

Aus der Medizinischen Klinik
des Marienhospitals Herne - Universitätsklinik -
der Ruhr-Universität Bochum
Direktor: Prof. Dr. med. W. Zidek

**Nachweis, Isolierung und Charakterisierung von
N₂,N₂-Dimethylguanosin
als inhibierenden Faktor der Ca²⁺-ATPase
bei chronischer Niereninsuffizienz**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von:
Rüdiger Hörbelt
aus Rhede
1998

Dekan: Prof. Dr. med. U. Eysel

1. Referent: Priv. Doz. Dr. rer. nat. H. Schlüter

2. Referent: Prof. Dr. M. G. Heilmeyer

Tag der Mündlichen Prüfung: 23.11.1999

I. Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Inhaltsverzeichnis	I
II. Abkürzungsverzeichnis	III
III. Material und Geräte	IV
1. Einleitung	1
1.1. Die Funktion der Ca ²⁺ -ATPase	1
1.2. Chronische Niereninsuffizienz und Urämie	3
1.3. Aktivität der Ca ²⁺ -ATPase bei chronischer Niereninsuffizienz	6
1.4. Problemstellung der Arbeit	7
1.5. Zielsetzung	7
2. Methodik	8
2.1. Das Prinzip der Hämofiltration	8
2.2. Trennung des Hämofiltrats	8
2.2.1. Reversed-Phase-Chromatographie mit TEAA als Ionenpaarreagenz	8
2.2.2. Displacementchromatographie	9
2.3. ¹ NMR-spektrometrische Konzentrationsbestimmung im Blutserum	11
2.4. Strukturanalyse der aromatischen Substanz	12
2.4.1. ¹ H-NMR-spektrometrische Untersuchung	12
2.4.2. GC- / MS-Untersuchung	13
2.5. Entwicklung des Ca ²⁺ -ATPase-Tests und Inhibitionsversuche	14
2.5.1. Erythrozytenmembranpräparation	14
2.5.2. Tangentialflußfiltration	14
2.5.3. Proteinkonzentrationsbestimmung	15
2.5.4. Aktivitätstest der Erythrozytenmembran	15
2.5.5. Enzymatischer Test	16
2.5.6. Dosis-Wirkungs-Beziehung	17

	Seite
3. Ergebnisse	18
3.1. Trennung und Analyse der aromatischen Verbindung	18
3.2. N ₂ ,N ₂ -Dimethylguanosin-Konzentration in menschlichem Blutserum	22
3.2.1. Patienten	22
3.2.2. Vergleich der N ₂ ,N ₂ -Dimethylguanosin-Konzentration im Blutserum terminal niereninsuffizienter Patienten und gesunder Probanden	24
3.3. Ergebnisse des enzymatischen Tests	26
3.3.1. Aktivität der erythrozytären Ca ²⁺ -ATPase	26
3.3.2. Der Einfluß von N ₂ ,N ₂ -Dimethylguanosin auf die Ca ²⁺ -ATPase	28
3.3.3. Abhängigkeit der Inhibition der Ca ²⁺ -ATPase von der Konzentration des N ₂ ,N ₂ -Dimethylguanosins	32
4. Diskussion	34
4.1. Isolierung und Identifizierung der aromatischen Verbindung	34
4.1.1. Chromatographie, NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie	34
4.1.2. N ₂ ,N ₂ -Dimethylguanosin -Konzentration im Blutserum	35
4.1.3. Die Bedeutung von N ₂ ,N ₂ -Dimethylguanosin im Organismus	36
4.2. Entwicklung des enzymatischen Tests	38
5. Literatur	42
6. Danksagung	49
7. Lebenslauf	50

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
c	Konzentration
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether) N, N, N', N', Tetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
^1H	Proton
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kd	Kilodalton
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoressigsäureamid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
P_i	anorganisches Phosphat
RP	Reverse Phase
Tab.	Tabelle
TEAA	Triethylammoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
TSP	Trimethylsilylpropionsäure
UV	Ultraviolett
v	Reaktionsgeschwindigkeit
μl	Mikroliter

III. Material und Geräte

Fraktionssammler	Redifrac; Fa. Pharmacia LKB
LiChrospher RP ₁₈	Fa. Merck
Gradient Pump 2249	Fa. Pharmacia
H ₂ O-Bi-Destillationsanlage	Typ 1080; Fa. Köttermann
Leitfähigkeitsmessgerät	LF 36; Fa. WTW
Lyophilisationsanlage	Freezemobil 12; Virtis
Massenspektrometer	MAT 8200; Fa. Finnigan
NMR-Spektrometer	AMX 400 MHz; Fa. Bruker
PC-NMR-Software	Win-NMR 3.0; Fa. Bruker-Franzen
pH-Meter	Typ 27; Fa. Knick
Probenkopf	5 mm, selektiver ¹ H-Kopf; Fa. Bruker
UV-Detektor	Unicord S II; Fa. Pharmacia
Vakuumpumpe	Vacu-Brand R6-A; Fa. Brand
Vakuumzentrifuge	Speed Vac Concentrator SVC 100 H; Fa. Savant
Zentrifuge	Eppendorf 3200; Fa. Eppendorf / 101 M; Fa. Sigma

1. Einleitung

1.1. Die Funktion der Ca^{2+} -ATPase

Die intrazelluläre, freie Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) liegt im Zytosol bei 10^{-7} mol/l und damit etwa vier Zehnerpotenzen unterhalb der extrazellulären Konzentration. Eine Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration stellt für viele Zellen das Signal für wichtige Funktionsänderungen dar. Ca^{2+} steuert die elektromechanische Kopplung bei der Muskelkontraktion, es beeinflusst die Na^+ -Leitfähigkeit erregbarer und vieler nicht erregbarer Zellen, es steigert die K^+ -Leitfähigkeit, beeinflusst Ionenpumpen, ermöglicht die Transmitterausschüttung an Synapsen, stimuliert die Sekretionstätigkeit exokriner Drüsen, löst die Ausschüttung von Hormonen aus, spielt für mehrere Phasen der Blutgerinnung eine Rolle und reguliert die Aktivität von Enzymen [49]. Damit kommt der Aufrechterhaltung des großen Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten entlang der Zellmembran eine entscheidende Bedeutung zu.

Diese Aufgabe erfüllen im wesentlichen drei verschiedene Transportsysteme [43].

1. Der Einstrom der Ca^{2+} -Ionen in die Zelle erfolgt passiv entlang des Konzentrationsgradienten über spezifische Kanalsysteme in der Zellmembran [59].
2. Ein spezifisches $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Pumpsystem transportiert Ca^{2+} -Ionen in beide Richtungen, besitzt jedoch nur eine geringe Ca^{2+} -Affinität [6].
3. Für die Ausschleusung ist in erster Linie die Ca^{2+} -ATPase verantwortlich. Sie besteht aus einer Polypeptidkette mit einer Molekülmasse von etwa 100 kd und ist in der Zellmembran lokalisiert. Ihr Kopfstück, das in das Zytosol hinein ragt, enthält die katalytische Reaktionsdomäne und besitzt Bindungsstellen für den Energieträger

Adenosintriophosphat (ATP). Die Bindungsstellen für die Ca^{2+} -Ionen befinden sich auf der zytosolischen Seite der Zellmembran [21].

Der Mechanismus des Ca^{2+} -Transports ist in Abbildung 1 vereinfacht dargestellt. Zunächst werden zwei Ca^{2+} -Ionen an die E1-Form des Enzyms gebunden, die dem Zytosol zugewandt ist. Durch Phosphorylierung entsteht aus der Ca^{2+} -haltigen, aktivierten E1-Form die E2-P-Form, wobei die Ca^{2+} -Bindungsstellen so umgestülpt werden, daß sie dem Extrazellulärraum zugewandt sind. Da die Ca^{2+} -Affinität der E2-P-Form etwa um den Faktor 1000 geringer ist als die der E1-Form, werden die gebundenen Ca^{2+} -Ionen nun freigesetzt. Die E2-P-Form ohne Ca^{2+} -Ionen wird im Anschluß zur E2-Form hydrolysiert. Diese lagert sich dann um in die wesentlich stabilere E1-Form, welche die nächsten zwei Ca^{2+} -Ionen aufnimmt. Der Calciumtransport aus der Zelle erfolgt somit unter Spaltung von Adenosintriophosphat (ATP) in Adenosindiphosphat (ADP) und anorganisches Phosphat (Pi) [6; 56].

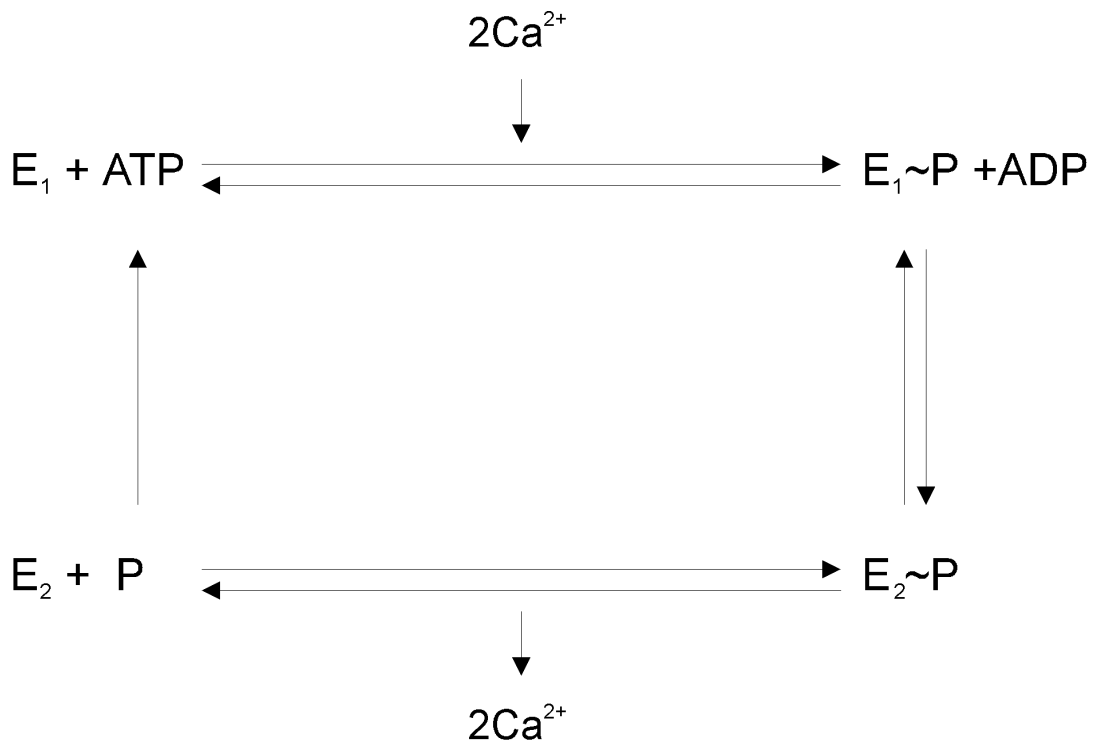


Abb.1: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus der Ca^{2+} -ATPase

1.2. Chronische Niereninsuffizienz und Urämie

Die chronische Niereninsuffizienz ist definiert als die irreversible Abnahme des Glomerulumfiltrats bei progressivem Untergang von funktionsfähigem Nierengewebe.

Eine Vielzahl von Erkrankungen, allen voran die diabetische Nephropathie, Glomerulonephritis, Pyelonephritis und Zystennieren, kann zu einem solchen dauerhaften Funktionsverlust der Nieren führen.

Berechnungen der europäischen Dialyse- und Transplantationsgesellschaft im Jahr 1976 haben ergeben, daß zu dieser Zeit pro Million Einwohner 350 Menschen aufgrund einer Niereninsuffizienz therapiebedürftig waren [9]. Schätzungen zufolge nimmt die Zahl der Erkrankten in Deutschland jährlich um ca. 80 zu [51].

Die Pathophysiologie der Niereninsuffizienz ist bestimmt durch das Versagen der exokrinen und endokrinen Nierenfunktionen. Durch die verminderte Ausscheidungsfunktion kommt es neben Störungen im Elektrolyt-, Wasser- und Säurebasenhaushalt zur Retention harnpflichtiger Substanzen und toxischer Endprodukte. Über die Struktur und die pathophysiologische Bedeutung dieser als Urämie-Toxine bezeichneten Substanzen ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur wenig bekannt. Man geht jedoch davon aus, daß sie die im Organismus ablaufenden enzymatischen Reaktionen in vielfacher Weise beeinflussen.

Die eingeschränkte Bereitstellung der in der Niere synthetisierten Hormone Erythropoetin und Calcitriol führt zu Anämie und Störungen im Calcium-Phosphat-Stoffwechsel.

Bis zu einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate auf etwa 50% haben die Patienten im allgemeinen keine Beschwerden. Die Fähigkeit der Harnkonzentrierung ist jedoch bereits bei geringgradiger Schädigung der Nieren eingeschränkt, da für die verbliebenen Nephronen ein Überangebot an gelösten Stoffen herrscht. Es resultiert eine osmotische Diurese mit Nykturie, Polyurie und Polydipsie.

Aufgrund der renalen Funktionsreserve kommt es zu einem Anstieg der Retentionswerte im Serum erst dann, wenn mehr als 60% des funktionstüchtigen Nierengewebes ausgefallen sind, und entsprechend die glomeruläre Filtrationsrate auf unter 20% abgesunken ist. Dieses Stadium der Erkrankung wird als Urämie bezeichnet.

Neben der Azotämie ist das klinische Bild der Urämie gekennzeichnet durch Flüssigkeitsretention mit Rückgang der Diurese, durch eine metabolische Azidose, durch Elektrolytstörungen sowie durch klinische Symptome, die nahezu den gesamten Organismus betreffen können.

Allgemeine Symptome bestehen in leichter Ermüdbarkeit und Leistungsabfall. Als Zeichen der Flüssigkeitsretention entwickeln sich Ödeme, die zunächst an den Fußknöcheln und Augenlidern wahrgenommen werden, sich jedoch im weiteren Verlauf der Erkrankung generalisiert ausbilden.

Die Vielfalt möglichen zentralnervösen Symptome ist sehr groß und reicht von Konzentrationsschwäche über Parästhesien im Rahmen einer renalen Polyneuropathie bis hin zu psychischen Veränderungen, die sich als Depression oder sogar Psychose äußern.

Eine vitale Gefährdung besteht für die Patienten vor allem durch die Überwässerung der Lungen und die durch die Hyperkaliämie auftretenden Herzrhythmusstörungen.

Sehr häufig entwickelt sich im Rahmen der Urämie ein sekundärer Hypertonus, der das subjektive Beschwerdebild durch seine typischen Sensationen, wie Kopfschmerzen oder Sehstörungen, bestimmen kann und bei längerem Bestehen zu schweren Organschädigungen führt.

Die urämische Gastroenteritis äußert sich in chronischem Erbrechen und Diarrhoe.

