

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

**DISSERTATION**

**Isolierung und Identifizierung von  
Adenosinguanosintriphosphat, Adenosinguanosinpentaphosphat und  
Diguanosindiphosphat  
aus menschlichem Nebenschilddrüsengewebe**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Simone Kathemann  
aus Frankfurt am Main

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

**Datum der Promotion: 14.06.2009**

Meinen Eltern

Sigrid Stoll  
und  
Werner Kathemann

## Inhaltsverzeichnis

|          |   |              |
|----------|---|--------------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG</b>   | <b>1-8</b>   |
| 1.1      | Pathogenese der arteriellen Hypertonie  | 1-4          |
| 1.2      | Die endokrine Funktion der Nebenschilddrüse   | 4-5          |
| 1.3      | Rolle der Dinukleosidpolyphosphate bei Entstehung der arteriellen Hypertonie                            | 5-8          |
| 1.4      | Fragestellung   | 8            |
| <b>2</b> | <b>METHODIK</b>   | <b>9-17</b>  |
| 2.1      | Übersicht der Arbeitsschritte   | 9            |
| 2.2      | Isolierung der Dinukleosidpolyphosphate   | 10-14        |
| 2.2.1    | Mechanische Desintegration  | 10           |
| 2.2.2    | Extraktion  | 10           |
| 2.2.3    | Präparative Reversed-Phase-Chromatographie  | 11           |
| 2.2.4    | Displacement-Chromatographie  | 11           |
| 2.2.5    | Analytische Anionenaustausch-Chromatographie  | 12           |
| 2.2.6    | Reversed-Phase-Chromatographie  | 13           |
| 2.2.7    | Homogenitätsevaluation  | 14           |
| 2.3      | Synthese authentischer Dinukleosidpolyphosphate   | 15-16        |
| 2.4      | Identifizierung der Dinukleosidpolyphosphate Ap <sub>3</sub> G, Ap <sub>5</sub> G und Gp <sub>2</sub> G | 16-17        |
| 2.4.1    | Massenbestimmung mittels (PSD-) MALDI-Massenspektrometrie   | 16-17        |
| 2.4.2    | Enzymatische Analytik   | 17           |
| <b>3</b> | <b>ERGEBNISSE</b>   | <b>18-33</b> |
| 3.1      | Isolierung der Dinukleosidpolyphosphate   | 18-26        |
| 3.1.1    | Mechanische Desintegration und Extraktion   | 18           |
| 3.1.2    | Präparative Reversed-Phase-Chromatographie  | 18           |
| 3.1.3    | Displacement-Chromatographie  | 18-19        |
| 3.1.4    | Analytische Anionenaustausch-Chromatographie  | 19-22        |
| 3.1.5    | Reversed-Phase-Chromatographie  | 23-25        |
| 3.1.6    | Homogenitätsevaluation  | 26           |
| 3.2      | Identifikation der Dinukleosidpolyphosphate   | 26-33        |
| 3.2.1    | Massenbestimmung mittels (PSD-) MALDI-Massenspektrometrie   | 26-29        |
| 3.2.2    | Enzymatische Analytik   | 29-33        |

---

|           |                             |              |
|-----------|-----------------------------|--------------|
| <b>4.</b> | <b>DISKUSSION</b>           | <b>34-40</b> |
| <b>5.</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>      | <b>41</b>    |
| <b>6.</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b> | <b>42-50</b> |
| <b>7.</b> | <b>ANHANG</b>               | <b>51-53</b> |
| 7.1       | Chemikalien/Enzyme          | 51           |
| 7.2       | Geräte                      | 51           |
| 7.3       | Abkürzungen                 | 52-53        |
| <b>8.</b> | <b>LEBENS LAUF</b>          | <b>54-55</b> |
| <b>9.</b> | <b>DANKSAGUNG</b>           | <b>56</b>    |

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Pathogenese der arteriellen Hypertonie

Als arterielle Hypertonie wird eine dauerhafte Erhöhung des Blutdruckes oberhalb der von der WHO festgelegten Grenzwerte bezeichnet (Chalmers, 1999). Für die Diagnose einer arteriellen Hypertonie ist das Überschreiten des systolischen und/oder diastolischen Grenzwerts bei mindestens zwei voneinander unabhängigen Blutdruckmessungen in Ruhe erforderlich. Tabelle 1 zeigt die Stadieneinteilung der arteriellen Hypertonie entsprechend des Schweregrads. Fallen systolische und diastolische Werte eines Patienten in zwei verschiedene Stadien, erfolgt die Zuteilung in das höhere Stadium.

**Tabelle 1:** Stadieneinteilung der arteriellen Hypertonie nach WHO (Chalmers, 1999)

| <b>Stadien Hypertonie</b>   | <b>Grenzwert Systole</b> | <b>Grenzwert Diastole</b> |
|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1. Milde Hypertonie         | 140-159 mmHg             | 90-99 mmHg                |
| 2. Mittelschwere Hypertonie | 160-179 mmHg             | 100-109 mmHg              |
| 3. Schwere Hypertonie       | > 180 mmHg               | > 110 mmHg                |

Bei einem systolischen Blutdrucks zwischen 120 und 139 mmHg und/oder einem diastolischen Blutdruck zwischen 80 und 89 mmHg spricht man von einer Grenzwerthypertonie (Moser, 2004). Die Prävalenz einer arteriellen Hypertonie oder Grenzwerthypertonie bei erwachsenen US-Amerikanern beträgt etwa 60 % und steigt mit zunehmendem Lebensalter (Wang, 2004, He, 1998).

Die Ätiologie der arteriellen Hypertonie ist vielschichtig. Findet sich keine Ursache für die Entstehung der Hypertonie, wird diese als primär oder auch essentiell bezeichnet. Die primäre arterielle Hypertonie macht einen Anteil von etwa 90-95 % aller Fälle der arteriellen Hypertonie aus (Krautzig, 2001). Bei den verbleibenden 5-10 % findet sich eine organische Ursache der arteriellen Hypertonie, sie wird dann auch als sekundäre arterielle Hypertonie bezeichnet (Krautzig, 2001). Die Ätiologie der primären Hypertonie ist zum größten Teil ungeklärt, statistische Zusammenhänge zwischen genetischen Faktoren (Fornage, 2006), Umwelt- und Ernährungsfaktoren wie erhöhtem Kochsalzkonsum (Uzu, 2006), psychischem Stress (Brady, 2006), Adipositas (Chrostowska, 2006) und übermäßigem Alkoholkonsum liegen jedoch vor

(Dietze, 2000). Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über mögliche Risikofaktoren der primären arteriellen Hypertonie.

**Tabelle 2:** Risikofaktoren der primären arteriellen Hypertonie (Krautzig, 2001)

| <b>Genetische Disposition</b> | <b>Umweltfaktoren</b> | <b>Ernährungsfaktoren</b> |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Polygonaler Erbgang           | Stress                | Kochsalzkonsum            |
|                               | Rauchen               | Adipositas                |
|                               |                       | Fetteiche Kost            |
|                               |                       | Alkoholkonsum             |

Ätiologische Faktoren für die Entstehung einer primären arteriellen Hypertonie sind somit unter anderem die Risikofaktoren des metabolischen Syndroms (JNC, 2003). Mögliche pathophysiologische Entstehungsmechanismen wären beispielsweise ein Mangel vasodilatatorisch wirkender Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) oder ein Überschuss vasokonstriktorisch wirkender Substanzen wie Angiotensin II, Endothelin oder auch Dinukleosidpolyphosphate (Humphrey 2003, Schlüter 1996).

Die größte Gruppe der sekundären arteriellen Hypertonieformen stellt die renale Hypertonie dar, die etwa 5-8 % aller Fälle der arteriellen Hypertonie ausmacht. Je nach Lokalisation der Nierenschädigung wird von einer renovaskulären, renoparenchymatösen oder postrenalen Hypertonie gesprochen. Bei der die Nierengefäße betreffenden renovaskulären Hypertonie handelt es sich um die häufigste Form der renalen Hypertonie. Durch die verminderte Durchblutung der Niere kommt es zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems und damit zu einer vermehrten Angiotensin II vermittelten Vasokonstriktion und Aldosteron induzierter Natrium- und Wasserrückresorption im Sammelrohr (Riehl 2005). Bei der parenchymatösen, das Nierengewebe betreffenden Hypertonie, handelt es sich häufig um eine Folge akuter oder chronischer Nierenparenchymschädigung durch entzündliche Prozesse oder Tumoren. Die postrenale Hypertonie entsteht aufgrund von Abflussstörungen der ableitenden Harnwege. Die renale Hypertonie stellt auch die häufigste Ursache einer schweren arteriellen Hypertonie im Kindesalter dar (Flynn, 2008), die Prävalenz einer arteriellen Hypertonie im Kindesalter ist jedoch insgesamt deutlich geringer als im Erwachsenenkollektiv. Weitere Ursachen einer sekundären arteriellen Hypertonie sind die kardiovaskuläre Hypertonie, beispielsweise bei einer Aortenisthmusstenose, die neurogene Hypertonie bei erhöhtem

Hirndruck oder Enzephalitis, die EPH Gestose (engl. Edema Proteinuria Hypertension) im Rahmen einer Schwangerschaft, die medikamentös-toxisch induzierte Hypertonie und die endokrine Hypertonie. Die endokrine Hypertonie wird durch ein unphysiologisches Vorkommen von verschiedenen Hormonen hervorgerufen (Unger, 2006). Beim Phäochromozytom, einem Tumor des Nebennierenmarks, führt die exzessive Sekretion von Katecholaminen zu einem sympathikusvermittelten Anstieg des Blutdrucks (Lenders, 2005). Sowohl beim durch exzessive Cortisol-Sekretion entstehenden Morbus Cushing, als auch nach exogener Zufuhr von Glukokorticoiden, kommt es durch die partielle mineralocorticoide Wirkung der Glukokortikoide zu einer vermehrten Natrium- und Wasserrückresorption im Sammelrohr der Niere und somit zu einem Volumenhochdruck (Sacerdote, 2005). Beim primären Hyperaldosteronismus, dem Morbus Conn, resultiert die Sekretion des Mineralocorticoids Aldosteron in einer vermehrten Natrium- und Wasserrückresorption im Sammelrohr der Niere und damit in einem Volumenhochdruck (Labinson, 2006). Durch vermehrte Östrogensekretion oder exogene Östrogenzufuhr beispielsweise im Rahmen der hormonellen Kontrazeption kommt es über eine vermehrte hepatische Produktion von Renin-Substrat zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems und damit zur Angiotensin II vermittelten peripheren Vasokonstriktion und Aldosteron-induzierten Natrium- und Wasserrückresorption (Lubianca, 2005). Auch bei einer vermehrten Wachstumshormon (STH) Ausschüttung kommt es vermutlich durch eine vermehrte Natrium- und Wasserretention zu einem Volumenhochdruck (Bondanelli, 2001). Eine vermehrte Ausschüttung von Schilddrüsenhormonen bei einer Hyperthyreose führt zwar zu einem Ansteigen der Blutdruckamplitude, jedoch nicht zur Erhöhung den Mitteldruck, da es zu einem Absinken der Diastole durch periphere Mehrperfusion kommt. Bei einer Hypothyreose kommt es bei leicht erhöhtem diastolischen Blutdruck aufgrund des reduzierten kardialen Auswurfs auch zu keiner nennenswerten Erhöhung des Mitteldrucks (Gallowitsch, 2005). Der Blutdruckanstieg bei primärem Hyperparathyreoidismus wird auf den bisher unzureichend charakterisierten „Parathyroid Hypertensive Factor“ zurückgeführt (Benishin, 1994).

Unabhängig von der Ätiologie führt eine dauerhafte Erhöhung des arteriellen Blutdrucks durchschnittlich 7–10 Jahre nach Erstmanifestation zu sekundären Organschäden. Die Lebenserwartung wird durch die Folgen der arteriellen Hypertonie um 10-20 Jahre reduziert (Krautzig, 2001). Eine dauerhafte Erhöhung des arteriellen Blutdrucks im großen Blutkreislauf führt zu einer Hypertrophie des linken Ventrikels und später über eine Gefügedilatation zur Herzinsuffizienz (Dusing, 2006). Eine Verengung der Koronargefäße führt über eine Minderversorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff zur koronaren Herzkrankheit (KHK). Die im

Zusammenhang mit der arteriellen Hypertonie entstehende Arteriosklerose verstärkt das Bild der koronaren Herzkrankheit. Eine Arteriosklerose der Arteria carotis und der Hirngefäße kann zu ischämischen und hämorrhagischen Insulten und zur vaskulären Demenz führen (Birkenhager, 2006). Eine arterielle Hypertonie begünstigt das Auftreten von Bauchaortenaneurysmen und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK). Eine Arteriosklerose der Netzhautgefäße kann zur hypertensiven Retinopathie und zur Blindheit führen (Nadar, 2006). Tabelle 3 zeigt eine Übersicht möglicher Ursachen einer sekundären arteriellen Hypertonie.

**Tabelle 3:** Ursachen der sekundären Hypertonie (Krautzig, 2001)

| <b>Renale Ursachen</b> | <b>Endokrine Ursachen</b> | <b>Kardiovaskuläre Ursachen</b> | <b>Sonstige Ursachen</b> |
|------------------------|---------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| renovaskulär           | Phäochromozytom           | Aortenisthmusstenose            | Neurogen                 |
| renoparenchymatös      | Cushing Syndrom           |                                 | EPH-Gestose              |
| postrenal              | Conn Syndrom              |                                 | Medikamentös             |
|                        | Hyperöstrogenämie         |                                 | toxisch                  |
|                        | Hyperparathyreoidismus    |                                 |                          |
|                        | Hyperthyreose             |                                 |                          |
|                        | Hypothyreose              |                                 |                          |

## 1.2 Die endokrine Funktion der Nebenschilddrüse

Erkrankungen der Nebenschilddrüse können an der Entstehung einer arteriellen Hypertonie beteiligt sein (Nyirenda, 2005). Ein verstärktes Nebenschilddrüsenwachstum im Rahmen eines Hyperparathyreoidismus führt zu einer verstärkten Sekretion von Hormonen, von denen einige eine vasokonstriktorische Wirkung zeigen. Die Nebenschilddrüsen, Glandulae parathyreoideae, bestehen aus vier etwa linsengroßen Organen die sich auf der Dorsalseite der Schilddrüse befinden. Bei einer Einzelgröße von etwa 5 x 4 x 2 mm haben sie ein Gesamtgewicht von etwa 50 mg. Die einzelnen Organe bestehen aus einer lockeren Bindegewebskapsel und dem Drüsenkörper aus Epithelsträngen mit oxidativ aktiven oxyphilen Zellen, kolloidhaltigen Follikeln, Fettzellen und Parathormon bildenden Hauptzellen (Schiebler, 1997). Das Parathormon reguliert den Kalzium- und Phosphathaushalt des menschlichen Organismus. Die Hauptwirkung besteht in einer Erhöhung des Kalziumspiegels im Blut über eine Mobilisation

von Kalzium aus dem Knochen und einer vermehrten Rückresorption von Kalzium in der Niere. Unklar war die Funktion des Parathormons bei der Pathogenese der arteriellen Hypertonie und bestehendem primären Hyperparathyreoidismus. In verschiedenen Fallbeschreibungen und klinischen Studien wurde eine Normalisierung des arteriellen Blutdrucks in Patienten nach Parathyreoidektomie bei primärem Hyperparathyreoidismus beschrieben (Puepet 2008). Während zunächst die Hypothese aufgestellt wurde, dass die Erhöhung des Parathormons direkt zu einer Vasokonstriktion führte, wurde im Gegensatz dazu eine vasodilatatorische Wirkung des Parathormons nachgewiesen (Rambausek, 1982; Pang, 1984; Shan, 1994). Eine Erhöhung des Parathormons bei einem primären Hyperparathyreoidismus kann somit nicht als Ursache der entstehenden arteriellen Hypertonie angesehen werden (Lewanczuk, 1994). Die Nebenschilddrüse enthält neben dem Parathormon zahlreiche weitere Hormone. Eine weitere vasokonstriktorisch wirkende Substanz, der „Parathyroid Hypertensive Factor“ (PHF) wurde aus den Nebenschilddrüsen von Ratten isoliert (Pang, 1989). Aus dem Plasma dieser Ratten wurde ein Extrakt hergestellt, das in verschiedenen Versuchsreihen nach Injektion zu einer Vasokonstriktion führte (Kaneko, 1989). Die molekulare Struktur des hypothetischen „Parathyroid Hypertensive Factors“ (PHF) ist unklar, es besteht möglicherweise aus einem Peptid, das an ein Lysophospholipid gebunden ist (Benishin, 1994). Aus der menschlichen Nebenschilddrüse wurde weiterhin das Coenzym-A-Glutathion-Disulfid (CoASSG) isoliert, das an isoliert perfundierten Rattennieren eine vasokonstriktorische Wirkung zeigte, eine Mitbeteiligung an der vasokonstriktorischen Wirkung von PHF wird hier vermutet (Jankowski, 2000). Insgesamt ist die Nebenschilddrüse somit Synthese- und Sekretionsort für endokrine vasoaktive Substanzen, deren molekulare Strukturen jedoch bisher noch nicht vollständig geklärt sind.

