

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Isolierung und Identifizierung des Adenosin-Tetraphosphats
aus dem endothelialen Sekretom**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Hub
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. J. Jankowski
2. PD Dr. med. R. Vetter
3. PD Dr. med. S. Herget-Rosenthal

Datum der Promotion: 14. Oktober 2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung der Studie	1
1.1. Einleitung	1
1.2. Zielsetzung der Studie	11
2. Methodik	12
2.1. Allgemeiner Teil	12
2.2. Spezieller Teil	14
2.2.1. Kultivierung humaner Endothelzellen	15
2.2.2. Stimulation und Konservierung der Endothelzell-Überstände	15
2.2.3. Deproteinierung	15
2.2.4. Präparative Reversed-Phase-Chromatographie	15
2.2.5. Affinitäts-Chromatographie	16
2.2.6. Reversed-Phase-Chromatographie	17
2.2.7. Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie	17
2.2.8. Isolierte perfundierte Niere	18
3. Ergebnisse	19
3.1. Isolierung des Mononukleotids	19
3.1.2. Präparative Reversed-Phase-Chromatographie	19
3.1.3. Affinitäts-Chromatographie	20
3.1.4. Reversed-Phase-Chromatographie	21

Inhaltsverzeichnis

3.2. Identifizierung des Mononukleotids	22
3.2.1. MALDI-TOF- Massenspektrometrie	22
3.2.2. MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie	23
3.2.3. Strukturformel des Adenosin-Tetraphosphats	24
3.3. Vasoregulatorische Wirkung des Adenosin-Tetraphosphats	24
3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse	27
4. Diskussion	28
5. Zusammenfassung	36
6. Literaturverzeichnis	38
7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	49
8. Geräte und Reagenzien	50
9. Danksagung	52

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme
ATP	Adenosin-Triphosphat
AU	Relative Intensität
B2-Rezeptoren	Bradykinin-Rezeptor
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CaCl	Kalziumchlorid
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
Da	Dalton
EDCF	Endothelium-derived contracting factor
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
ET-Rezeptor	Endothelin-Rezeptor
G-Protein	Guanosin-Triphosphat-bindendes Protein
GTP	Guanosin-Triphosphat
HMEC	Human microvascular endothelial cells
HPLC	High performance liquid chromatography
IE	Internationale Einheit
KCl	Kaliumchlorid
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NP-Rezeptor	Natriuretisches-Peptid-Rezeptor
P2-Rezeptor	purinerge Rezeptor
PSD	post source decay
RP	Reversed-Phase
NO	Stickstoffmonoxid
TOF	time of flight
V-Rezeptor	Vasopressin-Rezeptor

1. Einleitung und Zielsetzung der Studie

1.1. Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Arteriosklerose und kardiovaskuläre Folgeerkrankungen wie die koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit, apoplektischer Insult und Herzinsuffizienz sind die häufigsten Todesursachen in Industrieländern [Herold, 2004a]. Arteriosklerose ist eine diffuse Erkrankung der Gefäße, in deren Mittelpunkt die endotheliale Dysfunktion steht [Esper et al., 2006]. Zu den Risikofaktoren der Arteriosklerose zählen Hypertonie, Alter, Nierenerkrankungen, Diabetes mellitus, Adipositas, körperliche Inaktivität, Fettstoffwechselstörungen, Nikotinabusus und eine positive Familienanamnese [Chobanian et al., 2003]. Hypertonie wurde als Hauptrisikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen identifiziert und ist streng mit der altersspezifischen Mortalitätsrate durch Gefäßerkrankungen assoziiert [Kannel, 2000, Lewington et al., 2002]. Die Prävalenz der Hypertonie beträgt in den westlichen Industrieländern 20% [Herold, 2004b]. Epidemiologisch zeigen sich Unterschiede in der geographischen Verteilung der Hypertonie sowie im Geschlecht und in Abhängigkeit vom sozioökonomischen Status. Die Höhe des durchschnittlichen Blutdrucks ist proportional zum Lebensalter [Carretero et al., 2000].

Eine Hypertonie wird diagnostiziert, wenn wiederholt diastolische Werte >90 mmHg oder systolische Werte >140 mmHg gemessen werden [Herold, 2004b]. Die normalen und pathologischen Werte gibt Tabelle 1 wieder. Eine hypertensive Krise liegt ab stark erhöhten Werten von über 230/130 mmHg vor [Herold, 2004b].

Tabelle 1: Klassifikation des Blutdrucks bei Erwachsenen [Chobanian et al., 2003]

Blutdruck	Systole [mmHg]	Diastole [mmHg]
Normal	< 120	< 80
Prähypertonie	120-139	80-89
Stadium I	140-159	90-99
Stadium II	> 160	> 100

Diese im siebenten Bericht des *Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure* empfohlene Klassifikation bezeichnet Werte von 120-139

oder 80-89 mmHg als prähyperton. Schon in diesen Bereichen steigt das Risiko für eine sich später manifestierende Hypertonie [Chobanian et al., 2003]. Für die Prähypertonie wird die Senkung des Blutdrucks durch nicht-medikamentöse Maßnahmen empfohlen, um potentielle Komplikationen zu vermeiden [Herold, 2004b]. Solche Maßnahmen umfassen Gewichtsreduktion, mediterrane Kost und physische Aktivität [Chobanian et al., 2003].

Klassifikation der Hypertonie

Es werden die primär essentielle Hypertonie und die sekundär symptomatische Hypertonie unterschieden. Die häufigsten Ursachen einer sekundär symptomatischen Hypertonie sind in Tabelle 2 aufgelistet. Sie werden in renale, endokrine und weitere Ursachen unterteilt [Herold, 2004b]. Wenn eine symptomatische Hypertonie ausgeschlossen werden kann, wird die Diagnose der essentiellen Hypertonie gestellt. Das betrifft die Mehrzahl der Erkrankungen: 85-95% aller Hypertonie-Erkrankungen werden der essentiellen Hypertonie zugeordnet [Carretero et al., 2000; Herold, 2004b].

Tabelle 2: Ursachen der sekundär symptomatischen Hypertonie [Chobanian et al., 2003; Herold, 2004b]

Nierenerkrankungen	endokrine Erkrankungen	weitere Ursachen
Glomerulonephritis	Cushing-Syndrom	Medikamente, z.B. Steroide
chronische Pyelonephritis	Adrenogenitales Syndrom	Aortenisthmusstenose
Zystennieren	Phäochromozytom	Überlaufblase
Nierentumore	Hyperaldosteronismus	Schlafapnoe
Nierenarterienstenose	Schilddrüsenerkrankungen	
	Nebenschilddrüsenerkrankungen	

Die essentielle Hypertonie ist eine multifaktorielle Erkrankung, die durch genetische, verhaltensbedingte und umweltbedingte Komponenten beeinflusst wird [Herold, 2004b]. Eine einheitliche Ätiologie und Pathogenese der essentiellen Hypertonie ist unbekannt. Zu den die essentielle Hypertonie begünstigenden „hypertensinogenen Faktoren“ zählen Adipositas, Insulinresistenz, hoher Alkoholkonsum, Diätfehler wie ein hoher Salzkonsum und eine geringe Kalium- und Kalziumaufnahme, sitzende Tätigkeit, Stress und als nicht modifizierbarer Faktor das fortgeschrittene Alter [Carretero et al., 2000].

Blutdruckregulation

Der Blutdruck ist das Produkt aus Herz-Zeit-Volumen und peripherem Gefäßwiderstand [Herold, 2004b]. Das Herz-Zeit-Volumen wird durch das kardiale Auswurfvolumen und die Herzfrequenz bestimmt. Die Erhöhung des Herz-Zeit-Volumens und/oder des peripheren Widerstandes führt zur Hypertonie [Herold, 2004b]. Im Frühstadium der essentiellen Hypertonie ist das Herz-Zeit-Volumen gesteigert, im Verlauf der Erkrankung kommt es zur Erhöhung des peripheren Widerstandes [Herold, 2004b].

Die kurzfristige Anpassung des Blutdrucks wird über Barorezeptoren und das autonome Nervensystem vermittelt [Busse, 2000]. Barorezeptoren sind im Karotissinus und im Aortenbogen lokalisiert. Ihre Aktivität ist abhängig vom arteriellen Mitteldruck und der Druckamplitude. Die Druckaktivierung der Barorezeptoren führt über den Nervus vagus zur Steigerung der parasympathischen Aktivität mit Senkung der Herzfrequenz [Busse, 2000].

Die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin sind die aus dem Nebennierenmark stammenden Transmitter des sympathischen Nervensystems. Adrenalin führt zur Dilatation der Skelettmuskelgefäße und zur Konstriktion an Haut- und Splanchnikusgefäßen. Noradrenalin erhöht direkt den peripheren Gefäßwiderstand. Beide Katecholamine bedingen eine Blutdrucksteigerung. Bei starker Belastung der Herz-Vorhöfe werden dort lokalisierte Dehnungsrezeptoren aktiviert, die den Sympathikus hemmen [Busse, 2000].

Die mittel- bis langfristige Adaptation des Blutdrucks erfolgt über die Anpassung des zirkulierenden Volumens an die Gefäßkapazität durch renale Flüssigkeitsausscheidung oder -retention. Der Regulierung des Volumenhaushaltes dienen neurohumorale Systeme wie das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, Vasopressin, das natriuretische-Peptid-System und das Kinin-System [Busse, 2000].

Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Die renale Minderdurchblutung führt zur Freisetzung von Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat. Renin spaltet aus dem in der Leber gebildeten Angiotensinogen Angiotensin I ab. Pulmonales Angiotensin converting enzyme (ACE) spaltet aus Angiotensin I Angiotensin II ab. Angiotensin II ist ein starker Vasokonstriktor und stimuliert die Aldosteron-Freisetzung. Aldosteron steigert die tubuläre Rückresorption von Natrium und Wasser [Busse, 2000]. Neben dem globalen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System gibt es auch ein lokales Renin-Angiotensin-System, dessen pathophysiologische Bedeutung bei der Entwicklung bestimmter Hypertonieformen erforscht wird [Busse, 2000; Jankowski et al., 2005c]. Eine verminderte Nierendurchblutung, die

das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert, kann sowohl die essentielle als auch die symptomatische Hypertonie renal fixieren [Herold, 2004b].

Vasopressin

Vasopressin wird bei Hypovolämie oder Hyperosmolalität des Blutes aus der Hypophyse freigesetzt. Ein Verlust von durchschnittlich 6% des Blutvolumens führt zur Ausschüttung dieses Hormons [Antunes-Rodrigues et al., 2004]. Die Sekretion wird über Barorezeptoren, kardiopulmonale Volumenrezeptoren und zirkulierendes Angiotensin II vermittelt. Die Hauptfunktion des Vasopressins ist die Antidiurese [Antunes-Rodrigues et al., 2004]. Nach Bindung an renale G-Protein gekoppelte V_2 -Rezeptoren werden Aquaporine-2 am distalen Tubulus eingebaut, die Wasser aus dem Primärharn rückresorbieren. Dadurch wird das Ausscheidungsvolumen konzentriert und das zirkulierende Volumen gesteigert [Antunes-Rodrigues et al., 2004]. Extrarenale V_2 -Rezeptoren stimulieren zudem die Synthese des vasodilatierenden Stickstoffmonoxids (NO) [Luft, 2007]. Vasopressin kann einerseits durch seinen antidiuretischen Effekt, andererseits durch direkten Einfluss auf den Vasotonus zur Pathogenese der Hypertonie beitragen. Zusätzlich sind V_{1a} -Rezeptoren der glatten Gefäßmuskelzelle der Niere involviert, welche die Nierendurchblutung regulieren [Luft, 2007].

Natriuretisches-Peptid-System

Zu den natriuretischen Peptiden zählen das atriale natriuretische Peptid, das brain natriuretic Peptid, das C-type natriuretic Peptid und das Urodilatin [Antunes-Rodrigues et al., 2004]. Sie induzieren über NP-Rezeptoren an der Niere Diurese und Natriurese. Das atriale natriuretische Peptid wird bei Erregung von auf Myozyten lokalisierten Dehnungsrezeptoren aus dem rechten Vorhof ausgeschüttet [Antunes-Rodrigues et al., 2004]. Atriales natriuretisches Peptid aktiviert eine Guanylatzyklase, die aus GTP cGMP generiert. cGMP aktiviert eine Proteinkinase [Antunes-Rodrigues et al., 2004]. Am Herzen führt atriales natriuretisches Peptid zur Minderung der Kontraktionskraft und Herzfrequenz. An Gefäßen wirkt es vasodilatierend [Antunes-Rodrigues et al., 2004]. Atriales natriuretisches Peptid hemmt zusätzlich das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System [Busse, 2000]. Ein Defekt in diesem System trägt somit über mehrere Pathomechanismen zur Hypertonie bei [Antunes-Rodrigues et al., 2004].

Kallikrein-Kininogen-Kinin-System

Renales Kallikrein aus dem distalen Tubulus führt zur Abspaltung von Kinin aus Kininogen. Kinine steigern die Nierendurchblutung und induzieren Diurese und Natriurese. Ein Teil der kochsalz-sensitiven hypertonen Erkrankungen wird auf Defekte im renalen Kallikrein-Kininogen-Kinin-System zurückgeführt [Busse, 2000]. Gewebeständiges Kallikrein bildet lokal wirksame Kinine, die an den Gefäßen an den B₂-Rezeptor binden und durch NO- und Prostacyclin-Synthese zur Vasodilatation führen [Rhaleb et al., 2001].

Das Kallikrein-Kininogen-Kinin-System ist mit dem Renin-Angiotensin-System über das Angiotensin converting enzyme verbunden, das mit dem Enzym identisch ist, das Kinine spaltet und inaktiviert. Endogene Kinine sind endothelprotektiv und wirken antiproliferativ. Ein Teil der kardioprotektiven Wirkung von ACE-Inhibitoren in der antihypertensiven Therapie wird auf die Akkumulation von Kininen zurückgeführt [Chao et al., 2005].

Die mittel- bis langfristige Regulation des Blutdrucks im Gesamtkreislauf ist durch ein Zusammenwirken volumenregulierender Systeme gekennzeichnet. Die beteiligten Mediatoren sind direkt oder indirekt auch vasoaktiv wirksam und beeinflussen den peripheren Widerstand [Antunes-Rodrigues et al., 2004].

Peripherer Widerstand

Während neurohumorale Abweichungen nur bei einem Teil der Hypertonie-Patienten diagnostiziert werden können, ist ein erhöhter peripherer Widerstand pathognomonisch für die essentielle Hypertonie (Herold, 2004b; Mulvany, 2005). Der periphere Widerstand ist durch das Lumen der Widerstandsgefäße determiniert. Widerstandsgefäße sind kleine Arterien und Arteriolen, in denen der arterielle Druck massiv abfällt, um die kapilläre Austauschfläche zu regulieren [Schiebler, 1996]. Unter physiologischen Bedingungen wird der Gefäßtonus der Widerstandsgefäße funktionell durch den myogenen Basaltonus, das autonome Nervensystem und die lokale Wirkung gefäßaktiver Substanzen reguliert, die teilweise direkt aus dem Endothel stammen [Ledoux et al., 2006]. Damit stehen die Endothelzellen im Mittelpunkt der pathophysiologischen Mechanismen der essentiellen Hypertonie. Der Dysfunktion liegen eine veränderte neurohormonale Aktivität oder Sensitivität der Endothelzellen zugrunde [Mulvany, 2005].