Hämatologisch stellen sich, neben der bereits erwähnten renalen Anämie durch Erythropoetinmangel, eine Thrombozytopenie und immunologische Funktionsstörungen ein.

Durch die eingeschränkte renale Phosphatausscheidung mit nachfolgender Hyperphosphatämie wird die Calcitriol-Produktion der Nieren gehemmt. Die resultierende Hypocalzämie stimuliert wiederum die Parathormonausschüttung, die eine vermehrte Mobilisation von Calcium aus den Knochen bewirkt. In der Folge kommt es bedingt durch

den Calcitriolmangel und den Parathormonüberschuß zu einer Kombination aus Osteomalazie und Osteoklasie, der renalen Osteopathie.

Die Therapie bei chronischer Niereninsuffizienz kann in frühen Stadien konservativ erfolgen. Stellen sich jedoch urämische Symptome ein, steigt die Serum-Kreatininkonzentration auf Werte größer 10 mg/dl oder kommt es zu Überwässerung oder Hyperkaliämie ist die Hämodialyse die Therapie der Wahl.

Allgemein wird als Dialyse die Entfernung von Stoffwechselprodukten aus dem Blut mittels Diffusion durch eine Membran bezeichnet. Als Membran dienen dazu entweder das Peritoneum bei der Peritonealdialyse oder eine sich außerhalb des Körpers befindende, semipermeable Membran, wie sie bei der extrakorporalen Hämodialyse und der Hämofiltration verwendet wird. Grundsätzlich sind diese verschiedenen Verfahren als gleichwertig anzusehen. Einen Vorteil bietet die Hämofiltration bei der Behandlung kreislaufstabiler Patienten, da sie einen schonenderen Flüssigkeitsentzug ermöglicht [26].

Die Effizienz der Dialysebehandlung wird einerseits an dem Wohlbefinden des Patienten bemessen, zum anderen an klinischen Parametern, wie der optimalen Einstellung des Wasser- und Elektrolythaushaltes, des Blutdrucks, des Serum-Harnstoffspiegels und der ausreichenden Eliminierung von Phosphaten.

Die Symptome der Niereninsuffizienz können durch die Hämodialyse nur gemildert, jedoch nicht beseitigt werden. Zudem leiden niereninsuffiziente Patienten nach wie vor an der Vielzahl von Folgeerkrankungen, die trotz regelmäßiger Dialysebehandlung auftreten [26]. Welche Urämie-Toxine durch die Dialyse abgetrennt oder unvollständig eliminiert ist bisher noch nicht geklärt [5].

1.3. Aktivität der Ca^{2+} -ATPase bei chronischer Niereninsuffizienz

Im Verlauf der Chronischen Niereninsuffizienz kommt es in unterschiedlichen Kompartimenten des Organismus zu Abweichungen von der physiologischen Ca^{2+} -Konzentration.

Neben der Beobachtung, daß bereits in frühen Stadien der Erkrankung ein Abfall des ionisierten Serumcalciums nachzuweisen ist, konnten bei Patienten mit Niereninsuffizienz deutliche Anzeichen für eine vermehrte Anreicherung von Calcium im zentralnervösen Gewebe nachgewiesen werden. Im Rahmen einer Untersuchung der neurologischen Funktionen bei niereninsuffizienten Patienten stellten Cooper und Lazarowitz fest, daß das cerebrale Gewebe bei den an Niereninsuffizienz leidenden Menschen einen signifikant erhöhten Ca^{2+} -Gehalt gegenüber gesunden Menschen aufweist [8].

Die Erhöhung der zytosolischen, freien Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wird auf mehrere Ursachen zurückgeführt. Zum einen kommt es durch eine Störung der physiologischen Barriere der Zellmembran zur Steigerung des Ca^{2+} -Einstroms; andererseits wurde eine Beeinträchtigung der Ca^{2+} -Ausschleusung nachgewiesen, welche auf der verminderten Aktivität der Ca^{2+} -ATPase beruht.

Durch Messungen an Erythrozyten terminal niereninsuffizienter Patienten konnte Gafter nachweisen, daß die Ca^{2+} -ATPase dieser Zellen vor der Dialysebehandlung eine um 50 % eingeschränkte Aktivität aufweist und die Enzymaktivität nach der Hämodialyse zunimmt. Auch die in vitro Inkubation von Erythrozyten gesunder Probanden mit urämischem Plasma führte zu einer Verminderung der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität. Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, daß ein dialysierbarer Urämiefaktor existiert, der die erythrozytäre Ca^{2+} -ATPase hemmt [13].

Ähnliche Ergebnisse hatte zuvor Yang erzielt. Im Rahmen seiner Untersuchungen war die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität bei Patienten mit hämodialysepflichtiger Niereninsuffizienz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gesunder Menschen um bis zu 60% vermindert, während

die intrazelluläre Konzentration des Calciums fünfmal erhöht war. Die Hämodialyse bewirkte bei diesen Patienten zwar eine Zunahme der Enzymaktivität, doch lag diese auch nach der Behandlung noch immer deutlich unterhalb derjenigen der Kontrollgruppe [67].

Alle diese Untersuchungen zeigen eine eingeschränkte Aktivität der Ca^{2+} -ATPase. Welche Faktoren aber die Enzymaktivität hemmen, ist bisher ungeklärt.

1.4. Problemstellung der Arbeit

Bei der Niereninsuffizienz kommt es offenbar zur Akkumulation eines im Plasma zirkulierenden Faktors, welcher die Ca^{2+} -ATPase in ihrer Aktivität hemmt und durch Hämodialyse nur unzureichend aus dem Plasma zu entfernen ist. Um welche Substanz es sich dabei handelt, konnte bisher nicht geklärt werden.

In einer vorhergehenden Untersuchung konnte gezeigt werden, daß das Filtrat, das bei der Hämofiltrationsbehandlung niereninsuffizienter Patienten abgepreßt wird, insgesamt die Ca^{2+} -ATPase hemmt. Darüberhinaus ließ sich protonen-NMR-spektroskopisch im Blut der Patienten eine aromatische Substanz nachweisen, die im Blut gesunder Menschen nicht zu detektieren war [68].

1.5. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit besteht daher darin, die aromatische Substanz aus dem Hämofiltrat niereninsuffizienter Patienten zu isolieren und zu identifizieren.

In einem zu entwickelnden biochemischen Testverfahren ist zu untersuchen, ob die isolierte Substanz die Ca^{2+} -ATPase hemmt.

Mit Hilfe protonen-NMR-spektroskopischer Messungen ist die Konzentration der Substanz im Blutserum gesunder und niereninsuffizienter Probanden zu bestimmen. Darüberhinaus soll bei den Patienten mit Niereninsuffizienz die Serumkonzentration der Substanz vor und nach der Hämofiltration ermittelt werden.

2. Methodik

2.1. Das Prinzip der Hämofiltration

Bei der Therapie von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz wird alternativ zur extrakorporalen Hämodialyse das Verfahren der Hämofiltration eingesetzt. Die Elimination toxischer Substanzen aus dem Organismus geschieht durch Ultrafiltration. Dabei werden die Filtrationsvorgänge im Glomerulum nachgeahmt; aus einer Vene abgeleitetes Blut fließt über eine Membran, welche für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 35.000 Dalton durchgängig ist. Unter Ausnutzung eines Druckgradienten (bis 500 mmHg) wird dem Patientenblut ein dem Primärharn ähnliches Filtrat abgepreßt, das retinierte Stoffwechselprodukte in etwa der gleichen Konzentration enthält wie das Plasma. Dem Organismus können dabei innerhalb von 3-6 Stunden Ultrafiltratmengen von 20-35 l entzogen werden. Der Ausgleich des entstehenden Flüssigkeits- und Elektrolytdefizits erfolgt durch entsprechende Mengen einer Substitutionslösung. Die Hämofiltration hat sich als ein der Hämodialyse gleichwertiges Behandlungsverfahren erwiesen und bietet den Vorteil der geringeren Kreislaufbelastung.

2.2. Trennung des Hämofiltrats

2.2.1. Reversed-Phase-Chromatographie mit TEAA als Ionenpaarreagenz

Zur Trennung des bei der Hämofiltration abgepreßten Filtrats wurden chromatographische Trennverfahren eingesetzt.

Nachdem der pH-Wert mit Hilfe von 1 N HCl-Lösung auf 7,3 eingestellt worden war, wurden zu einem Volumen von 16 l Hämofiltrat 640 mmol/l Triethylammoniumacetat (TEAA) als kationisches Ionenpaarreagenz hinzugegeben. Diese Probe wurde im Anschluß

daran auf eine Lichrorep RP18-Säule aufgetragen, die zuvor mit 150 ml einer 40 mmol/l TEAA-Lösung äquilibriert worden war. Die Säule wurde nach dem Auftragen der Probe mit 150 ml der 40 mmol/l TEAA-Lösung gespült. Danach wurden die vom Säulenmaterial adsorbierten Probenbestandteile mit 150 ml einer 30%-igen Acetonitrillösung eluiert. Das Eluat wurde nicht-fraktioniert aufgefangen, auf -80°C gekühlt und lyophilisiert. Die Säule wurde mit einem Gemisch aus 50% Ameisensäure und 50% Acetonitril regeneriert.

2.2.2. Displacementchromatographie

Die weitere Auftrennung des aus dem elutionschromatographischen Trennungsgang hervorgegangenen Substanzgemisches erfolgte nach dem Verfahren der Displacementchromatographie.

Bei dieser Methode werden die auf dem Säulenmaterial gebundenen Probenmoleküle durch eine Substanz, den Displacer, von den Adsorptionsstellen verdrängt. Der Displacer muß zum Säulenmaterial eine höhere Affinität haben als die Probenbestandteile, er darf weder mit den Proben noch mit dem Säulenmaterial reagieren und sollte leicht wieder von der Säule entfernbar sein.

Zunächst wird dazu die Säule mit dem Lösungsmittel äquilibriert, in dem auch die Probe gelöst ist. In dieser als Carrier dienenden Flüssigkeit sollten die Probenbestandteile, um deren hohe Adsorption an der Säule (stationäre Phase) zu gewährleisten, weniger gut löslich sein als in der stationären Phase. Zudem muß auch der Displacer in der Carrier-Flüssigkeit löslich sein.

Nachdem das Probengemisch vollständig aufgetragen worden ist, wird der Displacer gelöst in der Carrier-Flüssigkeit über die Säule gepumpt. Die Displacermoleküle konkurrieren mit den sich auf der Säule befindenden Probenbestandteilen um die Bindungsstellen, und wegen seiner definitionsgemäß höheren Affinität zum Säulenmaterial verdrängt er sämtliche auf der

Säule adsorbierten Substanzen und schiebt diese vor sich her. Dabei wird der Displacer bei konstantem Volumenstrom und konstanter Konzentration auf die Säule gegeben, so daß die Sättigungsfront sich mit gleichmäßiger Geschwindigkeit zum Säulenende bewegt. Daneben aber verdrängen sich die Substanzgruppen, die unterschiedliche Affinitäten zur stationären Phase aufweisen, auch untereinander, so daß die Probenmoleküle mit der höchsten Affinität, sobald sie vom Displacer von ihren Adsorptionsstellen verdrängt worden sind, ihrerseits die Substanzgruppe mit der zweithöchsten Affinität zum Säulenmaterial verdrängen. So werden die verschiedenen Substanzen der Probe langsam ihrer Affinität gemäß getrennt, und liegen in den entstehenden Rechtecksbanden in hoher Konzentration und Reinheit vor.

Die gewählte Nucleosil-RP18-Säule (4,6 x 250 mm, Partikelgröße: 5 µm) wurde mit 0,1 % TFA äquilibriert. Die Probe wurde in 4 ml Carrierlösung gelöst und mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,1 ml/min auf die Säule gepumpt. Im Anschluß an die Probenlösung folgte die Displacperlösung, die aus 160 mmol/l n-Butanol gelöst im Carrier bestand. Die Fraktionsgröße betrug 1 ml. Nachdem der Displacer das Säulenende erreicht hatte, wurde die Säule mit einem Gemisch aus 50 % Ameisensäure und 50 % Acetonitril regeneriert.

2.3. ^1NMR -spektrometrische Konzentrationsbestimmung im Blutserum

Patienten:

Das Patientenkollektiv bestand aus 10 Probanden mit terminaler Niereninsuffizienz.

Alle Patienten wurden an drei Tagen pro Woche hämofiltriert. Sie erhielten alle Erythropoetin intravenös und Calciumcarbonat und Calcitriol oral. Fünf Patienten erhielten Folat, Pyridoxalphosphat und Vitamin B12.

Die Kontrollgruppe setzte sich aus 13 gesunden Probanden zusammen, die keine Medikamente einnahmen.

Durch Erhebung der Anamnese, die klinische Untersuchung und Bestimmung der Routinelaborparameter wurde der Gesundheitszustand der Versuchsteilnehmer festgestellt.

Pro Patient wurden durch Punktion der Vena cubitalis 1,5 ml Vollblut entnommen. In der Gruppe der niereninsuffizienten Patienten wurden die Blutentnahmen unmittelbar vor und nach der Hämofiltration durchgeführt.

Probenvorbereitung:

Nach der Entnahme wurde die Blutprobe bis zur weiteren Untersuchung mit Eis gekühlt. Durch 20 minütiges Zentrifugieren bei 3000 g und einer kontrollierten Temperatur von 277 K wurde das Serum vom Vollblut abgetrennt und konnte als gelblicher Überstand abpipettiert werden.

Um die Homogenität der Probe zu gewährleisten, wurde sie unmittelbar vor der NMR-Untersuchung mit einem Rüttler für 60 s durchmischt. Ein Volumen von 0,5 ml des jeweiligen Serums wurde mit 25 μl D_2O und mit 25 μl einer 0,5 mol/l wässrigen TSP-Lösung versetzt und in ein 5 mm-NMR-Röhrchen gefüllt. Das Röhrchen wurde mit einem Polyethylenstopfen und zusätzlich mit Parafilm verschlossen. Direkt im Anschluß daran wurde die Probe vermessen.

NMR-Untersuchung:

Die NMR-Untersuchung der Blutseren erfolgte nach der selben Vorgehensweise und unter identischen Bedingungen wie die in Abschnitt 2.3.1. beschriebene NMR-spektrometrische Untersuchung der einzelnen Fraktionen des Hämofiltrats.

Anhand von Kalibrierungskurven wurde ein annähernd lineares Verhältnis zwischen Resonanzmaximum und Konzentration der identifizierten Verbindung festgestellt. Somit konnte aus den Intensitäten charakteristischer Resonanzen der Substanz ihre Konzentration im Serum bestimmt werden [1].

Zur Auswertung der NMR-Spektren wurde die Software Win-NMR der Firma Bruker eingesetzt.

2.4. Strukturanalyse der aromatischen Substanz

2.4.1. ¹H-NMR-spektrometrische Untersuchung

Nach der displacementchromatographischen Auftrennung des Hämofiltrats wurden die erhaltenen Fraktionen zunächst ¹H-NMR-spektrometrisch analysiert, um Aussagen über das Vorliegen von aromatischen Substanzen in den einzelnen Fraktionen machen zu können.

