildung 7**. Zur Kontrolle wurde unter identischen Bedingungen eine UV-Spektrometrie von synthetisch hergestelltem Adenosin-Guanosin-Triphosphat durchgeführt, die ein identisches Ergebnis wie die Fraktion der Reversed-Phase-Chromatographie erbrachte.

**Tabelle 8:** Maxima und Minima der UV-Absorption der isolierten Substanz (Abbildung 7) bei unterschiedlichen pH-Werten.

	pH 3		pH 7		pH 9	
	$\lambda_{\min}$ / nm	$\lambda_{\max}$ / nm	$\lambda_{\min}$ / nm	$\lambda_{\max}$ / nm	$\lambda_{\min}$ / nm	$\lambda_{\max}$ / nm
Ap <sub>3</sub> G	230.1	256.8	227.8	255.1	226.9	255.0

#### 4.12. Enzymatische Spaltungen

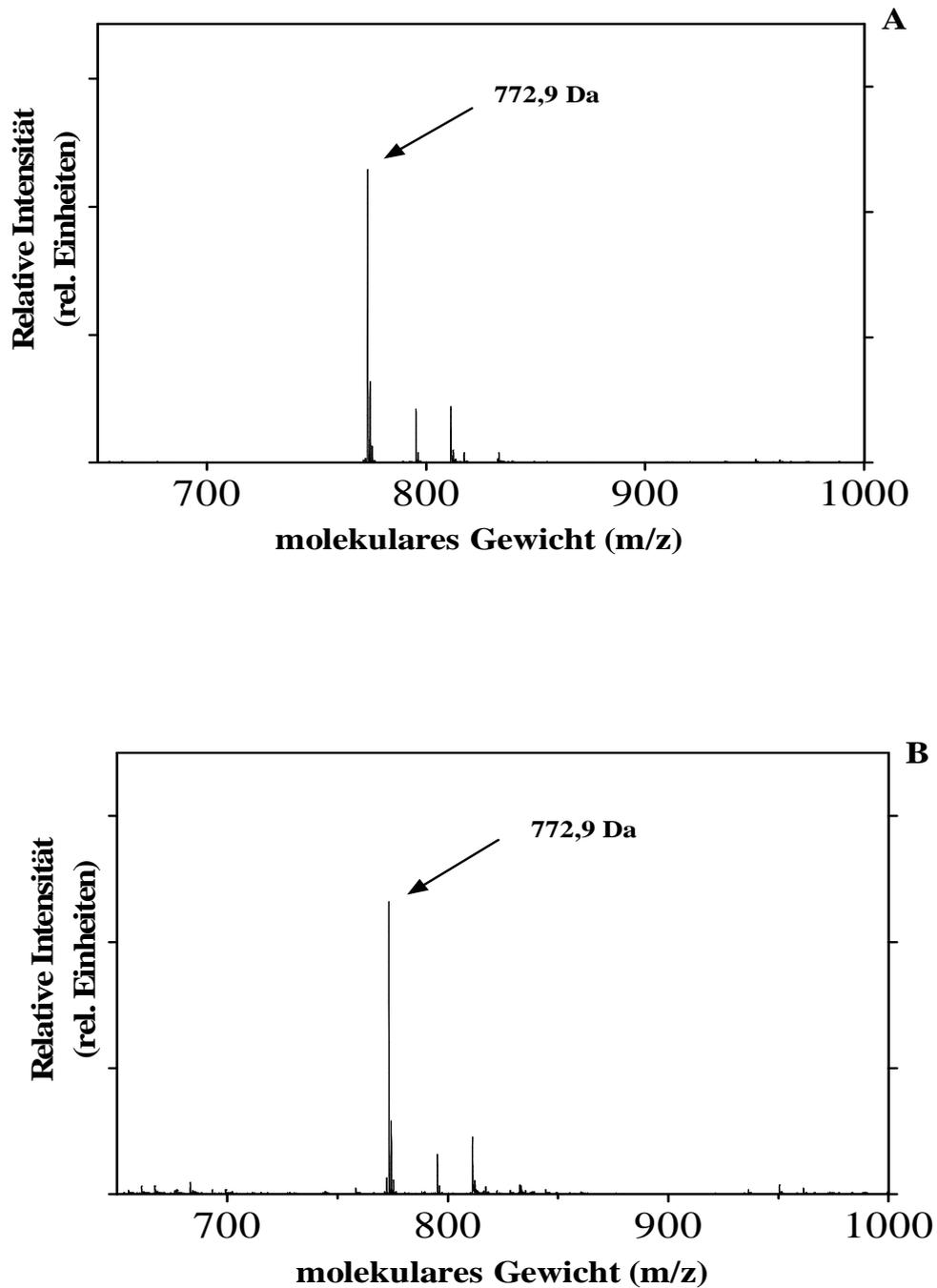
Aus Ergebnissen mit synthetisch hergestelltem Adenosin-Guanosin-Triphosphat und Vergleichen mit der isolierten Substanz der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie, wurde die aufgereinigte Substanz als Adenosin-Guanosin-Triphosphat identifiziert. Die Proben aus der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie wurden aufgereinigt, entsalzt und lyophilisiert. Anschließend erfolgte die massenspektrometrische Untersuchung vor und nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase, 3'-Phosphodiesterase und 5'-Phosphodiesterase.



**Abbildung 9:** Massenspektren der isolierten Substanz vor (A) und nach (B) Inkubation mit alkalischer Phosphatase

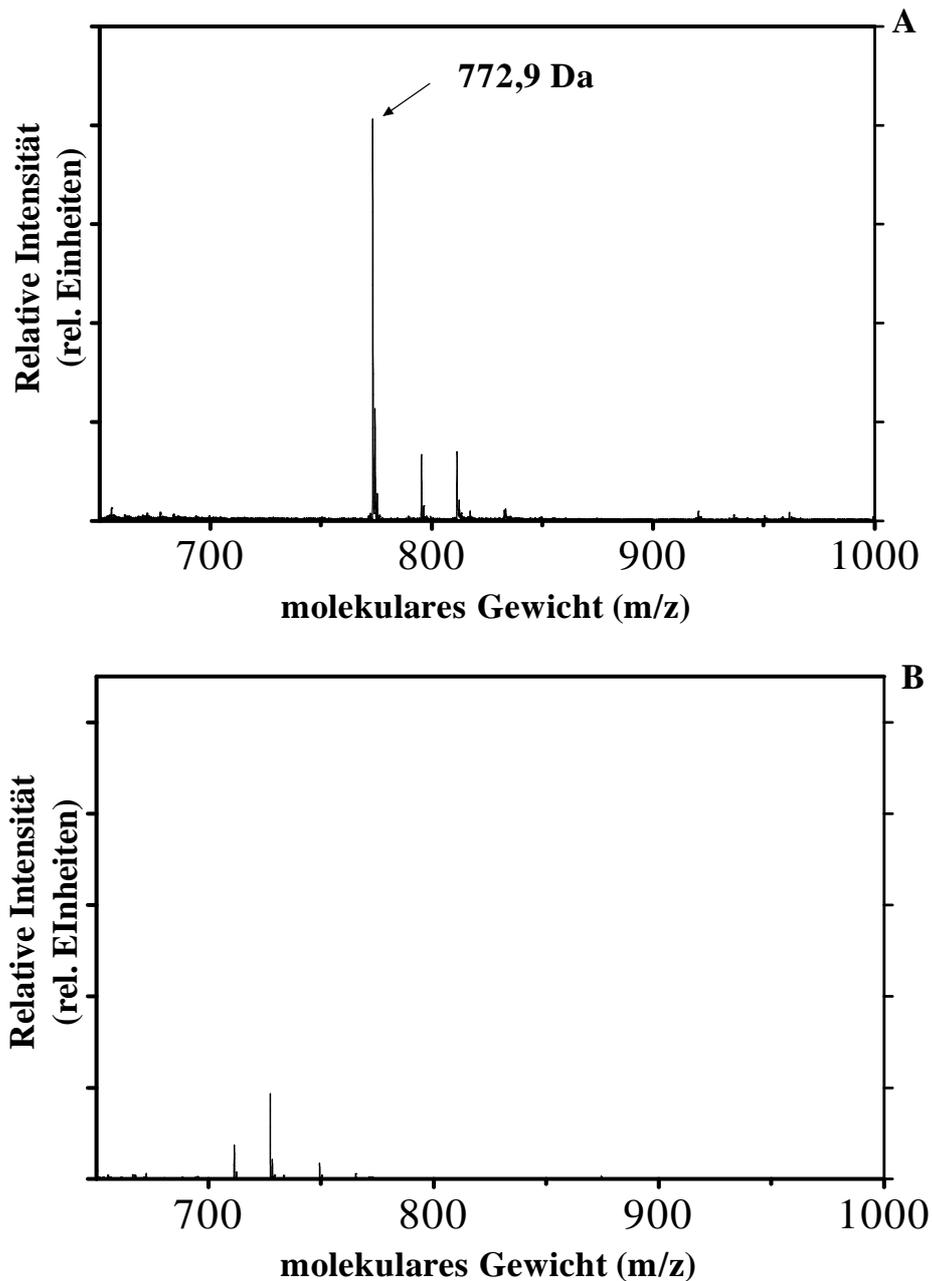
Nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase wurde die gleiche Massenzahl ermittelt die vor der Inkubation mit der alkalischen Phosphatase detektiert wurde. Eine Spaltung der Probenmoleküle