Lage und Funktion der Endothelzellen

Endothelzellen bilden die innere, stoffwechselaktive Schicht der Gefäße. Die Zellen sind in der Intima der Gefäße lokalisiert. Ihre Fortsätze stehen in Verbindung mit den glatten Muskelzellen der mittleren Gefäßschicht [Schiebler, 1996]. Endothelzellen regulieren den vaskulären Tonus und beeinflussen vaskuläre Entzündungsprozesse, die Neogenese und Zellproliferation sowie das Gerinnungssystem. Ihre intakte Funktion ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Blutkreislaufsystems [Ades et al., 1992; Pearson, 2000; Davignon et al., 2004].

Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen

Die Kontraktion der Muskelzelle erfolgt durch die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bei Depolarisation [Ledoux et al., 2006]. Kalzium wird aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt oder kann nach Öffnung von spannungs-abhängigen Kalzium-Kanälen aus dem Extrazellulärraum in die Zelle gelangen [Rüegg, 2000]. Kalzium-Ionen binden an Kalmodulin. Der Kalzium-Kalmodulin-Komplex aktiviert eine Myosinkinase, die eine Phosphatgruppe von ATP auf Myosin überträgt. Phosphoryliertes Myosin interagiert mit Aktin und führt zur Verkürzung des kontraktile Apparats [Hilgers et al., 2005]. Von einer Änderung des Membranpotentials unabhängige Wege zum Anstieg der Kalziumkonzentration sind die ligandengesteuerte Öffnung von Kalziumkanälen sowie die Synthese von Inositol-Triphosphat [Rüegg, 2000]. Wenn der intrazelluläre Kalziumspiegel sinkt, relaxiert die glatte Muskelzelle durch die Hemmung der Myosinkinase [Rüegg, 2000].

Das Endothel reguliert den vaskulären Tonus durch Synthese und Sekretion vasoaktiver Substanzen, die eine Kontraktion oder Relaxation der glatten Muskelzelle bedingen. Zum endothelialen Sekretom gehören sowohl vasodilatierende als auch vasokonstringierende Substanzen [Lüscher, 1990a; Mateo et al., 1996]. Eine schematische Darstellung bekannter tonus-regulierender Substanzen zeigt Abbildung 1.

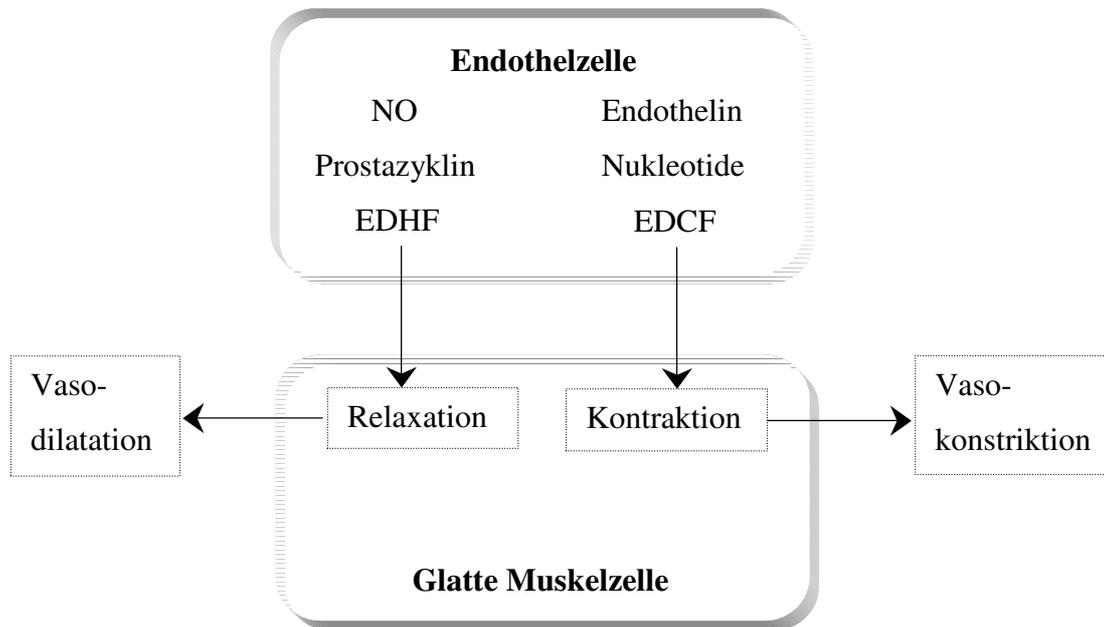


Abbildung 1: Schematische Darstellung endothelialer vasoregulatorischer Mediatoren

Endotheliales Sekretom

Stickstoffmonoxid (NO)

Ein bedeutendes Produkt der Endothelzellen ist das vasodilatative Stickstoffmonoxid (NO) [Busse, 2000]. Die endotheliale NO-Synthase synthetisiert NO aus L-Arginin und Stickstoff [Esper et al., 2006]. NO aktiviert an der Muskelzelle eine lösliche Guanylatzyklase, die cGMP bildet.

Über eine Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen kommt es zur Relaxierung der glatten Gefäßmuskelzelle [Lincoln et al., 2001]. NO verhindert darüber hinaus die Plättchenaggregation und -adhäsion, hemmt die Muskelzellproliferation und wirkt immunologisch modulierend [Klahr, 2001].

Auch unter Ruhebedingungen kommt es zu einer kontinuierlichen basalen NO-Freisetzung aus dem Endothel, die der adrenerg-sympathischen Grundaktivität entgegenwirkt [Busse, 2000]. Eine zusätzliche NO-Bildung wird durch mechanische Reize angeregt. Scher-Kräfte sind dabei der Hauptaktivator der NO-Synthese [Pearson, 2000]. Acetylcholin, Bradykinin und andere Hormone, die aus Thrombozyten und Endothelzellen stammen oder in der Blutbahn zirkulieren, stimulieren ebenfalls die NO-Synthese [Lüscher, 1990b; Moncada et al., 2006].

Dysfunktionales Endothel sezerniert zu wenig NO. Dieser Mangel kann das Resultat eines Enzym- oder Substratmangels sein. Auch eine schnelle Inaktivierung durch oxidativen Stress führt zur Verknappung von NO [Moncada et al., 2006].

Prostazyklin

Prostazyklin ist ein Metabolit der Arachidonsäure und wird durch die Cyclooxygenase-1 in den Endothelzellen synthetisiert. Die Cyclooxygenase-2 wird unter pathophysiologischen Bedingungen vermehrt exprimiert. Prostazyklin aktiviert G-Protein gekoppelte Inositol-Triphosphat-Rezeptoren auf der Oberfläche der glatten Muskelzelle und führt über die Aktivierung der Adenylatzyklase zum cAMP Anstieg und zur Relaxation [Villar et al., 2006].

Endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHFs)

Neben NO und Prostazyklin synthetisieren Endothelzellen Substanzen, die die glatte Muskelzelle hyperpolarisieren [Lüscher, 1990b]. Die glatte Muskelzelle hyperpolarisiert durch Kalium-Ausstrom oder die Erhöhung von cAMP und cGMP. Diese zyklischen Nukleotide fördern die Rückresorption von Kalzium in das Sarkoplasmatische Retikulum, hemmen die Myosinkinase und verringern die Kalziumsensitivität der Myofilamente [Rüegg, 2000]. Welche Substanzen zu den EDHFs zählen, ist nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung noch ungesichert [Hecker et al., 1994; Feletou et al., 2006].

Endothelin

Endotheline sind Peptide, die in neuronalen, epithelialen und intestinalen Zellen gebildet werden [Busse, 2000]. Endothelin-1 wird in den Endothelzellen synthetisiert. Es führt zu einer starken und langanhaltenden Vasokonstriktion. In kultivierten Endothelzellen wird das Hormon abluminal ausgeschüttet und ist vor allem lokal wirksam. Endothelin bindet an G-Protein gekoppelte ET_A und ET_B-Rezeptoren der glatten Muskelzellen, die zu einer indirekten Aktivierung spannungs-abhängiger Kalzium-Kanäle und einem Kalzium-Einstrom führen. Endothelin ist unter physiologischen Bedingungen nicht vorhanden. Es wurde bisher im Plasma von herz- und niereinsuffizienten Patienten nachgewiesen. Dieser Befund stützt die Annahme, dass das Hormon vor allem unter pathophysiologischen Bedingungen von Bedeutung ist [Lüscher et al., 1992].

Nukleotide und purinerges Rezeptorsystem

Extrazelluläre Nukleotide sind vasoregulatorisch wirksam und beeinflussen die Plättchenaggregation und das Proliferationsverhalten der Gefäße [Ogilvie, 1992]. Sie bestehen aus ein oder zwei Purin- oder Pyrimidinbasen, die mit einer Phosphatkette verknüpft sind. Aus dem Überstand kultivierter Endothelzellen ist das Dinukleotid Uridin-Adenosin-Tetraphosphat isoliert worden [Jankowski et al., 2005a]. Uridin-Adenosin-Tetraphosphat ist vasokonstriktiv wirksam und beeinflusst die Nierendurchblutung [Jankowski et al., 2008]. Auch das Mononukleotid ATP ist ein vasoregulatorischer Mediator. ATP wird aus den Endothelzellen sowie aus den Nervenendigungen in den Gefäßen, wo es mit Noradrenalin kolokalisiert ist, freigesetzt [Busse, 2000; Liu et al., 2004]. Endothelzellen metabolisieren Nukleotide über Ektonukleotidasen, die an der luminalen Endothelzell-Oberfläche lokalisiert sind [Mateo et al., 1996; Zimmermann, 1996].

Nukleotide aktivieren ubiquitär exprimierte purinerge Rezeptoren. Purinerge Rezeptoren werden in P1 und P2-Rezeptoren eingeteilt [Ralevic et al., 1998]. Es gibt vier Subtypen der P1-Rezeptoren [Ralevic et al., 1998]. Unter den P2-Rezeptoren wurden sieben Subtypen der P2X-Familie und acht Subtypen der P2Y-Familie kloniert und funktionell charakterisiert [Burnstock, 2007].

P1-Rezeptoren sind Adenosin-Rezeptoren, die über G-Proteine die Adenylatzyklase und das Inositol-Triphosphat regulieren [Munchi et al., 1991; Burnstock, 2007; Ralevic et al., 1998]. Ihre Aktivierung führt an Endothel- und glatten Muskelzellen zur Vasodilatation [Ralevic et al., 1998]. P2X-Rezeptoren sind Ionenkanäle [Ralevic et al., 1998]. Endogene Agonisten der P2X-Rezeptoren sind die Adenosin-Nukleotide. Die Potenz der Agonisten steigt mit der Länge der Phosphatkette [Bo et al., 1993; Lewis et al., 2000]. P2X-Rezeptoren werden primär auf glatten Muskelzellen exprimiert und führen über die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration zur Vasokonstriktion [Valera et al., 1994; Soto et al., 1996; Lewis et al., 2000; Wang et al., 2002; Burnstock, 2007]. P2Y-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Purin- und Pyrimidin-Rezeptoren, die vorrangig auf Endothelzellen exprimiert werden. Die Aktivierung der P2Y-Rezeptoren regt dort die Synthese und Sekretion vasodilatierender Substanzen an [Ralevic et al., 1998; Wang et al., 2002].

Endothelium-derived contracting factors (EDCFs)

Endothelzellen synthetisieren neben Endothelin und Nukleotiden noch andere vasokonstringierende Mediatoren. Ein kontraktiler Effekt wurde bisher für Histamin, Serotonin, Superoxidationen und verschiedene Arachidonsäure-Derivate gezeigt [Lüscher et al., 1992].

Endotheliale Dysfunktion

Unter physiologischen Bedingungen wirkt das Endothel über die Freisetzung von vasoregulatorischen, entzündungshemmenden und antithrombotischen Mediatoren protektiv. Durch kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hyperlipidämie, hohen Blutzucker oder Nikotinabusus werden Endothelzellen geschädigt [Lüscher, 1990a]. Endotheliale Dysfunktion repräsentiert das gemeinsame Resultat der Risikofaktoren [Mulvany, 2005].

Vanhoutte et al. berichten darüber, dass bei hypertonen Patienten ein Übergewicht an endothel-abhängigen vasokonstriktiven Mediatoren und eine unzureichende Vasodilatation nachweisbar ist [Vanhoutte et al., 2005]. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass ein Ungleichgewicht zwischen endothel-abhängigen dilatativen und kontrahierenden Mediatoren der Endothelzellen zum erhöhten peripheren Widerstand führt [Lüscher, 1990b].

1.2. Zielsetzung der Studie

Endothelzellen sind parakrin und autokrin aktive Zellen, die den vaskulären Tonus durch Mediatoren beeinflussen, die an der glatten Muskelzelle zur Kontraktion oder Relaxation führen [Pearson et al., 1993]. Die fehlende Balance zwischen diesen Substanzen ist Teil der Pathogenese der essentiellen Hypertonie [Davignon et al., 2004]. Ein Überwiegen der konstriktiven bzw. eine Schwäche der dilatativen Komponente kann zur Erhöhung des peripheren Widerstandes beitragen [Vanhoutte et al., 2005]. Die Identifizierung der entsprechenden endothel-abhängigen Mediatoren ist notwendig, um das Wissen über die molekularen Mechanismen der essentiellen Hypertonie zu vervollständigen. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind ein Teil der endothel-abhängigen vasoregulatorischen Substanzen identifiziert und charakterisiert: Neben NO, Prostacyclin und Endothelin nehmen auch vasoaktiv-wirkende Nukleotide eine bedeutende Rolle für die Regulierung des vaskulären Tonus ein.

Das Ergebnis von Vorversuchen zu der hier vorliegenden Studie zeigt, dass das endotheliale Sekretom kultivierter Endothelzellen an der isolierten perfundierten Niere stark vasokonstriktiv wirksam war. Es gab Hinweise darauf, dass verschiedene Substanzklassen von vasoregulatorischen Mediatoren für diese Vasokonstriktion ursächlich sind, unter anderem auch bisher unbekannte Nukleotide. Im Jahr 2005 wurde aus dem endothelialen Sekretom das Dinukleotid Uridin-Adenosin-Tetraphosphat isoliert. Die vasokonstringierende Wirkung des Uridin-Adenosin-Tetraphosphats erklärte aber nicht die gesamte Aktivität, die den Nukleotiden zugeschrieben wurde. Es wurde ergänzend nachgewiesen, dass auch Mononukleotide einen deutlichen Beitrag zur vasokonstriktorischen Wirkung des endothelialen Sekretoms beitragen. Ein bekanntes vasoregulatorisches Mononukleotid ist ATP. ATP ist jedoch sehr kurzlebig, infolgedessen konnte seine Wirkung den beobachteten Effekt nicht zufriedenstellend erklären. Es war zunächst offen, welche Mononukleotide im endothelialen Sekretom enthalten sind. Aus diesem Grund war es das Ziel dieser Studie, die zugrundeliegenden vasokonstriktorisch wirksamen Mononukleotide aus dem endothelialen Sekretom zu isolieren, identifizieren und charakterisieren.