Es wurde dieses Verfahren gewählt, da zum einen geringe Probenvolumina von 0,5 ml für die Untersuchung ausreichen, und zum anderen die Proben dabei nicht zerstört werden und somit weiteren analytischen Messungen zugeführt werden können.

Probenvorbereitung:

Ein Volumen von 0,5 ml jeder Fraktion wurde mit 25 µl D₂O und mit 25 µl einer 0,5 mol/l wässrigen TSP-Lösung versetzt, in einem 5 mm-NMR-Röhrchen verschlossen und unmittelbar danach vermessen.

NMR-Untersuchung:

Zur Aufnahme der hochaufgelösten 400 MHz NMR-Spektren wurde ein AMX-400 FT-NMR-Spektrometer der Firma Bruker (Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten, Deutschland) mit einem selektiven ^1H -5mm-Probenkopf verwendet. Zur Gerätsteuerung wurde die Bruker Software AM911110.1 benutzt. Das D_2O wurde den Proben zur Deuterium-Feld/Frequenz-Stabilisierung zugesetzt. Die Rotationsfrequenz der Probe betrug während der Messung 21 Umdrehungen pro Minute. Die Halbwertslinienbreite des TSP-Signals wurde als Kriterium zum Ausschluß von Magnetfeldinhomogenitäten bestimmt. Die standardisierten Messungen wurden bei einer kontrollierten Temperatur von 298 K aufgenommen. Es wurde ein Anregungswinkel von 90° ($= 6,2 \mu\text{s}$) benutzt, der in Vormessungen jeweils bestimmt wurde. Die Sättigungsfrequenz des Wassersignals wurde für jede Probe individuell bestimmt. Der Freie-Induktions-Abfall (engl.: Free-Induction-Decay (FID)) wurde mit und ohne Apodisierung Fourier transformiert. Im Anschluß wurden die Spektren basislinienkorrigiert, kalibriert und auf einem Plotter ausgedruckt.

2.4.2. GC- / MS-Untersuchung

Die einzelnen Fraktionen der Displacementchromatographie, die NMR-spektrometrisch gemessen aromatische Verbindungen enthielten, wurden mit MSTFA (N-Methyl-N-Trisilyltrifluoressigsäureamid) aufgenommen. Sie wurden eine Stunde bei 343 K inkubiert und in eine GC-/MS-Kopplungseinheit der Firma Finnigan MAT 8200 mit dem Datensystem FS 33 bei einer Temperatur von 553 K injiziert. Die RCN150-Säule wurde während der Läufe mit einer Aufheizgeschwindigkeit von 6K/min von 323 auf 553 K aufgeheizt. Als Trägersubstanz diente Helium, die Flußgeschwindigkeit betrug 2 ml/min.

Am Säulenende wurden die Probenbestandteile durch Elektronenstoß ionisiert und fragmentiert. Die entstandenen Ionen wurden im elektrischen Feld beschleunigt und in Abhängigkeit ihrer Ladung und Masse durch ein senkrecht zum Ionenstrahl stehendes Feld abgelenkt.

Durch Eichung mit MSTFA als Standardsubstanz wurde die Masse der Ionen ermittelt. Durch Vergleich mit Datenbanken und Bibliotheken konnten die Substanzen bestimmt werden.

2.5. Entwicklung des Ca^{2+} -ATPase-Tests und Inhibitionsversuche

2.5.1. Erythrozytenmembranpräparation

Heparinvollblut normotoner Probanden wurde bei 4000 g und 277 K für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde bis auf die Erythrozyten alles verworfen [40]. Die Zellen wurden dann zweimal mit einer isotonischen NaCl-Lösung und einem NaHCO_3 -Puffer (8,4 Gew.%) gewaschen, wobei sie nach jedem Waschvorgang bei 4000 g und 277 K von der Lösung abzentrifugiert wurden.

2.5.2. Tangentialflußfiltration

Um die Erythrozytenmembranen und damit die Ca^{2+} -ATPase weiter aufzureinigen, wurde im folgenden mit Hilfe der Tangentialflußfiltration gewaschen. Dies erfolgte bei einer Temperatur von 277 K und es wurde dabei ein Filter von 300 kd verwendet. Zur Vorbereitung wurde das System zunächst mit 2 l bidest. Wasser gespült, dann mit hypotonischem NaHCO_3 -Puffer (2 Vol% des isotonischen Puffers), der 0,1 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid und 1 mmol/l Benzamid enthielt. Mit 0,1 mmol/l HCl wurde der pH auf 7,4 eingestellt. Unter kontinuierlichem Rühren wurden die gewaschenen Erythrozyten einer hypotonen Pufferlösung zugeführt und so zur Hämolyse gebracht. Das Gesamtvolumen der hämolysierten Erythrozyten wurde durch die Tangentialflußfiltration in 2 h auf 0,6 l konzentriert.

Um nicht membranhaltige Bestandteile zu entfernen, wurde die eingeeengte Lösung der Erythrozytenmembranen dreimal mit jeweils 8 l 25 mmol/l Tris-(hydromethyl-) amino-

methan, NaCl, 25 mM KCl, 1 mmol/l MgCl, 1 mmol/l EGTA, 0,1 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 mmol/l Benzamid haltigen Lösung gewaschen. Zur Waschlösung wurde, um einen Pilzbefall der Membranen zu verhindern, 0,1 M NaN_3 hinzugegeben.

Durch Zugabe von 2 l eines 1 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 mmol/l Benzamid, 28 mmol/l Tris-(hydromethyl-)aminomethan-HCl-haltigen Puffergemisches wurde nach dem Waschen das EGTA von den Membranen entfernt.

Schließlich wurden die Membranen durch Ultrazentrifugierung (20 Minuten bei 100.000 g) vom Überstand getrennt und danach in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.5.3. Proteinkonzentrationsbestimmung

Mit Hilfe der von Bradford beschriebenen Methode, die im Vergleich zu der Standardmethode nach Lowry viermal empfindlicher ist, wurde die Proteinkonzentration bestimmt [4; 34]. Dabei wurden die Proteinmoleküle in saurem Milieu für 10 Minuten mit einem Farbreagens (Coomassie Blue F250, Fa. BioRad) bei 310 K inkubiert und dadurch untereinander gebunden. Das Extinktionsmaximum des Farbstoffs von 465nm verschiebt sich zu dem des Protein-Farbkomplexes nach 595 nm. Über eine Verdünnungsreihe läßt sich aus der Intensität der Färbung die Proteinkonzentration der Lösung bestimmen.

2.5.4. Aktivitätstest der Erythrozytenmembran

Bevor die Erythrozytenmembranen im Inhibitionstest verwendet wurden, wurde die Aktivität der membranständigen Ca^{2+} -ATPase gemessen. Diese Messung erfolgte durch Kopplung des ATP-Umsatzes an eine photometrisch bestimmbare Nachweisreaktion. Mit dem Nullwert, zu dessen Berechnung sich die Ca^{2+} -ATPase in quasi Ca^{2+} -freiem Milieu (über einen Ca^{2+} -Ionentauscher (Chelex) gereinigtes, bidest. Wasser) befand, wurde die Aktivität in einem 0,2 mmol/l Ca^{2+} -haltigen Puffergemisch verglichen.

200 μl Erythrozytenmembransuspension wurden dazu in 200 μl Ca^{2+} -freiem, bidest. Wasser suspendiert. Zu den ersten 200 μl dieser Suspension wurden 100 μl Calmodulin, 800 μl Ca^{2+} -freies, bidest. Wasser und 3900 μl Ca^{2+} -freier Puffer gegeben. Zu den zweiten 200 μl der Suspension wurden anstelle des Ca^{2+} -freien Puffers 3900 μl eines 0,2 mmol/l Ca^{2+} -haltigen Puffers gegeben, und in einer dritten Versuchsreihe wurden die 200 μl der Erythrozytensuspension durch Ca^{2+} -freies, bidest. Wasser ersetzt, um den Einfluß der Ca^{2+} -ATPase zu validieren. Nach Zugabe von jeweils 10 μl einer 197 mmol/l ATP-Lösung zu den drei Proben wurden diese bei 310 K inkubiert.

In 10 min Zeitintervallen wurden jeweils 500 μl von diesen Proben abgenommen und mit einer unten beschriebenen, malachithaltigen Lösung versetzt, welche die Reaktionen stoppt. Nach 5 min wurde im UV-Photometer die Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 578$ nm gemessen. Über eine KH_2PO_4 -Kalibrierungsfunktion konnte aus der Extinktion die Konzentration des freien Phosphats berechnet werden.

2.5.5. Enzymatischer Test

Um die zu untersuchende Substanz auf eine Inhibition der Ca^{2+} -ATPase hin zu testen, wurden mit Ca^{2+} -freiem, bidest. Wasser zunächst 0,1 mmol/l und 1 mmol/l Lösungen hergestellt.

Die Ca^{2+} -freie Pufferlösung bestand aus 0,125 mmol/l Magnesiumchlorid, 24,6 mmol/l NaN_3 , 30,9 mmol/l Tris-Base (Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan), 0,12 mmol/l Quabain, (G-Strophantin), 31,7 mmol/l Tris-HCl (Tris-(hydroxymethyl-)aminomethanhydrochlorid) und als Ca^{2+} -Komplexbildner 0,25 mmol/l EGTA (Ethylen-glycol-bis-(-aminoethylether-)N,N,N',N'-Tetraessigsäure). Der Ca^{2+} -haltige Puffer enthielt anstelle der 0,25 mmol/l EGTA 0,15 mmol/l CaCl_2 und 0,1 mmol/l EGTA. Der pH-Wert wurde mit 0,1 N HCl-Lösung auf 7,18 eingestellt. Zu 390 μl der Pufferlösung wurden 10 μl Erythrozytenmembranlösung und 80 μl der 0,1 mmol/l bzw. 1 M N_2, N_2 -Dimethylguanosin-Lösung hinzugegeben. Zudem wurde die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase durch die Zugabe von 10 μl Calmodulin maximal gesteigert, wodurch ein Aktivitätsunterschied besser zum

Ausdruck kommt. Die Reaktion der Ca^{2+} -ATPase wurde gestartet durch Inkubation mit 10 μl einer ATP-Lösung für 90 min bei 310 K. Die ATP-Konzentration wurde in den verschiedenen Serien gesteigert (0,004 mmol/l, 0,01 mmol/l, 0,02 mmol/l, 0,04 mmol/l, 0,08 mmol/l, 0,2 mmol/l). Eine Senkung der Temperatur auf Raumtemperatur und die Zugabe von 2 ml einer Stopplösung bestehend aus 2,1 mmol/l Malachitgrün, bidest. Wasser, 300 $\mu\text{mol/l}$ Polyvinylalkohol und 46,2 mmol/l Ammoniummolybdate (Verhältnis 2:2:1:1) in 6 N wässriger HCl-Lösung bewirkte eine Unterbrechung der Reaktion.

Photometrisch wurde die Extinktion der jeweiligen Probe bei einer Wellenlänge von $\lambda = 578 \text{ nm}$ gemessen. Zur Bestimmung der Konzentration des freien Phosphats wurde die Extinktion einer KH_2PO_4 -Lösung im Konzentrationsbereich 1-100 mmol/l in Anwesenheit von 2 ml der verwendeten malachithaltigen Stopplösung bestimmt.

2.5.6. Dosis-Wirkungs-Beziehung

Um die Wirkung der isolierten Substanz auf die Ca^{2+} -ATPase in Abhängigkeit von ihrer Konzentrationen zu untersuchen, wurden mit Hilfe von Ca^{2+} -freiem bidest. Wasser 0,29 mmol/l bis 18,82 mmol/l Lösungen erstellt.

Zu jeweils 390 μl der Ca^{2+} -haltigen bzw. der Ca^{2+} -freien Pufferlösung (die Zusammensetzung der Pufferlösungen entspricht der in Kapitel 2.5.5) wurden 10 μl Erythrozytenmembranlösung und 80 μl der Probenlösung in der jeweiligen Konzentration gegeben. Durch die Zugabe von 10 μl Calmodulin wurde die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase maximal gesteigert. Die Reaktion der Ca^{2+} -ATPase wurde gestartet durch die Inkubation mit 10 μl einer 40 mmol/l ATP-Lösung bei 310 K. Nach 90 min. wurde die Reaktion durch Absenkung der Temperatur auf Raumtemperatur und die Zugabe von 2 ml der in Abschnitt 2.5.5 beschriebenen Stopplösung unterbrochen. Die Bestimmung der Konzentration des freien Phosphats erfolgte photometrisch wie in Kapitel 2.5.5.

3. Ergebnisse

3.1. Trennung und Analyse der aromatischen Verbindung

Das bei der Hämofiltration abgepreßte Filtrat enthält nur niedermolekulare Verbindungen, da der verwendete Dialyseschlauch für höhermolekulare Substanzen nicht durchlässig ist. Daher konnte das Hämofiltrat direkt chromatographischen Trennverfahren zugeführt werden.

Aus dem elutionschromatographischen Trennungsgang gingen 50 mg Substanzgemisch hervor. In Abbildung 3.1.1. ist das Chromatogramm der weiteren, displacementchromatographischen Auftrennung zu sehen. Anhand der Entwicklung der UV-Extinktion wird deutlich, daß die verschiedenen Substanzgruppen in direkter Abfolge eluieren [57; 20].

Die nachfolgende NMR-spektroskopische Untersuchung aller 265 entstandenen Fraktionen ließ darauf schließen, daß in einer Fraktion (Retentionszeit: 820 min) eine einzelne aromatische Verbindung in sehr hoher Konzentration vorlag.

Die zu untersuchende Fraktion wurde zunächst gaschromatographisch getrennt. Anschließend konnten massenspektrometrisch die Massen der einzelnen Fragmente gemessen werden. Durch den Vergleich dieses charakteristischen Massenspektrums mit einer Datenbank wurde die isolierte Verbindung als N_2,N_2 -Dimethylguanidin identifiziert. Die Abbildung 3.1.2. zeigt das Massenspektrum von N_2,N_2 -Dimethylguanidin.

In der Abbildung 3.1.3. ist die Strukturformel der Verbindung dargestellt. Die Purinbase Guanin hat am neunten Stickstoffatom den C_5 -Zucker Ribose N-glycosidisch gebunden und weist am zweiten Stickstoffatom zwei Methylgruppen auf.