mit der alkalischen Phosphatase war also nicht erfolgt. Daraus lässt sich folgern, dass die Phosphatgruppen nicht endständig an der Ribose gebunden sind, sondern zwischen zwei Ribosen als Kette im Innern des Moleküls vorliegen müssen.



**Abbildung 10:** Massenspektren der isolierten Substanz vor (A) und nach (B) Inkubation mit 3'-Phosphodiesterase

Nach der Inkubation mit 3'-Phosphodiesterase wurde das gleiche Massensignal wie vor der Inkubation mit 3'-Phosphodiesterase gemessen. Eine 3'-Verknüpfung mit der Ribose liegt also nicht vor.



**Abbildung 11:** Massenspektren der isolierten Substanz vor (A) und nach (B) Inkubation mit 5'-Phosphodiesterase

Nach Inkubation mit der 5'-Phosphodiesterase wurden andere Massensignale als vor Inkubation gemessen. Die Massen entsprachen den Spaltungsprodukten AMP, ADP, GMP und GDP im Massenspektrum. Es liegt also eine 5'-Bindung von Ribose mit der Phosphatgruppe vor. Dass es sich um Bruchstücke von RNA oder DNA handelt, kann ausgeschlossen werden, da diese auch nach Inkubation mit der 3'-Phosphodiesterase gemessen würden.

## 5. Diskussion

Die Ursachen des Bluthochdruckes, speziell des primären (essentiellen) Bluthochdruckes, sind weiterhin nicht vollständig aufgeklärt. Die Untersuchung von Mediatoren, die einen Bluthochdruck durch vasokonstriktive Eigenschaften oder Wachstumsstimulation glatter Gefäßmuskelzellen bewirken oder modulieren, ist daher für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte unerlässlich. In den letzten Jahren wurden hierbei Substanzen identifiziert, bei denen es sich um Diadenosin-Polyphosphate handelt. Seit der ersten Beschreibung des Diadenosin-Triphosphat ( $Ap_3A$ ) in menschlichen Thrombozyten ist eine zunehmende Anzahl analoger Substanzen bei Säugetieren und Menschen beschrieben worden. In weiteren Analysen wurden diese Dinukleotid-Polyphosphate auch in der Plazenta und in den Nebennieren isoliert (Schlüter et al, 1994 und 1996, Jankowski et al, 2001). Zuerst gelang es, Diadenosin-Polyphosphate mit 4, 5 oder 6 Polyphosphatgruppen ( $Ap_nAs$ ) in menschlichen Zellen nachzuweisen (Ralevic, 2001). In weiteren Untersuchungen wurden Dinukleotid-Polyphosphate mit Adenosin und Guanosen als Nukleotid identifiziert, die 2, 3, 4, 5 und 6 Polyphosphatgruppen enthalten ( $Ap_nGs$ ).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung der Substanz Adenosin-Guanosen-Triphosphat ( $Ap_3G$ ) aus Nebennieren. Adenosin-Guanosen-Triphosphat ist eine Substanz, die stark vasokonstringierend wirkt und durch Wachstumsstimulation glatter Gefäßmuskelzellen den Blutdruck beeinflusst (Hollah, 2001). Die Substanz kann nicht einfach nachgewiesen werden, daher war eine aufwendige Isolierung und Nachweis per Massenspektrometrie erforderlich. Die Isolierung der Substanz aus Nebennieren macht deren weiterführende Untersuchung zum Verständnis der Genese des Bluthochdruckes sowie die Entwicklung neuer Therapieoptionen zur Kontrolle des Bluthochdruckes möglich. Dinukleotid-Polyphosphate sind nicht durch eine Antikörper vermittelte Reaktion und Nachweis zu identifizieren. Um Dinukleotid-Polyphosphate in Zellen oder Geweben nachzuweisen, war es notwendig, dass diese Substanzen homogen

vorliegen, um sie dann mit physikalisch-chemischen Analysen zu identifizieren. Das frisch gewonnene Nebennierengewebe wurde zur Minimierung eines enzymatischen Abbaus vor der Analytik nach dem Verfahren nach Wheelock behandelt (Wheelock et al., 1991): Das Rindernebenierengewebe wurde in flüssigem Stickstoff bei  $-80\text{ °C}$  12 Stunden tiefgefroren. Anschließend erfolgten Lyophilisation und Pulverisierung. Damit konnte eine Zersetzungsreaktion größtenteils verhindert werden und die zu untersuchende Substanz schonend freigesetzt werden. Zuerst wurde eine große Anzahl kleiner hydrophobischer und hydrophiler Substanzen wie Lipide und Kohlenhydrate mittels einer präparativen Reversed-Phase-Chromatographie von dem zu isolierenden Adenosin-Guanosin-Triphosphat getrennt (**Abbildung 2**). Die Reversed-Phase-Chromatographie wurde verwendet, um wenig polare Stoffe wie Lipide und stark polare Stoffe wie Kohlenhydrate abzutrennen. Um die Anbindung der hydrophilen Substanz an die unpolare Säule zu ermöglichen, wurde das Ionenpaarreagenz Triethylammoniumacetat verwendet. Triethylammoniumacetat maskierte anionische Anteile der Nukleotide, dadurch kann die hydrophile Substanz an die unpolare Säule binden. Durch hydrophobe Wechselwirkungen bei der Reversed-Phase-Chromatographie werden generell Probenmoleküle absorbiert. Verwendet wurde ein präparatives C18-Chromatographie-Gel. Eluiert wurden die Nukleotide mit einer dreißigprozentigen Azetonitrillösung, da sehr unpolare Stoffe stärker an die Säule binden und dann nur mit höheren Azetonitrillösungen eluiert werden können. Das Eluat wurde anschließend lyophilisiert, um störende Lösungsmittel zu entfernen. Anschließend wurde das Eluat der Reversed-Phase-Chromatographie mittels einer Größenausschluss-Chromatographie bezüglich der molekularen Größe weiter fraktioniert (**Abbildung 3**). Adenosin-Guanosin-Triphosphat gehört zu der Gruppe der Dinukleotid-Polyphosphate. Dinukleotid-Polyphosphate sind hauptsächlich an Proteine gebunden, daher ist zu vermuten, dass Adenosin-Guanosin-Triphosphat an Protein gebunden vorliegt. Um die Proteine aus dieser Bindung zu verdrängen, wurde entsprechend dem Massenwirkungsgesetz Adenosin-Triphosphat im Überschuss zur Probe gegeben. Das Adenosin-Triphosphat konkurriert mit dem Adenosin-Guanosin-Triphosphat um die Proteinbindung, die Adenosyl-Polyphosphate werden dann von der Proteinbindung verdrängt. Darauf einsetzende enzymatische Abbaureaktionen werden durch zugeben von Ethylendiamintetraessigsäure verhindert. Ethylendiamintetraessigsäure bindet Calciumionen und kann so Calcium abhängige enzymatische Abbaureaktionen verhindern. Die Fraktionierung erfolgte hier aufgrund der unterschiedlichen Molekülgröße. Es wurde eine S-100-Trennsäule verwendet, die aus einem porösen Gel besteht. Das Gel besteht aus einem mit Acrylamid quervernetzten Dextrapolymer mit