### **1.3 Rolle der Dinukleosidpolyphosphate bei Entstehung der arteriellen Hypertonie**

Dinukleosidpolyphosphate sind endokrine Substanzen, deren vasoaktive und proliferationsfördernde Wirkungen beschrieben wurden (Schlüter, 1996). Sie bestehen aus zwei über eine Phosphatkette miteinander verbundenen Nukleosidgruppen, die aus wahlweise Adenosin oder Guanosin bestehen. Die beiden Nukleoside sind an ihrer 5'-Position über eine Phosphatkette miteinander verbunden. Die Länge der Phosphatkette variiert von 2 bis 8 Phosphatgruppen. Dinukleosidpolyphosphate konnten sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten nachgewiesen werden. Bei den Dinukleosidpolyphosphaten handelt es sich um humorale

vasoaktive Substanzen (Schlüter, 1994; Schlüter, 1998). Als erstes Dinukleosidpolyphosphat wurde Diadenosintetraphosphat, Ap<sub>4</sub>A, aus humanen Thrombozyten isoliert und dessen Freisetzung aus mit Thrombin stimulierten Thrombozyten beschrieben (Flodgaard, 1982). Hier wurde ein möglicher Zusammenhang mit der Wachstum stimulierenden Wirkung von Thrombozyten diskutiert. 1983 folgte die Isolierung von Diadenosintriphosphat, Ap<sub>3</sub>A aus humanen Thrombozyten, die in Folge einer Stimulierung mit Thrombin gemeinsam mit Diadenosintetraphosphat, Ap<sub>4</sub>A in den Extrazellularraum abgegeben wurden (Lüthje, 1983, 1984, 1985). 1988 wurden die Dinukleosidpolyphosphate Ap<sub>4</sub>A und Ap<sub>5</sub>A aus chromaffinen Granula des Nebennierenmarks von Rindern isoliert und identifiziert (Rodriguez del Castillo, 1988). Eine durch die Dinukleosidpolyphosphate Ap<sub>3</sub>A und Ap<sub>4</sub>A induzierte Reduktion des koronaren Perfusionsdrucks wurde am isolierten Kaninchenherzen demonstriert (Pohl, 1991). Die Charakterisierung und Quantifizierung von Ap<sub>6</sub>A aus chromaffinen Granula gelang 1992 (Pintor, 1992). 1994 gelangen Schlüter et al. die Isolierung von Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>6</sub>A aus humanen Thrombozyten. An isoliert perfundierten Rattennieren und bei intraaortalen Injektionen bei Ratten in vivo zeigte sich die vasokonstriktive Wirkung dieser Diadenosinpolyphosphate (Schlüter, 1994). Die Isolierung Guanosin enthaltender Dinukleosidpolyphosphate aus humanen Thrombozyten folgte 1998 mit Ap<sub>n</sub>G und Gp<sub>n</sub>G (n = 3-6). Während die Adenosinguanosinpolyphosphate sowohl eine vasokonstriktische als auch eine wachstumsfördernde Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen zeigten, war bei den Diguanosindiphosphaten lediglich eine wachstumsfördernde Wirkung nachzuweisen (Schlüter, 1998). Aus humanem Myokardgewebe wurden 1999 Ap<sub>2</sub>A und Ap<sub>3</sub>A isoliert (Luo, 1999). Am isoliert perfundierten Rattenherz zeigten Ap<sub>2</sub>A und Ap<sub>3</sub>A eine dosisabhängige Koronardilatation und eine negativ inotrope Wirkung. Ap<sub>3</sub>A wurde 1983 aus humanen Thrombozyten isoliert (Lüthje, 1983). Aus humanen Erythrozyten erfolgte 1999 die Isolierung von Ap<sub>6</sub>A (Luo, 1999). Ein möglicher Zusammenhang mit dem Hämoglobin – induzierten Vasospasmus wurde hier diskutiert. Als weiteres Diadenosinpolyphosphat konnte 1999 Ap<sub>7</sub>A aus humanen Thrombozyten isoliert werden, auch hier konnte eine vasokonstriktive Wirkung an der isoliert perfundierten Rattenniere nachgewiesen werden (Jankowski, 1999). Die Isolierung der Diadenosindiphosphate Ap<sub>n</sub>A (n = 2-7) aus der menschlichen Plazenta erfolgte 2001 (Jankowski, 2001). Ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein dieser Diadenosinpolyphosphate und der Pathophysiologie einer Prä-Eklampsie wurde vermutet. Die Dinukleosiddiphosphate Ap<sub>2</sub>A, Ap<sub>2</sub>G und Gp<sub>2</sub>G wurden aus humanen Thrombozyten isoliert (Jankowski, 2001).

Die Bedeutung der Dinukleosidpolyphosphate ist noch nicht vollständig geklärt. Ihnen wird eine physiologische Bedeutung bei der Glukoneogenese (Edgecombe, 1997) und der Insulinsekretion

(Ripoll, 1996; Verspohl, 1998) zugesprochen. Eine Beeinflussung des Immunsystems (Gasmi, 1997), des Nervensystems (Miras-Portugal, 1998), der Nierenfunktion (Hohage, 1996), der Thrombozytenaggregation (Jankowski, 1999; Lühje, 1985), des Zellwachstums (Heidenreich, 1995), der Zelldifferenzierung und der Apoptose (Vartanian, 1997) wird vermutet. Abhängig von ihrer molekularen Struktur verhalten sich die Dinukleosidpolyphosphate als Vasokonstriktoren oder Vasodilatoren, dies ist von der Art der Nukleoside und auch von der Anzahl der Phosphatgruppen abhängig (Schlüter, 1996). Eine ATP-vermittelte Wachstumsstimulation glatter Gefäßmuskelzellen (Erlinge, 1993; Malam-Souley, 1993) und glomerulären Mesangiumzellen (Schulze-Lohoff, 1992) wurde beschrieben. Die Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System erfolgt vor allem über eine Beeinflussung des Gefäßmuskeltonus unter anderem der Nierenarterien und über eine Beeinflussung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Schlüter, 1996). Ob ein Dinukleosidpolyphosphat eine vasokonstringierende oder vasodilatierende Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen hat, ist abhängig von der Art der beteiligten Nukleoside und der Anzahl der Phosphatgruppen. So haben  $Ap_xA$  ( $x = 2 - 4$ ) eine vasodilatierende Wirkung (Pohl, 1991; Luo, 1999),  $Ap_xA$  ( $x = 5 - 6$ ) jedoch eine vasokonstriktorische Wirkung an isoliert perfundierten Rattennieren (Schlüter, 1994). Während Dinukleosidpolyphosphate, die mindestens einen Adenosin Anteil enthalten, den Gefäßmuskeltonus beeinflussen, zeigen Diguanosinpolyphosphate keine Wirkung auf den Tonus glatter Gefäßmuskelzellen (Schlüter, 1998). Die Wirkung der Diadenosinpolyphosphate wird über verschiedene Purinozeptoren und auch Adenosinrezeptoren vermittelt (Dalziel, 1994, Freholm, 1994). Das Ausmaß der vasoaktiven Wirkung korreliert mit dem Vorhandensein dieser Purinozeptoren in der glatten Gefäßmuskulatur. Die jeweilige Rezeptorselektivität ist abhängig von der molekularen Struktur der Dinukleosidpolyphosphate, insbesondere von der Länge ihrer Phosphatkette und der Art ihrer Nukleosidgruppen. Die Purinrezeptoren werden unterteilt in  $P_{2x}$ - und  $P_{2y}$ -Rezeptoren, diese können weiter differenziert werden. Über  $A_1$ -Adenosinrezeptoren wirken die Diadenosinpolyphosphate  $Ap_2A$  und  $Ap_3A$  vasokonstringierend auf isoliert perfundierten Rattennieren (van der Giet, 1996). Die vasokonstriktorische Wirkung von  $Ap_5A$  an isoliert perfundierten Rattennieren wird über  $P_{2x}$ -Rezeptoren vermittelt. Über eine Aktivierung von  $P_{2x}$ -Purinozeptoren kommt es zu einer Depolarisation des transzellulären Potentials mit einem Einstrom von Natrium und Calcium in den Intrazellularraum. Über diese Potentialänderung kommt es zur Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen und damit zu einer weiteren Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt über die Bildung des Calcium-Calmodulin Komplexes zu einer Aktivierung der Myosinkinase, die unter ATP-Spaltung die leichte Kette der Myosin ATPase

phosphoryliert (Petrides, 1998). Die phosphorylierte Myosin-ATPase tritt mit dem Actin in Wechselwirkung, dies führt zu einer Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen und damit zu einer Erhöhung des Gefäßmuskeltonus (Tepel, 1997). Die Vasokonstriktion der Dinukleosidpolyphosphate  $Ap_nA$  und  $Ap_nG$  ( $n = 4-6$ ) wird durch  $P_{2x}$ -Purinozeptoren vermittelt. Die durch die Dinukleosidpolyphosphate  $Ap_4G$ ,  $Ap_5G$  und  $Ap_6G$  hervorgerufene Vasokonstriktion kann mit den selektiven  $P_{2x1}$ -Rezeptor Antagonisten Suramin und Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2,4-disulfonsäure (PPADS) blockiert werden. Während ein oder zwei Adenosingruppen enthaltende Dinukleosidpolyphosphate zu einer Aktivierung von  $P_{2x}$ -Rezeptoren führen, haben Diguanosinpolyphosphate keine Wirkung auf den  $P_{2x}$ -Rezeptor (van der Giet, 2001).  $Ap_xA$ ,  $Ap_xG$  und  $Gp_xG$  ( $x = 2 - 8$ ) agieren als Wachstumsstimulatoren an glatten Gefäßmuskelzellen (Schlüter, 1998).

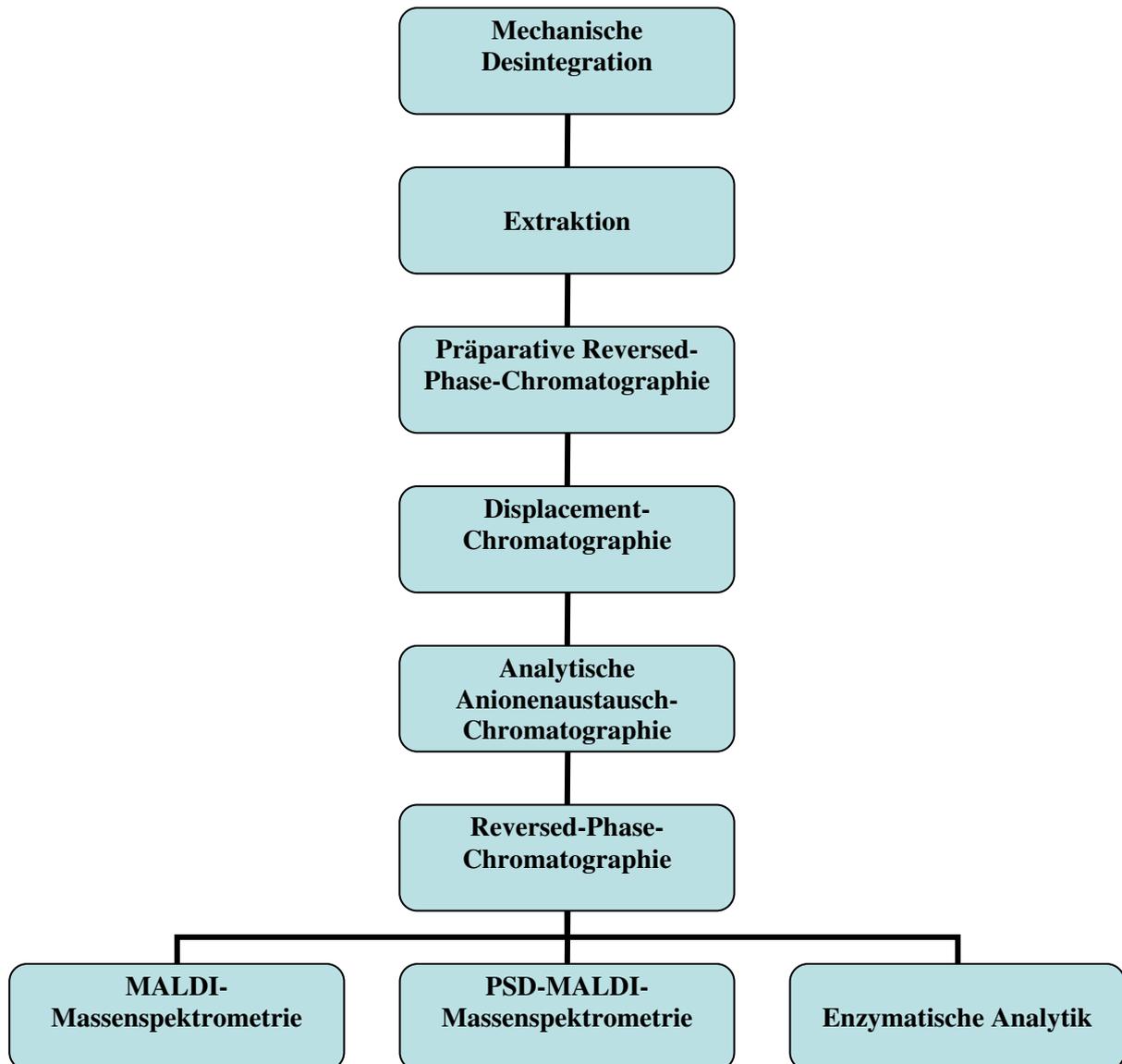
#### 1.4 Fragestellung

Erkrankungen der Nebenschilddrüse, insbesondere der primäre Hyperparathyreoidismus, können zu einer Erhöhung des Blutdrucks führen. Der im Zusammenhang mit der Nebenschilddrüse diskutierte „Parathyroid Hypertensive Factor“ (PHF) ist in seiner Struktur noch nicht endgültig charakterisiert worden. In den letzten Jahren sind Dinukleosidpolyphosphate als eine Gruppe von Substanzen beschrieben worden, die eine wesentliche Rolle bei der Genese der arteriellen Hypertonie haben könnten. Dinukleosidpolyphosphate wurden schon bereits aus verschiedenen menschlichen Geweben isoliert und identifiziert. Der Einfluss der Dinukleosidpolyphosphate auf den Tonus glatter Gefäßmuskelzellen und deren Proliferationsrate ist bereits an mehreren Stellen beschrieben worden. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob Dinukleosidpolyphosphate Bestandteile der Nebenschilddrüse sind. Dies würde für deren Mitbeteiligung bei der Entstehung einer arteriellen Hypertonie, bei einem primären Hyperparathyreoidismus sprechen.

## 2. METHODIK

Hier werden die Arbeitsschritte zur Isolation und Identifikation von Dinukleosidpolyphosphaten aus menschlichem Nebenschilddrüsengewebe beschrieben.

### 2.1 Übersicht der Arbeitsschritte



**Abbildung 1:** Arbeitsschritte zur Isolierung und Identifizierung von Dinukleosidpolyphosphaten aus menschlichem Nebenschilddrüsengewebe.

## **2.2 Isolierung der Dinukleosidpolyphosphate**

Die Nebenschilddrüsen stammten von Patienten, die sich bei einem vorbestehenden primären Hyperparathyreoidismus einer Parathyreoidektomie unterzogen. Die Studie wurde von der örtlichen Ethikkommission genehmigt, es lag eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten vor. Es wurde nur makroskopisch intaktes Nebenschilddrüsen Gewebe verwendet. Die benötigten Chemikalien wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Deutschland) erworben, sofern nicht anders angegeben.

### **2.2.1 Mechanische Desintegration**

Nach der operativen Entnahme wurden die Nebenschilddrüsen in eisgekühlter physiologischer Kochsalzlösung gelagert. Innerhalb von 30 Minuten wurden sie zerkleinert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Anschließend wurden die Nebenschilddrüsen gefriergetrocknet und unter Kühlung pulverisiert.

### **2.2.2 Extraktion**

Das gefriergetrocknete Nebenschilddrüsenpulver, entsprechend etwa 250 mg Frischgewebe, wurde mit 20 ml eiskalter 0,6 mmol/l Perchlorsäure versetzt. Das Gemisch wurde mit einem Mixer in 10 Intervallen zu je 30 Sekunden mit jeweils 1 Minute Pause bei 25.000 U/min unter Kühlung homogenisiert. Das homogenisierte Nebenschilddrüsen Gemisch wurde bei 30.000 U/min für 60 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, mit konzentrierter KOH-Lösung auf pH 8,5 eingestellt, 30 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  gekühlt und für 10 Minuten bei 4.000 U/min und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde mit HCl auf pH 6,5 eingestellt und erneut für 10 Minuten bei 4.000 U/min und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde in den folgenden Schritten weiterverarbeitet.