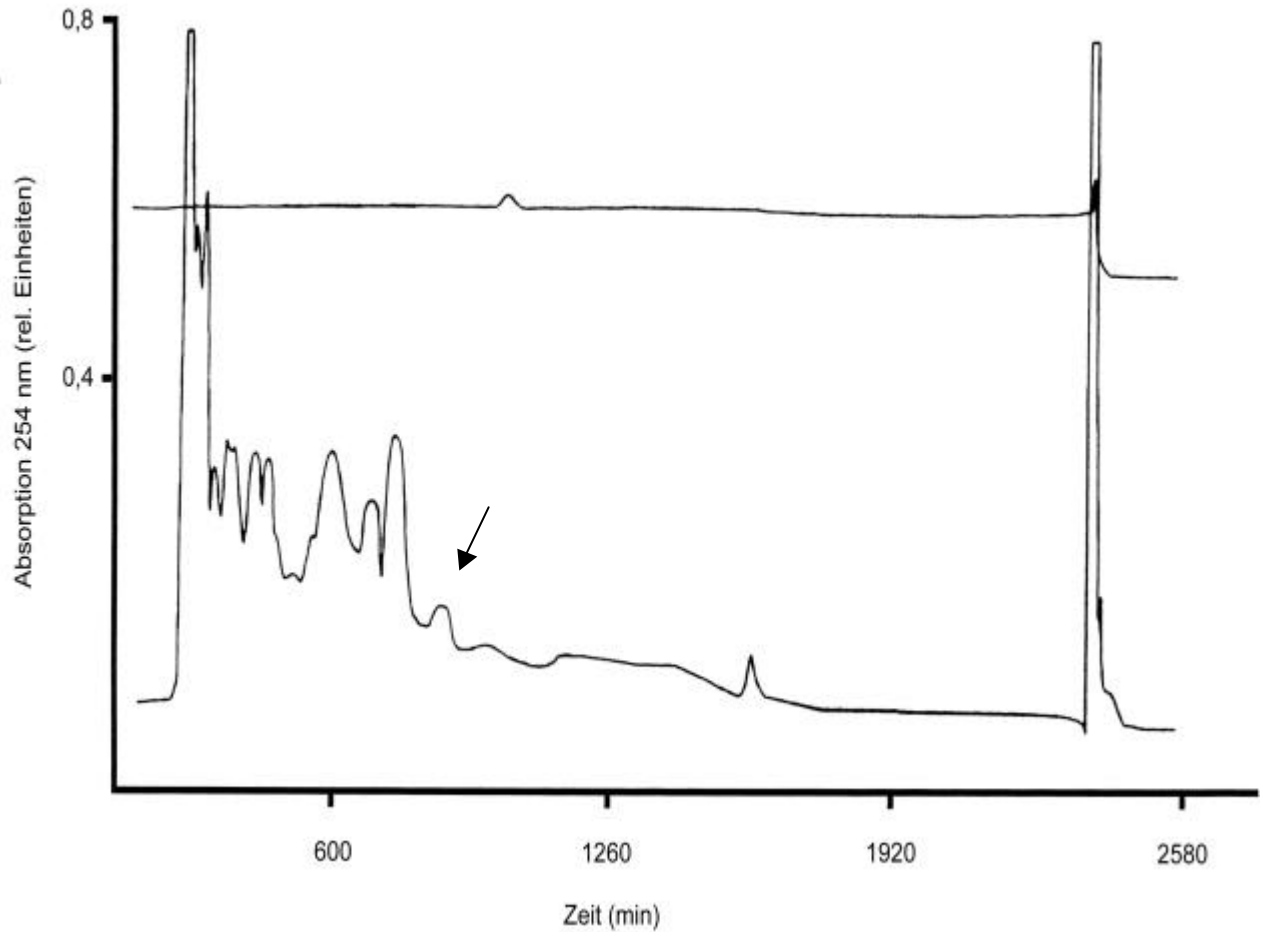


Abb. 3.1.1: Displacementchromatogramm von Hämofiltrat eines Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Der Pfeil markiert den Peak, in dem N_2,N_2 -Dimethylguanosin isoliert wurde (Retentionszeit: 820 min).

Probe:	50 mg Hämofiltrat
Säule:	Nucleosil RP18 (4,6 x 250 mm, Partikelgröße 5 μ m)
Carrier:	0,1 % TFA
Displacer:	160 mM n-Butanol
UV-Detektion:	254 nm
Fluß:	0,1 ml/min

Fraktionsgröße: 1 ml

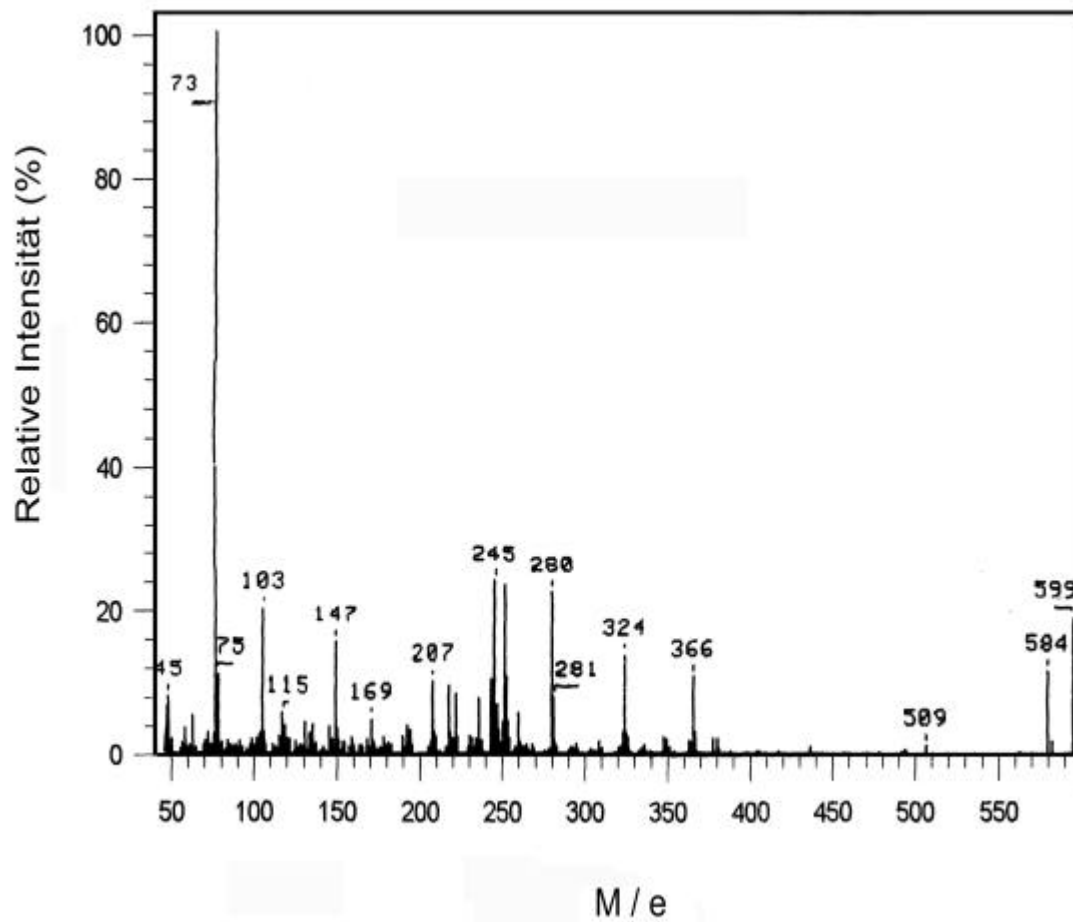


Abb. 3.1.2: Elektronenstoß-Ionisations-Massen-Spektrum der in Abb 3.1.1 mit einem Pfeil markierten Fraktion. Die Massen-Signale repräsentieren die Fragmente des Mutterions.
Abszisse: Relative Masse/Elementarladung (M/e);
Ordinate: Signalintensität relativ zum intensivsten Signal.

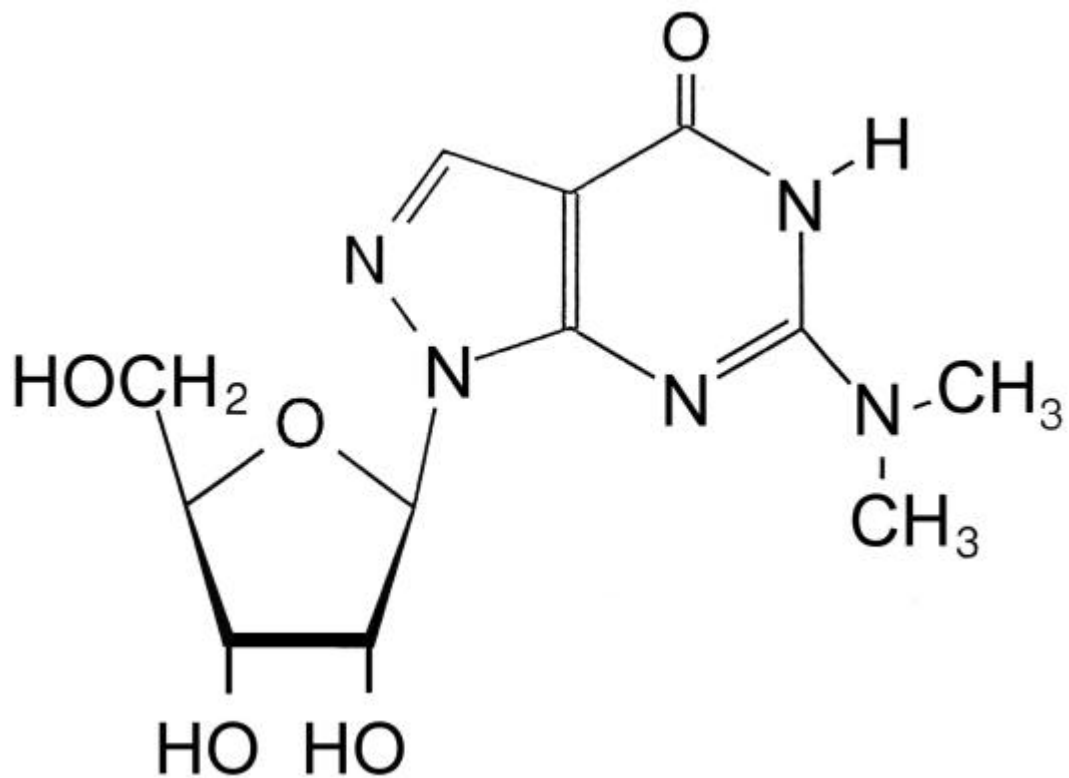


Abb. 3.1.3: Strukturformel von N₂,N₂-Dimethylguanosin

3.2. N₂,N₂-Dimethylguanidin -Konzentration in menschlichem Blutserum

In Abschnitt 3.1 konnte eine aromatische Substanz in hoher Konzentration im Hämofiltrat niereninsuffizienter Patienten nachgewiesen und als N₂,N₂-Dimethylguanidin identifiziert werden.

In diesem Abschnitt der Untersuchung wird geklärt, in welchem Ausmaß sich N₂,N₂-Dimethylguanidin im Serum der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz verglichen mit einer Kontrollgruppe gesunder Menschen anreichert. Die Konzentrationsbestimmung wurde bei den kranken Probanden vor und nach der Hämofiltration vorgenommen, um Aussagen über die Effektivität der Behandlung in Bezug auf die Elimination des N₂,N₂-Dimethylguanidin machen zu können.

3.2.1. Patienten

Das Patientenkollektiv bestand aus 10 Probanden mit dialysepflichtiger, terminaler Niereninsuffizienz. Der renalen Funktionsstörung lag in sechs Fällen eine Glomerulonephritis und in je zwei Fällen eine diabetische Nephropathie oder eine interstitielle Nephritis zugrunde.

Die Kontrollgruppe setzte sich aus 13 gesunden Probanden zusammen. Alle diese Probanden hatten normwertige Nierenfunktionsparameter.

Durch Anamnese, klinische Untersuchung und Bestimmung der Routinelaborparameter wurde der - abgesehen von der Urämie bei der Patientengruppe - gute Gesundheitszustand aller Versuchsteilnehmer festgestellt.

In Tabelle 3.2.1 sind die klinischen und laborchemischen Daten der Hämofiltrationspatienten und der Kontrollgruppe aufgeführt.

	Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz	Kontrollgruppe	p-Wert
Anzahl [Männer/Frauen]	5/5	7/6	
Alter [Jahre]	48 ± 13	46 ± 15	nicht signifikant
Dauer der Hämodilutions- pflichtigkeit [Monate]	35,7 ± 13,4	-	
Serumkreatinin [mg/dl]	9,3 ± 1,1	1,0 ± 0,2	< 0,001
Serumharnstoff [mg/dl]	128 ± 18	19 ± 7	< 0,001
Hämoglobin [g/dl]	9,5 ± 0,6	14,5 ± 1,1	< 0,001
Blutdruck [mmHg]			
systolisch	151 ± 13	133 ± 6	< 0,001
diastolisch	87 ± 7	80 ± 3	< 0,001

Tabelle 3.2.1: Klinische und laborchemische Daten der Patientengruppe mit terminaler Niereninsuffizienz und der Kontrollgruppe.
Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM.

3.2.2. Vergleich der N₂,N₂-Dimethylguanidin -Konzentration im Blutserum terminal niereninsuffizienter Patienten und gesunder Probanden

Die Bestimmung der Serumkonzentrationen erfolgte über die Aufnahme von wasserunterdrückten ¹H-NMR-Spektren und die Messung der durch N₂,N₂-Dimethylguanidin hervorgerufenen Resonanzen. Die Intensität der Resonanzen konnte zur Quantifizierung verwendet werden, da eine zuvor erstellte Kalibrierfunktion eine lineare Beziehung zwischen Konzentration und Resonanzintensität ergeben hatte.

Die Abbildung 3.2.2 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung. Dabei handelt es sich um Mittelwerte, die aus je einer Messung bei den 13 Patienten der Kontrollgruppe und je einer Messung bei den 10 Hämodilutionspatienten vor und nach der Dialysebehandlung hervorgehen.

In den Seren der gesunden Probanden konnte kein N₂,N₂-Dimethylguanidin nachgewiesen werden. Bei der Patientengruppe mit chronischer Niereninsuffizienz beträgt die Serumkonzentration 0,15 mmol/l. Diese wird durch die Hämodilution um 20% auf 0,12 mmol/l gesenkt.