einem Trennbereich von 1-100 k Da und einer hohen mechanischen Stabilität, wodurch reproduzierbare Resultate erzielt werden konnten. Im Gelmaterial befinden sich Poren. Die Substanzen der Probe, die kleiner sind als die in der Gelmatrix befindlichen Poren, diffundieren in die Poren hinein. Substanzen mit einem großen Molekulargewicht diffundieren nicht in die Poren des Gels und werden das System schneller durchlaufen. Dabei wurde Wasser als Laufmittel eingesetzt. Durch das ausgewählte Chromatographiegel mit negativer Ladung wurden die Moleküle gleichzeitig durch ihre elektrostatische Wechselwirkung, wie Ionenaustausch, Ionenausschlussmechanismus, hydrophobe Wechselwirkungen und  $p-\pi-p-\pi$ -Wechselwirkungen getrennt. Die ebenfalls negativ geladenen Nukleotide werden beim Ionenausschlussmechanismus von der Oberfläche des Gels abgestoßen und dringen nicht in die Poren des Gels ein. Die Nukleotide erfahren eine Repulsion und eluieren früher, als es ihrem Molekulargewicht entspricht. Positiv geladene Probenmoleküle werden durch Ionenaustauschkraften verstärkt an die Oberfläche des Gels gebunden. Dadurch wird der Transport der positiv geladenen Moleküle durch die Säule verzögert. Es resultiert für positive Probensubstanzen eine verlängerte Retentionszeit. Der Ionenaustauschmechanismus und der Ionenausschlussmechanismus lassen sich durch Änderung des pH-Wertes in der mobilen Phase durch die Zugabe eines Puffers von 0,3-0,5 M NaCl ausschalten, da die Ladungen der Probenmoleküle reduziert werden. Neutrale Substanzen eluieren ihrem Molekulargewicht entsprechend.

Im nächsten Schritt erfolgte eine selektive Konzentrierung von Nukleotiden, die zwei oder mehr 1,2-cis-diol Gruppen enthalten, mit der Affinitäts-Chromatographie (**Abbildung 4**). In diesem Schritt wurden Dinukleotid-Polyphosphate von Mononukleotid-Polyphosphaten getrennt. Hierbei wurde eine PBA-Säule verwendet. An den Kationenaustauscher Bio-Rex-70-Gel wurde Phenylboronsäure angelagert. Aufgrund der negativen Ladung werden Diadenosin-Polyphosphate von den alkalischen Austauschgruppen des Kationenaustauschers abgestoßen. Nukleotide wie ATP mit weniger als zwei cis-diol-Gruppen binden nicht an das Boronsäuregel in Anwesenheit einer 1 M Ammoniumacetatlösung aufgrund von ladungsabhängigen Abstoßungsreaktionen zwischen den negativen Phosphatgruppen und den funktionellen Gruppen des Kationenaustauschergels. In einer Borylesterformation der zwei cis-diol Gruppen der Dinukleotid-Polyphosphate sind die Bindungskräfte stärker als die Abstoßungskräfte. Moleküle mit zwei cis-diol-Gruppen binden kovalent oder komplex mit der Gelmatrix. Adenosin-Guanosin-Triphosphat bindet auf Grund der cis-Diol-Gruppen der beiden Basen an die Phenylboronsäure, da die Bindungskraft der Phenylboronsäure größer als die Abstoßungskraft des Kationenaustauschers war. Die Bindung der

Diadenosyl-Polyphosphate an die Phenylboronsäure ist abhängig vom pH-Wert und der Salzkonzentration. Ein pH-Wert von unter 9,5 bewirkte eine hydrolytische Spaltung der cis-diol-Gruppen. Dadurch werden die Abstoßungskräfte durch den Puffer nicht mehr kompensiert. Es resultiert eine verstärkte Abstoßungskraft. Die Elution erfolgte daher mit 10 mM HCl. HCl bewirkt eine Senkung des pH-Wertes und die gebundenen Substanzen der Probe eluieren. Das Eluat enthielt mindestens 2 cis-Diol-Gruppen.

In der folgenden Displacement-Chromatographie wurde das Eluat der Affinitätschromatographie weiter fraktioniert (**Abbildung 5**). Substanzen, die auf der stationären Phase gebunden sind, werden durch eine Substanz (Displacer), deren Affinität zum Säulengel höher ist, von ihren Bindungsstellen verdrängt. Die Trennleistung erfolgt auf Grund hydrophober Effekte bei steigender Affinität der Substanzen zu einer mit C18-Ketten modifizierten Silicagel-Säule. Dadurch werden irreversible Proteinbindungen verhindert. Die Oberfläche besteht aus einer unpolaren stationären Phase. Je unpolarer die Substanzen der mobilen Phase sind, um so mehr binden sie an die stationäre Phase des Chromatographiegels. Dinukleotid-Polyphosphate sind polar, um sie zu retendieren musste dem entsprechend Triethylammoniumazetat als Ionenpaarreagenz zugegeben werden. Als Displacerlösung diente Butanol. Der Alkohol Butanol hat eine höhere Affinität zu den absorptiven Bindungszentren der stationären Phase als die Probenbestandteile, die daher von den Bindungszentren verdrängt werden. Während des Trennvorgangs bildete sich entlang der Säule ein Displacementtrain aus. Es handelt sich um einzelne Rechteckbanden mit hoher Reinheit und Konzentration der Probensubstanzen. Im Chromatogramm erscheinen sie als stufenartige UV-Peaks, da sie in Reihenfolge ihrer Ausbildung eluieren. Mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge wurde das Triethylammoniumazetat und Lösungsmittel vom Eluat getrennt.

Anschließend wurde das Eluat in der analytischen Anionenaustausch-Chromatographie (**Abbildung 6**) nach Ladung und Hydrophobizität auf Grund steigender Affinität zum Anionenaustauscher im Gradientenmodus fraktioniert. Ionenaustauschergele im Anionenaustauscher haben positiv geladene Gruppen (ein quartäres Amin), die kovalent an einer Polymermatrix gebunden sind. Wegen der elektrostatischen Wechselwirkungen mit der stationären Phase der Säule werden anionische Substanzen der mobilen Phase gebunden. Die retendierten anionischen Bestandteile der mobilen Phase werden durch Probenionen ersetzt. Im Gradientenmodus erfolgt die Elution der retendierten Substanzen. Dabei wird die Konzentration der Anionen der mobilen Phase kontinuierlich erhöht, wodurch die Probenmoleküle aus ihren Bindungen verdrängt werden. Abhängig von der Anzahl der Phosphatgruppen haben die Nukleotide eine unterschiedliche Affinität

zum Austauschergel. Die Substanzen mit der geringsten Affinität zum Gelmaterial eluieren zuerst. Dies sind die Moleküle mit niedriger Anzahl negativer Ladungen. Die Bindungsstärke steigt mit Anzahl der negativen Ladungen im Probenmolekül, bei den Dinukleotid-Polyphosphaten mit der Anzahl der Phosphatgruppen.

Durch die analytische Reversed-Phase-Chromatographie (**Abbildung 7**) erfolgte die Trennung hydrophober Nebenbestandteile vom Adenosin-Guanosin-Triphosphat von den anderen Nucleotiden. Die Verwendung einer C18-Ketten-Säule als stationäre Phase sowie Triethylammoniumacetat als Ionenpaar-Reagenz ist gegenüber anderen Methoden z.B. der Silica-Reversed-Phase-Chromatographie und der Perfusions-Chromatographiesäule vorteilhaft. Vor den Untersuchungen von Jankowski et al. wurde Tetrabutylammonium-Hydrogensulfat als Ionenpaarreagenz verwendet. Der Vorteil des Triethylammoniumacetats als Ionenpaarreagenz ist der, dass eine anschließende MALDI-Massenspektrometrie kompatibel ist. Die C18-Ketten-Säule ermöglicht eine bessere Trennung der verschiedenen Dinukleotid-Polyphosphate sowie deren Isolierung, insbesondere bei geringeren Konzentrationen. Wegen des geringeren Widerstandes in der Säule ist die für die Trennung benötigte Perfusionszeit kürzer. Unpolare Substanzen der mobilen Phase binden an das unpolare Gelmaterial der stationären Phase der C18-Ketten-Säule. Durch die Verwendung des Triethylammoniumacetats als Ionenpaarreagenz ist es möglich, das sehr polare Adenosin-Guanosin-Triphosphat an die stationäre Phase der Reversed-Phase-Oberfläche zu binden. Bei Verwendung eines flachen Gradienten werden die eluierenden Substanzen im Vergleich zur isokratischen Elution besser aufgelöst. Anschließend wurden die Proben in einer Vakuumzentrifuge vom flüchtigen Triethylammoniumacetat getrennt, um die Matrix-Assistierte-Laser-Desorptions-Massenspektrometrie (MALDI-Massenspektrometrie) und die UV-Spektrometrie anzuschließen.