### 2.2.3 Präparative Reversed-Phase-Chromatographie

Für diesen Trennungsschritt wurde eine mit einer Kieselgelmatrix gepackte C 18 Reversed-Phase-Chromatographiesäule (LiChroprep, 310 mm x 65 mm, 65-40 µm, Firma Merck, Deutschland) verwendet. Das Nebenschilddrüsenextrakt wurde mit wässriger 1 mol/l Triethylammoniumacetat-Lösung versetzt bis eine Endkonzentration von 40 mmol/l erreicht war. Die Säule wurde mit 200 ml Acetonitril konditioniert und mit 200 ml wässriger 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung äquilibriert. Die Probe wurde bei einer Flussrate von 2 ml/min auf die Säule aufgetragen. Nach Spülung der Säule mit wässriger 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung erfolgte die Elution der Probe mit 20% Acetonitril in Wasser bei einer Flussrate von 2 ml/min unter Detektion der UV-Absorption bei 254 nm. Die Fraktion mit einer deutlichen UV-Absorption bei 254 nm wurde aufgefangen, lyophilisiert und bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.4 Displacement-Chromatographie

Für diesen Trennungsschritt wurde eine C18 Reversed-Phase-Chromatographiesäule (Supersphere, 2,1 mm x 100 mm, 4 µm, Firma Merck, Deutschland) verwendet. Die lyophilisierte Probe der Reversed-Phase-Chromatographie wurde in wässriger 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung gelöst und nach Äquilibrierung der Säule mit wässriger 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung bei einer Flussrate von 50 µl/min auf die Säule aufgetragen. Nach dem Auftragen der Probe wurde 100 mmol/l n-Butanol in wässriger 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung als Displacer bei einer Flussrate von 50 µl/min auf die Säule aufgetragen. Die Elution der Probe erfolgte unter Detektion der UV-Absorption bei 254 nm. Die Größe der gesammelten eluierenden Fraktionen betrug jeweils 100 µl. Jede Fraktion der Displacement-Chromatographie wurde lyophilisiert und mittels analytischer Anionenaustausch-Chromatographie weiterverarbeitet.

### 2.2.5 Analytische Anionenaustausch-Chromatographie

Für diesen Trennungsschritt wurde eine Anionenaustausch-Chromatographiesäule verwendet (Mono Q HR 5/5, 50 mm x 5 mm, 10 µm, Firma Pharmacia Biotech, USA). Die einzelnen lyophilisierten Fraktionen der Displacement-Chromatographie wurden in jeweils 1 ml wässriger 20 mmol/l  $K_2HPO_4$ -Lösung gelöst (pH 8). Die Chromatographiesäule wurde mit wässriger 20 mmol/l  $K_2HPO_4$ -Lösung (pH 8) äquilibriert; anschließend wurde die Probe bei einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Säule aufgetragen. Nach Spülung der Säule mit wässriger 20 mmol/l  $K_2HPO_4$ -Lösung (pH 8, Laufmittel A) erfolgte die Elution der Probe mit wässriger 20 mmol/l  $K_2HPO_4$  und 1 mol/l NaCl-Lösung (pH 8, Laufmittel B) im Gradientenmodus bei einer Flussrate von 0,5 ml/min unter Detektion der UV-Absorption bei 254 nm. Dabei wurde der in Tabelle 4 angegebene Gradient verwendet. Jede Fraktion der Anionenaustausch-Chromatographie mit einer hohen UV-Absorption bei 254 nm und einer Retentionszeit vergleichbar mit der von authentischen Dinukleosidpolyphosphaten wurde weiter analysiert.

**Tabelle 4: Gradient der analytischen Anionenaustausch-Chromatographie**

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>Säule:</b>         | Mono Q HR 5/5, 50 mm x 5 mm, 10 µm,<br>Firma Pharmacia Biotech, USA |
| <b>Probe:</b>         | Fraktionen der Displacement-Chromatographie                         |
| <b>Laufmittel A:</b>  | 20 mmol/l $K_2HPO_4$ in $H_2O$                                      |
| <b>Laufmittel B:</b>  | 20 mmol/l $K_2HPO_4$ und 1 mol/l NaCl in $H_2O$                     |
| <b>Flussrate:</b>     | 0,5 ml/min  |
| <b>UV-Absorption:</b> | 254 nm  |

| <b>Zeit (min)</b> | <b>Konzentration B (%)</b> |
|-------------------|----------------------------|
| 0                 | 0                          |
| 10                | 5                          |
| 100               | 35                         |
| 105               | 40                         |
| 110               | 100                        |

### 2.2.6 Reversed-Phase-Chromatographie

Für diesen Trennungsschritt wurde eine C18 Reversed-Phase-Chromatographiesäule (Supersphere, 250 mm x 4 mm, 4 µm, Firma Merck, Deutschland) verwendet. Die Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie mit hoher UV-Absorption bei 254 nm, bzw. vergleichbarer Retentionszeit mit den authentischen Substanzen, wurden in wässriger 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung gelöst und nach Äquilibrierung der Säule mit wässriger 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung bei einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 10 ml einer wässrigen 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung (Laufmittel A) gespült. Die Elution der Probe erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit dem in Tabelle 5 angegebenen Gradienten von 100% Acetonitril (Laufmittel B) unter Detektion der UV-Absorption bei 254 nm. Fraktionen mit hoher UV-Absorption bei 254 nm wurden erneut mit einer Reversed-Phase-Säule unter identischen Bedingungen chromatographiert. Die resultierenden Fraktionen wurden lyophilisiert und bei -30°C eingefroren.

**Tabelle 5: Gradient der Reversed-Phase-Chromatographie**

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <b>Säule:</b>         | Supersphere, 250 mm x 4 mm, 4 µm, Firma Merck, Deutschland |
| <b>Probe:</b>         | Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie            |
| <b>Laufmittel A:</b>  | 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung                    |
| <b>Laufmittel B:</b>  | 100% Acetonitril   |
| <b>Flussrate:</b>     | 0,5 ml/min   |
| <b>UV-Absorption:</b> | 254 nm   |

| <b>Zeit (min)</b> | <b>Konzentration B (%)</b> |
|-------------------|----------------------------|
| 0                 | 0                          |
| 4                 | 1                          |
| 50                | 6                          |
| 56                | 60                         |
| 57                | 80                         |
| 61                | 80                         |

### 2.2.7 Homogenitätsevaluation

Zur Homogenitätsevaluation wurde jeweils ein kleiner Teil (1/1000) der entsalzten und lyophilisierten Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie auf einer zweiten Reversed-Phase-Säule chromatographiert (Poros, R 2/H, 2,1 mm x 100 mm, Firma Perseptive Biosystems, USA). Die Probe wurde in einer wässrigen 10 mmol/l  $K_2HPO_4$  und 2 mmol/l Tetrabutyl-Ammoniumhydrogensulfat-Lösung gelöst und nach Äquilibration der Säule mit wässriger 10 mmol/l  $K_2HPO_4$  und 2 mmol/l Tetrabutyl-Ammoniumhydrogensulfat-Lösung bei einer Flussrate von 300  $\mu$ l/min auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit wässriger 10 mmol/l  $K_2HPO_4$  und 2 mmol/l Tetrabutyl-Ammoniumhydrogensulfat-Lösung (Laufmittel A) gespült. Die Elution der an der Säule bindenden Substanzen erfolgte im Gradientenmodus mit 80 % Acetonitril in Wasser bei einer Flussrate von 0,3 ml/min unter der Detektion der UV-Absorption bei 254 nm. Dabei wurde der in Tabelle 6 angegebene Gradient verwendet.

**Tabelle 6: Gradient der Reversed-Phase-Chromatographie**

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>Säule:</b>         | Poros, R 2/H, 2,1 mm x 100 mm, Firma Perseptive Biosystems, USA |
| <b>Probe:</b>         | Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie                   |
| <b>Laufmittel A:</b>  | 10 mmol/l $K_2HPO_4$ und 2 mmol/l TBA in Wasser                 |
| <b>Laufmittel B:</b>  | 80% Acetonitril in Wasser                                       |
| <b>Flussrate:</b>     | 0,3 ml/min  |
| <b>UV-Absorption:</b> | 254 nm  |

| <b>Zeit (min)</b> | <b>Konzentration B (%)</b> |
|-------------------|----------------------------|
| 0                 | 0                          |
| 30,5              | 30                         |
| 31                | 50                         |
| 34,5              | 50                         |

### 2.3 Synthese authentischer Dinukleosidpolyphosphate

Um die Retentionszeiten und Eigenschaften der isolierten Fraktionen mit denen authentischer Dinukleosidpolyphosphate vergleichen zu können, mussten diese synthetisch zur Verfügung stehen. Da im Gegensatz zu Gp<sub>2</sub>G, Ap<sub>3</sub>G und Ap<sub>5</sub>G nicht kommerziell zu erwerben sind, mussten diese nach dem Verfahren, das von Jankowski et al. beschrieben wurde, synthetisiert werden (Jankowski, 1998). AMP (25 mmol/l) und GMP (25 mmol/l) wurden in der Anwesenheit von 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid (2,5 mol/l), N-([2-Hydroxyethyl]-Piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]) (HEPES) (2 mol/l) und Magnesiumchlorid (125 mmol/l) gemischt und in Wasser gelöst. Das Gemisch wurde bei 37°C und einem pH-Wert von 6,5 für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mittels Reversed-Phase-Chromatographie (LiChroprep, 310 mm x 25 mm, 65-40 µm, Firma Merck, Deutschland) konzentriert. Die in wässriger 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung gelöste Probe wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die Säule aufgetragen. Nach Spülung der Säule mit wässriger 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung erfolgte die Elution der Probe mit 30% Acetonitril in Wasser bei einer Flussrate von 2 ml/min unter Detektion der UV-Absorption bei 254 nm. Die Fraktion mit einer hohen UV-Absorption bei 254 nm wurde lyophilisiert und bei -80°C eingefroren. Bei der anschließenden Displacement-Chromatographie wurden zwei Säulen (Supersphere, 300 mm x 8 mm, 4 µm, Firma Merck, Deutschland) in Reihe geschaltet. Die Fraktion der präparativen Reversed-Phase-Chromatographie wurde in wässriger 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung gelöst und bei einer Flussrate von 50 µl/min auf die Säule aufgetragen. Die Displacement-Chromatographie erfolgte mit wässriger 160 mmol/l n-Butanol und 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung als Displacer bei einer Flussrate von 50 µl/min unter Detektion der UV-Absorption bei 254 nm. Die Größe der gesammelten Fraktionen betrug jeweils 100 µl. Jede Fraktion der Displacement-Chromatographie wurde lyophilisiert und mittels Anionenaustausch-Chromatographie weiter aufgetrennt. Bei der Anionenaustausch-Chromatographie wurden die Fraktionen in 1 ml wässriger 20 mmol/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung (pH 8) gelöst und bei einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Säule (Mono Q, 100 x 10 mm, Firma Pharmacia Biotech, USA) aufgetragen. Nach Spülung der Säule mit wässriger 20 mmol/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung (pH 8, Laufmittel A) erfolgte die Elution der Probe im Gradientenmodus (Tabelle 7) mit wässriger 20 mmol/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 1 mol/l NaCl-Lösung (pH 8, Lösung B) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels MALDI-Massenspektrometrie und PSD-MALDI-Massenspektrometrie untersucht und die Dinukleosidpolyphosphate Ap<sub>3</sub>G und Ap<sub>5</sub>G identifiziert.

**Tabelle 7: Gradient der Anionenaustausch-Chromatographie**

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>Säule:</b>         | Mono Q, 100 x 10 mm, Firma Pharmacia Biotech, USA     |
| <b>Probe:</b>         | Fractionen der Displacement-Chromatographie           |
| <b>Laufmittel A:</b>  | wässrige 20 mmol/l $K_2HPO_4$ -Lösung                 |
| <b>Laufmittel B:</b>  | wässrige 20 mmol/l $K_2HPO_4$ und 1 mol/l NaCl-Lösung |
| <b>Flussrate:</b>     | 0,5 ml/min  |
| <b>UV-Absorption:</b> | 254 nm  |

| <b>Zeit (min)</b> | <b>Konzentration B (%)</b> |
|-------------------|----------------------------|
| 0                 | 0                          |
| 10                | 5                          |
| 100               | 35                         |
| 105               | 40                         |

## 2.4 Identifizierung der Dinukleosidpolyphosphate $Ap_3G$ , $Ap_5G$ und $Gp_2G$

Die homogenen Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie (2.2.6) wurden mittels Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie, Post-Source-Decay Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie und enzymatischer Analytik untersucht.

### 2.4.1 Massenbestimmung mittels (PSD-) MALDI-Massenspektrometrie

Die entsalzten und lyophilisierten Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie wurden mittels Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie und Post-Source-Decay Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (MALDI-/PSD-MALDI-Massenspektrometrie) untersucht. Das Massenspektrometer (Reflex II, Firma Bruker, Deutschland) wurde nach dem Verfahren von Hillenkamp und Karas (Hillenkamp, 1990) betrieben, das hier kurz beschrieben wird. Die Konzentration der analysierten Dinukleosidpolyphosphate betrug 1-10  $\mu\text{mol/l}$  in Wasser. 1  $\mu\text{l}$  der Analysenlösung wurde mit 1  $\mu\text{l}$  einer UV-absorbierenden Desorptionsmatrix gemischt (50 mg/ml 3-Hydroxypicolinsäure in Wasser). Nachdem die Probe auf der inerten Metalloberfläche des Proben Tellers getrocknet war, konnte dieser in das Massenspektrometer eingeführt werden. Durch den Impuls eines Stickstoff-

Lasers (VSL-337 ND, Laser Science Inc., USA; Wellenlänge 337 nm, Impulsdauer 3 ns, Durchmesser des Bestrahlungsfelds 50  $\mu\text{m}$ , Einfallswinkel  $45^\circ$  zur Trägersoberfläche) erfolgte die Desorption der Probenionen. 10-20 Einzelspektren wurden zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses aufsummiert. Zur Kalibrierung der Massenspektren wurde Diadenosinhexaphosphat ( $\text{Ap}_6\text{A}$ ) als externer Standard verwendet. Die Messungsgenauigkeit lag in einem Bereich von  $\pm 0,3$  Da.

### 2.4.2 Enzymatische Analytik

Aliquots der Dinukleosidpolyphosphate enthaltenden Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie wurden mittels enzymatischer Analytik untersucht. Ein Teil der Probe wurde in 20  $\mu\text{l}$  10 mmol/l Tris-, 1 mmol/l  $\text{ZnCl}_2$ - und 1 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ -Puffer gelöst und mit 1 mU alkalischer Phosphatase (aus Darmmukosa vom Kalb, EC 3.1.3.1, Roche Molecular Biochemicals, Deutschland) für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Ein Teil der Probe wurde in 20  $\mu\text{l}$  200 mmol/l Tris- und 20 mmol/l EDTA-Puffer (pH 7,4) gelöst und mit 1 mU 3'-Phosphodiesterase (aus Kalbsmilz, EC 3.1.16.1, Roche Molecular Biochemicals, Deutschland) für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Ein Teil der Probe wurde in 20  $\mu\text{l}$  200 mmol/l Tris-Puffer (pH 8,9) gelöst und mit 3 mU 5'-Phosphodiesterase (*Crotalus durissus*, EC 3.1.15.1, Roche Molecular Biochemicals, Deutschland) 9 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Enzyme durch einen Filter (10 kDa cut-off) abzentrifugiert und die Reaktion damit gestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels MALDI-Massenspektrometrie nach der bereits in 2.4.1 beschriebenen Methode untersucht.

### **3. ERGEBNISSE**

Aus menschlichem Nebenschilddrüsengewebe konnten Dinukleosidpolyphosphate isoliert werden. Flüssigkeitschromatographische Verfahren lieferten homogene Fraktionen, welche mittels Matrix-assisted-Laser-Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie, Post-source-decay-Matrix-assisted-Laser-Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie und enzymatischer Analytik identifiziert werden konnten. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Isolierungs- und Identifizierungsschritte von Ap<sub>3</sub>A, Ap<sub>5</sub>G und Gp<sub>2</sub>G dargestellt.

#### **3.1 Isolierung der Dinukleosidpolyphosphate**

##### **3.1.1 Mechanische Desintegration und Extraktion**

Nach mechanischer Desintegration und Extraktion des Nebenschilddrüsengewebes entstand ein klarer Überstand, der weiterverarbeitet wurde.

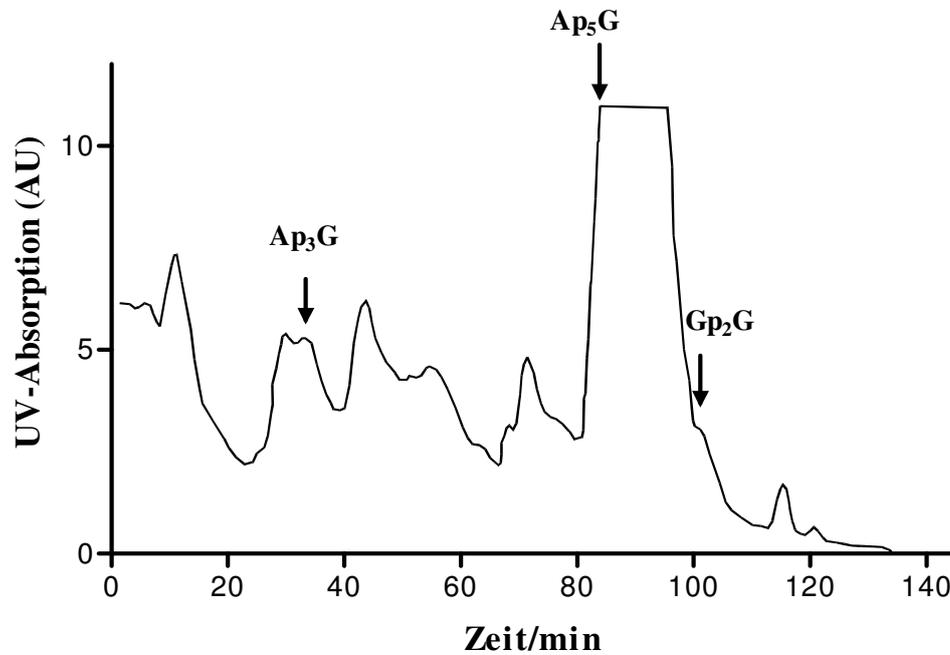
##### **3.1.2 Präparative Reversed –Phase-Chromatographie**

Der klare Überstand des Nebenschilddrüsengewebes wurde auf einer Reversed-Phase-Säule (Methodik 2.2.3) chromatographiert. Bei der Elution zeigte sich bei einigen Fraktionen eine hohe UV-Absorption bei 254 nm, diese wurden weiterverarbeitet.