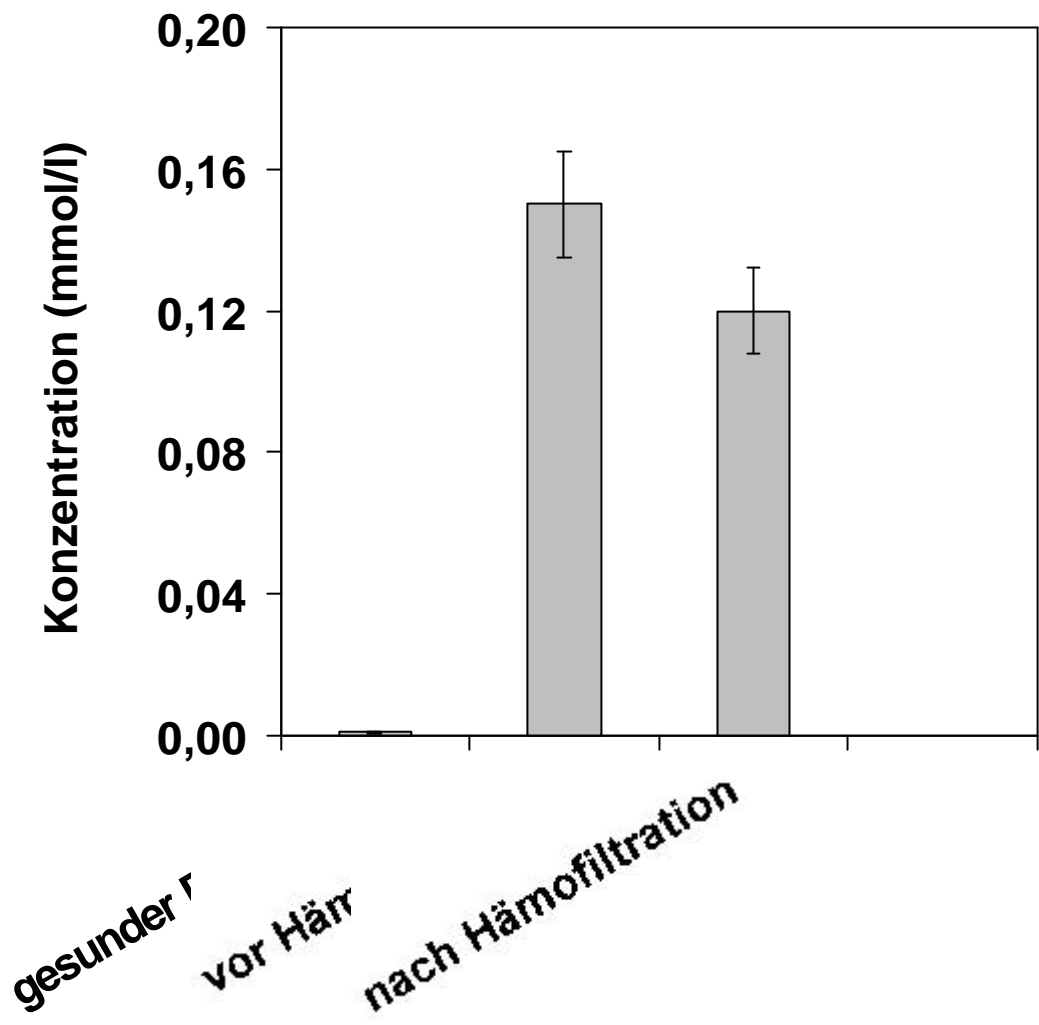


Abb. 3.2.2: Vergleich der N₂,N₂-Dimethylguanidin-Konzentration im Blutserum gesunder und niereninsuffizienter Probanden vor und nach Hämodialyse. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

3.3. Ergebnisse des enzymatischen Tests

3.3.1. Aktivität der erythrozytären Ca²⁺-ATPase

Aus 500 ml heparinisiertem Vollblut normotoner Patienten konnten ca. 30 ml Erythrozytenmembranen isoliert werden. Diese Membranen zeigten auch nach mehreren Waschvorgängen mit insgesamt 30 l Waschlösung eine leicht rötliche Färbung.

Im ersten Teil der Versuchsreihe war zu überprüfen, ob die Ca²⁺-ATPase der für den Test isolierten Erythrozytenmembranen auch eine ausreichende Aktivität aufweist. Die Abbildung 3.3.1. zeigt, daß die Kurve in der Versuchsreihe mit Calcium ansteigt. Die Konzentration an anorganischem Phosphat nimmt dabei innerhalb von 90 Minuten um 0,14 mmol/l zu. Dadurch wird verdeutlicht, daß das Enzym nach Zugabe von Calcium innerhalb der Inkubationszeit deutlich mehr ATP zu ADP und anorganischem Phosphat umgesetzt hat als in calciumfreiem Milieu. Die leichte Zunahme der Phosphatkonzentration unter calcium- und erythrozytenfreien Bedingungen ist durch einen spontanen, nichtenzymatischen Zerfall von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat zu erklären.

Somit weisen die Membranen trotz der beobachteten rötlichen Verfärbung eine ausreichend hohe Aktivität der Ca²⁺-ATPase auf, um den Einfluß der identifizierten Substanz auf das Enzym untersuchen zu können. Eine mehrfache Wiederholung dieses Tests im Verlauf der Versuchsreihe zeigte vernachlässigbare Ergebnisse. Die Proteinkonzentration der Erythrozytenmembranen betrug 30,14 mg/ml.

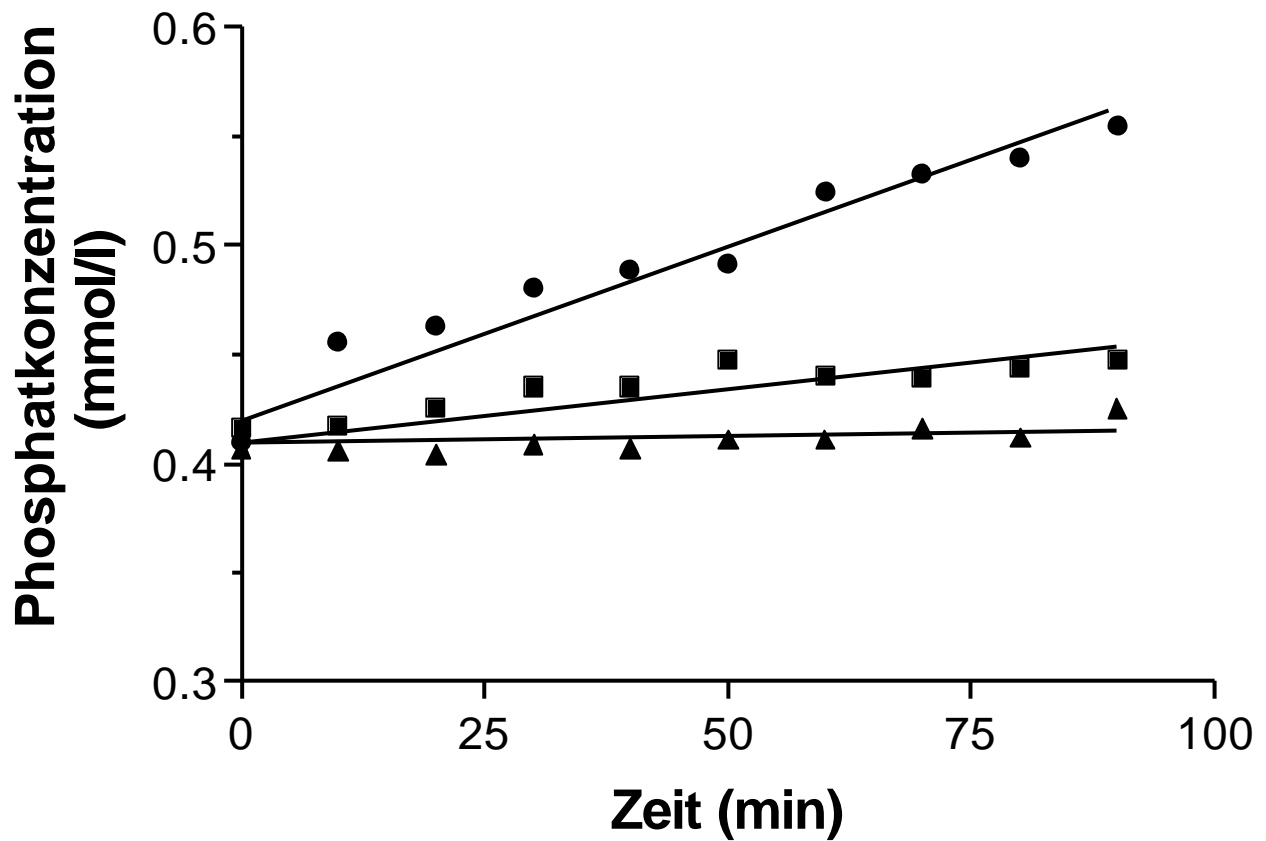


Abb. 3.3.1: Abhängigkeit der Konzentration des gebildeten, anorganischen Phosphats von der Inkubationszeit mit Ca²⁺-haltigem und Ca²⁺-freiem Puffer und in Abwesenheit von Erythrozyten. • Puffer enthält 0,16 mmol/l Ca²⁺; ■ Puffer ohne Ca²⁺; ? ohne Erythrozyten. Die Enzymaktivität nach Zugabe von Ca²⁺-haltigem Puffer beträgt 1,56 µmol/min.

3.3.2. Der Einfluß von N₂,N₂-Dimethylguanidin auf die Ca²⁺-ATPase

Die Zielsetzung dieser Testreihe bestand darin, den Einfluß des N₂,N₂-Dimethylguanidins auf die Ca²⁺-ATPase darzustellen. Um Einflüsse der ebenfalls in der Membran enthaltenen K⁺/Na⁺-ATPase [55] auszuschließen, wurde dieses Enzym selektiv durch Zugabe von Ouabain gehemmt. Der ATP-Umsatz wurde im Anschluß in zwei Versuchsansätzen mit und ohne Ca²⁺-Ionen gemessen, um die Reaktionsgeschwindigkeit sowohl der Ca²⁺- und Mg²⁺-ATPase als auch der Mg²⁺-ATPase isoliert zu bestimmen und dann über die Differenz der Ergebnisse die Aktivität der Ca²⁺-ATPase ermitteln zu können.

In den Abbildungen 3.3.2.a.-c. ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Ca²⁺-ATPase in Abhängigkeit von der steigenden ATP-Substratkonzentration ohne Zusatz und nach Zugabe von N₂,N₂-Dimethylguanidin in 16 mmol/l und 160 mmol/l Konzentration dargestellt.

Es zeigt sich in allen Versuchsreihen ein hyperbolischer Kurvenverlauf: bei zunehmendem Substratangebot nähert sich die Reaktionsgeschwindigkeit asymptotisch der Maximalgeschwindigkeit an. Während pro Stunde ohne Zugabe von N₂,N₂-Dimethylguanidin bei einer ATP-Konzentration von 0,2 mmol/l 0,20 mmol/g_{Protein} anorganischen Phosphats gebildet werden, beträgt die Umsatzrate der Ca²⁺-ATPase in Anwesenheit von N₂,N₂-Dimethylguanidin in einer Konzentration von 16 mmol/l bei gleichem Substratangebot nur 0,17 mmol_{ATP}/g_{Protein}/h. Bei einer N₂,N₂-Dimethylguanidinkonzentration von 160 mmol/l werden 0,12 mmol_{ATP}/g_{Protein}/h umgesetzt.

N₂,N₂-Dimethylguanidin hat demnach eine konzentrationsabhängig hemmende Wirkung auf die Aktivität der Ca²⁺-ATPase.

Die Aktivität war im Verlauf der Versuche im Rahmen der Meßgenauigkeit konstant.

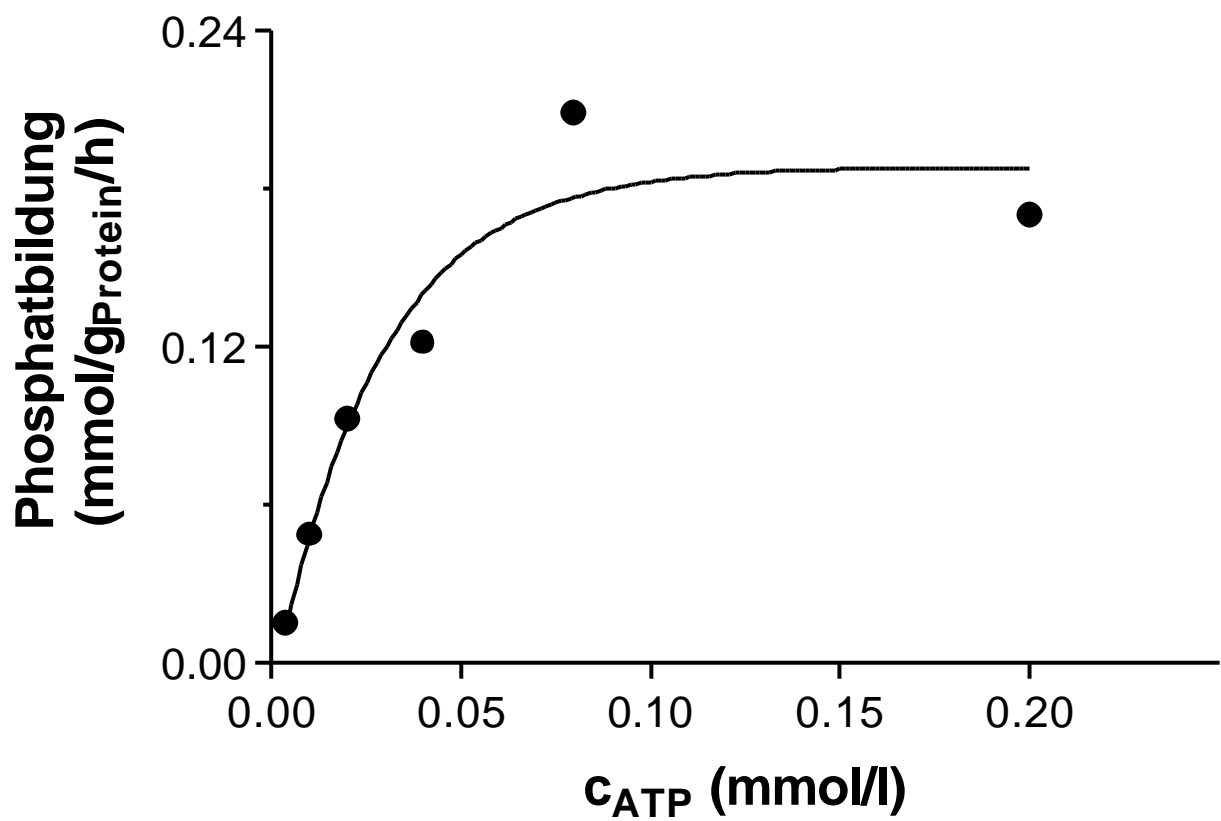


Abb. 3.3.2.a: Reaktionsgeschwindigkeit der Ca²⁺-ATPase in Abhängigkeit von der ATP-Substratkonzentration. Die N₂,N₂-Dimethylguanosinkonzentration beträgt 0 mmol/l.