2. Methodik

2.1. Allgemeiner Teil

Grundlagen der High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)

Die Chromatographie dient zur Trennung von Substanzgemischen. High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) ist ein Verfahren der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie, die schnell und mit hoher Auflösung erfolgt [Kellner, 2006].

Das Substanzgemisch wird in der *mobilen Phase* gelöst durch eine Trennsäule geleitet, die mit der *stationären Phase* bepackt ist. Die Trennung erfolgt durch eine Verteilung der einzelnen Komponenten des Substanzgemisches zwischen mobiler und stationärer Phase. Die stationäre Phase besteht aus einem Trägermaterial, an dem die für die Chromatographie entscheidenden funktionellen Gruppen gebunden sind. Die einzelnen Komponenten des Substanzgemisches treten in Wechselwirkung mit der Oberfläche der Säule. Die *Retentionszeit* der Komponenten beschreibt die Zeitspanne zwischen Injektion und Austritt aus der Säule. Bei der *isokratischen Elution* bleibt die Zusammensetzung der mobilen Phase konstant. Komponenten mit geringer Adsorption an die Säule werden sofort eluiert. Substanzen mit hoher Affinität werden an der Säule retentiert. Um diese gebundenen Substanzen von der Säule zu lösen, ist eine stärkere Elutionskraft der mobilen Phase notwendig. Deshalb wird bei der *Gradienten-Elution* die mobile Phase durch ein zweites Lösungsmittel mit höherer Elutionskraft ergänzt [Kellner, 2006]. Während der Chromatographie werden zur Prozess-Kontrolle sowohl die *UV-Absorption* bezüglich einer ausgewählten Wellenlänge als auch die *Leitfähigkeit* detektiert [Kellner, 2006].

Reversed-Phase-Chromatographie

Die Reversed-Phase-Chromatographie basiert auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Substanz und Säule. Die stationäre Phase besteht aus Kieselgelen, die mit Alkyl-Resten unterschiedlicher Kohlenwasserstoff-Ketten-Längen besetzt sind. Apolare, hydrophobe Moleküle adsorbieren an die hydrophobe stationäre Phase. Mit der polaren mobilen Phase eluieren hydrophile Substanzen. Die Elution stärker hydrophober Substanzen erfolgt mit einer zweiten apolaren mobilen Phase [Kellner, 2006].

Affinitäts-Chromatographie

Das Prinzip der Trennung mittels Affinitäts-Chromatographie basiert auf spezifischen und reversiblen Wechselwirkungen zwischen einzelnen Komponenten eines Substanzgemisches und Säule. Es werden die Substanzen isoliert, die mit dem an die Säulenmatrix gebundenen Liganden räumlich und elektrostatisch kompatibel sind. Die Elution retendierter Substanzen erfolgt durch die kompetitive Verdrängung der Substanz aus der Bindung durch den Einsatz einer entsprechenden zweiten mobilen Phase [Ostrove, 1990; Kellner, 2006].

Grundlagen der Matrix-unterstützten Laser-Desorptions-/Ionisations-Time of Flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-Massenspektrometrie)

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie dient der Bestimmung der Masse einfach ionisierter Moleküle. Die Substanz wird mit einer organischen Matrix vermischt. Matrix und Substanz kokristallisieren. Die Kristalle werden mit einem Laser beschossen. Die Energie des Lasers relativiert in das Kristall-Gitter, das ausgedehnt und gestört wird. Dabei kommt es zu einem Phasenübergang, der einen Teil der Kristalloberfläche aufweicht. Während dieses Phasenübergangs werden die zu analysierenden Substanzen in den gasförmigen und ionisierten Zustand versetzt [Meyer et al., 2006]. Die positiv geladenen, gasförmigen Substanzen werden im Vakuum durch ein elektrisches Feld in Richtung Analysator beschleunigt. Die Flugzeit, die ein Ion zur Überwindung der feldfreien Strecke im Vakuum benötigt, ist bei gleicher kinetischer Energie abhängig vom Masse/Ladungs-Verhältnis. Durch das reziproke Verhältnis zwischen Geschwindigkeit und Masse/Ladungs-Verhältnis kann die Masse errechnet werden. Das Signal der auftreffenden Ionen wird in ein Elektronensignal umgewandelt und verstärkt. Eine hohe Auflösung lässt sich durch den Einsatz von Reflektoren erzielen [Spengler et al., 1992; Meyer et al., 2006]. Eine Erweiterung der TOF-Massenspektrometrie stellt die TOF/TOF-Massenspektrometrie dar. Dabei werden die nach der Ionisierung fragmentierten Ionen detektiert. Die Fragmentierung ist ein metastabiler Zerfall oder post source decay (PSD) und führt zur Ausbildung eines geladenen und eines neutralen Moleküls. Beide haben zwar eine geringere kinetische Energie als das unfragmentierte Molekül, aber die ursprüngliche Geschwindigkeit. Deshalb werden sie in der TOF-Analyse nicht getrennt aufgezeichnet. Durch ein zweites elektrisches Feld, das dem niedrigen Energie-Niveau der Fragmente angepasst ist, wird die Detektierung der PSD-Fragmente ermöglicht [Meyer et al., 2006]. Die resultierenden Fragmentspektren geben Hinweise auf die molekulare Struktur des Muttermoleküls und können mit Referenzspektren verglichen werden.

2.2. Spezieller Teil

Die Abbildung 2 zeigt schematisch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendeten Schritte zur Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von Mononukleotiden aus dem endothelialen Sekretom.

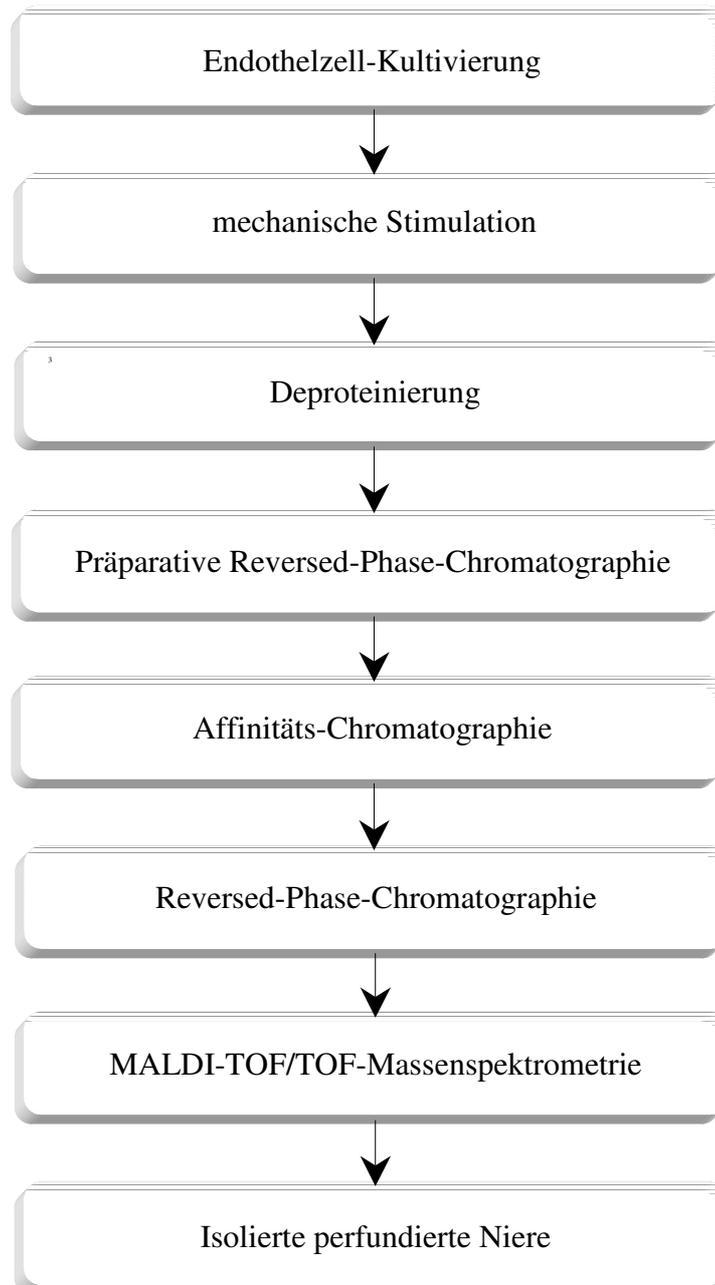


Abbildung 2: Übersicht über die Arbeitsschritte zur Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von Mononukleotiden aus dem endothelialen Sekretom

2.2.1. Kultivierung humaner Endothelzellen

Immortalisierte humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1) wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen (n=15) im Medium MCDB131 kultiviert. Das Medium enthielt 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/l Penicillin, 1% (v/v) L-Glutamin und 7,5% (v/v) Rinderserum. Die Endothelzellen wurden bis zur 70%igen Konfluenz angezüchtet.

2.2.2. Stimulation und Konservierung der Endothelzell-Überstände

Die Endothelzell-Kulturen in den Kulturflaschen wurden dreimal mit einer wässrigen physiologischen Kochsalz-Lösung gewaschen. Nach Zugabe von 15 ml physiologischer Kochsalz-Lösung wurden die Zellen mit einer Stimulationszeit von 10 min mechanisch stimuliert. Der Überstand der Endothelzellen wurde gesammelt und bei -20°C eingefroren.

2.2.3. Deproteinierung

Dem Überstand wurde langsam Perchlorsäure bis zu einer Endkonzentration von 0,6 M zugesetzt. Die Überstände wurden dabei durch ein Eisbad gekühlt. Die Proben wurden bei 4°C bei 3.500 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Der pH-Wert des Überstandes wurde im Eisbad mit Kaliumhydroxidlösung auf 9,0 titriert. Kaliumperchlorat wurde dabei ausgefällt. Die Substanzen wurden bei -20°C eingefroren. Nach 24 h wurden die Überstände aufgetaut und 5 min bei 4°C mit 3.500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und bei -80°C für 24 h eingefroren.

2.2.4. Präparative Reversed-Phase-Chromatographie

Der pH-Wert der Überstände wurde mit 1 M Triethylammoniumacetat auf 6,5 titriert. Je 25 ml des Probengemisches wurden auf zwei hintereinandergeschaltete Chromolith RP-18e-Säulen aufgetragen. Die Säulen wurden mit 40 mM Triethylammoniumacetat konditioniert. Die erste mobile Phase A war 40 mM Triethylammoniumacetat. Die zweite mobile Phase B bestand aus wässrigem 80%igen Acetonitril. Es wurde ein Ansteigen der zweiten mobilen Phase in einem 20%igen Gradienten gewählt. Die Leitfähigkeit und die UV-Absorption bei 254 nm wurden detektiert. Die Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase betrug 1 ml/min bei einer Fraktionsgröße

von 1,5 ml. Das Probeneluat wurde gesammelt. Die Fraktionen wurden bei -80°C eingefroren und lyophilisiert.

Tabelle 3: Gradient der präparativen RP-Chromatographie. Probe: Endothelzell-Überstände nach Deproteinierung, 2 Säulen: Chromolith RP-18e 100-4.6, Eluent A: 40 mM Triethylammoniumacetat in wässriger Lösung, pH: 6,5, Eluent B: 80% wässriges Acetonitril, Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min, UV-Detektion: 254 nm, Fraktionsgröße: 1,5 ml

Zeit [min]	0-15	15-23	23-31	31-39	39-47	47-57
80%iges wässriges ACN (Eluent B) [%]	0	20	40	60	80	100

2.2.5. Affinitäts-Chromatographie

Mit den Fraktionen, die während der Reversed-Phase-Chromatographie innerhalb der Konzentration von 20% wässrigen Acetonitrils eluierten, wurde eine Affinitäts-Chromatographie durchgeführt. Die stationäre Phase war ein mit m-Aminophenylboronsäure gekoppelter Kationenaustauscher. 100g Phenylboronsäure Bio-Rex-Gel wurde mit 400 ml wässriger 0,25 M Natriumacetatlösung bei einem pH-Wert von 5,0 vermischt. Mit konzentrierter Essigsäure wurde der pH auf 5,0 eingestellt. Es wurden 10 g 1-Ethyl,3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid hinzugefügt. Die Substanzen wurden 15 min vermengt. Das Gel wurde mit 10 g m-Aminophenylboronsäure-Hemisulfat 15 min vermengt. Der pH Wert der Suspension wurde auf 5,0 eingestellt. Daraufhin wurde das Gel 18 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Flüssigkeit wurde abgetrennt. Das Gel wurde in eine Glassäule gefüllt und mit 1 l destilliertem Wasser gewaschen. Danach folgten weitere Waschschrte mit 500 ml einer 100 mM Natriumacetat- und 1 M Natriumchlorid-Lösung bei einem pH-Wert von 4,5 und 500 ml einer wässrigen 100 mM Ammoniumacetat- und 1 M Natriumchlorid-Lösung bei pH 9. Zuletzt wurde das Gel mit 500 ml destilliertem Wasser aufgefüllt und 60 min entgast [Barnes et al., 1985]. Die Säule wurde mit 10 mM Ammoniumacetat equilibriert. Die Proben wurden in 10 mM Ammoniumacetat gelöst, der pH-Wert wurde auf 9,5 titriert. Das Probenvolumen wurde auf die Säule aufgetragen. Die erste mobile Phase war 1 M Ammoniumacetat. Die zweite mobile Phase war 10 mM Salzsäure. 10 mM Salzsäure stieg in einer Stufe für 8 min auf 100% an. Die Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase betrug 3 ml/min Die Fraktionsgröße betrug 3,5 ml. Die Leitfähigkeit und die UV-Absorption bei 254 nm wurden detektiert. Das Eluat wurde gesammelt. Die Fraktionen wurden bei -80°C gefroren.

Tabelle 4: Gradient der Affinitätschromatographie. Probe: Lyophilisiertes Eluat bei 20%igem wässrigen ACN, Säule: Kationenaustauscher mit m-Aminophenylboronsäure, Eluent A: 1 M NH₄Ac, pH: 9,5, Eluent B: 10 mM HCl, Flussgeschwindigkeit: 3 ml/min, UV-Detektion: 254 nm, Fraktionsgröße: 3,5 ml

Zeit [min]	0 - 10	10-18
10 mM HCl (Eluent B) [%]	0	100

2.2.6. Reversed-Phase-Chromatographie

Als Säule wurde die Chromolith RP-18e verwendet. Die Säule wurde mit 40 mM Triethylammoniumacetat equilibriert. Der pH-Wert wurde auf 6,5 titriert. Lösungsmittel A war 40 mM Triethylammoniumacetat. Lösungsmittel B war 80%iges wässriges Acetonitril. Lösungsmittel B stieg in einem linearen Gradienten an. Die Flussgeschwindigkeit betrug 1 ml/min bei einer Fraktionsgröße von 1 ml. Die Leitfähigkeit und die UV-Absorption bei 254 nm wurden detektiert. Die fraktionierten Proben wurden gesammelt, eingefroren und lyophilisiert.