Die Fraktionen der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie wurden mit der MALDI-Massenspektrometrie untersucht. Diese massenspektrometrische Methode ist eine einfache und schnelle Möglichkeit zur molekularen Massenbestimmung. Darüber hinaus können durch die selektive Verwendung von Enzymen stereochemische Fragestellungen beantwortet werden.

Enzyme können beispielsweise durch kovalente Bindungen an Sepharosebeads immobilisiert werden. Im Rahmen der Arbeit wurden so, alkalische Phosphatase, 3'-Phosphodiesterase und 5'-Phosphodiesterase immobilisiert.

Nach Lyophilisation wurden die Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie in H<sub>2</sub>O gelöst und mit den immobilisierten Enzymen inkubiert. Nach Inkubation wurde die jeweilige

Inkubationslösung wiederum massenspektrometrisch analysiert. Hierzu wurde der jeweilige Reaktionsansatz mit 3-Hydroxypicolinsäure als Matrix versetzt und direkt in das Massenspektrometer eingebracht (Jankowski, 2001). Es konnte eine Substanz mit einer molekularen Masse von 772,9 DA in der Massenspektrometrie detektiert werden (**Abbildung 8**). Anschließend erfolgte in der PSD-MALDI Massenspektrometrie die Messung der Massensignale (**Tabelle 7**). Zur Bestätigung dieser Annahme wurde die massenspektrometrische Untersuchung auch mit synthetisch hergestelltem, authentischem Adenosin-Guanosin-Triphosphat durchgeführt. Aufgrund der vorliegenden Referenzdaten konnten die in der MALDI-Massenspektrometrie und PSD-MALDI-Massenspektrometrie gemessenen Massensignale Adenosin-Guanosin-Triphosphat zugeordnet werden. Hierbei wurde die gleiche Masse ermittelt. Ein Vergleich der Retentionszeiten der Fraktionen der von authentischem Adenosin-Guanosin-Triphosphat unterstützte diese Annahme. Reversed-Phase-Chromatographie mit den entsprechenden Retentionszeiten. Zur Identifizierung der absorptiven Eigenschaften der Substanzen der Reversed-Phase-Chromatographie wurden UV-spektroskopische Methoden verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass in dem Wellenbereich von 200 bis 300 nm die isolierte Substanz, die für Adenosin beziehungsweise Guanosin charakteristische, pH-Wert abhängige UV-Maxima und UV-Minima aufweist (**Tabelle 8**).

Die Verknüpfung der Phosphate mit Ribosen könnte einerseits über die 5'-Position oder über die 3'-Position der Ribose erfolgen. Die jeweiligen Isomeren wären massenspektrometrisch nicht unterscheidbar, da bei beiden Varianten die gleiche molekulare Masse nachgewiesen würde. Um die jeweilige Bindungsstellen der Phosphatgruppen an den Ribosen zu bestimmen, erfolgte die enzymatische Analytik der isolierten Substanz mit immobilisierter 3'-Phosphodiesterase, 5'-Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase.

Die 5'-Phosphodiesterase, spaltet Nukleotide mit einer 5'-Phosphoesterbindung. Diese finden sich nur an der 5'-Bindungsstelle der Ribose und innerhalb der Phosphatketten. Die 3'-Phosphodiesterase spaltet Nukleotide mit einer 3'-Phosphoesterbindung, diese finden sich an der 3'-Bindungsstelle der Ribose und innerhalb der Phosphatketten. Die alkalische Phosphatase hydrolysiert terminale Phosphoester. Nachdem die Proben mit alkalischer Phosphatase, 3'-Phosphodiesterase und 5'-Phosphodiesterase inkubiert und in einer analytischen Anionen-austausch-Chromatographie fraktioniert worden waren, erfolgte die MALDI-massenspektrometrische Analyse. Die massenspektrometrischen Ergebnisse zeigten, dass sich die Substanz weder durch alkalische Phosphatase (**Abbildung 9**) noch 3'-Phosphodiesterase (**Abbildung 10**) metabolisieren

ließ. Nach Inkubation mit 5'-Phosphodiesterase konnte eine Metabolisierung eindeutig gezeigt werden (**Abbildung 11**). Es wurden zwei Massen für die jeweiligen Nukleotide erhalten, die Adenosin und Guanosin entsprachen, die über ein und zwei Phosphatgruppen an die Ribose gebunden waren. Diese waren Adenosin-Monophosphat und Guanosin-Diphosphat, sowie Guanosin-Monophosphat und Adenosin-Diphosphat. (AMP und GDP sowie GMP und ADP) Die Aufspaltung der Substanz in die Komponenten Adenosin mit Monophosphat bzw. Diphosphat und Guanosin mit Monophosphat bzw. Diphosphat zeigt, dass es sich bei der isolierten Substanz um Adenosin-Guanosin-Triphosphat handelt, wobei die Nukleotide über die 5'-Bindung der Ribose miteinander verbrückt sind. Somit konnte Adenosin-Guanosin-Triphosphat im Nebennierengewebe nachgewiesen werden.

Die Isolierung von Adenosin-Guanosin-Triphosphat ist von besonderem Interesse für die Genese der Hypertonie, da diese Substanz offensichtlich eine große Bedeutung für die Regulation des Blutdruckes hat. Dinukleotid-Polyphosphate sind sowohl als extrazelluläre als auch intrazelluläre Mediatoren an der Regulation von Gefäßtonus sowie an der Proliferation der glatten Muskulatur der Gefäße und der Mesangiumzellen beteiligt (Hoyle, 1990). Adenosin-Guanosin-Triphosphat gehört zu der Gruppe der Dinukleotid-Polyphosphate, die als starke purinerge Agonisten gelten (Jankowski, 2007). Seit der ersten Beschreibung von Diadenosin-Triphosphat in menschlichen Thrombozyten (Lüthje, Olgivie, 1983) wurde eine immer zunehmende Anzahl ähnlicher Dinukleotid-Polyphosphate in Säugetieren und Menschen nachgewiesen, mit unterschiedlichen Purinen und unterschiedlicher Anzahl an Phosphatgruppen, die über Esterbindungen mit den Hydroxylgruppen an den 5'-C-Atomen beider Riboseeinheiten verbunden sind. Es wurden verschiedene Zellen identifiziert, die Ap<sub>n</sub>A offenbar synthetisieren: Thrombozyten (Olgivie, 1983), Erythrozyten (Forester, 1990), Herzzellen (Luo, 1999). Schlüter isolierte Diadenosin-Polyphosphate (Ap<sub>n</sub>A) mit 4, 5, und 6 Phosphatgruppen (Schlüter, 1994). Jankowski isolierte Uridin-Tetraphosphat (Up<sub>4</sub>A) nach einem Versuch mit Ratten (Jankowski, 2005). Der Überstand von stimuliertem menschlichen Gefäßendothel wurde in isoliert perfundierte Rattennieren injiziert, was eine Vasokonstriktion auslöste. Die vasokonstriktorisch aktive Substanz wurde isoliert und als Uridin-Adenosin-Tetraphosphat identifiziert. Erhöhte Konzentrationen von Uridin-Adenosin-Tetraphosphat Up<sub>4</sub>A wurden im Plasma von hypertensiven Kindern gemessen und isoliert. Eine gemessene linksventrikuläre Hypertrophie und verdickte Intima media der A. carotis stand in Korrelation mit den erhöhten Plasmaspiegeln von Up<sub>4</sub>A dieser hypertensiven Kinder (Jankowski,

2007). Castillo, Castro und Pintor beschreiben, dass neben den Thrombozyten, Erythrozyten und dem Herzen auch die Nebennieren Diadenosin-Polyphosphate speichern können (Castillo, 1992).