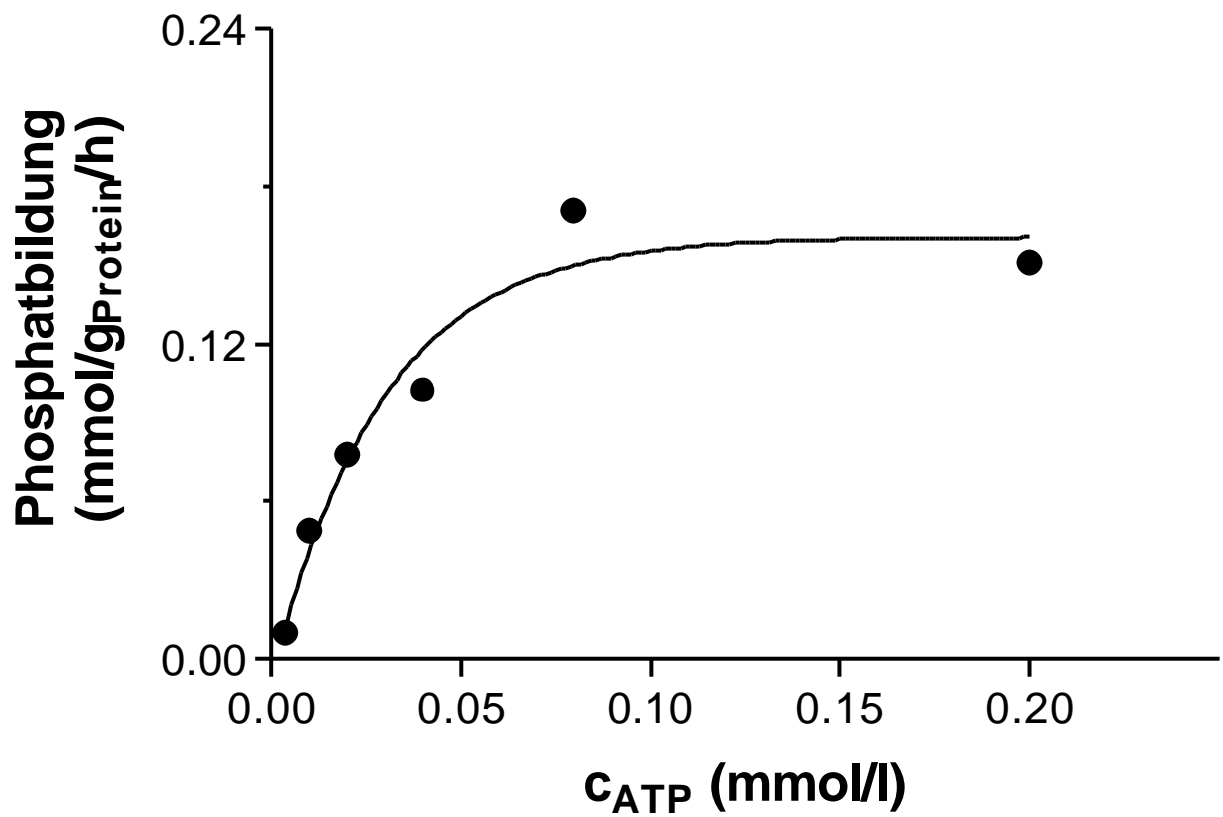


Abb. 3.3.2.b: Reaktionsgeschwindigkeit der Ca²⁺-ATPase in Abhängigkeit von der ATP-Substratkonzentration. Die N₂,N₂-Dimethylguanosinkonzentration beträgt 16 mmol/l.

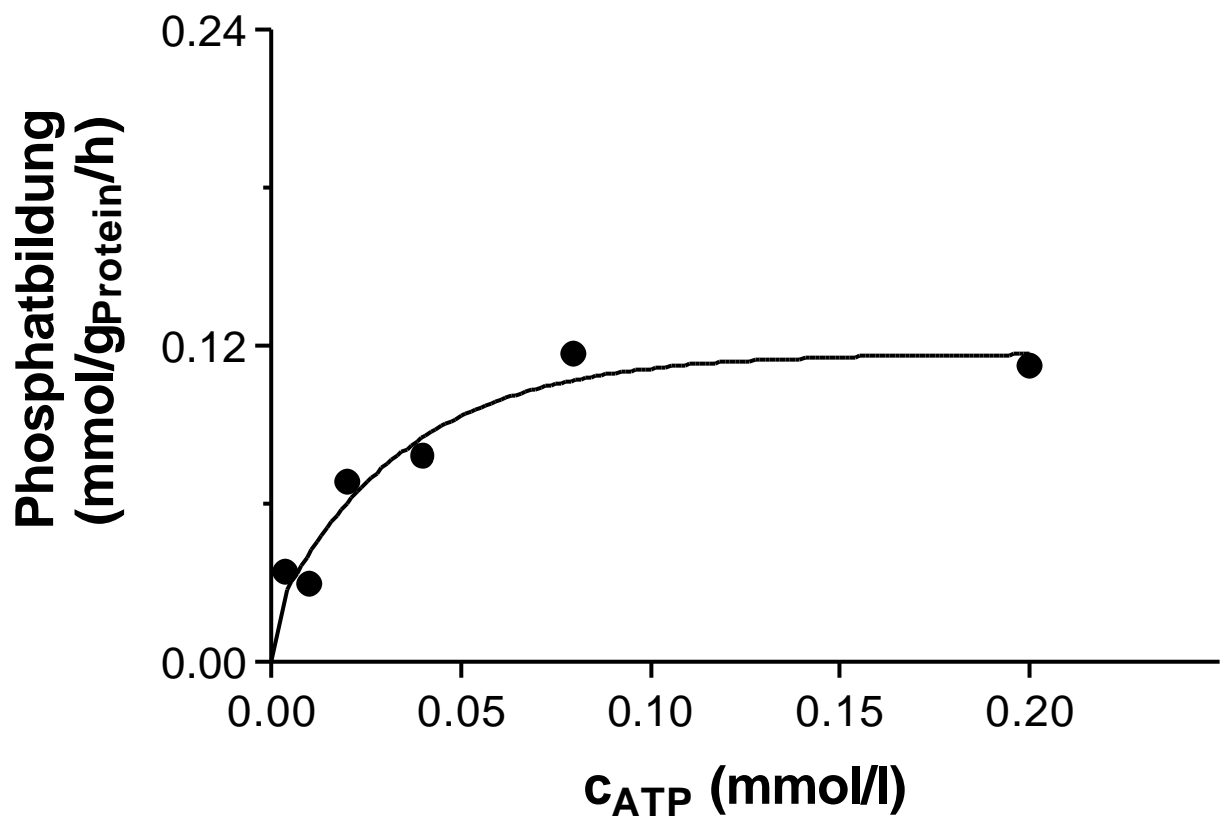


Abb. 3.3.2.c: Reaktionsgeschwindigkeit der Ca²⁺-ATPase in Abhängigkeit von der ATP-Substratkonzentration. Die N₂,N₂-Dimethylguanosinkonzentration beträgt 160 mmol/l.

3.3.3. Abhängigkeit der Inhibition der Ca^{2+} -ATPase von der Konzentration des N_2,N_2 -Dimethylguanosins

Die Ergebnisse der Inhibitionstests in Kapitel 3.3.2. haben gezeigt, daß zwischen der Konzentration des N_2,N_2 -Dimethylguanosins und der inhibierenden Wirkung auf die Ca^{2+} -ATPase insofern eine Beziehung besteht, als die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms bei einer hohen Inhibitorkonzentration von 160 mmol/l stärker abnimmt als bei einer 10-fach geringeren Konzentration.

Die genaue Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung ist Gegenstand dieses Versuchsabschnitts.

Hierzu wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der Ca^{2+} -ATPase in direkter Abhängigkeit von der Dimethylguanosin-Konzentration untersucht. Die ATP-Konzentration betrug in allen Versuchsreihen 0,08 mmol/l. Die isolierte Betrachtung der Ca^{2+} -ATPase erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie in Abschnitt 3.3.2. Unter Steigerung der Dimethylguanosin-Konzentration von 0,001 mmol/l auf 0,316 mmol/l wurde der ATP-Umsatz innerhalb einer Stunde bezogen auf die Proteinkonzentration in vier Serien gemessen.

In der Abbildung 3.3.3 ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Ca^{2+} -ATPase anhand des gebildeten anorganischen Phosphats gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration aufgetragen. Sowohl die Streuung der einzelnen Meßergebnisse als auch die berechneten Mittelwerte sind dargestellt.

Der absteigend sigmoidale Kurvenverlauf verdeutlicht die Abnahme der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität bei steigender Konzentration des Dimethylguanosins.

Bei einer Inhibitorkonzentration von 0,024 mmol/l ist die Enzymaktivität um 50% reduziert.

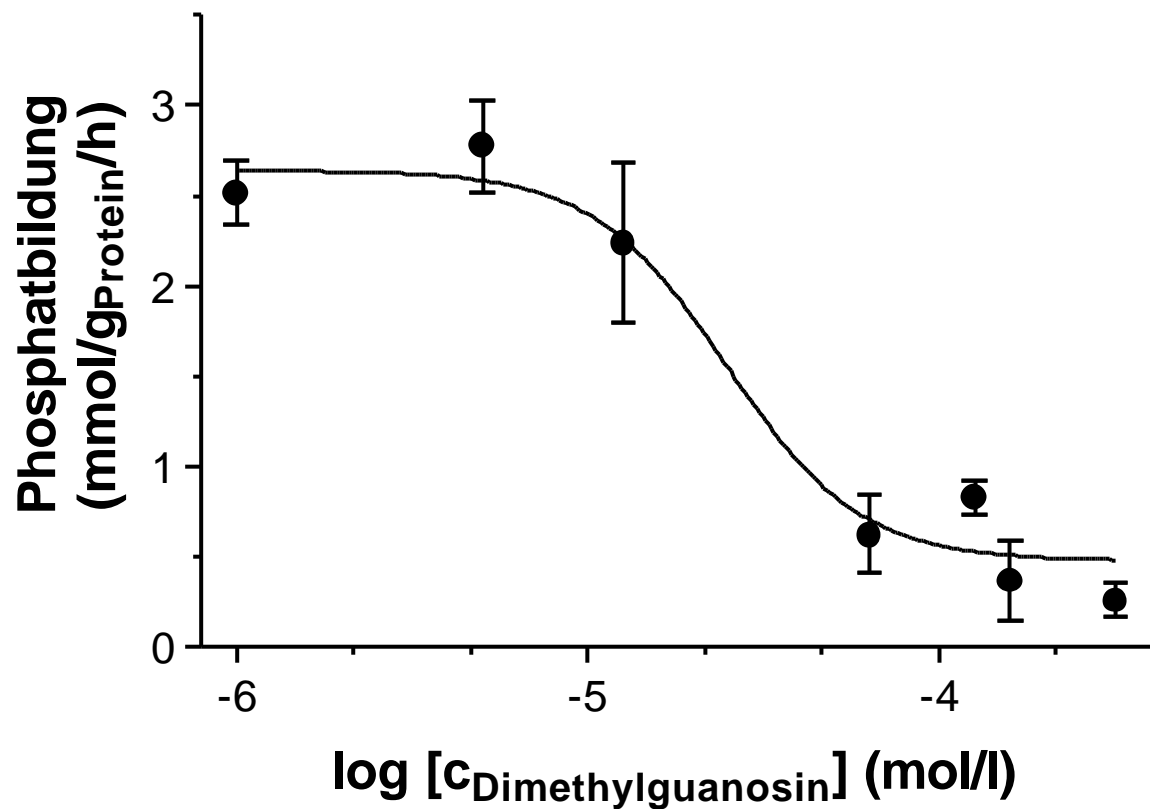


Abb. 3.3.3: Reaktionsgeschwindigkeit der Ca²⁺-ATPase in Abhängigkeit von der Dimethylguanosin-Konzentration;
c_{Dimethylguanosin}: 0,001 mmol/l - 0,316 mmol/l (in logarithmischer Auftragung);
c_{ATP}: 0,08 mmol/l

4. Diskussion

4.1. Isolierung und Identifizierung der aromatischen Verbindung

4.1.1. Chromatographie, NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden an Hämofiltrat durchgeführt, da sich, wie in Voruntersuchungen gezeigt werden konnte, sämtliche NMR-spektroskopisch bestimmbaren, aromatischen Substanzen aus dem Blutserum chronisch niereninsuffizienter Patienten auch im Hämofiltrat nachweisen lassen [69], und dieses in nephrologischen Ambulanzen in großen Mengen verfügbar ist. Vor den Messungen wurde das Hämofiltrat im Verhältnis 1:160 konzentriert, um die verbliebenen Aromaten besser nachweisen zu können.

Die elutions- und displacementchromatographischen Verfahren wurden lediglich zur Auftrennung des Hämofiltrats und nicht unter analytischen Gesichtspunkten eingesetzt. Das erstmalig von Tiselius beschriebene Verfahren der Displacementchromatographie [57] bietet gegenüber der konventionellen Elutionschromatographie einige Vorteile: es können bis zu 10-fach höhere Probenmengen getrennt werden, die Substanzmenge wird schnell und effektiv reduziert und die Probenmoleküle sind in hoher Konzentration von der Säule zu eluieren. Desweiteren können die Trennungen vollständig in wässrigen Medien durchgeführt werden [48]. Aus diesem Grund enthalten die Fraktionen keine Puffersalze, die den enzymatischen Ca^{2+} -ATPase-Test stören könnten.

Aufgrund der im Vergleich zu Heterokernen hohen Empfindlichkeit des Protonenkerns wurden von den einzelnen Fraktionen des displacementchromatographischen Laufs ^1H -NMR-Spektren aufgenommen. Mit Hilfe dieser Spektren konnte die Frage beantwortet werden, in welchen Fraktionen sich aromatische Substanzen befinden.

Ein Vorteil gegenüber chromatographischen Analyseverfahren besteht bei der gewählten Methode darin, daß die Fraktionen ohne aufwendige Probenvorbereitungen direkt der NMR-Analyse zugeführt werden können. Da die Proben bei der Aufnahme der Spektren nicht zerstört werden, wie es etwa bei der Massenspektrometrie der Fall ist, sind sie nach der Messung für weitere Untersuchungen verfügbar. Ein Nachteil der NMR-Spektroskopie liegt in der relativ geringen Empfindlichkeit, so daß Substanzen in sehr niedriger Konzentration nicht erfaßt werden.

Die Identifizierung der Verbindung als N_2,N_2 -Dimethylguanodin erfolgte durch das wesentlich empfindlichere Verfahren der Massenspektrometrie und den Vergleich der charakteristischen Massen mit einer Datenbank. Zuvor war die Fraktion zur besseren Auftrennung der Inhaltsstoffe gaschromatographisch aufgearbeitet worden.

4.1.2. N_2,N_2 -Dimethylguanodin -Konzentration im Blutserum

Da eine Hämofiltration bei gesunden Menschen aus medizinisch-ethischer Sicht nicht zu verantworten ist, wurden vergleichende Messungen am Blutserum vorgenommen, was für die Probanden lediglich die Belastung durch Blutentnahmen bedeutete. Die NMR-spektroskopisch ermittelten N_2,N_2 -Dimethylguanodinkonzentrationen (siehe Abb.3.2.2) verdeutlichen die signifikante Mehranreicherung der aromatischen Verbindung im Serum niereninsuffizienter Menschen. Mögliche Gründe für diese Konzentrationserhöhung sind in einer verminderten renalen Elimination auf dem Harnweg oder einem gravierenden Funktionsverlust des metabolisch sehr bedeutsamen Nierenparenchyms zu sehen [7].