Tabelle 5: Gradient der RP-Chromatographie. Probe: Fraktionen der Affinitätschromatographie, Säule: Chromolith RP-18e 100-4.6, Eluent A: 40 mM Triethylammoniumacetat in wässriger Lösung, pH: 6,5, Eluent B: 80% wässriges Acetonitril, Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min, UV-Detektion: 254 nm, Fraktionsgröße: 1 ml

Zeit [min]	0 - 40	40 - 41	41 - 44
80%iges wässriges ACN (Eluent B) [%]	0 - 10	10 - 100	100

2.2.7. Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)

1 µl Aliquot der Fraktionen wurde auf den MALDI-Ankerteller aufgetragen. Als organische Matrix wurde 1 µl 4-Hydroxypicolinsäure verwendet. Das Matrix-Proben-Verhältnis betrug 1:1. Nach der Trocknung wurde der Proben-teller über eine Vakuumschleuse in das Massenspektrometer eingeschleust. Die Messungen wurden auf einem Bruker Ultraflex TOF/TOF-Gerät von Bruker-Daltonics durchgeführt. Dieses Gerät ist mit einem Smart-Beam-Laser von Laser Science ausgestattet. Zur Kalibrierung des MALDI-Massenspektrometers wurde eine Mischung von Referenz-Peptiden benutzt. Die Wellenlänge des Lasers betrug 337 nm bei einer Impulsdauer von 3

ns. Der Durchmesser der Bestrahlungsfläche betrug 50-100 μm . Es wurden im Durchschnitt 200 Einzelspektren im Reflektor-Modus und 600 Einzelspektren im LIFT-Modus aufsummiert. Positiv geladene Ionen wurden im Reflektor-Modus analysiert. Fragmentierte Ionen wurden im LIFT-Modus detektiert.

2.2.8. Isolierte perfundierte Niere

Die isolierte perfundierte Niere ist ein Versuch zur Prüfung vasoregulativer Eigenschaften einer Substanz. Eine männliche Wistar-Kyoto-Ratte wurde intraperitoneal mit Urethan anästhesiert. Die Bauchhöhle wurde durch einen Längsschnitt eröffnet und die linke Niere stumpf freipräpariert. Die infrarenale Aorta und die linke Arteria renalis wurden ligiert. Von kranial wurde ein Polyethylen-Katheder in die Aorta eingeführt und 250 IE Heparin als Bolus injiziert. Der Katheder wurde bis in die Arteria renalis vorgeschoben. Die Aorta wurde proximal und distal durchtrennt. Die Niere wurde an die Perfusion mit physiologischer Krebs-Henseleit-Lösung angeschlossen. Diese Lösung bestand aus NaH_2PO_4 (0,42 mM), NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), MgCl_2 (1,1 mM), NaHCO_3 (12,0 mM), Glucose (5,6 mM) und CaCl (1,8 mM). Dem System wurde kontinuierlich 95%iges O_2 und 5%iges CO_2 bei 38°C zugeführt. Die präparierte Niere wurde 30 min equilibriert. Die Testsubstanzen wurden in die Arteria renalis injiziert. Je 100 μl Angiotensin II und α,β -Methyl-ATP in der Konzentration von 1 nM wurden als Referenzsubstanzen eingesetzt. Für die dosis-abhängigen Wirkungskurven wurden α,β -Methyl-ATP, Adenosin-Tetraphosphat, ATP, Noradrenalin und Uridin-Adenosin-Tetraphosphat auf die zu testenden Konzentrationen verdünnt und je 100 μl Aliquot injiziert. Zwischen den Injektionen wurde das Erreichen der Basislinie abgewartet. Im zweiten Teil wurde α,β -Methyl-ATP in einer Endkonzentration von 10 μM zur Perfusionslösung hinzugefügt. Adenosin-Tetraphosphat wurde auf die zu testenden Konzentrationen verdünnt und als Aliquot von je 100 μl injiziert.

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung des Mononukleotids

3.1.2. Präparative Reversed-Phase-Chromatographie

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass der Überstand kultivierter Endothelzellen vasokonstriktiv wirksam ist. Diese Vasoaktivität wurde unter anderem auf Mononukleotide zurückgeführt. Zur Isolierung dieser Mononukleotide aus endothelialen Überständen wurden Endothelzellen angezchtet. Die Überstände der Kulturen wurden nach mechanischer Stimulation gesammelt und mittels Perchlorsäure deproteiniert. Die deproteinierten Überstände wurden mittels einer präparativen Reversed-Phase-Chromatographie in einem Stufengradienten konzentriert und fraktioniert. Ein charakteristisches Chromatogramm ist in Abbildung 3 dargestellt.

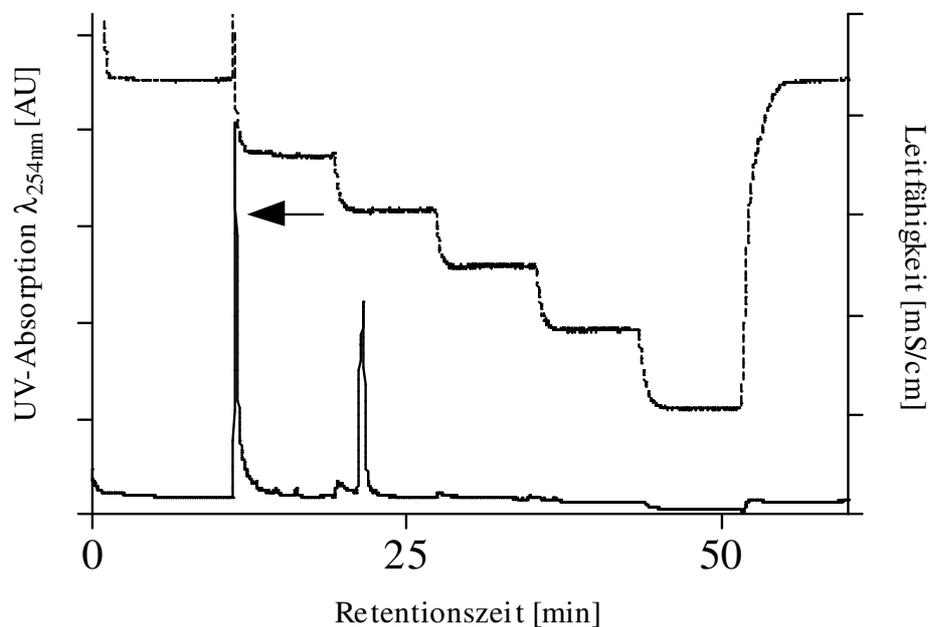


Abbildung 3: Chromatogramm der präparativen Reversed-Phase-Chromatographie
Probe: Endothelzell-Überstände nach Deproteinierung
—: UV-Absorption; ---: Leitfähigkeit
Eluent A: 40 mM TEAA in wässriger Lösung
Eluent B: 80% wässriges Acetonitril

In dem Chromatogramm sind zwei deutliche UV-Absorptionspeaks zu erkennen. Beim pfeilmarkierten Peak, der entsprechend 20% des wässrigen Acetonitrils eluierte, handelt es sich um die Fraktionen, in denen die vasoaktive Substanz gefunden wurde. Diese Fraktion wurde gesammelt und eingefroren.

3.1.3. Affinitäts-Chromatographie

Das Eluat der präparativen Reversed-Phase-Chromatographie wurde zusammengefasst und mit einem mit m-Aminophenylboronsäure derivatisierten Kationenaustauscher chromatographiert. Das resultierende Chromatogramm zeigt Abbildung 4.

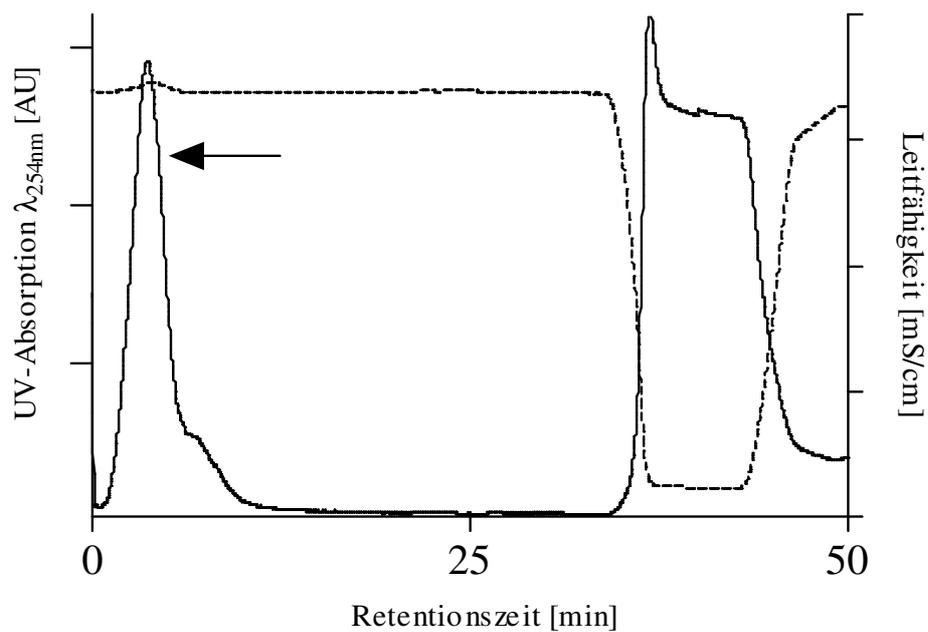


Abbildung 4: Chromatogramm der Affinitätschromatographie

Probe: Lyophilisiertes Eluat bei 20%igem wässrigen ACN

—: UV-Absorption; ---: Leitfähigkeit

Eluent A: 1 M NH_4Ac

Eluent B: 10 mM HCl

In der Abbildung erkennt man einen deutlichen Peak zu Beginn der Chromatographie. Dieser pfeilmarkierte UV-Absorptions-Peak wurde gesammelt, zusammengefasst und eingefroren.

3.1.4. Reversed-Phase-Chromatographie

Die Fraktion des pfeilmarkierten Absorptionspeaks aus Abbildung 4 wurde mittels Reversed-Phase-Chromatographie chromatographiert. Das Eluat wurde durch die Reversed-Phase-Chromatographie entsalzt. Des weiteren diente dieser Chromatographie-Schritt der Fraktionierung. Ein charakteristisches Chromatogramm der Entsalzung ist in Abbildung 5 dargestellt. Während der Retentionszeit zwischen der 12. und der 22. Minute sind mehrere UV-absorbierenden Peaks zu erkennen. Die pfeilmarkierten Fraktionen wurden lyophilisiert.

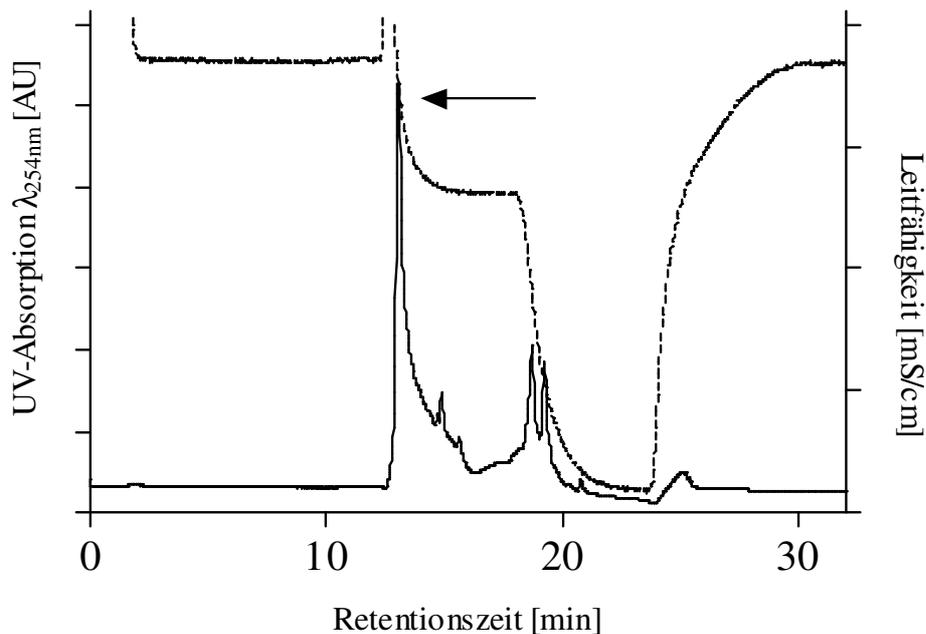


Abbildung 5: Chromatogramm der Reversed-Phase-Chromatographie
Probe: Fraktionen der Affinitätschromatographie
—: UV-Absorption; ---: Leitfähigkeit
Eluent A: 40 mM TEAA in wässriger Lösung
Eluent B: 80% wässriges Acetonitril

3.2. Identifizierung des Mononukleotids

3.2.1. MALDI-TOF- Massenspektrometrie

Die pfeilmarkierten UV-absorbierenden Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie aus Abbildung 5 wurden mit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. In Abbildung 6 ist das Spektrum der Fraktion dargestellt, in der eine Substanz mit dem Molekulargewicht von 588,4 Da bestimmt wurde. Diese Massenzahl entspricht der Massenzahl des Mononukleotids Adenosin-Tetraphosphat. Die bei 588,4 Da isolierte Substanz wurde fragmentiert, um Informationen über die molekulare Struktur zu erhalten.

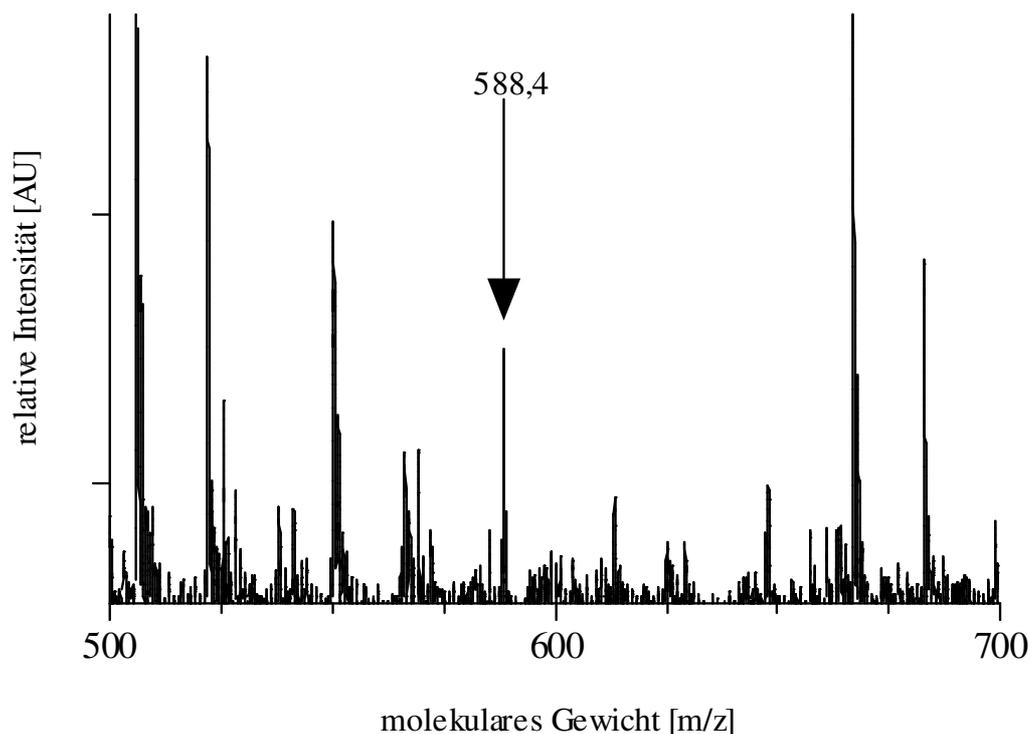


Abbildung 6: Massenspektrum der lyophilisierten Fraktion der Reversed-Phase-Chromatographie

3.2.2. MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie

Mit dem MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer wurden Fragmente der Substanz mit der Massenzahl 588,4 erzeugt. Das resultierende Fragmentspektrum ermöglichte durch den Abgleich mit dem Referenzspektrum des synthetisierten Adenosin-Tetraphosphats die Identifizierung.