##### **3.1.3 Displacement-Chromatographie**

Die Fraktion mit einer hohen UV-Absorption bei der präparativen Reversed-Phase-Chromatographie wurde mittels Displacement-Chromatographie weiter fraktioniert (Methodik 2.2.4). Die Elution erfolgte unter Detektion der UV-Absorption bei 254 nm. Das in Abbildung 2 gezeigte Chromatogramm zeigt die UV-Absorption der eluierenden Probe im Zeitraum von 0 bis 135 Minuten. Die in den folgenden Chromatographieschritten isolierten Dinukleosid-

polyphosphate  $\text{Ap}_3\text{G}$ ,  $\text{Ap}_5\text{G}$  und  $\text{Gp}_2\text{G}$  sind in der Abbildung durch die Pfeile markiert. Die Größe der gesammelten eluierenden Fraktionen betrug jeweils 100  $\mu\text{l}$ .



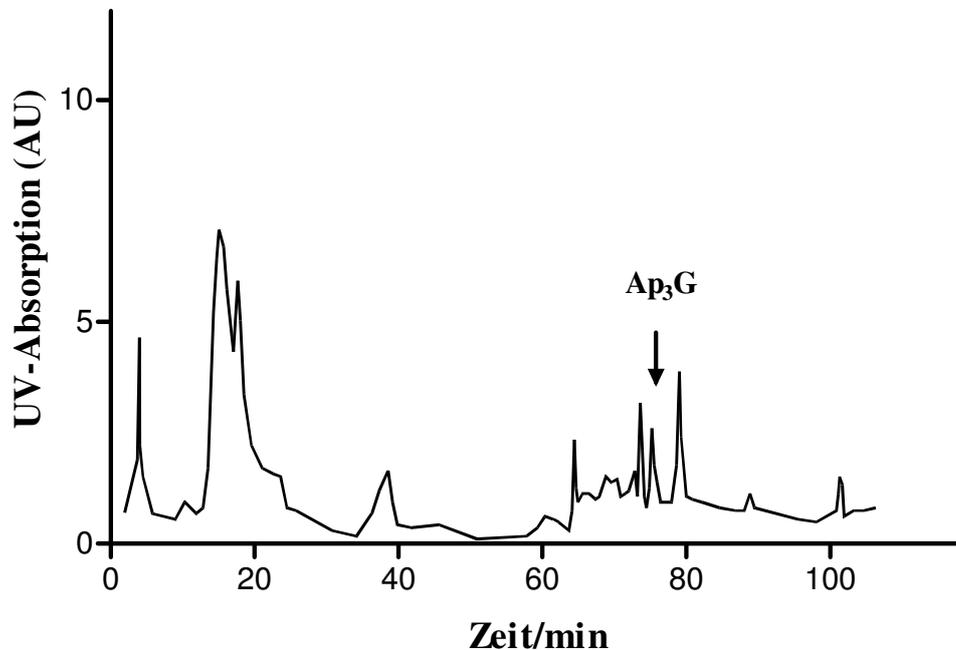
**Abbildung 2: Chromatogramm der Displacement-Chromatographie**

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>Säule:</b>         | Supersphere, 2,1 x 100 mm, 4 $\mu\text{m}$ , Firma Merck, Deutschland     |
| <b>Probe:</b>         | Fractionen der präp. Reversed-Phase-Chromatographie                       |
| <b>Laufmittel:</b>    | 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung                                   |
| <b>Displacer:</b>     | 100 mmol/l n-Butanol in wässriger 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung |
| <b>Flussrate:</b>     | 50 $\mu\text{l}/\text{min}$   |
| <b>UV-Absorption:</b> | 254 nm  |
| <b>AU:</b>            | relative Absorptionseinheiten   |

### 3.1.4 Analytische Anionenaustausch-Chromatographie

Sämtliche Fraktionen der Displacement-Chromatographie wurden mittels Anionenaustausch-Chromatographie weiter fraktioniert (Methodik 2.2.5). Die Chromatogramme der Fraktionen, aus denen die Dinukleosidpolyphosphate  $\text{Ap}_3\text{A}$ ,  $\text{Ap}_5\text{G}$  und  $\text{Gp}_2\text{G}$  isoliert werden konnten, sind in

den Abbildungen 3-5 zu sehen. Abbildung 3 zeigt das Chromatogramm der im Zeitraum von 31-32 Minuten eluierenden Fraktion der Displacement-Chromatographie (Siehe Abbildung 2). Aufgetragen ist der zeitliche Verlauf der UV-Absorption bei 254 nm.

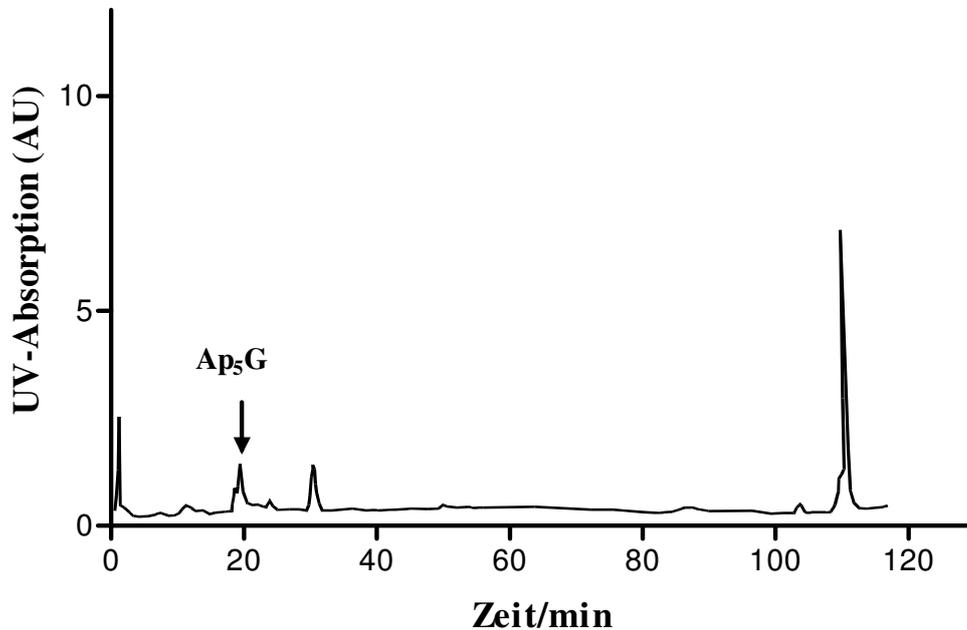


**Abbildung 3: Chromatogramm der analytischen Anionenaustausch-Chromatographie**

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <b>Säule:</b>         | Mono Q HR 5/5, 50 x 5 mm, 10 µm, Firma Pharmacia Biotech, USA                        |
| <b>Probe:</b>         | Fraktion (31-32 Minuten) der Displacement-Chromatographie (Abbildung 2)              |
| <b>Laufmittel A:</b>  | 20 mmol/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in Wasser                                  |
| <b>Laufmittel B:</b>  | 20 mmol/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> und 1 mol/l NaCl in Wasser                 |
| <b>Flussrate:</b>     | 0,5 ml/min   |
| <b>Gradient:</b>      | 0-10 min: 0-5% B; 10-100 min: 5-35% B; 100-105 min: 35-40% B; 105-110 min: 40-100% B |
| <b>UV-Absorption:</b> | 254 nm   |
| <b>AU:</b>            | relative Absorptionseinheiten  |

Die nach 77-78 Minuten eluierende Fraktion, aus der das Dinukleosidpolyphosphat Ap<sub>3</sub>G isoliert wurde, ist in der Abbildung durch einen Pfeil markiert.

Abbildung 4 zeigt das Chromatogramm der im Zeitraum von 81-82 Minuten eluierenden Fraktionen der Displacement-Chromatographie (Siehe Abbildung 2). Aufgetragen ist der zeitliche Verlauf der UV-Absorption bei 254 nm.

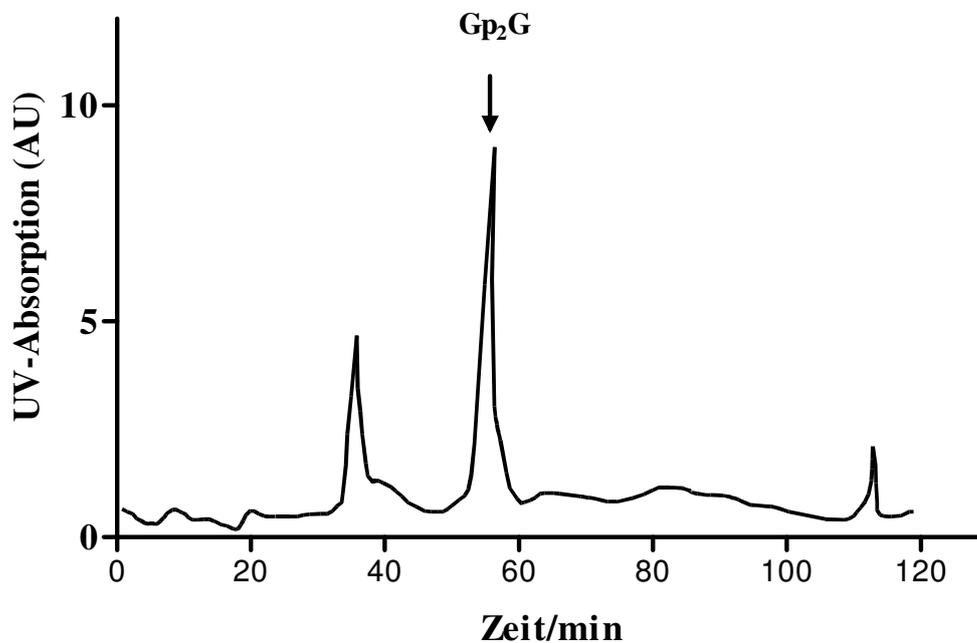


**Abbildung 4: Chromatogramm der analytischen Anionenaustausch-Chromatographie**

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <b>Säule:</b>         | Mono Q HR 5/5, 50 x 5 mm, 10 µm, Firma Pharmacia Biotech, USA                        |
| <b>Probe:</b>         | Fraktionen (81-82 Minuten) der Displacement-Chromatographie (Abbildung 2)            |
| <b>Laufmittel A:</b>  | 20 mmol/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in Wasser                                  |
| <b>Laufmittel B:</b>  | 20 mmol/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> und 1 mol/l NaCl in Wasser                 |
| <b>Flussrate:</b>     | 0,5 ml/min   |
| <b>Gradient:</b>      | 0-10 min: 0-5% B; 10-100 min: 5-35% B; 100-105 min: 35-40% B; 105-110 min: 40-100% B |
| <b>UV-Absorption:</b> | 254 nm   |
| <b>AU:</b>            | relative Absorptionseinheiten  |

Die nach 19-20 Minuten eluierende Fraktion, aus der das Dinukleosidpolyphosphat Ap<sub>5</sub>G isoliert wurde, ist in der Abbildung durch einen Pfeil markiert.

Abbildung 5 zeigt das Chromatogramm der im Zeitraum von 99-100 Minuten eluierenden Fraktion der Displacement-Chromatographie (Siehe Abbildung 2). Aufgetragen ist der zeitliche Verlauf der UV-Absorption bei 254 nm.



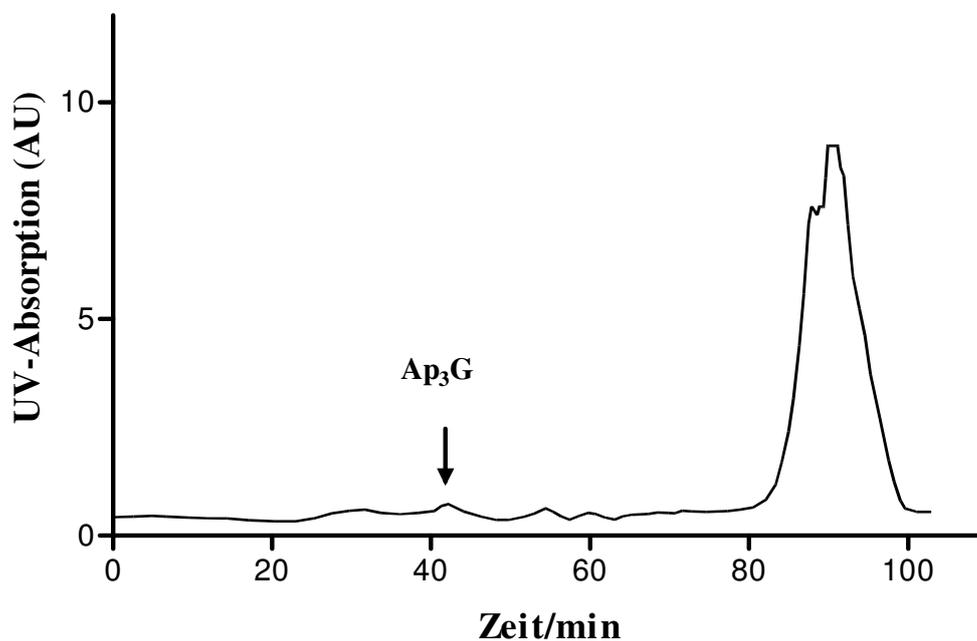
**Abbildung 5: Chromatogramm der analytischen Anionenaustausch-Chromatographie**

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <b>Säule:</b>         | Mono Q HR 5/5, 50 x 5 mm, 10 µm, Firma Pharmacia Biotech, USA                        |
| <b>Probe:</b>         | Fraktion (99-100 Minuten) der Displacement-Chromatographie (Abbildung 2)             |
| <b>Laufmittel A:</b>  | 20 mmol/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in Wasser                                  |
| <b>Laufmittel B:</b>  | 20 mmol/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> und 1 mol/l NaCl in Wasser                 |
| <b>Flussrate:</b>     | 0,5 ml/min   |
| <b>Gradient:</b>      | 0-10 min: 0-5% B; 10-100 min: 5-35% B; 100-105 min: 35-40% B; 105-110 min: 40-100% B |
| <b>UV-Absorption:</b> | 254 nm   |
| <b>AU:</b>            | relative Absorptionseinheiten  |

Die nach 51-56 Minuten eluierende Fraktion, aus der das Dinukleosidpolyphosphat Gp<sub>2</sub>G isoliert wurde, ist in der Abbildung durch einen Pfeil markiert. Zum Vergleich der Retentionszeiten wurden die authentischen Dinukleosidpolyphosphate ebenfalls über einen Anionenaustauscher chromatographiert. Fraktionen mit einer hohen UV-Absorption bei 254 nm und einer vergleichbaren Retentionszeit mit den Dinukleosidpolyphosphaten wurden mittels Reversed-Phase-Chromatographie analysiert.

### 3.1.5 Reversed-Phase-Chromatographie

Die Fraktionen der analytischen Anionenaustausch-Chromatographie mit einer signifikanten UV-Absorption bei 254 nm und einer mit der von authentischen Dinukleosidpolyphosphaten vergleichbaren Retentionszeit, wurden über eine Reversed-Phase-Säule chromatographiert (Methodik 2.2.6). Die Chromatogramme der Fraktionen, aus denen später die Dinukleosidpolyphosphate Ap<sub>3</sub>A, Ap<sub>5</sub>G und Gp<sub>2</sub>G isoliert werden konnten, sind in den Abbildungen 6-8 zu sehen. Abbildung 6 zeigt das Chromatogramm der in Abbildung 3 nach 77-78 Minuten eluierenden, durch einen Pfeil markierten Fraktion der analytischen Anionenaustausch-Chromatographie.