Bei Gesunden konnte mit der verwendeten Messmethode kein N_2,N_2 -Dimethylguanodin im Serum nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu hat eine Studie von Pane und Gehrke ergeben, daß sich mit affinitätschromatographischen Verfahren auch im Serum der gesunden Population N_2,N_2 -Dimethylguanodin nachweisen läßt. Die bei dieser Untersuchung gemessenen Werte liegen abhängig von Alter, Geschlecht und

Staatsangehörigkeit in der Größenordnung von 17 nmol/l bis 36 nmol/l [39] und damit wesentlich unterhalb der im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Werte bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.

Darüberhinaus ist aus der Serumuntersuchung nach der Hämofiltrationsbehandlung zu ersehen, daß die N₂,N₂-Dimethylguanosinkonzentration durch die Behandlung lediglich um 20 % gesenkt wird. Damit liegt sie auch nach der Therapie noch um vier Zehnerpotenzen über der Norm.

4.1.3. Die Bedeutung von N₂,N₂-Dimethylguanosin im Organismus

Bei N₂,N₂-Dimethylguanosin handelt es sich um das Nucleosid Guanosin, das an dem N₂-Atom zwei zusätzliche Methylgruppen aufweist. Dieses modifizierte Nucleosid konnte in vielen eukaryotischen Zellen als Bestandteil sowohl cytoplasmatischer als auch mitochondrialer t-RNA nachgewiesen werden [55]. Es gibt auch Berichte über Vorkommen in ribosomaler RNA [33], die aber bisher nicht bestätigt werden konnten [35].

Wenn t-RNA N₂,N₂-Dimethylguanosin enthält, dann befindet sich das Nucleosid in der weitaus überwiegenden Zahl der Fälle an der Position 26. Eine Untersuchung von 129 eukaryotischen t-RNA Molekülen mit einem Guanosin-26 hat ergeben, daß bei 103 t-RNA's (80%) Guanosin in der methylierten Form, als N₂,N₂-Dimethyl-guanosin, vorlag [10].

Die Modifizierung von t-RNA Molekülen wird als Teil des t-RNA Reifungsprozesses angesehen und geschieht immer auf der Polynucleotid-Ebene. Die Methylierung von N₂,N₂-Dimethylguanosin-26 wird katalysiert durch die t-RNA-N₂,N₂-Dimethylguanosin-Methyltransferase. Als Methyl-Donor dient S-Adenosyl-methionin.

In *Saccharomyces Cerevisiae* konnte ein dieses Enzym kodierendes Gen (TRM1) geklont und sequenziert werden [11; 12]. Diesen Untersuchungen zufolge handelt es sich bei dem

Enzym um ein 63-kDa-Protein bestehend aus 570 Aminosäuren, das sich in den Zellen von *Saccharomyces Cerevisiae* sowohl in der inneren Membran des Nucleus als auch in den Mitochondrien nachweisen läßt [32; 45].

Mutationsversuche am TRM1-Gen haben ergeben, daß das Fehlen von N₂,N₂-Dimethylguanosin in der t-RNA zu keiner phänotypischen Veränderung führt [42; 52]. Somit ist die Anwesenheit des modifizierten Nucleosids für die Zelle nicht essentiell. Allerdings konnte bei Untersuchungen der t-RNA's von Hyperthermophilen eine Korrelation zwischen der Thermostabilität der Zellen und dem Methylierungsgrad von Guanosin-26 beobachtet werden [24].

Unter Berücksichtigung röntgen-christallographischer Daten zur 3D-Struktur, die an t-RNA von Hefezellen erhoben wurden, scheint N₂, N₂-Dimethylguanosin-26 als eine Art molekularer Angelpunkt zu funktionieren, der der Architektur in dem betreffenden Abschnitt des t-RNA-Moleküls eine bestimmte Rigidität/Flexibilität verleiht. Diese strukturelle Funktion erleichtert möglicherweise die Interaktion mit anderen Makromolekülen [10].

Es ist bisher nicht bekannt, wie die Aktivität und die Synthese der spezifischen t-RNA-Methyltransferase *in vivo* reguliert werden. Einige Studien brachten den Aktivitätsgrad des Enzyms in Zusammenhang mit dem Entwicklungsstadium der Zelle [38]. In der Literatur ist an mehreren Stellen beschrieben worden, daß die Aktivität der t-RNA-Methyltransferase in neoplastischem Gewebe gegenüber normalem Gewebe erhöht ist [44; 2].

Der Metabolisierungsweg des N₂,N₂-Dimethylguanosins nimmt insofern eine Sonderstellung ein, als das Molekül nicht den Weg der nicht-modifizierten Nucleoside geht, die entweder zu Harnsäure abgebaut werden oder über sogenannte Salvage Pathways der Synthese neuer RNA-Moleküle zugeführt werden, sondern ohne weitere Metabolisierung unverändert mit dem Urin ausgeschieden wird [3]. Daher wird N₂,N₂-Dimethylguanosin neben anderen modifizierten Nucleosiden als funktionsloses Endprodukt und prinzipiell als idealer Marker für den Umsatz von t-RNA, r-RNA und sn-RNA angesehen [50; 60].

Eine Vielzahl von Studien ist durchgeführt worden, um die Bedeutung von N_2,N_2 -Dimethylguanosin als Tumormarker zu untersuchen. Waalkes et al. haben mit chromatographischen Methoden N_2,N_2 -Dimethylguanosinkonzentrationen im 24-h-Urin von mehr als 200 Patienten mit soliden Tumoren gemessen. Neben der signifikanten Erhöhung der N_2,N_2 -Dimethylguanosin-Urinausscheidung bei den Tumorpatienten wurde im Verlauf dieser Arbeit eine ebenfalls vermehrte Exkretion bei Patienten mit chronischen Erkrankungen beobachtet. Die niedrigsten Urinkonzentrationen wurden bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ermittelt [64]. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Patienten mit Mamma-Karzinom [58], mit kleinzelligem Bronchialkarzinom [65] und bei Patienten mit dem acquired immune deficiency syndrome (AIDS) [37] erzielt.

4.2. Entwicklung des enzymatischen Tests

Mit Hilfe displacementchromatographischer, NMR- und massenspektrometrischer Verfahren ist es gelungen, eine aromatische Verbindung zu finden, die sich im Hämofiltrat und Blutserum niereninsuffizienter Menschen unphysiologisch anreichert. Eine entscheidende Elektrolytverschiebung im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz besteht in der intrazellulären Anreicherung von Calciumionen [8; 17], welche neben anderen Störungen auch auf der verminderten Aktivität der Mg^{2+}/Ca^{2+} ATPase beruht. Auf diesem Hintergrund wurde ein Testsystem entwickelt, durch das geprüft werden kann, inwieweit die akkumulierende Substanz einen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms hat.

Eine wichtige Voraussetzung für die enzymatischen Untersuchungen war das Vorliegen der Mg^{2+}/Ca^{2+} -ATPase in großer Menge und Reinheit. Da bei Erythrozyten die Ausschleusung der Calciumionen ganz überwiegend diesem Enzym unterliegt [22; 46], lag es nahe, die Tests mit Membranen der roten Blutkörperchen durchzuführen.

Die zur Isolierung der Erythrozyten angewandte Methode der Tangentialflußfiltration [47] erwies sich aus mehreren Gründen als vorteilhaft. Bei geringem praktischem Aufwand

lassen sich große Probevolumina schnell und effektiv trennen. Da Partikel, die sich an der Filtrationsmembran anlagern, durch das mit hoher Geschwindigkeit tangential an der Membran vorbeiströmende Retentat immer wieder aufgewirbelt werden, ist die Gefahr der Verstopfung des Filters sehr gering. Die peristaltische Pumpe, welche den nötigen Druck für das Abpressen des Filtrats aufbaut, sorgt gleichzeitig für eine ständige Durchmischung des Mediums, wodurch das Rühren erspart wird. Ein im Verhältnis zum Volumen der Probe großes Waschvolumen gewährleistet die reine Form der isolierten Membranen.

In dem entwickelten Testsystem können Änderungen der Phosphatkonzentration von 0,08 mmol/l gemessen werden. Um trotz calciumfreier Arbeitsweise im Reaktionsgemisch verbliebene Calciumionen zu eliminieren, wurde EGTA als Komplexbildner hinzugefügt. Durch Calmodulin lassen sich die Ca^{2+} -Affinität und die maximale Transportkapazität der Ca^{2+} -ATPase bis auf das 10-fache steigern [25; 36]. Um die Unterschiede der Enzymaktivität bei der Messung stärker zum Ausdruck zu bringen, wurde im Test die Ca^{2+} -ATPase auf diese Weise maximal stimuliert. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches wurde über ein Tris-Base/Tris-HCl-Puffersystem in physiologischen Grenzen gehalten. Zudem wurde Natriumacid zum Ausschluß einer bakteriellen Kontamination hinzugegeben.

Als ein möglicher Störfaktor bei der Messung der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität ist die zusätzliche Entstehung freien Phosphats durch die spontane Hydrolyse von ATP anzusehen. Bei der isolierten Betrachtung dieses Mechanismus - in Abwesenheit der Erythrozytenmembranen (siehe Abb.3.3.1) - stellte sich heraus, daß die Phosphatkonzentration unter diesen Bedingungen in einem Zeitraum von 90 Minuten um weniger als 3 % ansteigt und somit vernachlässigbar ist.

Unter Testbedingungen - in Anwesenheit der Membranen (siehe Abb.3.3.1) - nahm dagegen die Phosphatkonzentration in dem gleichen Zeitraum um 86,4 % zu. Demnach ist die Bildung von anorganischem Phosphat im Verlauf der enzymatischen Tests allein auf die Wirkung der $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase zurückzuführen.

Desweiteren konnte gezeigt werden, daß auch in Abwesenheit von Calciumionen die Konzentration an freiem Phosphat nach der Inkubationszeit von 90 Minuten um 22,9 % zugenommen hatte (siehe Abb.3.3.1). Diese Tatsache gibt Aufschluß über die Aktivität der Mg^{2+} -ATPase. Subtrahiert man den Wert dieser Messung von dem des Versuchs mit Zusatz von Calcium, so erhält man die isolierte Aktivität der Ca^{2+} -ATPase.

Das Ergebnis der enzymatischen Tests verdeutlicht, daß N_2,N_2 -Dimethylguanidin die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase herabsetzt (siehe Abb.3.3.2.a-c). Mit Hilfe der in Abbildung 3.3.3 dargestellten Dosis-Wirkungs-Kurve konnte gezeigt werden, daß die Intensität der Inhibition abhängig ist von der N_2,N_2 -Dimethylguanidinkonzentration. Bei einer InhibitorKonzentration von 0,024 mmol/l wurde die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität um 50 % gesenkt.

Die im Labortest dargestellten Inhibitoreigenschaften kommen in vivo nur dann zum Tragen, wenn das N_2,N_2 -Dimethylguanidin in ausreichend hoher Konzentration im Blut vorliegt. Die quantitativen Messungen ergaben, daß die Substanz im Blut niereninsuffizienter Patienten auch nach der Dialysebehandlung noch eine Konzentration von 0,12 mmol/l erreicht. Wie aus der Dosis-Wirkungs-Kurve (siehe Abb.3.3.3) hervorgeht, vermindert N_2,N_2 -Dimethylguanidin in vitro die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase in dieser Konzentration um etwa 82 %.

In der Literatur finden sich Angaben, daß bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz bestimmte Substanzen, die durch Dialyse aus dem Blut eliminierbar sind, eine Hemmung der Na^+/K^+ - und Mg^{2+}/Ca^{2+} -ATPase bewirken [13; 14], und für die Na^+/K^+ -ATPase konnten einige solche Substanzen auch schon identifiziert werden [14 ;15 ;66]. Dagegen ist über die Inhibitoren der Mg^{2+}/Ca^{2+} -ATPase nur wenig bekannt. Eine direkt hemmende Wirkung konnte für die Serumglucose nachgewiesen werden [19 ;29]; es wird diskutiert, ob dies möglicherweise über eine vermehrte Glycosylierung des Calmodulins geschieht, welches dadurch seine stimulierenden Eigenschaften verlieren würde. Die Rolle des Insulins bei der Regulation der Ca^{2+} -ATPase ist dagegen nicht eindeutig geklärt; sowohl hemmende

[23; 30; 31; 41] als auch aktivierende Einflüsse [16] werden beschrieben. Vanadat ist zwar als Inhibitor des Enzyms identifiziert worden, jedoch korrelierten erhöhte Serumspiegel nicht mit dem Grad der Inhibition [13].

Als Folge der verminderten Ca^{2+} -ATPase-Aktivität ist die intrazelluläre Calciumionenkonzentration erhöht. Dadurch kommt es zu einer Reihe von Veränderungen in der Zellfunktion; das Cytoskelett der Erythrozyten verliert an Elastizität und Stabilität [18; 28]; glatte Muskelzellen reagieren mit einer Tonuszunahme [54]. Auch bei der essentiellen Hypertonie ist die Aktivität der $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase herabgesetzt [61 ;62 ;63] und es besteht eine Korrelation zwischen der Abnahme der Enzymaktivität und der Erhöhung des Blutdrucks [66].

Zusammenfassend ist zu sagen, daß das N_2,N_2 -Dimethylguanidin, ein Produkt des RNA-Stoffwechsels, im Blutserum chronisch niereninsuffizienter Patienten akkumuliert und durch Hämofiltration nur unzureichend entfernbar ist. Inwieweit diese aromatische Verbindung als Inhibitor der $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase zum urämischen Syndrom beiträgt, ist an dieser Stelle noch nicht absehbar und interessanter Gegenstand weiterführender Untersuchungen. Desweiteren könnte in der effizienteren Abtrennung der Substanz aus dem Blut ein therapeutischer Ansatz für die Behandlung der chronischen Niereninsuffizienz liegen.