Die Massenzahlen der Fragmente sind in der zweiten Spalte der Tabelle 6 aufgelistet. Die Referenz-Fragmente des synthetisch hergestellten Adenosin-Tetraphosphats sind der dritten Spalte der Tabelle 6 angegeben. Die erste Spalte zeigt die den Fragment-Massen zugehörige Interpretation. Sämtliche Massen-Fragment-Signale konnten dem Adenosin-Tetraphosphat zugeordnet werden.

Tabelle 6: Fragmentspektrum der Masse 588,4 Da und des synthetischen Adenosin-Tetraphosphats mit Interpretation

Interpretation des MALDI TOF/TOF-Massensignals $[M+H]^+$	TOF/TOF-Fragmente der Masse 588,4 Da	TOF/TOF-Fragmente des synthetischen Adenosin-Tetraphosphats
Ribose w/o COH	101.8	102.1
A'NH ₃	117.5	119.0
A-2H ₂ O	232.1	232.1
Ap ₁	348.8	348.1
Ap ₂ -H ₂ O	410.5	410.0
Ap ₂ +H ₂ O	448.8	448.0
Ap ₃ -H ₂ O	490.3	490.0
Ap ₃	508.9	508.4
Ap ₃ +H ₂ O	527.1	526.0
Ap ₄ -H ₂ O	570.6	570.0
M-A'	451.9	452.1
M-H ₂ O	570.6	570.2

3.2.3. Strukturformel des Adenosin-Tetraphosphats

Die Substanz mit der molekularen Masse 588,4 Da wurde als Adenosin-Tetraphosphat identifiziert. Adenosin-Tetraphosphat besteht aus einem Adenosin, das am 5'-Ende der Ribose eine Phosphatkette mit vier Phosphaten enthält. Die Strukturformel des Adenosin-Tetraphosphats ist in Abbildung 7 dargestellt.

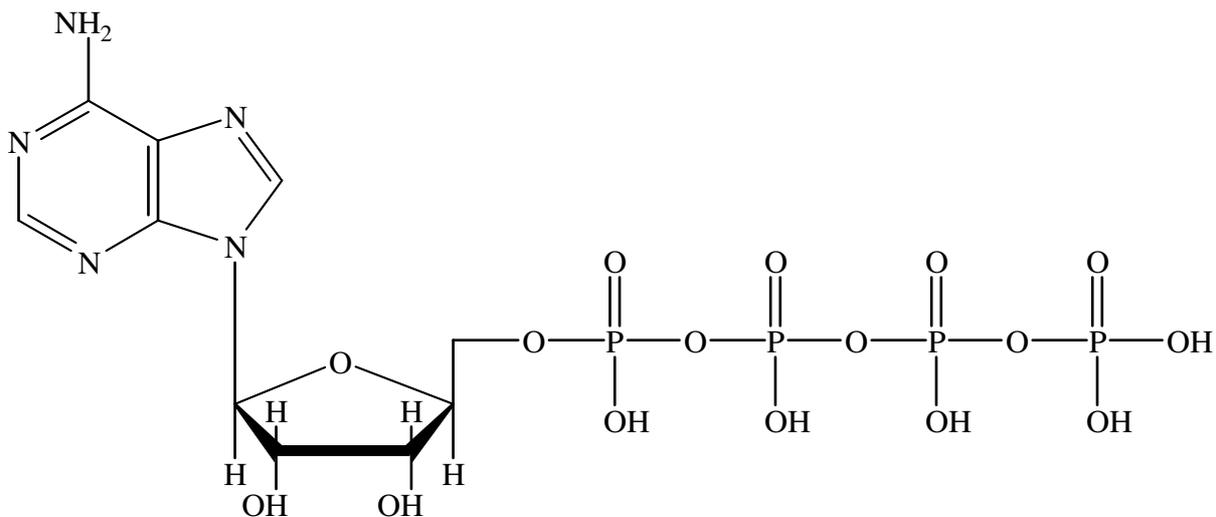


Abbildung 7: Strukturformel des Adenosin-Tetraphosphats

3.3. Vasoregulatorische Wirkung des Adenosin-Tetraphosphats

Nach Identifizierung wurde Adenosin-Tetraphosphat auf seine vasoregulatorische Wirkung an der isolierten perfundierten Niere getestet. Abbildung 8 zeigt die Wirkung des Adenosin-Tetraphosphats sowie bekannter vasokonstriktiv wirkender Substanzen in verschiedenen Konzentrationen. Es sind die dosis-abhängigen Wirkungskurven von Adenosin-Tetraphosphat, α,β -Methyl-ATP, ATP, Noradrenalin und Uridin-Adenosin-Tetraphosphat abgebildet.

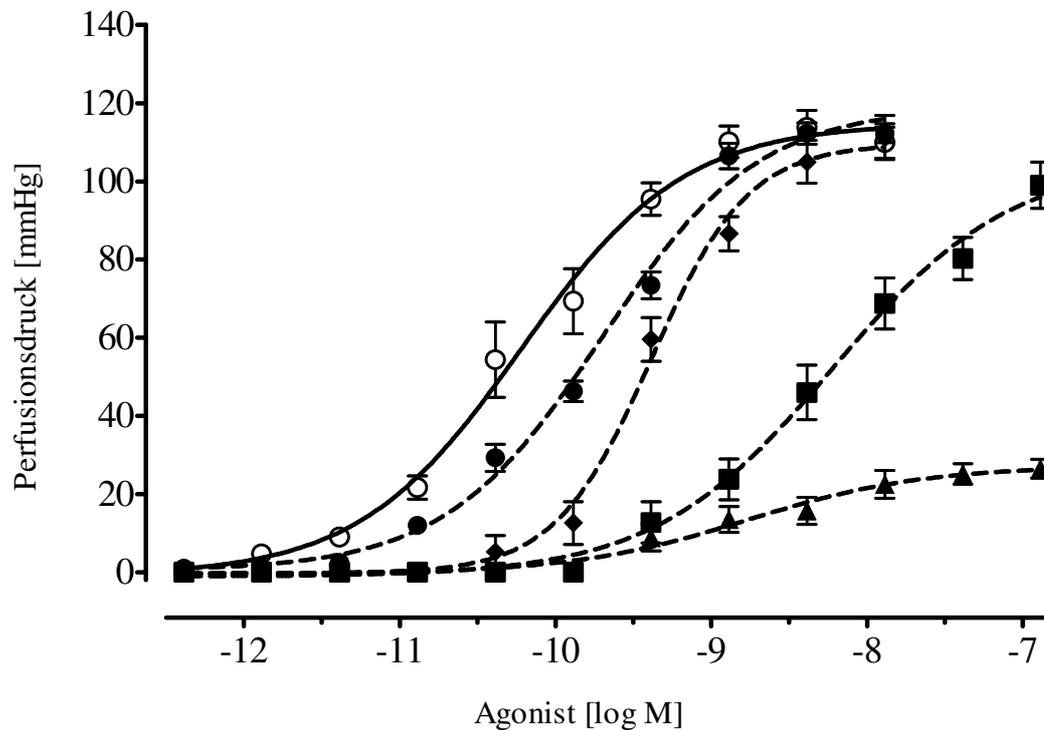


Abbildung 8: Dosis-abhängige Wirkungskurven von Adenosin-Tetraphosphat, α,β -Methyl-ATP, ATP, Noradrenalin und Uridin-Adenosin-Tetraphosphat an einer isolierten perfundierten Niere

Legende:

- Adenosin-Tetraphosphat
- α,β -Methyl-ATP
- ◆ Noradrenalin
- Uridin-Adenosin-Tetraphosphat
- ▲ ATP

Die dosis-abhängigen Wirkungskurven zeigen, dass es mit steigender Konzentration der Agonisten zu einem deutlichen Anstieg des Perfusionsdrucks der isolierten perfundierten Niere kommt. Adenosin-Tetraphosphat führt zur stärksten Veränderung des Drucks in allen Konzentrationen mit einer maximalen Druckveränderung bei $10^{-9,5}$ mol.

Zur Identifizierung des Rezeptors wurden die dosis-abhängigen Wirkungskurven des Adenosin-Tetraphosphats an der isolierten perfundierten Niere mit und ohne Zugabe von α,β -Methyl-ATP zur Perfusionslösung geprüft. Die resultierenden Wirkungskurven sind in Abbildung 9 dargestellt.

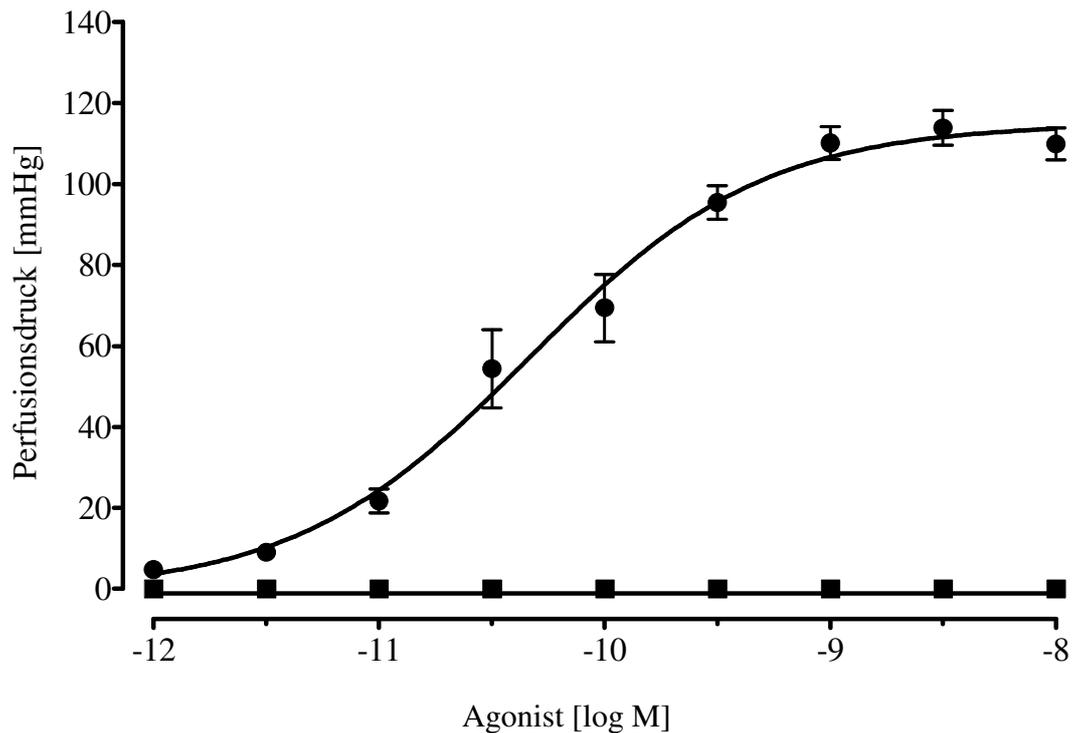


Abbildung 9: Dosis-abhängige Wirkungskurven von Adenosin-Tetraphosphat an einer isoliert perfundierten Niere mit und ohne Dauerperfusion mit α,β -Methyl-ATP

Legende: ● ohne Dauerperfusion
■ α,β -Methyl-ATP-Dauerperfusion

Der Kurvenverlauf ohne α,β -Methyl-ATP (●) zeigt, dass Adenosin-Tetraphosphat stark vaso-konstriktiv wirksam ist. In Gegenwart von α,β -Methyl-ATP (■) zeigte sich kein Effekt durch Adenosin-Tetraphosphat an der isolierten perfundierten Niere.

3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind:

- 1) Mittels Reversed-Phase- und Affinitäts-Chromatographie wurde der Überstand stimulierter Endothelzellen aufgereinigt.
- 2) Durch MALDI-TOF- und MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie wurde eine Substanz mit der Masse 588,4 Da nachgewiesen und als Adenosin-Tetraphosphat interpretiert.
- 3) Adenosin-Tetraphosphat ist an der isolierten perfundierten Niere stark vasokonstriktiv wirksam. Die Vasoaktivität lässt sich durch Dauerperfusion mit α,β -Methyl-ATP hemmen.

4. Diskussion

Essentielle Hypertonie ist eine multifaktorielle Erkrankung, in deren Mittelpunkt ein gesteigertes Herz-Zeit-Volumen und ein erhöhter peripherer Widerstand stehen. Endothelzellen als innere, stoffwechselaktive Schicht der Gefäße sind an der Regulierung des peripheren Widerstandes beteiligt. Sie sind von zentraler Bedeutung für die Pathogenese der Hypertonie.

Für das Verständnis des physiologischen und pathophysiologischen Einflusses der Endothelzellen auf den vaskulären Tonus ist eine genaue Kenntnis der zugrundeliegenden Mechanismen und Mediatoren erforderlich. Zu den endothel-abhängigen Mediatoren, die in die Blutbahn und in die direkte Umgebung abgegeben werden, gehören NO, Prostazyklin und Endothelin. Auch die Substanzklasse der vasoaktiv-wirkenden Nukleotide hat einen hohen Stellenwert für die Regulierung des vaskulären Tonus [Ogilvie, 1992]. Ein bekanntes endothel-abhängiges, vasoregulatorisches Mononukleotid ist ATP [Liu et al., 2004]. Ralevic et al. haben schon im Jahr 1998 vermutet, dass Endothelzellen neben ATP noch andere vasoregulatorische Nukleotide synthetisieren und sezernieren können [Ralevic et al., 1998]. Im Jahr 2005 isolierten Jankowski et al. das Dinukleotid Uridin-Adenosin-Tetraphosphat aus dem Überstand der kultivierten Endothelzell-Linie HMEC-1 und charakterisierten es als vasokonstringierende und proliferationssteigernde Substanz [Jankowski et al., 2005a]. Jankowski et al. entdeckten, dass die Konzentration des Uridin-Adenosin-Tetraphosphats im Plasma hypertoner Kinder signifikant erhöht ist. Daraus resultierte die Annahme, dass Uridin-Adenosin-Tetraphosphat ein früher Indikator für eine veränderte Endothelfunktion ist [Jankowski et al., 2007]. Im Rahmen von Untersuchungen zur Physiologie und Pathophysiologie des Uridin-Adenosin-Tetraphosphats wurde außerdem gezeigt, dass Uridin-Adenosin-Tetraphosphat präglomeruläre Arteriolen kontrahiert. Dies beeinflusst die Natriumauscheidung und den Blutdruck durch Drosselung der Filtrationsrate [Jankowski et al., 2008].