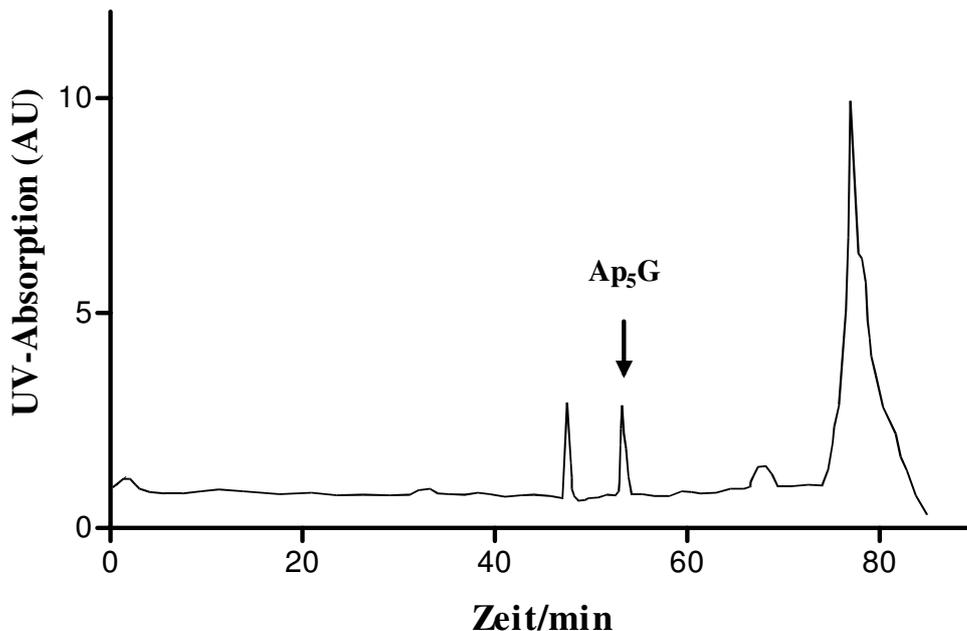


**Abbildung 6: Chromatogramm der Reversed-Phase-Chromatographie**

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>Säule:</b>         | Supersphere, 250 x 4 mm, 4 µm, Firma Merck, Deutschland   |
| <b>Probe:</b>         | Fraktion (77-78 Minuten) der analytischen Anionenaustausch-Chromatographie (Abbildung 3)                            |
| <b>Laufmittel A:</b>  | 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung   |
| <b>Laufmittel B:</b>  | 100% Acetonitril  |
| <b>Flussrate:</b>     | 0,5 ml/min  |
| <b>UV-Absorption:</b> | 254 nm  |
| <b>Gradient:</b>      | 0-4 min: 0-1 % B; 4-50 min: 1-6 % B; 50-56 min: 6-60 % B; 56-57 min: 60-80% B; 57-61 min: 80% B; 61-64 min: 80-0% B |
| <b>AU:</b>            | relative Absorptionseinheiten   |

Die nach 41-42 Minuten eluierende Fraktion, aus der das Dinukleosidpolyphosphat  $Ap_3G$  isoliert wurde, ist in Abbildung 6 durch einen Pfeil markiert.

Abbildung 7 zeigt das Chromatogramm der nach 19-20 Minuten eluierenden, in Abbildung 4 durch einen Pfeil markierten Fraktion der analytischen Anionenaustausch-Chromatographie.

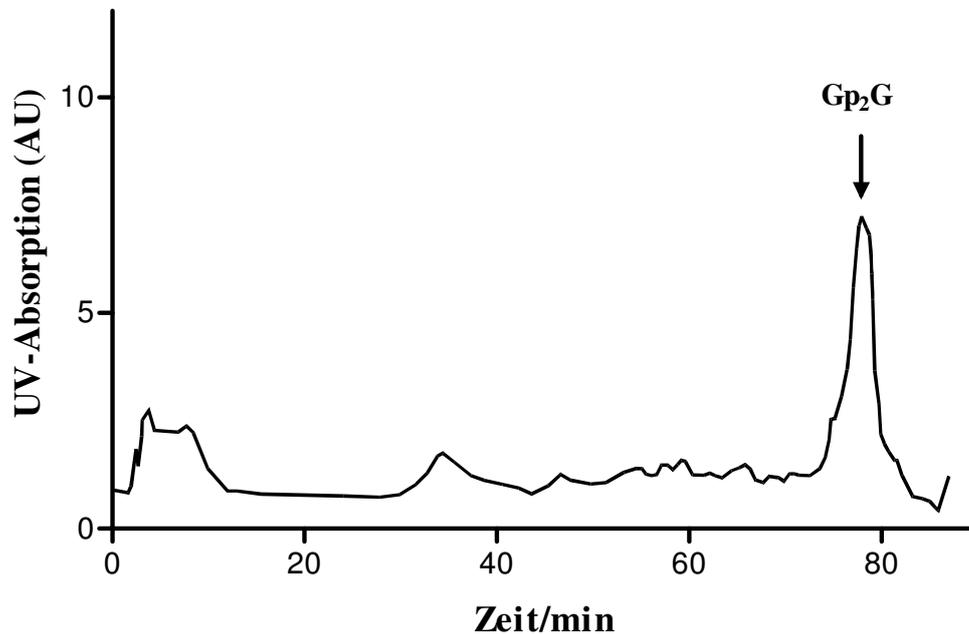


**Abbildung 7: Chromatogramm der Reversed-Phase-Chromatographie**

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>Säule:</b>         | Supersphere, 250 x 4 mm, 4 $\mu$ m, Firma Merck, Deutschland  |
| <b>Probe:</b>         | Fraktion (19-20 Minuten) der analytischen Anionenaustausch-Chromatographie (Abbildung 4)                            |
| <b>Laufmittel A:</b>  | 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung   |
| <b>Laufmittel B:</b>  | 100% Acetonitril  |
| <b>Flussrate:</b>     | 0,5 ml/min  |
| <b>Gradient:</b>      | 0-4 min: 0-1 % B; 4-50 min: 1-6 % B; 50-56 min: 6-60 % B; 56-57 min: 60-80% B; 57-61 min: 80% B; 61-64 min: 80-0% B |
| <b>UV-Absorption:</b> | 254 nm  |
| <b>AU:</b>            | relative Absorptionseinheiten   |

Die nach 53-54 Minuten eluierende Fraktion, aus der das Dinukleosidpolyphosphat  $Ap_5G$  isoliert wurde, ist in Abbildung 7 durch einen Pfeil markiert.

Abbildung 8 zeigt das Chromatogramm der nach 51-56 Minuten eluierenden, in Abbildung 5 durch einen Pfeil markierten Fraktion der analytischen Anionenaustausch-Chromatographie.



**Abbildung 8: Chromatogramm der Reversed-Phase-Chromatographie**

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <b>Säule:</b>         | Supersphere, 250 x 4 mm, 4 $\mu$ m, Firma Merck, Deutschland   |
| <b>Probe:</b>         | Fraktion (51-56 Minuten) der analytischen Anionenaustausch-Chromatographie (Abbildung 5)                           |
| <b>Laufmittel A:</b>  | 40 mmol/l Triethylammoniumacetat-Lösung  |
| <b>Laufmittel B:</b>  | 100% Acetonitril   |
| <b>Flussrate:</b>     | 0,5 ml/min   |
| <b>Gradient:</b>      | 0-4 min: 0-1 % B; 4-50 min: 1-6 % B; 50-56 min: 6-60 % B; 56-57 min: 60-80% B; 57-61 min: 80% B; 61-64 min 80-0% B |
| <b>UV-Absorption:</b> | 254 nm   |
| <b>AU:</b>            | relative Absorptionseinheiten  |

Die nach 79-80 Minuten eluierende Fraktion, aus der das Dinukleosidpolyphosphat  $Gp_2G$  isoliert wurde, ist in der Abbildung durch einen Pfeil markiert. Fraktionen mit einer hohen UV-Absorption bei 254 nm in der Reversed-Phase-Chromatographie wurden erneut auf einer Reversed-Phase-Säule unter identischen Bedingungen chromatographiert.

### 3.1.6 Homogenitätsevaluation

Aliquots der Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie wurden zwecks Prüfung auf Homogenität auf einer weiteren Reversed-Phase-Säule chromatographiert (Methodik 2.2.7). Die untersuchten Fraktionen zeigten nur einen Peak und waren somit als weitgehend homogen anzusehen.

## 3.2 Identifikation der Dinukleosidpolyphosphate

Nachdem aufgrund der Chromatographie-Schritte davon auszugehen war, dass die resultierenden Fraktionen homogen waren, wurden die Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie mit einer hohen UV-Absorption bei 254 nm mittels Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (MALDI-MS), Post-Source-Decay Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (PSD-MALDI-MS) und enzymatischer Analytik identifiziert. In den im Folgenden dargestellten Abbildungen (Abb. 9-13) wird die Identifizierung von Ap<sub>5</sub>G exemplarisch dargestellt, die Identifizierung von Ap<sub>3</sub>G und Gp<sub>2</sub>G erfolgte analog.

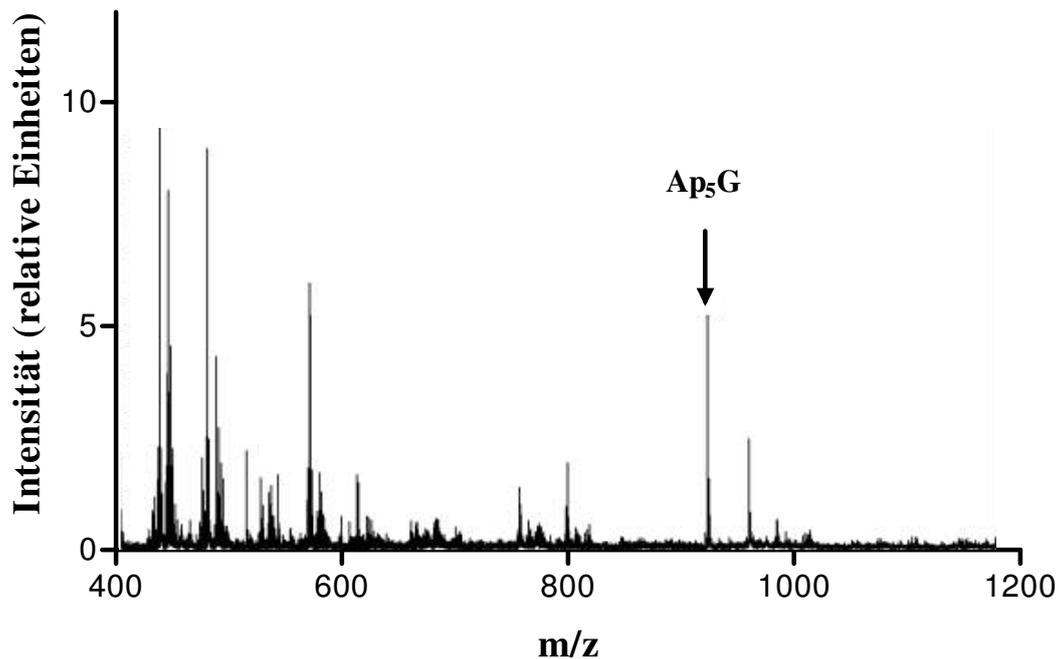
### 3.2.1 Massenbestimmung mittels MALDI-Massenspektrometrie und PSD-MALDI-Massenspektrometrie

Die homogenen Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie (Abbildungen 6-8) wurden mittels (PSD-) MALDI-Massenspektrometrie untersucht. Die MALDI-Massenspektrometrie charakterisierte hierbei die Molekularmasse, die PSD-MALDI-Massenspektrometrie die Masse der entstehenden Bruchstücke. Tabelle 8 zeigt die Molekularmasse sowie die Masse der im PSD-MALDI-Massenspektrum ermittelten Ionenfragmente. Das MALDI- und das PSD-MALDI Massenspektrum werden in Abbildung 9 und 10 am Beispiel des Ap<sub>5</sub>Gs dargestellt, für die Dinukleosidpolyphosphate Ap<sub>3</sub>G und Gp<sub>2</sub>G fanden sich auch entsprechende Spektren. Im MALDI-Massenspektrum (Abb. 9) zeigt sich ein Peak, entsprechend der Molekularmasse von Ap<sub>5</sub>G (934 kDa), im PSD-MALDI-Massenspektrum (Abbildung 10) zeigten sich mehrere Peaks, entsprechend der Massen der Ionenfragmente von Ap<sub>5</sub>G (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Molekularmassen der Ionenfragmente der PSD-MALDI-Massenspektrometrie**  
**Massenspektrometer:** Reflex II, Fa. Bruker, Deutschland  
**Proben:** Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie (Abbildungen 6-8)

| Ionenfragment                     | Gp <sub>2</sub> G (m/z) | Ap <sub>3</sub> G (m/z) | Ap <sub>5</sub> G (m/z) |
|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| H <sup>+</sup>                    | 1                       | 1                       | 1                       |
| A'                                |                         | 136,7                   | 136,5                   |
| G'                                | 152,2                   | 151,9                   | 152,4                   |
| A'+ CHO                           |                         |                         | 164,8                   |
| G'+ CH                            |                         |                         | 164,8                   |
| A'+ CHOCHOH                       |                         |                         | 179,5                   |
| G'+CHCHOH                         |                         | 194,3                   |                         |
| A-2 H <sub>2</sub> O              |                         | 231,7                   | 233,1                   |
| G-2 H <sub>2</sub> O              | 248,5                   | 259,9                   | 248,9                   |
| A-H <sub>2</sub> O                |                         | 249,9                   | 248,9                   |
| Gp <sub>1</sub> -H <sub>2</sub> O | 346,4                   |                         |                         |
| Ap <sub>1</sub>                   |                         | 348,8                   | 349,1                   |
| Gp <sub>1</sub>                   | 364,3                   | 364,4                   | 365,1                   |
| Ap <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O |                         | 410,0                   |                         |
| Gp <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O | 430,1                   |                         |                         |
| Ap <sub>2</sub>                   |                         | 430,9                   | 429,6                   |
| Gp <sub>2</sub>                   | 445,1                   | 446,3                   | 445,4                   |
| Gp <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O | 462,4                   |                         |                         |
| Molekulare Masse                  | 709                     | 773                     | 934                     |

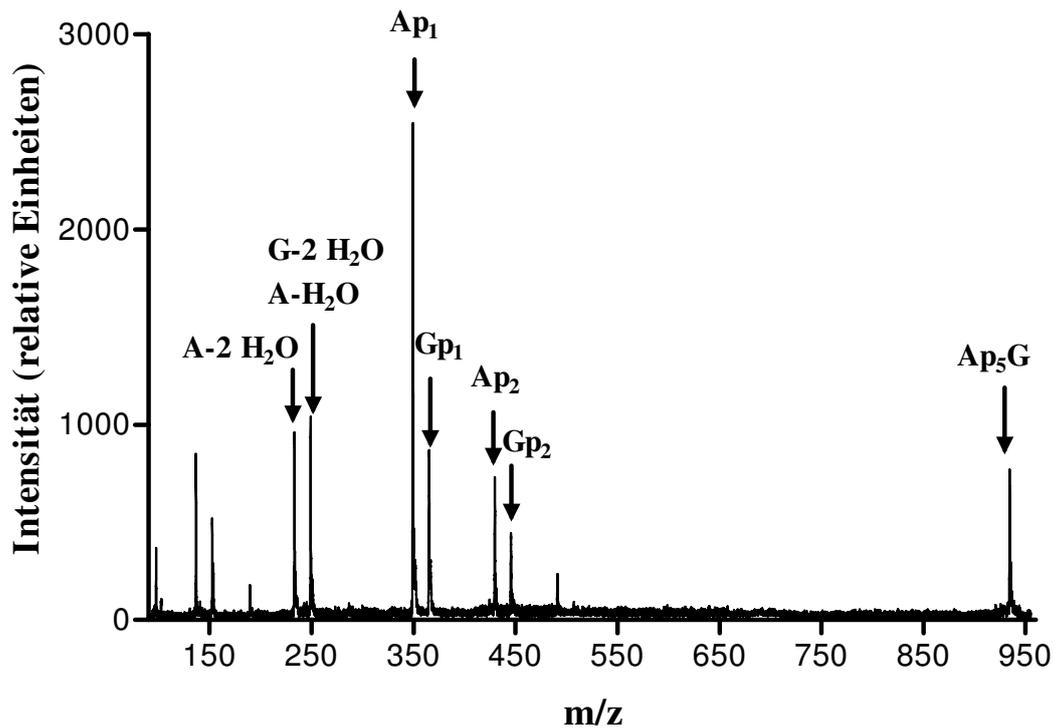
Es konnte gezeigt werden, dass die in der PSD-MALDI-Massenspektrometrie ermittelten Peaks den Massen der Ionenfragmente von Ap<sub>3</sub>G, Ap<sub>5</sub>G und Gp<sub>2</sub>G entsprachen. In Abbildung 9 ist das MALDI-Massenspektrum der in Abbildung 7 durch einen Pfeil markierten, nach 53-54 Minuten eluierenden Fraktion der Reversed-Phase-Chromatographie zu sehen. Auf der X-Achse ist die Masse in Dalton und auf der Y-Achse die relative Intensität in einer willkürlich gewählten Einheit dargestellt. Der Peak bei 934 Da entspricht der Molekularmasse von Ap<sub>5</sub>G.