Diadenosin-Polyphosphate und Adenosin-Guanosin-Polyphosphate wirken vasokonstriktorisch und Wachstum stimulierend auf Gefäßmuskelzellen. Insbesondere der Effekt des Adenosin-Guanosin-Triphosphats in der Vasokonstriktion von Nierengefäßen, und in der Proliferation von glatten Muskelzellen in Gefäßzellen (Schlüter 1998) ist von Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Isolierung des Adenosin-Guanosin-Triphosphat aus Rindernebnieren dargestellt. Mit dem Nachweis von Adenosin-Guanosin-Triphosphat in der Nebenniere können weitere Untersuchungen folgen. Als nächstes sollte untersucht werden, ob Adenosin-Guanosin-Triphosphat bei Menschen nachweisbar ist und ob Adenosin-Guanosin-Triphosphat bei Bluthochdruckpatienten erhöht nachweisbar ist. Danach wäre zu klären, wann oder wie das Adenosin-Guanosin-Triphosphat in der Nebenniere erhöht produziert und/oder ausgeschieden wird. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen können neue Ansätze zur Therapie des Bluthochdruckes gewonnen werden.

## **6. Zusammenfassung**

Der essentielle Bluthochdruck ist in seiner Genese noch nicht hinreichend geklärt. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Ansätze, die Ursachen des Bluthochdrucks zu erforschen und Mediatoren zu identifizieren, die den Blutdruck beeinflussen. In diesem Zusammenhang wurden Dinukleotid-Polyphosphate und im besonderen Diadenosin-Polyphosphate beschrieben. In dieser Arbeit wird ein Verfahren vorgestellt, die Substanz Adenosin-Guanosin-Triphosphat aus Rindernebnierengewebe zu isolieren. Im ersten Schritt wurde aus reinem Rindernebnierengewebe mit Hilfe eines anerkannten Verfahrens ein Homogenat hergestellt, das dann unterschiedlichen chemisch-physikalischen Aufbereitungsschritten unterzogen wurde. Zuerst erfolgte in der präparativen Reversed-Phase-Chromatographie eine Abtrennung sehr hydrophiler und hydrophober Substanzen. Anschließend wurde das Eluat in der Größenausschluss-Chromatographie bezüglich der molekularen Größe weiter fraktioniert. Im nächsten Schritt erfolgte eine Affinitäts-Chromatographie mit Phenolboronsäure, wodurch Dinukleotid-Polyphosphate von Mononukleotid-Polyphosphaten getrennt werden konnten. Das Resultat der Affinitäts-Chromatographie wurde mittels einer Displacement-Chromatographie weiter fraktioniert. In der analytischen Anionenaustausch-Chromatographie wurden die Nukleotide mit mehreren Phosphatgruppen isoliert. Abschließend erfolgte analytische

Reversed-Phase-Chromatographie zur weiteren Trennung der Probe von Nebenbestandteilen. Die Fraktionen der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie wurden mit MALDI-Massenspektrometrie analysiert. Es wurde eine molekulare Masse von 772,9 DA detektiert. Ein Versuch mit synthetisch hergestelltem Adenosin-Guanosin-Triphosphat und ein Vergleich der Retentionszeiten in der Reversed-Phase-Säule mit Standardwerten bekannter Dinukleotide zeigte ein übereinstimmendes Ergebnis. Die in der PSD-MALDI-Massenspektrometrie gemessenen Massensignale konnten somit Adenosin-Guanosin-Triphosphat zugeordnet werden. Mittels enzymatischer Analytik und anschließender analytischer Anionenaustausch-Chromatographie wurde eine Spaltungsreaktion festgestellt. Die Massen der zwei Ribosen entsprachen denen von Adenosin und Guanosin. Diese waren durch jeweils 1 und 2 Phosphatbrücken miteinander verbunden, deren Phosphoester-Bindungsstellen an der 5'-Position der Ribosen nachgewiesen wurden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es sich um die Substanz Adenosin-Guanosin-Triphosphat handelt mit den Molekülen AMP und GDP sowie GMP und ADP. Wie bereits erwähnt, hat Adenosin-Guanosin-Triphosphat Einfluss auf die Blutdruckregulation. Weitere Untersuchungen über das Vorkommen dieser Substanz in menschlichem Gewebe können Rückschlüsse auf die Genese des essentiellen Bluthochdrucks ermöglichen sowie zur Entwicklung neuer Therapieoptionen in der Behandlung des essentiellen Bluthochdruckes führen.

## 7. Literaturverzeichnis

Aiello S, Remuzzi G, Norris M (1998): Nitric oxide/endothelium balance after nephron reduction. Kidney Int Suppl **65**: 563-567

Alanko J., Jolma P., Kööbi P., Riutta A., Kalliovalkama J., Tolvanen J., Pörsti I. (2003): Prostacyclin and thromboxane A2 production in nitric oxide-deficient hypertension in vivo. Effects of high calcium diet and angiotensin receptor blockade. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids **69**(5):345-50

Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S (1990): Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. Nature **348** (6303): 730-732

August P (2004): Overview: Mechanisms of hypertension: cells, hormones and the kidney. J Am Soc Nephrol **15**: 1971

Bacchetti T, Morbidelli L (2000): Endothelial cells in a culture: A model for studying vascular functions. Pharmacol Res **42**: 9-19

Barlassina C, Lanzani C, Manunta P, Bianchi G (2002): Genetics of Essential Hypertension: From Families to Genes. J Am Soc Nephrol **13**: 155-164

Bazzano LA, Serdula MK, Liu S (2003): Dietary intake of fruits und vegetables and risk of cardiovascular disease. Curr Artheroscler Rep **5**(6): 492-499

Benninghoff, A.; Drenckhahn, D: Benninghoff-Drenckhahn (2003): Anatomie, Makroskopische Anatomie, Emryologie und Zellbiologie. Urban & Fischer, **956**:645-658

Bergler-Klein J, Pacher R (2002): Endothelinantagonisten in der neurohumoralen Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. Journal für Kardiologie **9** (5): 169-175

Bobik A, Grooms A, Millar JA, Mitchell A, Grinpukel S (1990): Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. Am J Physiol **258** C: 408-415

Bonow RO, Smaha LA, Smith SC, Mensah GA, Lenfant C (2002):. The international burden of cardiovascular disease: Responding to the emerging global epidemic. Circulation **106**: 1602-1605

Castillo CJ, Moro MA, Del Valle M, Sillero A, Garcia AG, Sillero MA (1992): Diadenosine tretraphosphate is co-released with ATP and catecholamines from bovine adrenal medulla J Neurochem **59**: 723-732

Currie MG, Geller DM, Cole BR, Siegel NR, Fok KF, Adams SP, Eubanks SR, Galluppi GR (1984): Purification and sequence analysis of bioactive atrial. peptides. Science **223**: 67-69

Dahl LK, Knudsen KD, Iwai J (1969): Humoral transmission of hypertension: evidence from parabiosis. Circ Res **24**: 21-33

Dechend R, Homuth V, Wallukat G, Muller DN, Krause M, Dudenhausen J, Haller H, Luft F C (2006): Agonistic Antibodies directed at the Angiotensin II, AT1 Receptor in Preeclampsia. Reproductive Science, **13**(2): 79 - 86

Dechend R (2004): Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF-KB und entzündlicher Reaktionen in der Pathogenese arteriosklerotischer und hypertensiver Gefäßschäden. Habilitationschrift

DeLano FA, Schmid-Schonbein GW (2004): Enhancement of Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptor Density in the Microcirculation of the spontaneously hypertensive Rat. Microcirculation **11**(1): 69-78

Dhein S, Hartmann E, Salameh A, Klaus W (1997): Characterization of a peptide endothelium derived constricting factor EDCF. Pharmacol Res **35** (1): 43-50

Dörffel W; Homuth V, Herberg M, Pruss A, Elsevier R (2003): Agonistic AT1 receptor autoantibodies and monocyte stimulation in hypertensive patients. American Journal of Hypertension **16**: 827-833

Durieu-Trautmann O, Federici C, Creminon C, Foignant-Chaverot N, Roux F, Claire M, Strosberg AD, Couraud PO (1993): Nitric oxide and endothelin secretion by brain microvessel endothelial cells: Regulation by cyclic nucleotides. J Cell Physiol **155** (1): 104-111

Dzau VJ (1993): The role of mechanical and humoral factors in growth regulation of vascular smooth muscle and cardiac myocytes. Curr Opin Nephrol Hypertens **2**: 27-32

Elliott P, Kesteloot H, Appel LJ, Dyer AR, Ueshima H, Chan O, Brown IJ, Zhao L, Stamler J (2008): INTERMAP Cooperative Research Group. Dietary phosphorus and blood pressure: international study of macro- and micro-nutrients and blood pressure. Hypertension: **51**(3):669-75.