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde gezeigt, dass das endotheliale Sekretom der kultivierten Endothelzell-Linie HMEC-1 an der isolierten perfundierten Niere zur Vasokonstriktion führt. Diese Vasokonstriktion war durch Inkubation des Überstandes mit alkalischer Phosphatase zum Teil aufhebbar. Da alkalische Phosphatase Mononukleotide spaltet, wurde ein Teil der Vasoaktivität auf Mononukleotid-Wirkung zurückgeführt. ATP wirkt durch seine kurze

Halbwertszeit nur gering vasokonstringierend, weshalb sich der beobachtete Effekt nicht nur auf das Mononukleotid ATP zurückführen ließ [Ralevic et al., 1998]. Aus diesem Grund wurde im experimentellen Teil der vorliegenden Dissertation untersucht, welche bisher nicht identifizierten vasoregulatorischen Mononukleotide im endothelialen Sekretom enthalten sind. Mit Hilfe chromatographischer und massenspektrometrischer Methoden konnte das Mononukleotid Adenosin-Tetraphosphat isoliert und identifiziert werden.

Es wurde in der vorliegenden Studie die immortalisierte humane mikrovaskuläre Zelllinie HMEC-1 verwendet, die bezüglich ihres Phänotyps und ihrer funktionellen Charakteristika mit primären Endothelzellen vergleichbar ist [Ades et al., 1992; Bouis et al., 2001]. Die detaillierte Charakterisierung der Endothelzellen erfolgte durch den Von-Willebrand-Faktor, den Kofaktor der Blutgerinnung [Pearson, 2000], die endotheliale NO-Synthase, den VEGF-Rezeptor-1 sowie durch die Abwesenheit von α -Aktinketten, welche nur in Muskelzellen nachweisbar sind [Wang et al., 2006; Gabbiani et al., 1984]. Durch diese präzise Charakterisierung ließen sich reife kultivierte Endothelzellen von anderen Zellen differenzieren.

Nach mechanischer Stimulation wurde das resultierende Sekretom kultivierter HMEC-1 gesammelt. Zur Deproteinierung wurde den Überständen Perchlorsäure hinzugefügt. Dadurch wurden eventuell vorhandene abbauende oder dem Transport dienende Proteine des Adenosin-Tetraphosphats denaturiert und Adenosin-Tetraphosphat wurde freigesetzt [Garrison et al., 1992]. Durch Zugabe von Kaliumhydroxid-Lösung wurde die Perchlorsäure als Kaliumperchlorat ausgefällt, denn der stark saure pH-Wert von < 3 könnte sowohl die Mononukleotide als auch die anschließend eingesetzte Reversed-Phase-Chromatographie-Säule hydrolysieren. Durch Zentrifugieren und Abdekantieren des Überstandes wurde daher das Kaliumsalz aus dem Substanzgemisch entfernt. Da während der Deproteinierung Energie in Form von Wärme frei wird, wurden die Substanzen in einem Eisbad gekühlt, um thermolabile Substanzen nicht zu zerstören.

Im ersten chromatographischen Schritt wurden die Endothelzell-Überstände mittels einer präparativen Reversed-Phase-Chromatographie entsalzt und fraktioniert. Die Reversed-Phase-Chromatographie basiert auf hydrophoben Wechselwirkungen [Kellner, 2006]. Diese Chromatographie-Art wurde eingesetzt, da durch ihren Einsatz weniger und stärker hydrophobe Substanzen von den mäßig hydrophoben Nukleotiden abgetrennt werden können. Der hydrophoben

Anziehung zwischen Säule und Substanz wirken die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleotide entgegen. Daher wurde das kationische Triethylammoniumacetat als Ionenpaarreagenz eingesetzt, um die ionischen Gruppen der Substanzen zu maskieren und die Adsorption an die Säule zu ermöglichen.

Zur der Elution der Substanzen wurden zwei mobile Phasen unterschiedlicher Polarität gewählt, die in einem Gradienten anstiegen: Mit der ersten schwachen mobilen Phase 40 mM wässriges Triethylammoniumacetat wurden die Endothelzell-Überstände auf die Säule aufgetragen. Das zweite Lösungsmittel Acetonitril konkurrierte um die hydrophoben Bindungsstellen der Säule und eluierte hydrophobe Substanzen mit seiner ansteigenden Konzentration. Acetonitril ist ein mittelstarkes organisches Lösungsmittel, das sich durch geringe Viskosität und hohes Auflösungsvermögen auszeichnet [Chicz et al., 1990]. Polare Substanzen wurden durch die präparative Reversed-Phase-Chromatographie entfernt, weil sie keine Affinität zur Säule haben. Die präparative Reversed-Phase-Chromatographie diente auch der Beseitigung von akzidentell desintegrierten Substanzen mit Diol-Gruppen, da sie im nächsten Chromatographie-Schritt an die Affinitäts-Chromatographie-Säule binden würden. Um eine ausreichende Trennkapazität zu gewährleisten, wurden zwei hintereinandergeschaltete Säulen verwendet. Die mäßig hydrophoben Nukleotide eluierten unter den gewählten Bedingungen beim Ansteigen des apolaren Lösungsmittels Acetonitril auf 20%. Die Fraktionen, die in diesem Bereich eluierten, wurden nach der Entfernung der Lösungsmittel durch Lyophilisierung mit einer Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt.

Durch die verwendete Affinitäts-Chromatographie konnten die Mono- von den Dinukleotiden getrennt werden. Die Affinitäts-Chromatographie ist ein Verfahren mit hoher Selektivität, welches Substanzen mit starker Affinität zur Säule aus dem Substanzgemisch isoliert [Ostrove, 1990]. Das Säulenmaterial der in der vorliegenden Studie verwendeten stationären Phase bestand aus einem Kationenaustausch-Gel, das mit m-Aminophenolboronsäure derivatisiert worden ist. Diese Säure hat im basischen pH-Bereich eine Affinität zu den Diol-Gruppen der Nukleotid-Ribose [Barnes et al., 1985]. Die negativen Phosphatgruppen des Adenosin-Tetraphosphats wurden durch Ammoniumacetat neutralisiert, um abstoßende ionische Wechselwirkungen mit den Kationenaustausch-Gruppen der Säule zu verhindern, die der Adsorption entgegenwirken. Da Mononukleotide nur aus einer Ribose mit einer Diol-Gruppe bestehen, besitzen sie eine geringe

Affinität zur Gelmatrix und durchlaufen die Säule ohne wesentliche Retention. Dinukleotide mit zwei Diol-Gruppen haben eine starke Affinität zur Säule. Sie eluieren erst beim Anstieg des zweiten Lösungsmittels Salzsäure, das die Kationenaustausch-Gruppen der Säule demaskiert. Die Trennung erfolgte im Affinitäts-Chromatographie-Schritt also dadurch, dass Mononukleotide vor Dinukleotiden eluierten.

Die Mononukleotide waren nach der Affinitäts-Chromatographie in den früh eluierenden Fraktionen konzentriert. Das Eluat wurde im Anschluss zur Entsalzung auf eine Reversed-Phase-Chromatographie-Säule aufgetragen. Die Entsalzung war notwendig, da Puffersalze die Kokristallisierung der Substanzen mit der Matrix verhindern und das Auflösungsvermögen der Massenbestimmung vermindern. Zur Elution wurde ein gering ansteigender linearer Gradienten gewählt, um eine breite Fraktionierung für die Massenbestimmung zu erhalten. Das als Ionenpaarreagenz eingesetzte Triethylammoniumacetat ist mit der MALDI-Massenspektrometrie kompatibel, denn es geht keine kovalenten Bindungen mit den Phosphatgruppen der Nukleotide ein und kann daher durch Lyophilisierung aus den Substanzen entfernt werden [Jankowski et al., 2005b].

MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie ist ein Verfahren zur Massenbestimmung, das durch hohe Sensitivität und Auflösung charakterisiert ist [Jankowski et al., 2008]. Mit der MALDI-TOF- und MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie konnte Adenosin-Tetraphosphat im aufgereinigten endothelialen Sekretom identifiziert werden.

Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde im Reflektor-Modus eine Substanz der Masse 588,4 Da detektiert, die Adenosin-Tetraphosphat zugeordnet werden konnte. Um diese Zuordnung zu sichern, wurde eine MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie durchgeführt, die Informationen über die molekulare Struktur liefert [Jankowski et al., 2003; Meyer, 2006]. Im LIFT-Modus wurde das vollständige Fragmentspektrum der Masse 588,4 Da aus dem endothelialen Sekretom aufgenommen und mit dem Fragmentspektrum des synthetisch hergestellten Adenosin-Tetraphosphats verglichen. Die Interpretation der Masse 588,4 Da als Adenosin-Tetraphosphat wurde dadurch bestätigt.

Adenosin-Tetraphosphat wurde nach Isolierung und Identifizierung auf seine vasokonstriktive Wirkung an der isolierten perfundierten Niere getestet. Für diesen Assay wurde das Organ extra-

korporal oxygeniert und mit einer in ihrer Elektrolyt- und Salzkonzentration dem Blut angeglichenen Lösung perfundiert. Die vasokonstriktive Wirkung des Adenosin-Tetraphosphats an der isolierten perfundierten Niere wurde mit der Wirkung der bekannten vasokonstriktiven Mediatoren α,β -Methyl-ATP, ATP, Noradrenalin und Uridin-Adenosin-Tetraphosphat verglichen. α,β -Methyl-ATP ist ein stabiles ATP-Analogon, das zwischen zwei Phosphatgruppen synthetisch methyliert ist [Ralevic et al., 1998]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Adenosin-Tetraphosphat bei gleicher absoluter Konzentration an der Arteria renalis am stärksten konstriktiv wirksam ist.

Die vasokonstriktive Wirkung des Adenosin-Tetraphosphats der vorliegenden Studie bestätigt frühere Studien, in denen seine Vasoaktivität an großen Gefäßen gezeigt wurde: Adenosin-Tetraphosphat ist ein starker Vasodilatator der Herzkranzgefäße [Westhoff et al., 2003]. In perfundierten Aortenringen und an der Mesenterialarterie wirkt Adenosin-Tetraphosphat vasostringierend [Lee et al., 1995b; Lewis et al., 2000a]. Die Infusion von Adenosin-Tetraphosphat in die Aorta führt im normotensiven Bereich zur Senkung, im hypotensiven Bereich zum Anstieg des Blutdrucks [Kong et al., 1991].

Extrazelluläre Mediatoren vermitteln ihre biologischen Effekte über spezifische Rezeptoren. Nukleotide sind Agonisten der P₂-Rezeptoren [Jankowski et al., 2005a; Burnstock, 2006]. Noradrenalin dagegen bindet als Katecholamin an α_1 -Adrenozeptoren [Knight et al., 2003]. Der vasokonstriktive Effekt Adenosin-Tetraphosphats wird an Aortenringen und der Arteria mesenterica über P₂X-Rezeptoren vermittelt [Lee et al., 1995b]. Für diesen Rezeptor ist an der Mesenterialarterie nachgewiesen, dass Adenosin-Tetraphosphat stärker konstriktiv wirksam ist als α,β -Methyl-ATP [Lewis et al., 2000a]. Das stabile ATP-Analogon α,β -Methyl-ATP ist am P₂X-Rezeptoren stärker wirksam als ATP, da es langsamer abgebaut wird [Ralevic et al., 1998]. Gleiches gilt für Adenosin-Tetraphosphat [Gomez-Villafuertes et al., 2000].

Der P₂X-Subtyp, an dem Adenosin-Tetraphosphat und α,β -Methyl-ATP an der Mesenterialarterie konstriktiv wirksam sind, ist der P₂X₁-Rezeptor [Lewis et al., 2000a]. P₂X₁ ist der dominante Rezeptor der glatten Muskelzelle [Burnstock, 2007; Lewis et al., 2000a; Wang et al., 2002]. Die Aktivierung von P₂X₁-Rezeptoren führt über einen intrazellulären Kalziumanstieg zur Depolarisation und Kontraktion [Lewis et al., 2000a]. Während häufig mehrere P₂X-Subtypen auf

der selben Zelle vorkommen, wird auf der glatten Muskelzelle der Arteria renalis nur P2X1 exprimiert [Turner et al., 2003]. Entsprechend wird die vasokonstriktive Wirkung α,β -Methyl-ATPs und ATPs an der isolierten perfundierten Niere über P2X1-Rezeptoren vermittelt [van der Giet et al., 1997].

In der vorliegenden Studie wurde die renale vasokonstriktive Wirkung des Adenosin-Tetraphosphats zur Identifizierung seines Rezeptors nach P2X1-Desensitivierung überprüft. Dafür wurden die P2X1-Rezeptoren in Gegenwart des P2X1-Agonisten α,β -Methyl-ATP durch eine Konformationsänderung des Ionenkanals funktionell inaktiviert [Rettinger et al., 2003]. Es wurde gezeigt, dass Adenosin-Tetraphosphat nach Desensitivierung keine Vasomotion mehr auslöst. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch Adenosin-Tetraphosphat an der isolierten perfundierten Niere am P2X1-Rezeptor angreift. Aufgrund dieses Ergebnisses kann vermutet werden, dass Adenosin-Tetraphosphat ubiquitär an P2X1-Rezeptoren wirksam ist.

Frühere Studien haben gezeigt, dass Adenosin-Tetraphosphat neben P2X-Rezeptoren auch P2Y-Rezeptoren aktiviert [Gomez-Villafuertes et al., 2000]. P2Y-Rezeptoren werden primär auf Endothelzellen exprimiert und sind vasodilatativ wirksam [Ralevic et al., 1998; Burnstock, 2007]. Da Adenosin-Tetraphosphat beide P2-Rezeptoren aktiviert, steht seine Charakterisierung als stärkster Agonist des P2X1-Subtyps nicht im Widerspruch dazu, dass es an den Koronargefäßen über P2Y-Rezeptoren der Endothelzellen zur Vasodilatation führt [Westhoff et al., 2003]. Diese koronare Vasodilatation kann durch das Überwiegen der P2Y-Rezeptoren gegenüber P2X1-Rezeptoren am Endothel erklärt werden, denn die Verbreitung der purinergen Rezeptoren ist heterogen und für jeden Gefäßtyp spezifisch [Ralevic et al., 1998; Mateo et al., 1996; Tepel et al., 1997]. Untersuchungen haben gezeigt, dass P2Y-Rezeptoren reichlich auf dem Endothel der Herzkranzgefäße exprimiert werden, P2X1-Rezeptoren dagegen gar nicht [Webb et al., 1996; Lewis et al., 2000b].