**Abbildung 9: MALDI-Massenspektrum von Ap<sub>5</sub>G**

|                            |   |
|----------------------------|---|
| <b>Massenspektrometer:</b> | Reflex II, Fa. Bruker, Deutschland  |
| <b>Probe:</b>              | Fraktion (53-54 Minuten) der Reversed-Phase-Chromatographie (Abbildung 7) |
| <b>Desorptionsmatrix:</b>  | 50 mg/ml 3-Hydroxypicolinsäure  |
| <b>Impulsgeber:</b>        | Stickstoff-Laser, $\lambda = 337$ nm, Impulsdauer: 3 ns                   |

In Abbildung 10 ist das PSD-MALDI-Massenspektrum der in Abbildung 7 durch einen Pfeil markierten, nach 53-54 Minuten eluierenden Fraktion der Reversed-Phase-Chromatographie zu sehen. Auf der X-Achse ist die Masse in Dalton und auf der Y-Achse die relative Intensität in einer willkürlich gewählten Einheit dargestellt. Die entstehenden Bruchstücke sind in der Abbildung durch Pfeile markiert. Ihnen entsprechen die Massen der entstehenden Ionenfragmente (Tabelle 8). Das PSD-MALDI Massenspektrum entsprach dem von authentischem Ap<sub>5</sub>G. Durch die spektrometrischen Untersuchungen wurde somit die Dinukleosidpolyphosphate Ap<sub>3</sub>G, Ap<sub>5</sub>G und Gp<sub>2</sub>G in menschlichem Nebenschilddrüsengewebe nachgewiesen.

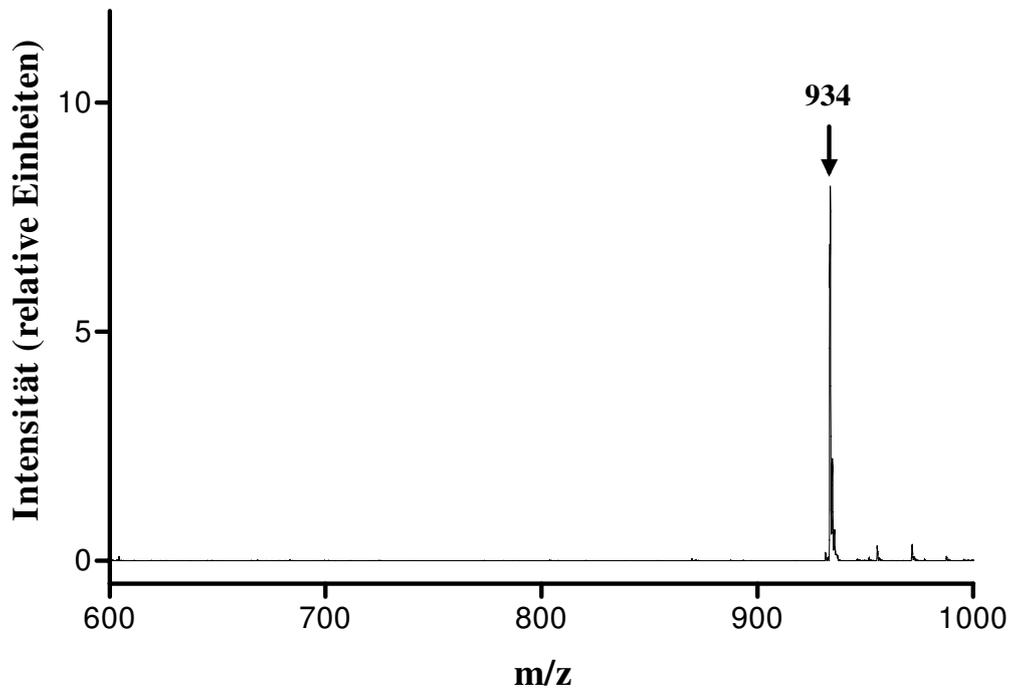


**Abb. 10:** PSD-MALDI-Massenspektrum von Ap<sub>5</sub>G  
**Massenspektrometer:** Reflex II, Fa. Bruker, Deutschland  
**Probe:** Fraktion (53-54 Minuten) der Reversed-Phase-Chromatographie (Abbildung 7)  
**Desorptionsmatrix:** 50 mg/ml 3-Hydroxypicolinsäure  
**Impulsgeber:** Stickstoff-Laser,  $\lambda = 337$  nm, Impulsdauer: 3 ns

### 3.2.3 Enzymatische Analytik

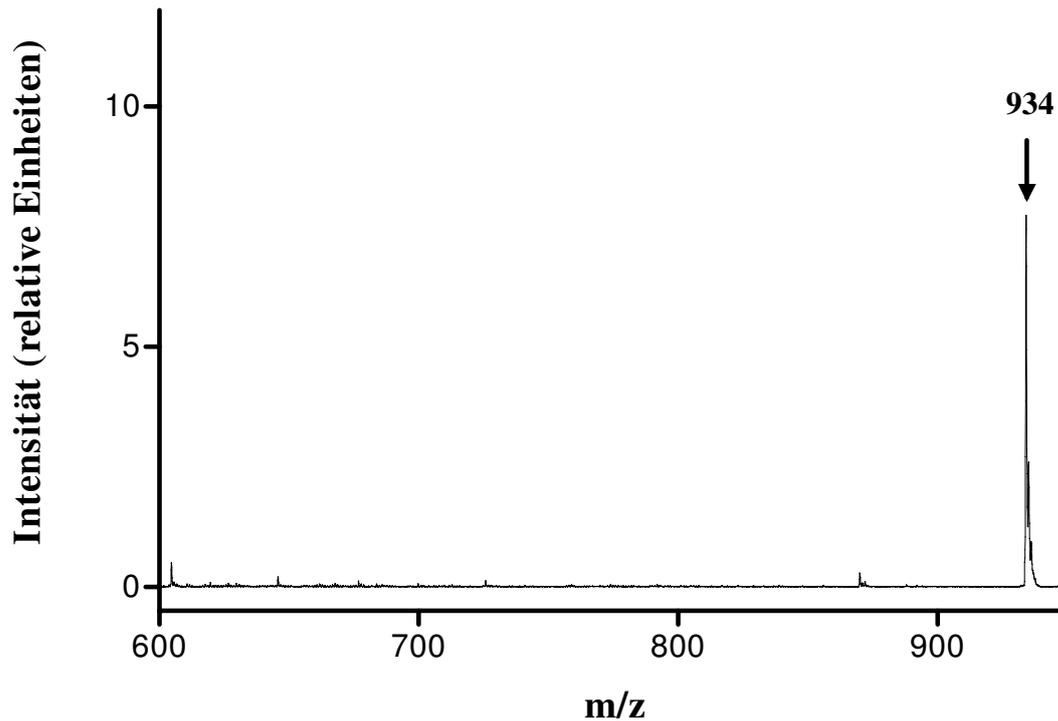
Aliquots der Dinukleosidpolyphosphate enthaltenden Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie wurden mittels enzymatischer Analytik untersucht (Methodik 2.4.2). Teile der Proben wurden jeweils mit alkalischer Phosphatase, 3'-Nukleotidase oder 5'-Nukleotidase inkubiert. Die Proben wurden jeweils vor und nach Enzyminkubation mittels MALDI-Massenspektrometrie untersucht. Die Messungsgenauigkeit lag in einem Bereich von  $\pm 0,3$  Da. Im Folgenden werden exemplarisch die MALDI-Massenspektren von Ap<sub>5</sub>G gezeigt. Dies entspricht der in Abbildung 7 durch einen Pfeil markierten, nach 53-54 Minuten eluierenden Fraktion der Reversed-Phase-Chromatographie. Die Identifizierung der Ap<sub>3</sub>G und Gp<sub>2</sub>G enthaltenden Fraktionen mittels enzymatischer Analytik erfolgte analog. Abbildung 11 und 12

zeigen die MALDI-Massenspektren der Ap<sub>5</sub>G enthaltenden Fraktion vor und nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase. Auf der X-Achse ist die Masse in Dalton und auf der Y-Achse die relative Intensität in einer willkürlich gewählten Einheit dargestellt.



**Abb. 11:** MALDI-Massenspektrum von Ap<sub>5</sub>G vor Inkubation mit alkalischer Phosphatase  
**Massenspektrometer:** Reflex II, Fa. Bruker, Deutschland  
**Probe:** Fraktion (53-54 Minuten) der Reversed-Phase-Chromatographie (Abbildung 7)

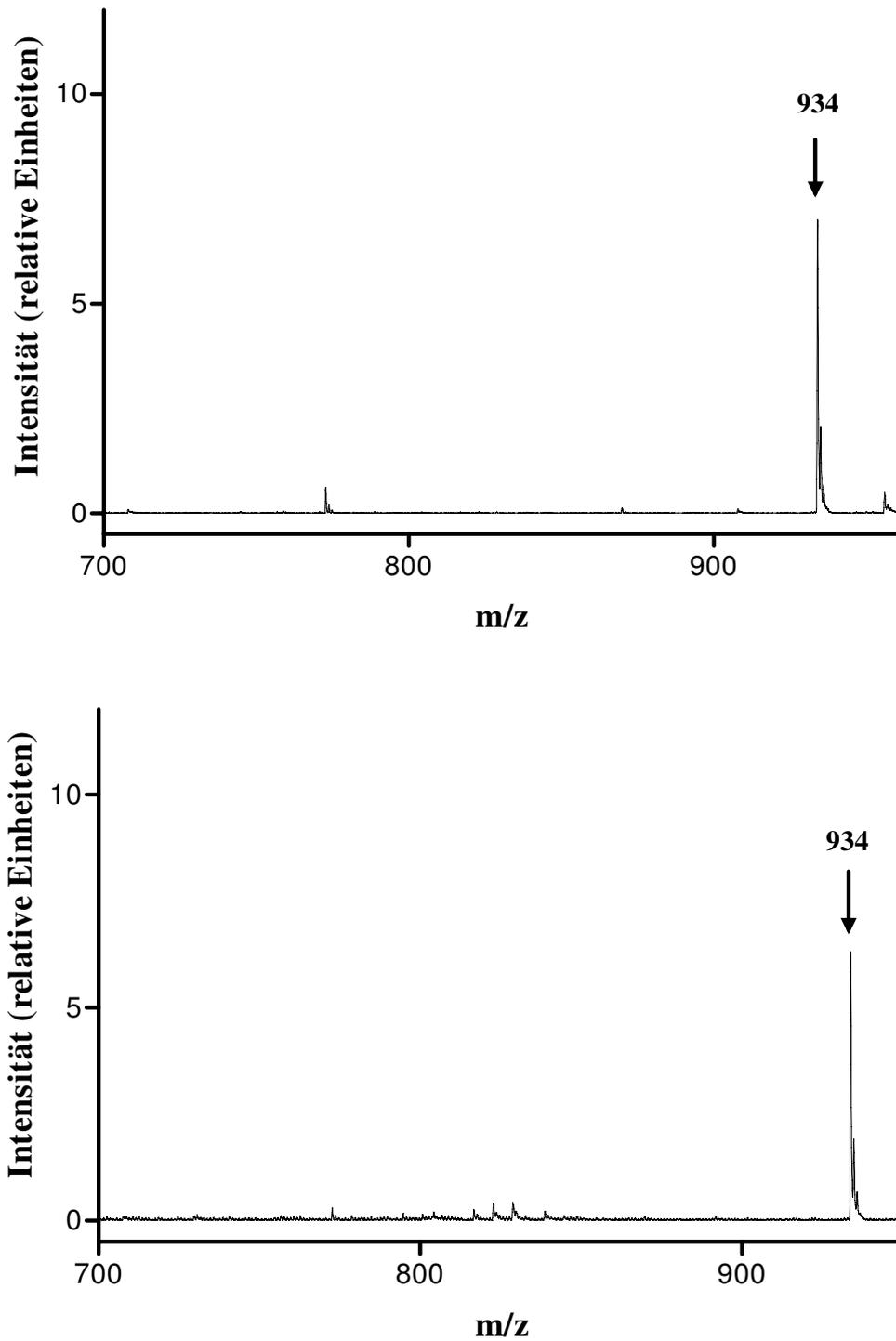
Es zeigt sich wie auch im MALDI-Massenspektrum von authentischem Ap<sub>5</sub>G nur ein Peak bei 934 Da.



**Abb. 12:** MALDI-Massenspektrum von Ap<sub>5</sub>G nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase  
**Massenspektrometer:** Reflex II, Fa. Bruker, Deutschland  
**Probe:** Fraktion (53-54 Minuten) der Reversed-Phase-Chromatographie (Abbildung 7)

Es zeigt sich wie auch im MALDI-Massenspektrum von authentischem Ap<sub>5</sub>G nur ein Peak bei 934 Da.

Abbildung 13 und 14 zeigen die MALDI-Massenspektren der Ap<sub>5</sub>G enthaltenden Fraktionen vor und nach Inkubation mit 3'-Nukleotidase. Auf der X-Achse ist die Masse in Dalton, auf der Y-Achse die relative Intensität in einer willkürlich gewählten Einheit dargestellt. In diesen Abbildungen zeigt sich wie bei authentischem Ap<sub>5</sub>G nur ein Peak.



**Abb. 13/14:** MALDI-Massenspektren von Ap<sub>5</sub>G vor und nach Inkubation mit 3'-Nucleotidase

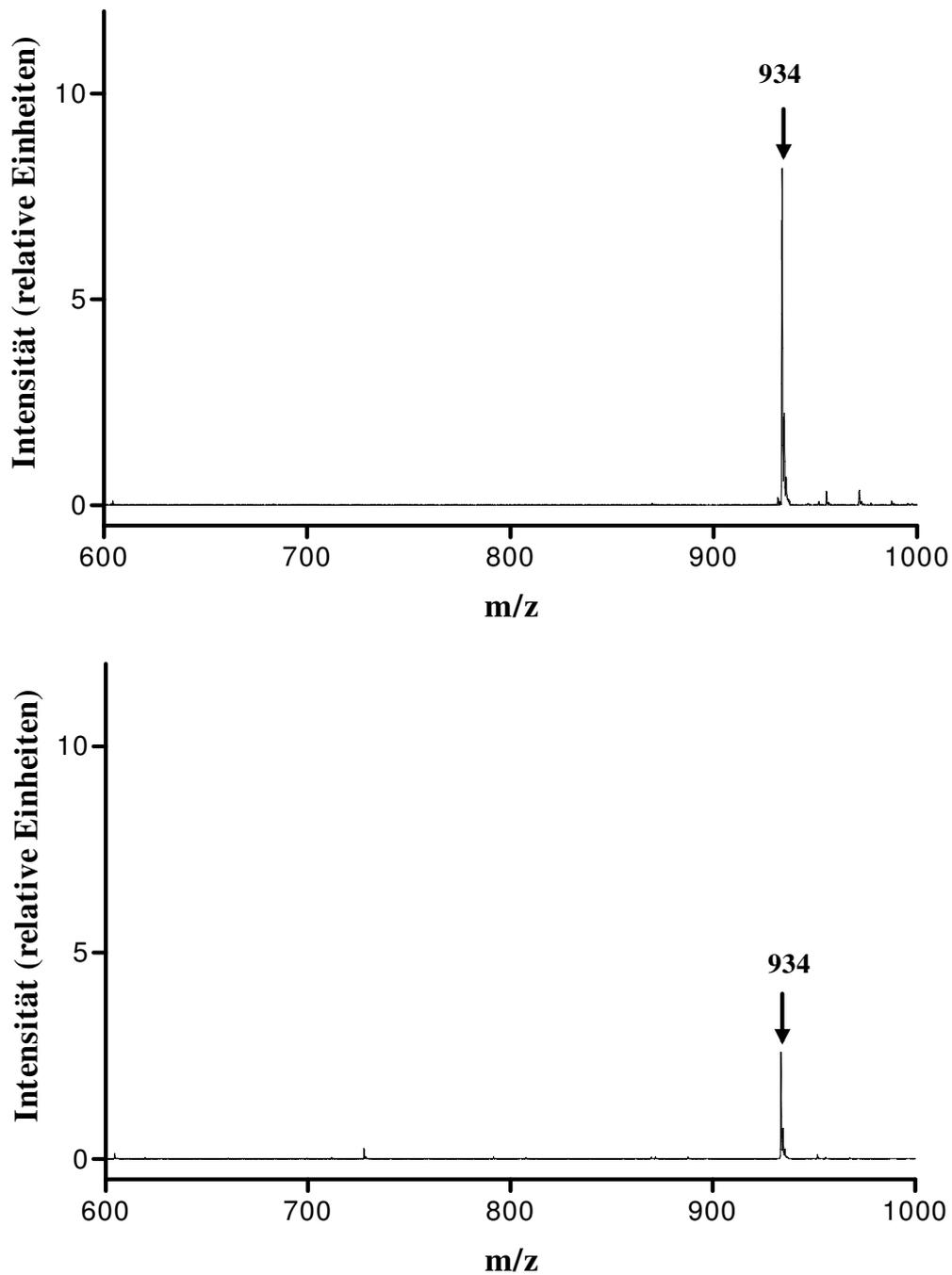
**Massenspektrometer:**

Reflex II, Fa. Bruker, Deutschland

**Probe:**

Fraktion (53-54 Minuten) der Reversed-Phase-Chromatographie (Abbildung 7)

Abbildungen 15 und 16 zeigen die MALDI-Massenspektren der Ap<sub>5</sub>G enthaltenden Fraktion vor und nach Inkubation mit 5'-Nukleotidase.