Fauci, F: Harrison's (2008): Principles of Internal Medicine 17<sup>th</sup> Edition, McGraw Hill: 2181-2183

Feletou M, Vanhoutte PM (1999): The alternative: EDHF. J Moll Cell cardiol **31**: 15-22

Forrester, T (1990): Release of ATP from heart. Presentation of a release model using human erythrocyte. Ann NY Acad Sci **603**: 351-352

- Freel EM, Connell JM (2004): Mechanisms of hypertension: the expanding role of aldosterone. J Am Soc Nephrol **15**(8): 1993-2001
- Fritsch H, Kühnel W (2005): Taschenatlas Anatomie. Bd. 2, Innere Organe, Thieme-Verlag, Stuttgart, 86-89
- Fu ML, et al (2000): Autoantibodies against angiotensin receptors (AT1) in patients with hypertension. J Hypertens **18**: 945-953
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature **288**: 373-376
- Furchgott RF (1999): Endothelium derived relaxing factor: Discovery, early studies and identification as nitric oxide. Biosci Rep, **19**(4): 235-251
- Gabriels G, Rahn KH, Schlatter E, Steinmetz M (2002): Mesenteric and renal vascular effects of diadenosine polyphosphates (Ap<sub>n</sub>A). Cardiovasc Res **56**: 22-32
- Galle J (2004): Arteriosclerosis and arteriitis: Implications for therapy of cardiovascular disease. Herz **29**: 4-11
- Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK (1988): Angiotensin induces hypertrophy not hyperplasia of cultured rat aortic smooth muscle cells. Circ Res **62** (4): 749-756
- Giatgen A, Spinass, Fischli S (2001): Endokrinologie und Stoffwechsel Taschenbuch, Thieme Verlag: 156-158
- Gibbons GH (1997): Endothelial function as a determinant of vascular function and structure: A new therapeutic target. Am J Cardiol **79**: 3-8
- Greenberg K, Gaine S, Sweatt D (1981): Evidence for circulating factors as a cause of venous hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol **241**: 421-430
- Haller H, Lindschau C, Erdmann B, Quass P, Luft FC (1996): Effects of Intracellular Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. Circ Res **79**: 765-772

Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T (2001): Endothelial dysfunction, oxidative stress and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease.

Circulation **104**: 2673-2678

Hilme E, Hansson L, Sandberg L, Soderstrom T, Herlitz H (1993): Abnormal immune function in malignant hypertension. J Hypertension **11** (9): 989-994

Hingorani AD, Brown MJ (1996): Identifying the genes for human hypertension.

Nephrol Dial Transplant **11**: 575-586

Hirata Y, Tobian L, Simon G, Iwai J (1984): Hypertension-producing factor in serum of hypertensive Dahl-salt-sensitive rats. Hypertension, American Heart Association **6**: 709-716

Hollah, O; Hausberg M, Kosch M, Barenbrock M, Letzel M, Schlatter E, Rahn K-H (2001): A novel assay for determination of diadenosine polyphosphates in human platelets: studies in normotensive subjects and in patients with essential hypertension.

Journal of Hypertension, **19**(2):237-245

Hollenberg SM, Tong W, Shelhamer JH, Lawrence M, Cunnion RE (1994): Eicosanoid production by human aortic endothelial cells in response to endothelin. Am J Physiol **267**: 2290-2296

Homuth V, Fischer T, Wallukat G, Schneider MP, Schlembach D, (2001): HELLP syndrome in the 18th week of gestation in association with elevated angiotensin AT(1)-receptor autoantibodies. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **97**(2): 255-257

Hoyle, C.H.(2003): Pharmacological activity of adenine dinucleotides in the periphery: possible receptor classes and transmitter function. Gen Pharmacol **21**(6): 827-831

Huang PL: Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction.

Curr Hypertens Rep **5**(6): 473-480

Huggins JP, Trumpp-Kallmeyer S, Hibert MF, Hoflack JM, Fanger BO, Jones CR (1993): Modelling and modification on the binding site to endothelin and other receptors. Eur J Pharmacol **245**: 203 -221

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T (1989): The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. Proc Natl Acad Sci USA **86**: 2863-2867

James A. Schafer (2002): Abnormal regulation of ENaC: syndromes of salt retention and salt wasting by the collecting duct Am J Physiol Renal Physiol **283**: 221-235

Jankowski J, Jankowski V, Laufer U, van der Giet M, Henning L, Tepel M, Zidek W, Schlüter H (2003): Identification and Quantification of Diadenosine Polyphosphate Concentrations in Human Plasma. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology **23**: 1231-1238

Jankowski J, Jankowski V, Seibt B, Henning L, Zidek W, Schlüter H (2003): Identification of Dinucleoside polyphosphates in adrenal glands. Biochemical and Biophysical Research Communications **304**: 365-370

Jankowski J, Tepel M, van der Giet M, Tente IM, Henning L, Junker R, Zidek W, Schlüter H (1999): Identification and Characterization of  $P^1, P^7$ -Di(adenosine-5')-heptaphosphate from Human Platelets. J Biol Chem **274**(34): 23926-23931

Jankowski J, Potthoff W, van der Giet M, Tepel M, Zidek W, Schlüter H (1999): High-performance liquid chromatographic assay of the diadenosine polyphosphates in Human Platelets. Anal Biochem **269**: 72-78

Jankowski J, Hagemann J, Tepel M, van der Giet M, Stephan N, Henning L, Gouni-Berthold H, Sachinidis A, Zidek W, Schlüter H (2001): Dinucleotides as Growth-promoting Extracellular Mediators: Presence of Dinucleoside Diphosphates  $Ap_2A$ ,  $Ap_2G$ , and  $Gp_2G$  in Releaseable Granules of Platelets. J Biol Chem **276**(12): 8904-8909

Jankowski, V., Tölle, M., et al.(2005):Uridine-adenosine-tetraphosphate: a novel endothelium-derived vasoconstrictive factor. Nat Med **11**(2): 223-227

Jankowski V, Meyer A-A, Schlattmann P, Gui Y, Zeng X, Stamcou I, Radtke K, Tran T, van der Giet M, Tölle M, Zidek W, Jankowski J (2007): Increased Uridine Adenosine Tetraphosphate concentrations in Plasma of juvenile Hypertensives. Arterioscler Thromb Vasc Biol. **27**(8):1776-81

Jankowski V, Vasnholder R, Henning L, Karadogan S, Zidek W, Schlüter H, Jankowski J (2005): Isolation and quantification of dinucleotide polyphosphates by using monolithic reversed phase chromatography columns. J of Chromatography **819**: 131-139

Jiankai L, Jankowski V, Gungör N, Neumann J, Schmitz W, Zidek W, Schlüter H, Jankowski J (2004): Endogenous Diadenosine Tetraphosphate, Diadenosine Pentaphosphate, and Diadenosine Hexaphosphate in Human Myocardial Tissue. Hypertension, American Heart Association **43**: 1055

John P. Girod and Daniel J. Brotman (2004): Does altered glucocorticoid homeostasis increase cardiovascular risk? Hospital Medicine Fellowship, Department of General Internal Medicine/S70, Cleveland Clinic Foundation, 9500 Euclid Avenue, Cleveland, OH 44195, United States; Cardiovascular Research **64**(2):217-226

Kannel WB (2000) Incidence and epidemiology of heart failure. Heart Fail **5**:167-73.