5. Literatur

1. Bell, J.D.; Lee, J.A.; Lee, A.; Sadler, P.J.; Wilkie, D.R., Woodham, R.H.: Nuclear magnetic resonance studies of blood plasma and urine from subjects with chronic renal failure: identification of trimethylamine-N-oxide, *Biochim Biophys Acta* 1096, 101-107 (1991)
2. Borek, E.: Introduction to symposium: tRNA and tRNA modification in differentiation and neoplasia. *Cancer Res* 31, 596-597 (1971)
3. Borek, E.; Baliga, B.S.; Gehrke, C.W.; Kuo, W.; Sidney Belman; Troll, W.; Waalkes T.P.: High turnover rate of transfer RNA in tumor tissue. *Cancer Res* 37, 3362-3366 (1977)
4. Bradford, M.A.: Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248 (1976)
5. Brunner, F.D.: End-stage renal failure due to diabetic nephropathy: data from the EDTA registry. *J Diab Compl* 3, 127 (1989)
6. Carafoli, E.: Intracellular calcium homeostasis. *Ann Rev Biochem* 56, 395-433 (1987)
7. Chu, P.; Cadley, M.; Bellingham, A.J.: Red cell metabolism in renal failure: The effect of dialysis. *Clin Lab Haematol* 7 (1), 1-5 (1985)
8. Cooper, J.D.; Lazarowitz, V.C.: Neurodiagnostic abnormalities in patients with acute renal failure. *Journal of Clinical Investigation* 61, 1448-1455 (1978)
9. European Dialysis and Transplantation Association, Amsterdam, The Netherlands, June 17-20, 1979. *Kidney Int* 16 (2), 216-244 (1979)

10. Edqvist, J.; Straby, K.B.; Grosjean, H.: Enzymatic formation of N₂,N₂-dimethylguanosine in eukaryotic tRNA: importance of the tRNA architecture. *Biochimie* 77, 54-61 (1995)
11. Ellis, S.R.; Morales, M.J.; Li, J.M.; Hopper, A.K.; Martin, N.C.: Isolation and characterization of the TRM1 locus, a gene essential for the N₂,N₂-dimethylguanosine modification of both mitochondrial and cytoplasmic tRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 261, 9703-9709 (1986)
12. Ellis, S.R.; Hopper, A.K.; Martin, N.C.: Amino-terminal extension generated from an upstream AUG codon is not required for mitochondrial import of yeast N₂,N₂-dimethylguanosine-specific tRNA methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 5172-5176 (1987)
13. Gafter, U.; Malachi, T.; Barak, H.; Djaldelli, M.; Levi, J.: Red blood cell calcium homeostasis in patients with end-stage renal disease. *J Lab Clin Med* 114, (3), 222-231 (1989)
14. Gallice, P.; Monti, J.: Separation from uremic body fluid and normal urine of Na⁺/K⁺-ATPase inhibitor. *Ad Exp Med Bio* 223, 215-218 (1987)
15. Gallice, P.; Monti, J.: Na²³-NMR study of Na⁺/K⁺-pump inhibition by a fraction from uremic toxins. *Clin Chem* 34 (10), 2044-2047 (1988)
16. Gavin, J.R.; Lowry, M.: Ca-ATPase-activity is stimulated by insulin in canine and fat rat cell membranes. *Diabetes* 36 (1), 50A (1986)
17. Goldstein, D.A.; Chui, L.A.: Calcium metabolism of the brain in acute renal failure. *Journal of Clinical Investigation* 62, 88-95, (1978)
18. Gregersen, M.I.; Bryant, C.A.; Chien, S.; Dellenback, R.J.; Magazinovic, V.; Usami, S.: Species differences in the flexibility and deformation of erythrocytes (RBC). *Bibl Anat* 10, 104-108 (1969)

- 19.Gronda, C.M.; Rossi, J.: Effect of different insulin sekretagogues and blocking agents on islet cell Ca^{2+} -ATPase activity. *Biochemica Biophysica Acta* 943, 183-189 (1988)
- 20.Horvath, C.; Nahum, A.; Frenz, J.H.: High performance liquid displacement chromatography. *J Chrom* 218, 365-393 (1981)
- 21.Inesi, G.; Kirtley, M.R.: Structural features of cation transport ATPase. *J. Bioenergetics and Biomembranes* 24, 3, 271-283 (1992)
- 22.Katz, S.; Blostein, R.: Ca^{2+} -stimulated membrane phosphorylation and ATPase aktivty of the human erythrocyte. *Biochim Biophys Acta* 389 (2), 314-324 (1975)
- 23.Kissebah, H.A.; Hoppe-Gill, H.; Vydellingum, N: Mode of insulin action. *Lancet* 1, 144-147 (1975)
- 24.Kowalack, J.A.; Dalluge, J.J.; McCloskey, J.A.; Stetter, K.O.: The role of post-transcriptionalmodification in stabilization of tRNA from hyperthermophiles. *Biochemistry* 33, 7869-7876 (1994)
- 25.Krebs, J; Vorherrm, T.; James, P.; et al.: Structural details of the interaction of calmodulin with the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *Adv Exp Biol* 269, 163-167 (1990)
- 26.Kuhlmann, H.; Thomae, U.: Dialysebehandlung bei terminal niereninsuffizienten Diabetikern. in: Brass, H.; Phillip, T.; Schulz, W.: *Nephrologicum* Dustri Verlag (1994)
- 27.Kwan, C.Y., Chudry, R., Zheng, X.F.: Effects of sarcoplasmatic reticulum calcium pump inhibitors on vascular smooth muscle cell. *J Hyperten* 23 (1), I 156-160 (1994)
- 28.La-Celle, P.L.; Kirkpatrick, F.H.: Determinants of erythrocyte membrane elasticity. In: Brewer, G.J. (Ed.): Erythrocyte structure and function. 535-557 New York, Liss. (1975)

29. Levin, S.R.; Kasson, B.G.: Adensin triphosphatases of pancreatic islets. Comparison with those of rat kidney. *J Clin Invest* 62, 692-701 (1978)
30. Levy, J; Gavin, J.R.: Hormonal regulation of Ca²⁺-ATPase: activity in canine renal basolateral membrane. *Endocrinology* 119, 2405-2410 (1986)
31. Levy, J.; Suzuki, Y.: Plasma membrane phospholipid content in non-insuline dependent streptozotocin-diabetic rats: effect of insuline. *Diabetologia* 31, 315-321 (1988)
32. Li, J.M.; Hopper, A.K.; Martin, N.C.: N2,N2-dimethylguanosine-specific tRNA methyltransferase contains both nuclear and mitochondrial targeting signals in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 109 (4 Pt 1), 1411ff (1989)
33. Limbach, P.A.; Crain, P.F.; McCloskey, J.A.: Summary: the modified nucleosides of tRNA. *Nucleic Acids Res* 22, 2183-2196 (1994)
34. Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, R.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Bio Chem* 193, 265 (1951)
35. Maden, B.E.H.: The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* 39, 241-303 (1990)
36. Menas, A.R.: Molecular Mechanisms of action of calmodulin. *Rec Progress Horm Res* 44, 223-259 (1989)
37. Nakano, K.; Nakao, T.; Schram, K.H.; Hammargren, W.M.; McClure, T.D.; Katz, M.; Petersen, E.: Urinary excretion of modified nucleosides as biological marker of RNA turnover in patients with cancer and AIDS. *Clin Chim Acta* 218, 169-183 (1993)
38. Nau, F.: The methylation of tRNA. *Biochimie* 58, 629-645 (1976)

39. Pane, F.; Oriani, G.; Kuo, K.C.T.; Gehrke, C.W.; Salvatore, F.; Sacchetti, L.: Reference intervals for eight modified nucleosides in serum in a healthy population from Italy and the United States. *Clin. Chem.* 38/5, 671-677 (1992)
40. Penniston, J.T.; Filoteo, A.G.: Purification, reconstitution and regulation of plasma membrane Ca^{2+} -pump. *Meth in Enzymology* 157, 1271 (1988)
41. Pershadasing, H.A.; McDonald, J.M.: Direct addition of insulin inhibits a high affinity Ca^{2+} -ATPase in isolated adipocytes plasma membranes. *Nature* 281, 495-497 (1979)
42. Phillips, J.H.; Kjellin-Straby, K.: Studies on microbial ribonucleic acid: IV two mutants of *S. cerevisiae* lacking N_2, N_2 -dimethylguanosine in tRNA. *J Mol Biol* 26, 509-518 (1967)
43. Rasmussen, H.: The complexities of intracellular Calcium signalling. *Biology and Chemistry / Hoppe Seyler* 371, 191-206 (1990)
44. Riddick, D.H.; Gallo, R.C.: Correlation of transfer RNA methylase activity with growth and differentiation in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 30, 2484-2492 (1970)
45. Rose, A.M.; Belford, H.G.; Shen, W.C.; Greer, C.L.; Hopper, A.K.; Martin, N.C.: Location of N_2, N_2 -dimethylguanosine-specific tRNA methyltransferase. *Biochimie* 77, 45-53 (1995)
46. Schatzmann, H.J.: ATP-dependant Ca^{2+} -Extrusion from Human Red Cells. *Experienta* 22, (6), 364-365 (1969)
47. Schlüter, H.; Krivoy, N.; Hürster, A.; Ingendonk, A.; Karas, M.; Zidek, W.: Application of cross-flow filtration to the purification of biologically active peptides in human plasma after incubation with a protease-rich extract. *Journal of Chromatography* 625, 3-11 (1992)

- 48.Schlüter, H.; Klostermann, A.; Kluth, B.; Hürster, A.; Zidek, W.: Displacement-Chromatographie von Biomolekülen. Kapillarelektrophorese - Chromatographie, Würzburger Kolloquium, Bertsch Verlag (1993)
- 49.Schmidt, R.F.; Thews, G.: Physiologie des Menschen. -24. Aufl.- Heidelberg; New York; London; Paris; Tokyo: Springer Verlag (1990)
- 50.Schoch, G.; Sander, G.; Topp, H.; Heller-Schoch, G.: Modified nucleosides in urine and in serum as selective markers for the whole body turnover of tRNA, rRNA and mRNA-cap - future prospects and impact. *Op. cit.* (ref.4), 389-441
- 51.Schöppe, W.: Nierentransplantation. *Dt Ärzteblatt* 89, 634-637 (1992)
- 52.Schoots, A.C.; Mikkers, F.E.; Cramers, C.A.; Ringoir, S.: Profiling of uremic serum by high -resolution gas chromatography -electronimpact, chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 164(1), 1-8 (1979)
- 53.Smolar, N.; Svensson, I.: tRNA methylating activity of yeast mitochondria. *Nucleic Acids Res* 1, 707-718 (1974)
- 54.Somlyo, A.P.; Himpens, B.: Cell Calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J*, 2266-2276 (1989)
- 55.Steinberg, S.; Misch, A.; Sprinzl, M.: Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res* 21, 3011-3015 (1993)
- 56.Stryer, L.: Biochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, New York (1992)
- 57.Tiselius, A.: *Ark. Kemi. Geol.* 16 A, 1 (1943); zitiert aus: Felinger, A.; Guiochon, G.: Optomization of the experimental conditions and the column design parameters in displacement chromatography. *J Chrom* 609, 35-47 (1992)
- 58.Tormey, D.C.; Waalkes, T.P.; Ahmann, D.; Gehrke, C.W.; Zumwalt, R.W.; Snyder, J.; Hansen, H.: Biological markers in breast carcinoma. *Cancer* 35, 1095-1100 (1975)

59. Tsien, R.W.: Calcium channels in excitable cell membranes. *Annual Review of Physiology* 45, 341-358 (1983)
60. Uziel, M.; Selkirk, J.K.: Pyrimidine nucleoside, Pseudouridine, and modified nucleoside excretion by growing and resting fibroblasts. *Cell Physiol* 99, 217-222 (1979)
61. Vezzoli, G.; Elli, A.; Niuatta, E.; Quarto di Palo, F.; Bianchi, G.; Carafoli, E.: Ca-ATPase in erythrocyte membrane ghost cells of MHS rats. *Am J Nephrol* 6 (1), 63-65 (1986)
62. Vincenzi, F.F.; Morris, C.D.; Kinsel, L.B.; Kenny, M; McCarron, D.A.: Decreased Ca pump adenosine triphosphatase in red blood cells of hypertensive subjects. *Hypertension* 8 (11), 1058-1066 (1986)
63. Vincenzi, F.F.; Di Julio, D.; Morris, C.D.; McCarron, D.: Measurements of the activity of the plasma membrane Ca-Pump ATPase in human hypertension. *Prog Clin Biol Res* 252, 379-383 (1988)
64. Waalkes, T.P.; Gehrke, C.W.; Zumwalt, R.W.; Chang, S.Y.; Lakings, D.B.; Tormey, D.C.; Ahmann, D.L.; Moertel, C.G.: The urinary excretion of nucleosides of ribonucleic acid by patients with advanced cancer. *Cancer* 36, 390-398 (1975)
65. Waalkes, T.P.; Abeloff, M.D.; Ettinger, D.S.: Biological markers and small cell carcinoma of the lung. *Cancer* 50, 2457-2464 (1982)
66. Walter, U.; Muller, S.: Evidence for a Na⁺/K⁺-ATPase -inhibitor in erythrocytes of patients with essential hypertension. *European Journal of Clinical Investigation* 15 (4), 209-214 (1985)
67. Yang, Y.: Changes in red blood cell Ca²⁺-ATPase activity and red blood cell calcium concentration during dialysis in patients with uremia. *Chung Hua I Hsueh TSA Chih* 70, 23-25 (1989)
68. Zidek, W.: Mündliche Mitteilung (1994)

69.Zidek, W.: Mündliche Mitteilung (1995)

6. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. W. Zidek danke ich für das Vertrauen, das er in mich setzte, als er mir die Mitarbeit als Doktorand in seiner Forschungsgruppe ermöglicht hat.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Schlüter bedanke ich mich besonders für die freundliche Unterstützung bei der experimentellen Arbeit und für die Geduld, mit der er mir bei allen Problemen, die sich im Rahmen dieser Arbeit ergaben, geholfen hat.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. Jankowski für die Durchführung der ^1H -NMR-spektroskopischen Messungen und für die hilfreichen Hinweise bei der Erstellung der vorliegenden Dissertation.

Bei den Mitarbeitern der Forschungslaboratorien der Medizinischen Poliklinik der WWU Münster möchte ich mich für die vielen praktischen Hilfeleistungen bedanken. Hier ist vor allem Herr T. Lee zu nennen, dessen sehr freundliche Anleitung bei den Labortätigkeiten von unschätzbarem Wert waren.

Sehr herzlich aber danke ich meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin überhaupt ermöglicht haben. Sie hatten immer Verständnis und gaben mir die nötige Sicherheit, meine Ausbildung meinen Vorstellungen entsprechend gestalten zu können.

7. Lebenslauf

Persönliche Daten:	RÜDIGER HÖRBELT Bresserbergstr. 52 47533 Kleve geb.: 28.07.1970 katholisch ledig
Schulbildung:	1977-1981: Marienschule in Kleve 1981-1990: Freiherr-vom-Stein-Gymnasium in Kleve Mai 1990: Abitur
Wehrdienst:	1990-1991 in Goslar und Kalkar
Hochschulstudium:	<u>◆ 1991-1993: Vorklinischer Abschnitt.</u> Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen August 1993: Physikum, RWTH Aachen <u>◆ 1993-1994: Erster Klinischer Abschnitt.</u> Westfälische Wilhelms-Universität, Münster Dezember 1993: Beginn der Dissertationsarbeit bei Prof. Dr. med. W. Zidek August 1994: 1. Staatsexamen, WWU Münster <u>◆ 1994-1996: Zweiter Klinischer Abschnitt.</u> Westfälische Wilhelms-Universität, Münster August 1996: 2. Staatsexamen, WWU Münster <u>◆ 1996-1997: Praktisches Jahr.</u> Westfälische Wilhelms-Universität, Münster United Medical and Dental School, London, GB Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA Dezember 1997: 3. Staatsexamen, WWU Münster
Berufliche Tätigkeit	<u>◆ seit 03/1998: Arzt im Praktikum.</u> Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie der Justus-Liebig-Universität, Gießen