**Abb. 15/16:** MALDI-Massenspektrum von Ap<sub>5</sub>G vor und nach Inkubation mit 5'-Nukleotidase

**Massenspektrometer:**

Reflex II, Fa. Bruker, Deutschland

**Probe:**

Fraktion (53-54 Minuten) der Reversed-Phase-Chromatographie (Abbildung 7)

Es zeigt sich ein nach der Inkubation in der Intensität deutlich geminderter Peak bei 934 Da.

## 4. DISKUSSION

Die Pathogenese der arteriellen Hypertonie ist vielschichtig. Gegenwärtig kann nur in ca. 5 – 10 % der Patienten mit arterieller Hypertonie eine auslösende Grunderkrankung gefunden werden (Krautzig, 2001). Die verbleibenden 90-95% der Fälle gelten als primäre oder essentielle Hypertonie. Den in der Nebenschilddrüse produzierten und sezernierten Hormonen wird eine Rolle bei der Pathogenese der arteriellen Hypertonie zugeschrieben.

Gairard et al. zeigten bereits 1982 in einem Tiermodell mit spontan hypertensiven männlichen Sprague-Dawley-Ratten, dass eine operative Entfernung der Glandula parathyreoidea zu einem Abfall des Blutdrucks führt (Gairard, 1982). Erklärt wurde dieses Phänomen mit einer möglichen Beeinflussung des Natrium-Haushalts in den Versuchstieren. In einer klinischen Studie wiesen zudem Broulik et al. bei 86 Patienten mit einem primären Hyperparathyreoidismus nach operativ durchgeführter Parathyreoidektomie postoperativ einen statistisch signifikanten Abfall des systolischen und diastolischen Blutdrucks nach (Broulik, 1985). Dies führte zu der Vermutung, dass die Nebenschilddrüse möglicherweise Bildungsort vasoaktiv wirkender Substanzen sein könnte. Renale Mechanismen seien nach Meinung der Autoren vermutlich bei Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus und arterieller Hypertonie ätiologisch nicht bedeutsam. Das in der Nebenschilddrüse synthetisierte und sezernierte Parathormon führte zu einer Erhöhung des Plasma Calciumspiegels. Während eine Erhöhung des Calciumspiegels mit einer Erhöhung des Blutdrucks assoziiert war, führte das Parathormon über eine Erniedrigung der intrazellulären Calciumkonzentration zu einer Vasodilatation (Bukowski, 1995). Die Erhöhung des Blutdrucks bei einem primären Hyperparathyreoidismus konnte über die Wirkung des Parathormons aus diesem Grund nicht erklärt werden.

Pang et al. beschrieben erstmals einen „Parathyroid Hypertensive Factor“ (PHF) in der Nebenschilddrüse spontan hypertensiver Ratten (Pang, 1989). In der von ihnen durchgeführten Studie kam es nach Parathyreoidektomie spontan hypertensiver Ratten zu einem deutlichen Abfall des mittleren arteriellen Drucks (MAD). Eine Transplantation der Nebenschilddrüsen auf normotensive Sprague-Dawley-Ratten führte zu einem Anstieg des MADs. Die isolierte Substanz PHF führte nach Infusion im Gegensatz zu dem Parathormon bei zuvor normotensiven Sprague-Dawley-Ratten zu einem Anstieg des MADs. Die Autoren sahen somit ihre Hypothese bestätigt, dass eine bisher nicht charakterisierte Substanz PHF den Blutdruck von Sprague-Dawley-Ratten maßgeblich beeinflusste. Beim Menschen erfolgte die Isolierung eines

„Parathyroid Hypertensive Factor“ (PHF) durch Lewanczuk et al. bei Patienten mit einem Hyperparathyreoidismus und einer arteriellen Hypertonie (Lewanczuk, 1993). Nach Parathyreoidektomie kam es bei den Patienten postoperativ zu einem Verschwinden des „Parathyroid Hypertensive Factors“ im Plasma sowie zu einem Abfall des Blutdrucks. Der Autor folgerte, dass PHF bei der Entstehung eines arteriellen Hypertonus bei Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus ätiologisch bedeutsam sein könnte.

Der „Parathyroid Hypertensive Factor“ ist in seiner Struktur noch nicht eindeutig definiert. Dinukleosidpolyphosphate können zu einer Konstriktion und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen führen und somit den Gefäßmuskeltonus erhöhen (Schlüter 1996). Im Rahmen der Arbeit wurde vermutet, dass endogene humorale Substanzen wie Dinukleosidpolyphosphate dem PHF entsprechen könnten und somit für die Entstehung einer arteriellen Hypertonie bei primärem Hyperparathyreoidismus verantwortlich sein könnten. In der vorliegenden Arbeit wurden die Dinukleosidpolyphosphate  $Ap_5G$ ,  $Ap_3G$  und  $Gp_2G$  aus der menschlichen Nebenschilddrüse isoliert. Das für diese Studie verwendete Schilddrüsengewebe stammte von Patienten mit einem Hyperparathyreoidismus und wurde ihnen im Rahmen einer Parathyreoidektomie entnommen. Eine Verunreinigung der Präparate durch Substanzen aus dem angrenzenden Bindegewebe wurde durch möglichst genaue Präparation weitgehend vermieden.

Im Rahmen des Isolationsverfahrens wurden zunächst die Proteine durch Zugabe von Perchlorsäure und anschließende Zentrifugation aus dem Nebenschilddrüsenextrakt entfernt, um einen enzymatischen Abbau und eine Proteinbindung der Dinukleosidpolyphosphate zu verhindern. Zur Entfernung polarer Substanzen wurde das deproteinierte Nebenschilddrüsenextrakt über eine Reversed-Phase-Chromatographie-Säule fraktioniert. Durch Zugabe des Ionenpaarreagenzes Triethylammoniumacetat wurden die Bindungsstellen der polaren Dinukleosidpolyphosphate maskiert und somit dessen Bindung an der apolaren Säulenmatrix ermöglicht. Durch Spülung der Säule mit 40 mmol/l Triethylammoniumacetat wurden nicht an der Säule retendierte Substanzen entfernt. Die Elution der gebundenen Substanzen erfolgte durch das Auftragen einer 20%igen Acetonitril-Lösung. Das Eluat der Reversed-Phase-Chromatographie konnte mittels Displacement-Chromatographie weiter separiert werden. Ein Vorteil der Displacement-Chromatographie bestand darin, dass im Gegensatz zur konventionellen Chromatographie größere Substanzmengen in einem Durchlauf getrennt werden konnten. 40 mmol/l Triethylammoniumacetat hatte sich als optimale Trägerlösung erwiesen, da sie die Bindung der Dinukleosidpolyphosphate an der stationären

Phase sicherstellte. Bei der Displacement-Chromatographie kam es zum Konkurrieren der einzelnen Probensubstanzen um die apolaren Bindungsstellen der stationären Phase. Bei der Substanz mit der höchsten Affinität zur apolaren Säulenmatrix erfolgte die Bindung bereits am Säulenanfang, die Substanzen mit einem niedrigeren Bindungsvermögen folgten in Abhängigkeit von ihrer Affinität zu den Bindungsstellen. In den einzelnen Bindungszonen waren die verschiedenen Substanzen in hoher Konzentration angereichert, wobei die Konzentration mit dem Bindungsvermögen an die Säule anstieg. Als optimale Fraktionsgröße wurde eine Fraktionsgröße gewählt, die nach Auftragen auf die Säule etwa 50-80 % der Säulenbindungskapazität besetzte. Bei zu kleiner Fraktionsgröße könnten die einzelnen entstehenden Banden aufgrund ihrer geringen Breite schlecht gegeneinander abgegrenzt werden, sie würden stark zur Überlappung neigen. Bei einer Überladung der Säule mit einer zu großen Probenfraktion könnten sich die Banden nicht ausbilden. Bei der Wahl der mobilen Phase und des Displacers musste die molekulare Struktur der zu isolierenden Substanzen berücksichtigt werden. Die Wahl von n-Butanol als Displacer erfolgte aus folgenden Gründen: Zum einen besaß es eine stärkere Affinität zur stationären Phase als die Dinukleosidpolyphosphate, zum anderen reagiert es mit keinem der Probenbestandteile. Außerdem ließ es sich problemlos durch Lyophilisierung der eluierten Probe entfernen. Durch das Auftragen des Displacers n-Butanol auf die Säule wurden die retendierten Moleküle aus ihrer Bindung mit der Säulenmatrix verdrängt. Aufgrund der intermolekularen Wechselwirkungen zwischen der Säulenmatrix, der Probensubstanzen und des Displacers während der Elution kam es zur Entstehung eines Flussgleichgewichts. Die im Vergleich zur konventionellen Chromatographie geringe Flussrate wurde gewählt, weil sich das Bindungsgleichgewicht zwischen stationärer Phase und bindenden Substanzen aus der stationären Phase einstellen konnte. Die Elution der Substanzen erfolgte in Abhängigkeit von ihrem Bindungsvermögen zur Säule. Die Substanzen mit dem größten Bindungsvermögen zur Säule, welche bereits am Säuleneingang gebunden waren, eluierten zuerst, da sie zuerst in Kontakt mit dem Displacer kamen. Die einzelnen Dinukleosidpolyphosphat-enthaltenden Fraktionen der Displacement-Chromatographie wurden mittels Anionenaustausch-Chromatographie weiter aufgetrennt. Hierbei diente 20 mmol/l  $K_2HPO_4$ -Lösung als Trägersubstanz und 20 mmol/l  $K_2HPO_4$  und 1 mol/l NaCl in Wasser als Elutionsmittel. Die authentischen Dinukleosidpolyphosphate  $Ap_3G$ ,  $Ap_5G$  und  $Gp_2G$  wurden unter identischen Bedingungen auf der Anionenaustauschsäule chromatographiert. Um polare Substanzen zu entfernen, wurden die Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie über eine Reversed-Phase-Säule chromatographiert. Durch Zugabe des Ionenpaarreagens Triethylammoniumacetat wurden die Bindungsstellen der polaren Dinukleosidpolyphosphate

maskiert und somit dessen Bindung an der apolaren Säulenmatrix ermöglicht. Durch Spülung der Säule mit 40 mmol/l Triethylammoniumacetat wurden nicht an die Säule bindende Substanzen entfernt. Die Elution der gebundenen Substanzen erfolgte durch das Auftragen von 100 % Acetonitril, welches mit der hydrophoben Säulenmatrix um die Bindung zu den gebundenen Substanzen konkurrierte. Um eine größere Homogenität der Fraktionen zu gewährleisten, wurden die Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie erneut unter identischen Bedingungen auf einer Reversed-Phase-Chromatographie-Säule chromatographiert.

Aus den resultierenden homogenen Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie konnten die Dinukleosidpolyphosphate  $Ap_3G$ ,  $Ap_5G$  und  $Gp_2G$  mittels MALDI-Massenspektrometrie (engl. „matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry“) identifiziert werden. Nach Ionisation des Moleküls erfolgte die Bestimmung der Masse des beim Ionisationsprozess gebildeten Ions und des resultierenden Zerfallsprodukts im Hochvakuum mit Hilfe des Fragment-Massenspektrums. Da bei der Fragmentierung des Moleküls die Struktur der einzelnen Bruchstücke erhalten blieb, konnte über die Detektion der Molekülbruchstücke und des vollständigen Moleküls die Substanz identifiziert werden (Kaufmann, 1994). Die MALDI-Massenspektren waren vergleichbar mit denen der authentischen Substanzen. Über ihr Massenspektrum wurden die Dinukleosidpolyphosphate  $Ap_3G$ ,  $Ap_5G$  und  $Gp_2G$  identifiziert.

Für Dinukleosidpolyphosphate typischen intramolekularen Bindungen konnten mittels enzymatischer Diagnostik in den homogenen Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie detektiert werden. Die Fraktionen wurden mit 5'-Nukleotidase, 3'-Nukleotidase und alkalischer Phosphatase inkubiert. 5'-Nukleotidase spaltet Phosphoesterbindungen an der 5' Position von Nukleosidgruppen, 3'-Nukleotidase spaltet Phosphoesterbindungen an der 3' Position von Nukleosidgruppen, alkalische Phosphatase spaltet terminale Phosphatgruppen. Die Spaltungsprodukte, die aus der enzymatischen Spaltung der homogenen Fraktionen mit 5'-Nukleotidase resultierten, wurden mittels Anionenaustausch-Chromatographie identifiziert. Hierbei wurden die Retentionszeiten der eluierenden Dinukleosidpolyphosphaten mit den Retentionszeiten der gespaltenen authentischen Substanzen verglichen. Die Inkubation der Dinukleosidpolyphosphate mit 5'-Nukleotidase führte zur Molekülspaltung, sichtbar an einem verminderten Peak der Substanz im Massenspektrum (Abb. 15-16). Die Inkubation der Dinukleosidpolyphosphate mit 3'-Nukleotidase und alkalischer Phosphatase führte nicht zu Spaltungsreaktionen (Abb. 11-14). Die untersuchten Fraktionen

enthielten demzufolge wie Dinukleosidpolyphosphate Phosphoesterbindungen in 5'-Position, jedoch keine Phosphoesterbindungen in 3'-Position und keine terminalen Phosphatgruppen.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig die Dinukleosidpolyphosphate  $Ap_3G$ ,  $Ap_5G$  und  $Gp_2G$  aus menschlichem Nebenschilddrüsengewebe isoliert. Während die Wirkung der Dinukleosidpolyphosphate im Tierversuch gut beschrieben ist, müssten die Wirkungen auf den menschlichen Organismus noch zukünftig geklärt werden. So wiesen Schlüter et al. vasokonstriktische und -proliferative Effekte von Dinukleosidpolyphosphaten an isoliert perfundierten Rattennieren und glatten Gefäßmuskelzellen in-vitro nach (Schlüter, 1994, Schlüter, 1996). Der Effekt variierte jedoch innerhalb der Dinukleosidpolyphosphate abhängig von der Art der beteiligten Nucleoside (Guanosin oder Adenosin) und der Länge der sie verbindenden Phosphatkette.

Schlüter et al. zeigten bereits, dass die in dieser Arbeit isolierte Substanz  $Ap_3G$  an der isoliert perfundierten Rattenniere zu einer Vasokonstriktion führte. Außerdem steigerte die Substanz die Proliferation von kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen (Schlüter, 1998). Auch  $Ap_5G$  führte im Tierversuch zu einer Vasokonstriktion an isoliert perfundierten Rattennieren (van der Giet, 2001). Die vasokonstriktische Wirkung ließ sich durch die  $P_{2X}$ -Rezeptorantagonisten Suramin und Pyridoxalphosphat-6-Azophenyl-2,4-Disulfonsäure inhibieren, so dass anzunehmen ist, dass die durch  $Ap_5G$  hervorgerufene Vasokonstriktion in der Nierenstrombahn der Ratte über  $P_{2X}$ -Rezeptoren vermittelt wurde.  $P_{2X}$ -Rezeptoren konnten nur über Dinukleosidpolyphosphate aktiviert werden, die zumindest ein Adenosin enthielten.  $Ap_5G$  führte an der nach Langendorff perfundierten Ratte zu einer dosisabhängigen Dilatation der Koronararterien mit einem Abfall des koronaren Perfusionsdrucks (van der Giet, 2002). Der durch  $Ap_5G$  hervorgerufene Effekt ließ sich durch den  $P_{2Y(1)}$ -Rezeptorantagonisten 2'-Desoxy-N(6)-Methyl-Adenosin 3', 5'-Diphosphat Diammonium inhibieren, so dass anzunehmen war, dass die durch  $Ap_5G$  hervorgerufene Koronardilatation über  $P_{2Y(1)}$ -Rezeptoren vermittelt wurde.  $Ap_5G$  förderte zudem die Proliferation von kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen (Schlüter, 1998). Jankowski et al. zeigten, dass aus humanen Thrombozyten isoliertes  $Gp_2G$  die Proliferationsrate kultivierter glatter Gefäßmuskelzellen erhöht (Jankowski, 2001). Angaben zu einer induzierten Vasokonstriktion durch  $Gp_2G$  finden sich bisher nicht. Mögliche Effekte der in dieser Arbeit isolierten und identifizierten Dinukleosidpolyphosphate  $Ap_3G$ ,  $Ap_5G$  und  $Gp_2G$  wären somit bekannt. Die für einen signifikanten Blutdruckanstieg im menschlichen Organismus notwendige Plasma-Konzentration der jeweiligen Dinukleosidpolyphosphate ist nicht bekannt und müsste

bestimmt werden, um den anteiligen Effekt der Dinukleosidpolyphosphate an einer arteriellen Hypertonie abschätzen zu können.