Kanal WB (1994): Changing epidemiological features of cardiac failure. Br Heart J **72**: 53

Katz AM (1994): The cardiomyopathy of overload: An unnatural growth response in the hypertrophied heart. Ann Intern Med **121**: 363–371

Suresh Krishnamoorthy, MRCP, Gregory Y.H. Lip, (2008):Hypertension, Stroke and the Impact of Atrial Fibrillation. Expert Rev Cardiovasc Ther **6**(10):1287-1289

Lang R, Karow Th (2000): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Bergisch- Gladbach. Karow/Lang,735-737

Lee, Robert (2006):Changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor and myogenic response in rats with chronic renal failure and their association with hypertension. Editorial commentaries Journal of Hypertension **11**:2153-2155

Leitlinien für die Prävention, Erkennung, Diagnostik und Therapie der arteriellen Hypertonie der deutschen Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes e.V. (2003)

Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R (2002): Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality, a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. Lancet **360**: 1903-1913

Li Q, Puro DG (2001): Adenosine activates ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents in pericytes of rat retinal microvessels. Role of A1 and A2a receptors. Brain Res **907**: 93-99

- Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP (2002): 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. J Clin Invest **110**: 229-238
- Lifton RP (1996): Molecular genetics of human blood pressure variation. Science **272**: 676-680
- Lüthje J, Ogilvie A (1983): The presence of diadenosine 5',5'''-P<sub>1</sub>, P<sub>3</sub>-triphosphate (Ap<sub>3</sub>A) in human platelets. Biochem Biophys Res Commun **115**: 253-260.
- Luo J, Jankowski J, Knobloch M, van der Giet M, Gardaris K, Russ T, Vahlensieck U, Neumann J, Schmitz W, Tepel M, Deng MC, Zidek W, Schlüter H (1999): Identification and characterization of diadenosine 5', 5'''-P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>-diphosphate and 5'-5'''-P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>-triphosphate in human myocardial tissue. FASEB Journal **13**: 695-705
- Luther H-P, Homuth V, Wallukat G (1997): Alpha1-Adrenergic Receptor Antibodies in Patients with Primary Hypertension. Hypertension **29**: 682-687
- MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collons R, Sorlie P, Neaton J, Abbott R, Godwin J, Dyer A, Stamler J (1990): Blood Pressure, stroke, and coronary heart disease. Lancet **31**: 765-774
- Mancia G (2004): Prevention and treatment of stroke in patients with hypertension. Clin Ther **26**(5): 631-648
- Miyauchi H, Minamino T, Tateno K, Kunieda T, Toko H and Komur I (2004): Akt negatively regulates the *in vitro* lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. The EMBO Journal **23**: 212-220
- Morgan DB, Bill SR, Thomas TH, Lee MR (1978): Sodium losing renal disease: Two cases and a review of the literature. QJ Med **47**(185): 21-34
- Muller DN, Dechend R, Fiebeler A, Park JK, Haller H, Luft FC (2004). Angiotensin-induced inflammation and novel approaches to treatment. Adv Nephrol Necker Hosp **31**:89-103
- New MI (2002): Hypertension in congenital adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess. Ann NY Acad Sci **970**: 145-154

Ollenschläger G, Oesingmann U, Thomeczek C, Lampert U, Kolkmann F (1998): Leitlinien und Evidence-based Medicine in Deutschland. Münchener Med. Wschr. **140**:30-33

Osterhues HH, Hombach V (2002): Hypertonie/Hypotonie. In: Pfreundschuh M, Schölmerich J (2000): Pathophysiologie Pathobiochemie, Urban und Fischer Verlag: S.: 341-343

Page, Irvine H, Merlin F, Bumpus (Eds) (1974): Angiotensin. Berlin, Springer, **70** 456-461

Perros F, Montani D, Dorfmueller P, Durand-Gasselini I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, et al. (2008): Platelet-derived Growth Factor Expression and Function in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. Am. J. Respir. Crit. Care Med **178**: 81-88

Pintor J, Torres M, Miras-Portugal MT (1991): Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates--Ap<sub>4</sub>A and Ap<sub>5</sub>A--from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells. Life Sci **48**(24): 2317-2324

Pintor J, Rottlan P, Torres M, Miras-Portugal MT (1992): Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells. Granularstorage and secretagogue-induced release. Anal Biochem **200**: 296-300

Potter DD, Sobey CG, Tompkins PK, Rossen JD, Heistad DD (1998): Evidence that macrophages in atherosclerotic lesions contain angiotensin II. Circulation **98**: 800-807

Quaschnig, T., Ruschitzka, F.T., Maier, W. & Lüscher, T.F. (2000). Die Rolle des Endothels bei der Entstehung und Behandlung von Gefäßerkrankungen. Internist, 41: 355–362

Quaschnig T, Voss F, Relle K, Kalk P, Vignon-Zellweger N, Pfab T, Bauer C, Theilig F, Bachmann S, Kraemer-Guth A, Wanner C, Theuring F, Galle J, Hoher B (2007): Lack of Endothelial Nitric Oxide Synthase Promotes Endothelin-Induced Hypertension: Lessons from Endothelin-1 Transgene/Endothelial Nitric Oxide Synthase Knockout Mice. J Am Soc Nephrol **18** (3): 730-740.

Ralevic V, Jankowski J, Schlüter H (2001): Structure-activity relationships of diadenosine polyphosphates (Ap<sub>n</sub>As), adenosine polyphospho guanosines (Ap<sub>n</sub>Gs) and guanosine polyphospho guanosines (Gp<sub>n</sub>Gs) at P2 receptors in the rat mesenteric arterial bed. British Journal of Pharmacology **134**, 1073–1083

Rosenthal, Braunwald (1992): Hematological-oncological disorders and heart disease in Heart Disease. Textbook of Cardiovascular Medicine, edited by Braunwald E, 4<sup>th</sup> ed, Philadelphia, USA, WB Saunders: 1786-1808

Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T (1992): Molecular characterization of endothelin receptors. Department of Pharmacology, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan. Trends Pharmacol Sci **13**:103-108

Sato A, H Suzuki, M Murakami, Y Nakazato, Y Iwaita and T Saruta(1994):Glucocorticoid increases angiotensin II type 1 receptor and its gene expression Hypertension **23**:25-30

Schlüter H, Tepel M, Zidek W (1996): Vascular actions of diadenosine phosphates.J Auton Pharmacol **16**: 357–362

Schlüter H, Gross I, Bachmann J, Kaufmann R, van der Giet M, Tepel M, Nofer JR, Assmann G, Karas M, Jankowski J, Zidek W (1998): Adenosine (5′)-oligophospho (5′) guanosines and guanosne(5′)-oligophospho-(5′) guanosines in human platelets. J Clin Invest **101**: 682-688

Schlüter H, Offers E, Brüggemann G, van der Giet M, Tepel M, Nordhoff E, Karas M, Spieker C, Witzel H, Zidek W (1994): Diadenosine phosphates and the physiological control of blood pressure: Nature **367**: 186-188

Schoen (1999): Blood Vessel in: Robbins pathologic basis of disease. WB Saunders Company, Philadelphia, USA: 493-541

Silbernagl (2001): Lehrbuch der Physiologie, Thieme Verlag.Stuttgart: 170-171

Turnbull F, Neal B, Algert C, Chalmers J (2005): Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. Effects of different blood pressure on major cardiovascular events in individuals with and without diabetes mellitus. Results of prospectively designed overviews of randomized trials. Arch. Intern. Med. **165**, 1410-1419

Skurk T, Lee YM, Hauner H (2001): Angiotensin II and its metabolites stimulate PAI-1 protein release from human adipocytes in primary culture. Hypertension **37**(5): 1336–40

- Suzuki J, Horiuchi M (2003): Renin-angiotensin system and heart failure. Nippon Rinsho **61**(5): 751-755
- Tai TC, Claycomb R, Her S, Bloom AK, Wong DL (2002): Glucocorticoid Responsiveness of the Rat Phenylethanolamine N-Methyltransferase Gene. Molecular Pharmacology **6**: 1385-1392
- Thews G, Vaupel P (2005): Vegetative Physiologie. 5. Auflage: S. 453-455
- Thibonnier M, Schok NJ (1995): The genetics of hypertension. Curr Opin Genet Dev **5**: 362-370
- Thone-Reinecke C, Zimmermann M, Neumann C, Krikov M, Li J, Gerova N, Unger T (2004): Are angiotensin receptor blockers neuroprotektive? Curr Hypertens Rep **6**: 257-266
- Touyz RM (2000): Molecular and cellular mechanisms regulating vascular function and structure-implications in the pathogenesis of hypertension. Can J Cardiol **16**: 1137-1146
- van der Giet M, Khattab M, Börgel J, Schlüter H, Zidek W (1997): Differential effects of diadenosine phosphates on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney, British Journal of Pharmacology **120**, 1453–1460
- Varagic J.; Frohlich E.D. (2002): Local Cardiac Renin–Angiotensin System: Hypertension and Cardiac Failure. J Mol Cell Car **34**,: 1435-1442
- Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupur A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC (1999): Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1-receptor. J Clin Invest **103**(7): 945-952
- Weber H, Taylor DS, Molloy C J (1994): Angiotensin II induces delayed mitogenesis and cellular proliferation in rat aortic smooth muscle cells. Correlation with the expression of specific endogenous growth factors and reversal by suramin. Clin Invest **93**(2): 788–798
- Wheelock G.D., Sieber K.P., Hagedorn H.H. (1991):Rapid isolation of a neurohormone from mosquito heads by HPLC. J Chromatogr **542**: 508-509