Auch an Nierengefäßen werden P2Y-Rezeptoren exprimiert. An der Niere sind sie jedoch nicht auf Endothelzellen, sondern auf glatten Muskelzellen lokalisiert [Turner et al., 2003]. Solche P2Y-Rezeptoren vermitteln keine Vasodilatation, sondern ebenfalls Vasokonstriktion [Wang et al., 2002, Knight et al., 2003]. Obwohl P2Y-Rezeptoren nicht durch α,β -Methyl-ATP desensitiviert werden, löste Adenosin-Tetraphosphat nach Inaktivierung der P2X1-Rezeptoren keine wei-

tere Gefäßreaktion aus [Ralevic et al., 1998]. Die Menge der an der glatten Muskelzelle der Arteria renalis exprimierten P2Y-Rezeptoren ist für die funktionelle Vasokonstriktion offenbar nicht ausreichend.

Adenosin-Tetraphosphat könnte darüber hinaus durch seinen Metaboliten Adenosin eine Vasodilatation bewirken [Lewis et al., 2000a, Ralevic et al., 1998]. Für Nukleotide ist ein ausgeprägter Metabolismus mit Interkonversion nachgewiesen. Nukleotid-Polyphosphate können enzymatisch in andere Nukleotide mit geringerer Phosphatgruppen-Anzahl überführt werden. Die Metabolite sind wirksam und verstärken einen Effekt oder wirken ihm entgegen [Ralevic et al., 1998]. Ein Abbauweg Adenosin-Tetraphosphats ist die Metabolisierung zu ATP. ATP wird über ADP zu AMP degradiert und schließlich zu Adenosin und Phosphat abgebaut [Guranowski, 2000].

Um die funktionelle Relevanz des Adenosin-Tetraphosphats im Organismus einzuordnen, ist die Kenntnis seiner Speicherorte und biologischen Funktionen wichtig. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurde Adenosin-Tetraphosphat in der quergestreiften Muskulatur, dem Myokard, der Leber, chromaffinen Zellen, Thrombozyten und dem Auge nachgewiesen [Liebermann, 1955; Small et al., 1966a; Zamecnik et al., 1969; Penglis, 1977; van Dyke et al., 1977; Lee et al., 1995a; Gualix et al., 1996; Westhoff et al., 2003; Pintor et al., 2004]. In diesen Zusammenhängen wirkt Adenosin-Tetraphosphat an der ADP-induzierten Plättchenaggregation mit, führt an der glatten Muskelzelle des Vas deferens zur Kontraktion, senkt am Auge den intraokularen Druck und beeinflusst den Nukleotid-Stoffwechsel durch die Hemmung abbauender Hydrolasen [Vallejo et al., 1974; Lobaton et al., 1975; Ignarro et al., 1976; Penglis, 1977; Cameselle et al., 1982; Taylor et al., 1983; Bailey et al., 1995; Lee et al., 1995a; Mateo et al., 1997, Pintor et al., 2004].

Der Syntheseweg des Adenosin-Tetraphosphats ist derzeit nicht bekannt. Es entsteht entweder durch die Übertragung einer Phosphatgruppe auf ATP oder durch Degradierung der Dinukleotide Ap₅A und Ap₆A [Guranowski et al., 2006]. Die Synthese Adenosin-Tetraphosphats kann sowohl durch enzymatische Mechanismen katalysiert werden als auch durch Dismutation erfolgen [Small et al., 1966b; Zamecnik et al., 1969; Kupriyanov et al., 1986; Ortiz et al., 1993; Guranowski et al., 1994; Zimmermann, 1996; Fontes et al., 1998; Madrid et al., 1998; Burnstock, 2006; Verheyden et al., 1965]. Adenosin-Tetraphosphat wird spezifisch durch eine Nukleosid-5'-

Tetraphosphatase-Hydrolase sowie eine Exopolyphosphatase, die aus Adenosin-Tetraphosphat ATP und ein Phosphat freisetzen, abgebaut [Guranowski, 2000]. Es bleibt zu klären, welche der Reaktionen in Endothelzellen durch Synthese und Abbau die Konzentration Adenosin-Tetraphosphats kontrollieren.

Aufgrund seiner Potenz als vasoregulatorischer Mediator sollte die Bedeutung Adenosin-Tetraphosphats für die Pathogenese der Hypertonie im Detail untersucht werden. In diesem Zusammenhang kann auch der Frage nachgegangen werden, ob selektive und metabolisch stabile P2-Rezeptoren-Hemmer für die Therapie des Bluthochdrucks geeignet sind. Ein anderes therapeutisches Ziel für selektiv blockierende Substanzen des P2X1-Subtyps der glatten Muskelzelle könnten kritische Ischämien im Rahmen einer peripheren arteriellen Verschluss-Krankheit oder koronaren Herzerkrankung sein.

Fazit

In der vorliegenden Dissertation wurde das Mononukleotid Adenosin-Tetraphosphat im Überstand stimulierter Endothelzellen nachgewiesen und an der isolierten perfundierten Niere als stärkster bekannter Agonist des P2X1-Rezeptors charakterisiert. Eine endgültige Aussage über die Bedeutung Adenosin-Tetraphosphats als Faktor für die Pathogenese der Hypertonie oder einer Gefäßerkrankung kann an dieser Stelle noch nicht getroffen werden. Es kann aufgrund seines Vorkommens in Endothelzellen und wegen seines hohen vasomotorischen Potentials davon ausgegangen werden, dass Adenosin-Tetraphosphat an der Regulierung des lokalen Gefäßtonus beteiligt ist. In nachfolgenden Studien sollten die systemischen Auswirkungen des Adenosin-Tetraphosphats detaillierter erforscht werden. Die Kenntnis der Physiologie und Pathophysiologie Adenosin-Tetraphosphats sowie des P2X1-Rezeptorsystems eröffnet potentiell Optionen für hypertone und ischämische Erkrankungen.

5. Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen und ihr Hauptrisikofaktor Bluthochdruck sind die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern. Die Mehrzahl der Hypertonie-Erkrankungen werden der essentiellen Hypertonie zugeordnet, deren Ätiologie und Pathogenese nicht ausreichend erforscht ist.

Pathognomonisch für die essentielle Hypertonie ist der erhöhte periphere Gefäßtonus. Endothelzellen, die durch verschiedene Stimuli zur Sekretion vasoregulatorischer Mediatoren angeregt werden, sind an der vaskulären Tonusregulierung beteiligt. Dysfunktionales Endothel scheint das Verhältnis zwischen vasokonstriktiven und vasodilatativen Mediatoren nicht mehr auszubalancieren zu können. Die physiologischen und pathophysiologischen endothel-abhängigen tonusregulierenden Mediatoren sind jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur teilweise erfasst. Zu den bekannten vasoregulatorischen Substanzen gehören NO, Prostazyklin und Endothelin, aber auch extrazelluläre Nukleotide. Nukleotide sind die dem purinergen Rezeptorsystem zugrunde liegenden Agonisten, die an glatten Muskelzellen zur Kontraktion führen und an Endothelzellen die Synthese vasodilatativer Substanzen anregen. Bisher ist bekannt, dass Endothelzellen neben dem Mononukleotid ATP auch das stark vasokonstriktorisch wirksame Dinukleotid Uridin-Adenosin-Tetraphosphat synthetisieren und sezernieren.

In der vorliegenden Studie wurde geprüft, welche bisher nicht identifizierten Mononukleotide im endothelialen Sekretom enthalten sind. Dazu wurde das Sekretom stimulierter humaner mikrovaskulärer Endothelzellen aufgereinigt. Im ersten chromatographischen Schritt wurden die Nukleotide durch eine präparative Reversed-Phase-Chromatographie isoliert. Mittels eines Affinität-Chromatographie-Schritts erfolgte die Trennung der Mono- von den Dinukleotiden. Im letzten Schritt wurden die Substanzen durch den Einsatz einer Reversed-Phase-Chromatographie entsalzt. Mittels Massenspektrometrie wurde eine Substanz mit der molekularen Masse 588,4 Dalton nachgewiesen. Durch MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie konnte diese Masse dem Mononukleotid Adenosin-Tetraphosphat zugeordnet werden. Des Weiteren wurde Adenosin-Tetraphosphat an der isolierten perfundierten Niere auf seine vasoaktive Wirkung hin überprüft. Adenosin-Tetraphosphat wurde als stark vasokonstriktorisch wirksam charakterisiert. Als entsprechender Rezeptor wurde der Rezeptor P2X1 identifiziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde das stark vasokonstriktiv wirksame Adenosin-Tetraphosphat im Überstand kultivierter stimulierter Endothelzellen nachgewiesen. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass Adenosin-Tetraphosphat an der Regulierung des vaskulären Tonus beteiligt ist. Die funktionelle Relevanz dieses Mediators, seine Bedeutung für die Pathogenese von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und die Suche nach selektiven Antagonisten müssen Gegenstand weiterer Studien sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 1992;99:683-690.
2. Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valenca MM, McCann SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 2004;84:169-208.
3. Bailey SJ, Hourani SM. Effects of suramin on contractions of the guinea-pig vas deferens induced by analogues of adenosine 5'-triphosphate. *Br J Pharmacol* 1995;114:1125-1132.
4. Barnes LD, Robinson AK, Mumford CH, Garrison PN. Assay of Ap4A hydrolytic enzymes by boronate. *Anal Biochem* 1985;144:296-304.
5. Beavis RC, Chait BT. Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry of proteins. *Methods Enzymol* 1996;270:519-551.
6. Bo X, Burnstock G. Triphosphat, the key structure of the ATP molecule responsible for interaction with P2X-purinoceptors. *Gen Pharmacol* 1993;24:637-640.
7. Bouis D, Hospers GA, Meijer C, Molema G, Mulder NH. Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* 2001;4:91-102.
8. Burnstock G. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 2006;147:S172-S181.
9. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:1471-1483.

10. Busse R. Gefäßsystem und Kreislaufregulation. In: Schmidt RF, Thews G, Lang F. Physiologie des Menschen. 28. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 2000:498-561.
11. Cameselle JC, Costas MJ, Sillero MA, Sillero A. Bis-(5'-guanosyl) tetraphosphatase in rat tissues. *Biochem J* 1982;201:405-410.
12. Carretero OA, Oparil S. Essential Hypertension: Part I: Definition and Etiology. *Circulation* 2000;101:329-335.
13. Chao J, Chao L. Kallikrein-kinin in stroke, cardiovascular and renal disease. *Exp Physiol* 2005;90:291-298.
14. Chicz RM, Regnier FE. High-performance liquid chromatography: effective protein purification by various chromatographic modes. *Methods Enzymol* 1990;182:392-421.
15. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003;42:1206-1252.
16. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III27-III32.
17. Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharron JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol* 2006;5:4.
18. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1215-1225.

19. Fontes R, Sillero MA, Sillero A. Acyl coenzyme A synthetase from *Pseudomonas fragi* catalyzes the synthesis of adenosine 5'-polyphosphates and dinucleoside polyphosphates. *J Bacteriol* 1998;180:3152-3158.
20. Gabbiani G, Kocher O, Bloom WS. Actin expression in smooth muscle cells of rat aortic intimal thickening, human atheromatous plaque, and cultured rat aortic media. *J Clin Invest* 1984;73:148-152.
21. Garrison PN, Barnes LD. Determination of dinucleosid polyphosphates. In: McLennan AG. Ap₄A and other dinucleoside polyphosphates. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1992:29-62.
22. Gomez-Villafuertes R, Gualix J, Miras-Portugal MT, Pintor J. Adenosine 5'-tetraphosphate (Ap₄), a new agonist on rat midbrain synaptic terminal P₂ receptors. *Neuropharmacology* 2000;39:2381-2390.
23. Gualix J, Abal M, Pintor J, Miras-Portugal MT. Presence of epsilon-adenosine tetraphosphate in chromaffin granules after transport of epsilon-ATP. *FEBS Lett* 1996;391:195-198.
24. Guranowski A, Gunther Sillero MA, Sillero A. Adenosine 5'-tetraphosphate and adenosine 5'-pentaphosphate are synthesized by yeast acetyl coenzyme A synthetase. *J Bacteriol* 1994;176:2986-2990.
25. Guranowski A. Specific and nonspecific enzymes involved in the catabolism of mononucleoside and dinucleoside polyphosphates. *Pharmacol Ther* 2000;87:117-139.
26. Guranowski A, Starzynska E, Pietrowska-Borek M, Jemielity J, Kowalska J, Darzynkiewicz E, Thompson MJ, Blackburn GM. Methylene analogues of adenosine 5'-tetraphosphate. Their chemical synthesis and recognition by human and plant mononucleoside tetraphosphatases and dinucleoside tetraphosphatases. *FEBS J* 2006;273:829-838.

27. Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J. Physiol* 1994;481:407-414.
28. Herold G. Koronare Herzerkrankung. In: Herold G. *Innere Medizin 2004*, Köln, 2004a:195-205.
29. Herold G. Arterielle Hypertonie. In: Herold G. *Innere Medizin 2004*, Köln, 2004b:249-259.
30. Hilgers RH, Webb RC. Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005;230:829-835.
31. Ignarro LJ, Gross RA, Gross DM. Inhibition of mammalian soluble guanylate cyclase activity by adenosine 5-tetraphosphate, guanosine 5-tetraphosphate and other nucleotides. *J Cyclic Nucleotide Res* 1976;2:337-346.
32. Jankowski J, Große-Hüttmann P, Zidek W, Schlüter H. Identification of dinucleoside polyphosphates by matrix-assisted laser desorption/ionisation post-source decay mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003;17:1189-1194.
33. Jankowski V, Tölle M, Vanholder R, Schönfelder G, van der Giet M, Henning L, Schlüter H, Paul M, Zidek W, Jankowski J. Uridine adenosine tetraphosphate: a novel endothelium-derived vasoconstrictive factor. *Nat Med* 2005a;11:223-227.
34. Jankowski V, Vanholder R, Henning L, Karadogan S, Zidek W, Schlüter H, Jankowski J. Isolation and quantification of dinucleoside polyphosphates by using monolithic reversed phase chromatography columns. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005b;819:131-139.
35. Jankowski V, Vanholder R, van der Giet M, Henning L, Tölle M, Schönfelder G, Krakow A, Karadogan S, Gustavsson N, Gobom J, Webb J, Lehrach H, Giebing G, Schlüter H, Hilgers

- KF, Zidek W, Jankowski J. Detection of angiotensin II in supernatants of stimulated mononuclear leukocytes by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight/time-of-flight mass analysis. *Hypertension* 2005c;46:479-480.
36. Jankowski V, Meyer AA, Schlattmann P, Gui Y, Zheng XL, Stamcou I, Radtke K, Tran TN, van der Giet M, Tölle M, Zidek W, Jankowski J. Increased uridine adenosine tetraphosphate concentrations in plasma of juvenile hypertensives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1776-1781.
37. Jankowski V, Patzak A, Herget-Rosenthal S, Tran TN, Lai EY, Günthner T, Buschmann I, Zidek W, Jankowski J. Uridine adenosine tetraphosphate acts as an autocrine hormone affecting glomerular filtration rate. *J Mod Med* 2008;86:333-340.
38. Kannel WB. Fifty years of Framingham Study contributions to understanding hypertension. *J Hum Hypertens* 2000;14:83-90.
39. Kellner R. Chromatographische Trennmethoden. In: Lottspeich F, Engels JW. *Bioanalytik*. 2. Auflage, Elsevier, München, 2006:215-233.
40. Klahr S. The role of nitric oxide in hypertension and renal disease progression. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16 Suppl 1:60-62.
41. Knight GE, Oliver-Redgate R, Burnstock G. Unusual absence of endothelium-dependent or -independent vasodilatation to purines or pyrimidines in the rat renal artery. *Kidney Int* 2003;64:1389-1397.
42. Kong ID, Jeong SW, Lee JW. Effects of adenosine tetraphosphate on the rat cardiovascular system. *New Med J* 1991;34:53-61.
43. Kupriyanov VV, Ferretti JA, Balaban RS. Muscle adenylate kinase catalyzes adenosine 5'-tetraphosphate synthesis from ATP and ADP. *Biochim Biophys Acta* 1986;869:107-111.

44. Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)* 2006;21:69-78.
45. Lee JW, Jeon SJ, Kong ID, Jeong SW. Identification of adenosine 5-tetraphosphate in rabbit platelets and its metabolism in blood. *Korean J Physiol* 1995a;29:217-223.
46. Lee JW, Kong ID, Park KS, Jeong SW. Effects of adenosine tetraphosphate (ATPP) on vascular tone in the isolated rat aorta. *Yonsei Med J* 1995b;36:487-496.
47. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. 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* 2002;360:1903-1913.
48. Lewis CJ, Gitterman DP, Schlüter H, Evans RJ. Effects of diadenosine polyphosphates (Ap(n)As) and adenosine polyphospho guanosines (Ap(n)Gs) on rat mesenteric artery P2X receptor ion channels. *Br J Pharmacol* 2000a;129:124-130.
49. Lewis CJ, Evans RJ. Comparison of P2X receptors in rat mesenteric, basilar and septal (coronary) arteries. *J Auton Nerv Syst* 2000b;81:69-74.
50. Liebermann I. Identification of adenosine tetraphosphate from horse muscle. *J Am Chem Soc* 1955;77:3373-3375.
51. Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* 2001;91:1421-1430.
52. Liu C, Mather S, Huang Y, et al. Extracellular ATP facilitates flow-induced vasodilatation in rat small mesenteric arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H1688-H1695.

53. Lobaton CD, Vallejo CG, Sillero A, Sillero MA. Diguanosinetetraphosphatase from rat liver: Acitivity on diadenosine tetraphosphate and inhibition by adenosine tetraphosphate. *Eur J Biochem* 1975;50:495-501.
54. Luft FC. Vasopressin, urin concentration, and hypertension: a new perspective on an old story. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:196-197.
55. Lüscher TF. The endothelium. Target and promoter of hypertension? *Hypertension* 1990a;15:482-485.
56. Lüscher TF. Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors. A new concept in hypertension? *Am J Hypertens* 1990b;3:317-330.
57. Lüscher TF, Boulanger CM, Dohi Y, Yang ZH. Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 1992;19:117-130.
58. Madrid O, Martin D, Atencia EA, Sillero A, Gunther Sillero MA. T4 DNA ligase synthesizes dinucleoside polyphosphates. *FEBS Lett* 1998;433:283-286.
59. Mateo J, Miras-Portugal MT, Castro E. Co-existence of P2Y- and PPADS-insensitive P2U-purinoceptors in endothelial cells from adrenal medulla. *Br J Pharmacol* 1996;119:1223-1232.
60. Mateo J, Miras-Portugal MT, Rotllan P. Ecto-enzymatic hydrolysis of diadenosine polyphosphates by cultured adrenomedullary vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1997;273:C918-C927.
61. Meyer E, Warscheid B. Massenspektrometrie. In: Lottspeich F, Engels JW. *Bioanalytik*. 2. Auflage, Elsevier, München, 2006:329-372.
62. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 2006;147 Suppl 1:S193-S201.

63. Mulvany MJ. Abnormalities of the resistance vasculature in hypertension: correction by vasodilator therapy. *Pharmacol Rep* 2005;57 Suppl:144-150.
64. Munchi R, Pang ICH, Sternweis PC, Linden J. A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2, and Go. *J Biol Chem* 1991;266:22285-22289.
65. Ogilvie A. Extracellular functions of ApnA. In: McLennan AG. Ap4A and other dinucleoside polyphosphates. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1992:29-62.
66. Ortiz B, Sillero A, Sillero MA. Specific synthesis of adenosine(5') tetraphospho(5')nucleoside and adenosine(5')oligophospho(5')adenosine catalyzed by firefly luciferase. *Eur J Biochem* 1993;212:263-270.
67. Ostrove S. Affinity chromatography: general methods. *Methods Enzymol* 1990;182:357-371.
68. Pearson JD. Normal endothelial cell function. *Lupus* 2000;9:183-188.
69. Pearson PJ, Vanhoutte PM. Vasodilator and vasoconstrictor substances produced by the endothelium. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1993;122:1-67.
70. Penglis F. The effect of chromatographically pure sample of adenosine 5'-tetraphosphate on sheep and rabbit blood platelets. *Clin Exp Pharmacol Exp* 1977;4:173-182.
71. Pintor J, Pelaez T, Peral A. Adenosine tetraphosphate, Ap4, a physiological regulator of intraocular pressure in normotensive rabbit eyes. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:468-473.
72. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998;50:413-492.

73. Rettinger J, Schmalzing G. Activation and desensitization of the recombinant P2X1 receptor at nanomolar ATP concentrations. *J Gen Physiol* 2003;121:451-461.
74. Rhaleb NE, Yang XP, Nanba M, Shesely EG, Carretero OA. Effect of chronic blockade of the kallikrein-kinin system on the development of hypertension in rats. *Hypertension* 2001;37:121-128.
75. Rüegg JC. Muskel. In: Schmidt RF, Thews G, Lang F. *Physiologie des Menschen*. 28. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 2000:67-87.
76. Schiebler TH. Kreislauf. In: Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie*. Übersetzt, überarbeitet und ergänzt von Schiebler, TH. 4. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1996:285-304.
77. Schwedt G. Physikalisch-chemische Trennmethode. In: Schwedt G. *Analytische Chemie, Grundlagen, Methoden, Praxis*. 1. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2001:293-381.
78. Small GD, Cooper C. Purification and properties of nucleoside tetraphosphate hydrolase from rabbit muscle. *Biochemistry* 1966a;1:14-26.
79. Small GD, Cooper C. Studies on the occurrence and biosynthesis of adenosine tetraphosphate. *Biochemistry* 1966b;1:26-33.
80. Soto F, Garcia-Guzman M, Hollmann M, Karschin C, Stühmer W. P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:3684-3688.
81. Spengler B, Kirsch D, Kaufmann R, Jaeger E. Peptide sequencing by matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1992;6:105-108.

82. Taylor DA, Wiese S, Faison EP, Yarbrough GG. Pharmacological characterization of purinergic receptors in the rat vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther* 1983;224:40-45.
83. Tepel M, Jankowski J, Schlüter H, Bachmann J, van der Giet M, Ruess C, Terliesner J, Zidek W. Diadenosine polyphosphates' action on calcium and vessel contraction. *Am J Hypertens* 1997;10:1404-1410.
84. Turner CM, Vonend O, Chan C, Burnstock G, Unwin RJ. The pattern of distribution of selected ATP-sensitive P2 receptor subtypes in normal rat kidney: an immunohistological study. *Cells Tissues Organs* 2003;175:105-117.
85. Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 1994;371:516-519.
86. Vallejo CG, Sillero MA, Sillero A. Diguanosinetetraphosphate guanylohydrolase in *Artemia salina*. *Biochimica Biophysica Acta* 1974;358,117-125.
87. Van der Giet M, Khattab M, Borgel J, Schlüter H, Zidek W. Differential effects of diadenosine phosphates on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney. *Br J Pharmacol* 1997;120:1453-1460.
88. Van Dyke K, Robinson R, Urquilla P, Smith D, Taylor M, Trush M, Wilson M. An analysis of nucleotides and catecholamines in bovine medullary granules by anion exchange high pressure liquid chromatography and fluorescence. Evidence that most of the catecholamines in chromaffin granules are stored without associated ATP. *Pharmacology* 1977;15:377-391.
89. Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol* 2005;144:449-458.

90. Verheyden DL, Wehrli WE, Moffat JG. Dismutation reactions of nucleoside polyphosphates. I. General features of the reaction. *J Am Chem Soc* 1965;87:2257–2265.
91. Villar IC, Francis S, Webb A, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone. *Kidney Int* 2006;70:840-853.
92. Wang J, Zohar R, McCulloch CA. Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res* 2006;312:205–214.
93. Wang L, Karlsson L, Moses S, Hultgardh-Nilsson A, Andersson M, Borna C, Gudbjartsson T, Jern S, Erlinge D. P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;40:841-853.
94. Webb TE, Boluyt MO, Barnard EA. Molecular biology of P2Y purinoceptors: expression in rat heart. *J Auton Pharmacol* 1996;16:303-307.
95. Westhoff T, Jankowski J, Schmidt S, Luo J, Giebing G, Schlüter H, Tepel M, Zidek W, van der Giet M. Identification and characterization of adenosine 5'-tetraphosphate in human myocardial tissue. *J Biol Chem* 2003;278:17735-17740.
96. Zamecnik PC, Stephenson ML. Nucleoside pyrophosphate compounds related to the first step in protein synthesis. *Alfred Benzon Found Symp I* 1969:276–291.
97. Zimmermann H. Extracellular purine metabolism. *Drug Dev Res* 1996;39:337-352.

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Schematische Darstellung endothelialer vasoregulatorischer Mediatoren. Seite 7
- Abbildung 2:** Übersicht über die Arbeitsschritte zur Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von Mononukleotiden aus dem endothelialen Sekretom. Seite 14
- Abbildung 3:** Chromatogramm der präparativen Reversed-Phase Chromatographie. Seite 19
- Abbildung 4:** Chromatogramm der Affinitätschromatographie. Seite 20
- Abbildung 5:** Chromatogramm der Reversed-Phase-Chromatographie. Seite 21
- Abbildung 6:** Massenspektrum der lyophilisierten Fraktion der Reversed-Phase-Chromatographie. Seite 22
- Abbildung 7:** Strukturformel des Adenosin-Tetraphosphats. Seite 24
- Abbildung 8:** Dosis-abhängige Wirkungskurven von Adenosin-Tetraphosphat, α,β -Methyl-ATP, ATP, Noradrenalin und Uridin-Adenosin-Tetraphosphat an einer isolierten perfundierten Niere. Seite 25
- Abbildung 9:** Dosis-abhängige Wirkungskurven von Adenosin-Tetraphosphat mit und ohne Dauerperfusion mit α,β -Methyl-ATP an einer isolierten perfundierten Niere. Seite 26

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Klassifikation des Blutdrucks bei Erwachsenen. Seite 1
- Tabelle 2:** Ursachen der sekundären Hypertonie. Seite 2
- Tabelle 3:** Gradient der präparativen RP-Chromatographie. Seite 16
- Tabelle 4:** Gradient der Affinitätschromatographie. Seite 17
- Tabelle 5:** Gradient der RP-Chromatographie. Seite 17
- Tabelle 6:** Fragmentspektrum der Masse 588,4 Da und des synthetischen Adenosin-Tetraphosphats mit Interpretation. Seite 23

8. Geräte und Reagenzien

Geräte

Aufbereitungsanlage für HPLC-Wasser: Milli-Q, Water purification-System, Millipore, Deutschland

Destillationsanlage: Köttermann 1080, Deutschland

Drucktransducer Statham-Element 23Gb: Siemens, Deutschland

Fraktionssammler: Biorad, USA

HPLC-Lösungsmittelfilter: Millex HV, Millipore, Deutschland

HPLC-Microbore-System: Smart, Pharmacia, Schweden

HPLC-Pumpe: Gradient Pump, 229, Amersham, Schweden

HPLC-Zubehör: Latek, Deutschland

Leitfähigkeitsmessgeräte: LF 39, WTW, Deutschland LF 196, Microprocessor Conductivity Meter, WTW, Deutschland LF 42, WTW, Deutschland

Massenspektrometer: Bruker Ultraflex TOF/TOF, Bruker-Daltonics, Bremen

peristaltischen Pumpe: Ismatec, Schweiz

pH-Meter: Typ 27, Knick, Deutschland

RPC-Säule: Chromolith RP-18e 100-4.6, Merck, Deutschland

Ultrafree-Filter MC 0,22 µm: Millipore, Deutschland

UV-Detektor: Econo UV-Monitor, Biorad, USA

Vakuumpumpe: Vacuubrand, Deutschland

Vakuumentrifuge: Speed Vac Concentrator SVC 100 H, Savant, USA

Zentrifugen: 3K-1, Sigma-Aldrich, Deutschland; Eppendorf 3200, Eppendorf, Deutschland

Reagenzien und Chemikalien

Acetonitril 100%:	J.T. Baker, Niederlande
Ammoniumacetat:	Fluka, Deutschland
Bio-Rex-Kationenaustauscher:	Biorad, USA
HCl:	Sigma-Aldrich, Deutschland
Hydroxypicolinsäure:	Sigma, Deutschland
KOH:	Merck, Deutschland
m-Aminoboronsäure-Hemisulfat:	Sigma, USA
NaCl:	Merck, Deutschland
NaOH:	J.T. Baker, Niederlande
Penicillin:	Ratiopharm, Deutschland
Perchlorsäure:	Merck, Deutschland
Rinderserum:	Sigma-Aldrich, Deutschland
Streptomycin:	Ratiopharm, Deutschland
synthetisches Adenosin-Tetraphosphat:	Sigma-Aldrich-Deutschland
Triethylammoniumacetat:	Sigma-Aldrich, Deutschland
Übrige Feinchemikalien:	Sigma-Aldrich, Deutschland

9. Danksagung

Herrn Professor Zidek möchte ich dafür danken, mir die Möglichkeit gegeben zu haben, an der Medizinischen Klinik für Nephrologie zu promovieren.

Mein spezieller Dank gilt Professor Jankowski für die Überlassung des Promotionsthemas, die geduldige und kompetente Betreuung in Praxis und Theorie sowie dafür, dass Humor in seiner Arbeitsgruppe immer erlaubt ist.

Vielen lieben Dank an Doktor Vera Jankowski für ihre fürsorgliche Betreuung. Ihre freundliche Aufmerksamkeit und ihr Interesse haben mir das Schreiben sehr erleichtert.

In guter Erinnerung werde ich auch alle anderen Doktoranden und Mitarbeiter der Arbeitsgruppe behalten. Besonders erwähnt werden an dieser Stelle Pierre und Angela. Das war mein zweitbesten Sommer.

Für die technische Unterstützung während der Versuche möchte ich mich herzlich bei Doktor Markus Tölle und Lars Henning bedanken.

Mein privater Dank geht an einige Menschen, die mir stetig Rückhalt geben und Stütze sind: An Mama und Papa für Brot und Wein, an meine Oma für ihren unerschütterlichen Glauben an mich, an Hannah, weil er so ein cooler Bruder ist, an Joachim und Lea für ihre konstruktive Kritik sowie an Steffi für ihre Motivation und Freundschaft.

Erklärung

„Ich, Franziska Hub, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: ‚Isolierung und Identifizierung des Adenosin-Tetraphosphats aus dem endothelialen Sekretom‘ 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.“

Franziska Hub

Berlin, 7. Mai 2008