Wofford MR, King DS, Wyatt SB, Jones DW (2000): Secondary Hypertension: Detection and Management for the Primary Care Provider. J Clin Hypertens **2**: 124-131

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988): A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature **332**: 411-415

Yoshimoto S, Y Ishizaki, T Sasaki and S Murota (1991): Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells  
Stroke **22**: 378-383

Zabel U, Kleinschmitz C, Oh P, Nedvetzky P, Smolenski A, Müller H, Kronich P, Kugler P, Walter U, Schnitzer JE, Schmidt HH (2002): Calcium dependent membrane association sensitizes soluble guanyl cyclase to nitric oxide. Nat Cell Biol **4**(4): 307-311

Zidek W, Heckmann U, Losse H, Vetter H (1986): Effects on blood pressure of cross circulation between spontaneously hypertensive and normotensive rats. Clin Exp Hypertens **8**(3): 347-354

Zidek W, Ottens E, Heckmann U, (1989): Transmission of hypertension in rats by cross circulation  
Hypertension; **14**:61-65

Zidek W, van der Giet M, Jankowski J, Schlüter H, Tepel, M (1998): Mediation of the vasoactive properties of diadenosine tetraphosphate via various purinoceptors. Journal of Hypertension: **16**(12), 1939-1943

## 8. Anhang

### 8.1. Chemikalien

Azetonitril	Fa. Merck, Deutschland
m-Aminophenylboronsäurehemisulfat	Fa. Bio-Rad, Deutschland
Ammoniumacetat	Fa. Sigma, Deutschland
Bio-Rex 70 Cation Exchange Resin	Fa. Bio-Rad, Deutschland
HCL	Fa. Sigma, Deutschland
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fa. Sigma, Deutschland
KOH	Fa. Sigma, Deutschland
Natriumacetat	Fa. Sigma, Deutschland
NaOH	Fa. Sigma, Deutschland
Perchlorsäure	Fa. Sigma, Deutschland
Tetrabutylammoniumhydrogensulfat	Fa. Merck, Deutschland
Triethylammoniumacetat 1 M	Fa. Fluka, Deutschland

#### 8.1.1. Geräte

Anionenaustauschersäule:

Bio-Rex-70-Gel (Acrylmatrix mit einer Korngröße von 70-150 µm, Bio-Rad)

Uno-Q HR5/2, Amersham-Pharmacia, Schweden

Tosohaas TSK DEAE 5 PW, 150 x 20mm, Japan

Aufbereitungsanlage für HPLC-Wasser:

Delta NF, Fa. Seralpur, Deutschland

## Fraktionssammler:

Frac-100, Fa. LBK, Deutschland

## HPLC-Pumpe:

Hitachi L-6200 Intelligent Pump, Fa. Merck, Deutschland

Gradient Pump 229, Fa. Pharmacia, Schweden

## HPLC UV-Monitor:

Lambda Max 81, Merck, Deutschland

## HPLC-Zubehör:

Fa. Latek, Deutschland

## Leitfähigkeitmessgerät:

LF 39, Fa. WTW, Deutschland

LF 196, Microprocessor Conductivity Meter, Fa. WTW, Deutschland

LF 42, Fa. WTW, Deutschland

## Lyophilisationsanlage:

Freezemobil 12, Fa. Virtis, Deutschland

## Massenspektrometer:

Bruker Reflex III, Fa. Bruker, Deutschland

pH-Meter:

Typ 27, Fa. Knick, Deutschland

Reversed Phase Säulen:

LiChroPrep C18, 2 x 310 mm, Korngröße 40-63  $\mu\text{m}$ , Fa. Merck, Deutschland

Superspher 100 RP C18 endc., 250 x 4mm, Korngröße 10  $\mu\text{m}$ , Fa. Knauer, Deutschland

Retentionszeitenvergleich:

Poros R2/H-Säule, 100 mm x 2,1mm, Fa. Amersham-Pharmacia, Schweden

Schlauchpumpe:

Masterflex, Deutschland (Motor: IP 21, Steuergerät IP 53, Mehrkanalpumpenkopf: 751900 mit Aufsätzen. 751950)

Schreiber:

Thermodrucker C-R 3A Shimadzu, Korea

2210 Recorder, Fa. Pharmacia/LBK, Deutschland

UV-Spektrometer:

DU 600, Fa. Beckmann, Deutschland

UV-Detektor:

Unicord S II, Fa. Pharmacia/LBK

Econo UV-Monitor, Fa. Bio-rad, Deutschland

Vakuumpumpe:

Vacu. Brand R 6-A, Fa. Brand, Deutschland

Vakuumpzentrifuge:

Speed Vac Concentrator SVC 100 H, Fa. Savant

Zentrifuge 3 E-1, Fa. Sigma, Deutschland

Eppendorf 3200, Fa. Eppendorf, Deutschland

101 M, Fa. Sigma, Deutschland

## 9. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Joachim Jankowski für die Vergabe des Themas. Ich danke ihm für die Möglichkeit, dass ich im Labor der Ruhruniversität Bochum den experimentellen Teil der Arbeit (1997-2000) durchführen durfte. Ganz besonders möchte ich ihm für seine an den experimentellen Teil der Arbeit anschließende unendliche Geduld bei der Betreuung der Arbeit danken. Dafür, dass er zu jeder Zeit und aus jeder Entfernung via Internet, Telefon oder bei persönlichen Besuchen hier im Ruhrgebiet Zeit für mich geopfert hat, damit ich die Dissertation fertig stellen konnte. Ich danke ihm für seine Hilfe bei der Erstellung der Tabellen und Abbildungen, für seine unermüdlichen konstruktiven Vorschläge bei der Erstellung des Textes. Seine immer vorhandene gute Laune und sein Optimismus haben zum Gelingen der Arbeit maßgeblich beigetragen. Durch das angenehme und freundliche Arbeitsklima hat er sich als Doktorvater mehr als ausgezeichnet.

Besonders möchte ich mich auch bei Frau Dr. Vera Jankowski, Nina Stephan und Arkadius Pacha für ihre Unterstützung im experimentellen Teil der Arbeit an der Ruhruniversität Bochum bedanken, ohne deren Hilfe ich die hochempfindlichen Laborgeräte sowie die verwendeten Chemikalien nie hätte bedienen beziehungsweise verwenden können. Nina Stephan danke ich besonders für ihre Hilfe in der MALDI und PSD-MALDI.

Ich kann mich nicht genug bei meiner Frau Karin Hilse und meinen Kindern Nikoline und Antonia bedanken, die mir in meinen freien Stunden die Zeit überließen, mich mit meiner Dissertation zu beschäftigen und sie abzuschließen.

Zu großem Dank bin ich auch meiner Mutter verpflichtet, die mich immer bei der Arbeit unterstützt hat, Fehlerkorrekturen durchführte und mich immer wieder motivierte.

Mein großer Dank geht an meine Freunde Holger Strauss, Achim Dreetz und Sean Hackstein deren Motivation und Beistand bei der Arbeit „mach fettisch das Ding!“

Die Dissertation widme ich meiner Familie, die mir jahrelang neben der beruflichen Tätigkeit immer wieder die Freiräume ließ, die Dissertation abzuschließen.

**10. Lebenslauf**

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

## **Erklärung**

„Ich, Frank Meyer-Hilse, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

“Nachweis des gemischten Dinukleotid-Polyphosphats Adenosin-Guanosin-Triphosphat aus boviner Nebenniere“

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.“

25.03.09