Die Frage, ob die von uns isolierten Dinukleosidpolyphosphate dem „Parathyroid Hypertensive Factor“ (PHF) entsprechen, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend beantwortet werden. Eine Erhöhung des arteriellen Blutdruckes ist bei primärem Hyperparathyreoidismus beschrieben. Die in dieser Arbeit isolierten Dinukleosidpolyphosphate stammten aus den Nebenschilddrüsen von parathyreoidektomierten Patienten mit einem primären Hyperparathyreoidismus. Pang et al. zeigten dass der von ihnen benannte fiktive „Parathyroid Hypertensive Factor“ die Calcium-Aufnahme in glatten Gefäßmuskelzellen förderte. Die Autoren erklärten hiermit den Anstieg des arteriellen Blutdrucks in spontan hypertensiven Ratten (Pang, 1990). Ebenso wie PHF führt auch beispielsweise  $Ap_5G$  zu einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration in glatten Gefäßmuskelzellen (van der Giet, 2001). Dies unterstützt die Theorie, dass Dinukleosidpolyphosphate eine Mitbeteiligung an der Blutdruck erhöhenden Wirkung von PHF haben. Benishin et al beschrieben PHF als eine Substanz mit einer Molekularmasse von etwa 2,5-3 kDa (Benishin, 1991). Obwohl die in dieser Arbeit gefundenen Dinukleosidpolyphosphate alle eine Masse unter 1 kDa haben, wäre aufgrund der unbekanntem Struktur von PHF ein Zusammenhang möglich. Möglicherweise liegen unterschiedliche Varianten des PHFs vor, abhängig davon, ob er aus tierischem oder menschlichem Gewebe stammt. Möglich wären auch unterschiedliche vasokonstriktorische wirkende endogene Substanzen.

Limitationen der Arbeit sind, dass die Verarbeitung der menschlichen Nebenschilddrüsen in einer gesammelten Fraktion erfolgte und eine Zuordnung des Ergebnisses zu einzelnen Patienten mit unterschiedlich ausgeprägtem Befund somit nicht möglich war. Darüber hinaus wurde nicht untersucht, ob sich eine bestehende arterielle Hypertonie nach Parathyreoidektomie besserte und es zusätzlich zu einem Abfall der systemischen Konzentration der Dinukleosidpolyphosphate kam. Da in der vorliegenden Studie kein Gewebe eines gesunden menschlichen Vergleichskollektivs untersucht wurde, konnte keine Aussage über ein mögliches physiologisches Vorkommen von Dinukleosidpolyphosphaten in gesundem Nebenschilddrüsen-gewebe getroffen werden. Weiterführende Studien sollten zeigen, ob die Konzentration der in dieser Arbeit isolierten Dinukleosidpolyphosphate  $Ap_3G$ ,  $Ap_5G$  und  $Gp_2G$  ausreichen würde, die im Tierversuch demonstrierten Effekte im menschlichen Organismus hervorzurufen. Des Weiteren muss in Zukunft untersucht werden, ob parathyreoidale Adenome oder hyperplastische

Nebenschilddrüsen vermehrt Dinukleosidpolyphosphate bilden oder sezernieren. In weiteren klinischen Studien muss zudem bei Patienten mit arterieller Hypertonie untersucht werden, ob tatsächlich eine signifikant höhere Produktion und Sezernierung von Dinukleosidpolyphosphaten in der Nebenschilddrüse nachweisbar ist.

In dieser Arbeit wurden die Dinukleosidpolyphosphate  $Ap_3G$ ,  $Ap_5G$  und  $Gp_2G$  aus menschlichem Nebenschilddrüsengewebe isoliert und identifiziert. Es ist zu vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen den Dinukleosidpolyphosphate und der arteriellen Hypertonie bei Hyperparathyreoidismus besteht. Normwerte für physiologische Konzentrationen von Dinukleosidpolyphosphaten in gesunden Nebenschilddrüsen können aus ethischen Gründen nicht ermittelt werden. Eine erneute Untersuchung von erkranktem menschlichem Nebenschilddrüsengewebe mit Korrelation zwischen klinischer Symptomatik vor und nach Parathyreoidektomie sowie den Konzentrationen der Dinukleosidpolyphosphate im Resektat wären durchführbar. Ebenso sollte im Tierversuch und an Zellkulturen die vasokonstriktorische und proliferationsfördernde Wirkung der isolierten Dinukleosidpolyphosphate untersucht werden. Sollte in weiteren Studien gezeigt werden, dass Dinukleosidpolyphosphate an der Entstehung einer arteriellen Hypertonie beteiligt sind, könnten möglicherweise selektive Rezeptorblocker zur gezielten Behandlung der Hypertonie eingesetzt werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Ätiologie der essentiellen Hypertonie ist multifaktoriell; viele der involvierten Faktoren sind bislang noch unbekannt. Gründe für eine Erhöhung des arteriellen Blutdrucks könnten unter anderem endogene bisher unbekannte vasoaktive Mediatoren sein.

Die Nebenschilddrüse ist Ort der Synthese und Sekretion unterschiedlicher Hormone. So ist das in der Nebenschilddrüse gebildete Parathormon für die Regulation des Calciumhaushalts verantwortlich. Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus entwickeln eine arterielle Hypertonie. Nachdem in vorhergehenden Studien gezeigt worden war, dass Parathormon nicht ursächlich für eine Erhöhung des arteriellen Blutdrucks bei Patienten mit Hyperparathyreoidismus war, konnte in Tierversuchen ein Zusammenhang zwischen dem hypothetischen „Parathyroid Hypertensive Factor“ (PHF) und der arteriellen Hypertonie nachgewiesen werden. Der „Parathyroid Hypertensive Factor“ wurde in seiner Struktur bisher nicht genau identifiziert, obwohl mehrere Hypothesen zur Form und Größe der Substanz aufgestellt wurden.

In den letzten Jahren sind Dinukleosidpolyphosphate, eine Gruppe endogener Mediatoren, aus tierischen und menschlichen Geweben isoliert worden. Dinukleosidpolyphosphate haben einen Einfluss auf den Tonus und die Proliferationsrate glatter Gefäßmuskelzellen. Dinukleosidpolyphosphate könnten somit einen Einfluss auf die Pathogenese der arteriellen Hypertonie haben.

In der vorliegenden Arbeit wurden Dinukleosidpolyphosphate aus Nebenschilddrüsengewebe isoliert. Das Nebenschilddrüsengewebe entstammte Patienten, die aufgrund eines primären Hyperparathyreoidismus parathyreoidektomiert wurden. Nach mechanischer Desintegration und Deproteinierung wurden mittels unterschiedlicher chromatographischer Verfahren homogene Fraktionen erhalten. Die zu Grunde liegenden Substanzen wurden mittels Massenspektrometrie, Vergleich der Retentionszeiten mit den authentischen Substanzen und enzymatischer Analytik analysiert. Mit diesen Methoden konnten die Dinukleosidpolyphosphate  $Ap_3G$ ,  $Ap_5G$  und  $Gp_2G$  in menschlichem Nebenschilddrüsengewebe nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Arbeit kann vermutet werden, dass diese Dinukleosidpolyphosphate bei einem Teil der Patienten mit Hyperparathyreoidismus für die arterielle Hypertonie verantwortlich sein könnten. In weiterführenden Studien sollte der Gehalt der Dinukleosidpolyphosphate  $Ap_3G$ ,  $Ap_5G$  und  $Gp_2G$  bei Patienten mit und ohne Hyperparathyreoidismus bestimmt werden. Hierdurch könnte möglicherweise ein neuer therapeutischer Ansatz zur Therapie der arteriellen Hypertonie entwickelt werden.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1.) Benishin CG, Lewanczuk RZ, Pang PK. Purification of parathyroid hypertensive factor from plasma of spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88(14):6372-6.
- 2.) Benishin CG, Lewanczuk RZ, Shan J, Pang PK. Purification and structural characterization of parathyroid hypertensive factor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994, 23: 9-13.
- 3.) Birkenhager WA, Staessen JA. Progress in cardiovascular diseases cognitive function in essential hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 2006; 49:1-10.
- 4.) Bondanelli M, Ambrosio MR, Degli Uberti EC. Pathogenesis and prevalence of hypertension in acromegaly. *Pituitary* 2001; 4: 239-49.
- 5.) Brady SS, Matthews KA. Chronic stress influences ambulatory blood pressure in adolescents. *Ann Behav Med* 2006; 31(1):80-8.
- 6.) Broulik PH, Horky K, Pacovsky V. Blood pressure in patients with primary hyperparathyroidism before and after parathyroidectomy. *Exp Clin Endocrinol* 1985; 86: 346-52.
- 7.) Bukowski RD, Ishibashi K, Bian K. Vascular actions of the calcium-regulating hormones. *Semin Nephrol* 1995; 15:536-49.
- 8.) Chrostowska M, Szczech R, Narkiewicz K. Antihypertensive therapy in the obese hypertensive patient. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006 ; 15(5):487-92.
- 9.) Dalziel HH, Westfall DP. Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution, and molecular characterization. *Pharmacol Rev* 1994; 46:449-66.

- 10.) Dietze GJ, van Erckelens F, Bunse M, Jung WI. Pathogenesis of coronary disease. *Z Kardiol* 2000; 89 Suppl 7:7-10.
- 11.) Dusing R. "Soft" and "hard" end points in hypertension. *Dtsch Med Wochenschr* 2006; 131:21-6.
- 12.) Edgecombe M, Craddock HS, Smith DC, McLennan AG, Fisher MJ. Diadenosine polyphosphate-stimulated gluconeogenesis in isolated rat proximal tubules. *Biochem J* 1997; 323(Pt 2):451-6.
- 13.) Erlinge D, Yoo H, Edvinsson L, Reis DJ, Wahlestedt C. Mitogenic effects of ATP on vascular smooth muscle cells vs. other growth factors and sympathetic cotransmitters. *Am J Physiol* 1993; 265(4 Pt 2):1089-97.
- 14.) Flodgaard H, Klenow H. Abundant amounts of diadenosine 5',5'''-P<sub>1</sub>,P<sub>4</sub>-tetraphosphate are present and releasable, but metabolically inactive, in human platelets. *Biochem J* 1982; 208(3):737-42.
- 15.) Flynn JT, Tullus . Severe hypertension in children and adolescents: pathophysiology and treatment. *Pediatr Nephrol* 2008; Online Pulikation DOI 10.1007/s00467-008-1000-1.
- 16.) Fornage M, Doris PA. Genomics and epigenomics of hypertension. *Curr Opin Mol Ther* 2006; 8(3):206-14.
- 17.) Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, et al. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 1994; 46:143-56.
- 18.) Gairard A, Berthelot A, Schleiffer R, Pernot F. Parathyroidectomy significantly decreases hypertension in spontaneously hypertensive and deoxycorticosterone plus saline treated rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1982; 60:208-12.
- 19.) Gallowitsch HJ. Thyroid and cardiovascular system. *Wien Med Wochenschr* 2005; 155:436-43.

- 20.) Gasmi L, McLennan AG, Edwards SW. Diadenosine polyphosphates induce intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization in human neutrophils via a pertussis toxin sensitive G-protein. *Immunology* 1997; 90(1):154-9.
- 21.) 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(8):1453-60.
- 22.) Van der Giet M, Westhoff T, Cinkilic O, et al. The critical role of adenosine and guanosine in the affinity of dinukleoside polyphosphates to P(2x)-receptors in the isolated perfused rat kidney. *Br J Pharmacol* 2001; 132:467-74.
- 23.) Van der Giet M, Schmidt S, Tolle M, et al. Effects of dinukleoside polyphosphates on regulation of coronary vascular tone. *Eur J Pharmacol* 2002; 448:207-13.
- 24.) He J, Klag MJ, Appel LJ, Charleston J, Whelton PK. Seven-year incidence of hypertension in a cohort of middle-aged African Americans and whites. *Hypertension* 1998; 31:1130-5.
- 25.) Heidenreich S, Tepel M, Schluter H, Harrach B, Zidek W. Regulation of rat mesangial cell growth by diadenosine phosphates. *J Clin Invest* 1995; 95(6):2862-7.
- 26.) Hillenkamp F, Karas M. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix- assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol* 1990; 193:280-95.
- 27.) Hohage H, Reinhardt C, Borucki U, et al. Effects of diadenosine polyphosphates on renal function and blood pressure in anesthetized Wistar rats. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7(8): 1216-22.
- 28.) Humphrey JD, Wilson E. A potential role of smooth muscle tone in early hypertension: a theoretical study. *J Biomech* 2003; 36(11):1595-601.

- 29.) Jankowski J, Potthoff W, Zidek W, Schlüter H. Purification of chemically synthesised dinukleoside (5', 5') polyphosphates by displacement chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998; 719:63-70.
- 30.) Jankowski J, Tepel M, van der Giet M, et al. Identification and characterization of P(1), P(7) – Di (adenosine-5')-heptaphosphate from human platelets. *J Biol Chem* 1999; 274:23926-31.
- 31.) Jankowski J, Schroeter A, Tepel M, et al. Isolation and characterization of coenzyme A glutathione disulfide as a parathyroid-derived vasoconstrictive factor. *Circulation* 2000; 102:2548-52.
- 32.) Jankowski J, Yoon MS, Stephan N, Zidek W, Schluter H. Vasoactive diadenosine polyphosphates in human placenta: possible candidates in the pathophysiology of pre-eclampsia. *J Hypertens* 2001; 19:567-73.
- 33.) Jankowski J, Hagemann J, Tepel M, et al. Dinucleotides as growth-promoting extracellular mediators. Presence of dinucleoside diphosphates Ap<sub>2</sub>A, Ap<sub>2</sub>G, and Gp<sub>2</sub>G in releasable granules of platelets. *J Biol Chem* 2001; 276:8904-9.
- 34.) Jankowski J, Hagemann J, Yoon MS, et al. Increased vascular growth in haemodialysis patients induced by platelet-derived diadenosine polyphosphates. *Kidney Int* 2001; 59:1134-41.
- 35.) Joint National Committee (JNC). Prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. National Institutes of Health Publication 2003; 3:5233.
- 36.) Kaneko T, Ohtani R, Lewanczuk RZ, Pang PK. A novel cell type in the parathyroid glands of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1989; 2:549–52.
- 37.) Kaufmann R, Kirsch D, Sprengler B. Sequencing of peptides in a time-of-flight mass spectrometer: evaluation of postsource decay following matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI). *Int J Mass Spectrom Ion Proc* 1994; 131:355-85.

- 38.) Krautzig S, Renz-Polster H. Arterielle Hypertonie. In: Braun J, Renz-Polster H, Basislehrbuch Innere Medizin. 2. Auflage, München, Deutschland: Urban & Fischer Verlag, 2001: 156-9.
- 39.) Labinson PT, White WB, Tendler BE, Mansoor GA. Primary hyperaldosteronism associated with hypertensive emergencies. *Am J Hypertens* 2006; 19:623-7.
- 40.) Lenders JW, Eisenhofer G, Mannelli M, Pacak K. Pheochromocytoma. *Lancet* 2005; 366:665-75.
- 41.) Lewanczuk RZ, Chen A, Pang PK. The effects of dietary calcium on blood pressure in spontaneously hypertensive rats may be mediated by parathyroid hypertensive factor. *Am J Hypertens* 1990; 3:349-53.
- 42.) Lewanczuk RZ, Pang PK. Expression of parathyroid hypertensive factor in hypertensive primary hyperparathyroid patients. *Blood Press* 1993; 2:22-7.
- 43.) Lewanczuk RZ, Resnick LM, Ho MS, Benishin CG, Shan J, Pang P. Clinical aspects of parathyroid hypertensive factor. *J Hypertens* 1994; 12:11-6.
- 44.) Lubianca JN, Moreira LB, Gus M, Fuchs FD. Stopping oral contraceptives: an effective blood pressure-lowering intervention in women with hypertension. *J Hum Hypertens* 2005; 19:451-5.
- 45.) Luo J, Jankowski J, Knobloch M, et al. Identification and characterization of diadenosine 5', 5''' - P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> -diphosphate and diadenosine 5', 5''' - P<sub>1</sub>, P<sub>3</sub> - triphosphate in human myocardial tissue. *FASEB J* 1998; 13:695-705.
- 46.) Luo J, Jankowski J, Tepel M, van der Giet M, Zidek W, Schluter H. Identification of diadenosine hexaphosphate in human erythrocytes. *Hypertension* 1999; 34: 872-5.
- 47.) Luthje J, Ogilvie A. The presence of diadenosine 5',5'''-P<sub>1</sub>,P<sub>3</sub>-triphosphate (Ap<sub>3</sub>A) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 115(1):253-60.

- 48.) Luthje J, Ogilvie A. Diadenosine triphosphate (Ap<sub>3</sub>A) mediates human platelet aggregation by liberation of ADP. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 118(3):704-9.
- 49.) Luthje J, Baringer J, Ogilvie A. Effects of diadenosine triphosphate (Ap<sub>3</sub>A) and diadenosine tetraphosphate (Ap<sub>4</sub>A) on platelet aggregation in unfractionated human blood. *Blut* 1985; 51(6):405-13.
- 50.) Malam-Souley R, Campan M, Gadeau AP, Desgranges C. Exogenous ATP induces a limited cell cycle progression of arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993; 264(4 Pt 1):783-8.
- 51.) Miras-Portugal MT, Gualix J, Pintor J. The neurotransmitter role of diadenosine polyphosphates. *FEBS Lett* 1998, 430(1-2):78-82.
- 52.) Moser M. Update on the Management of Hypertension: Recent Clinical Trials and the JNC 7. *J Clin Hypertens* 2004; 6(10 Suppl 2):4-13.
- 53.) Nadar SK, Tayebjee MH, Messerli F, Lipp GY. Target organ damage in hypertension: pathophysiology and implications for drug therapy. *Curr Pharm Des* 2006;12:1581-92.
- 54.) Nyirenda MJ, Patfield PL. Parathyroid hormone and hypertension. *J Hypertens* 2005; 23:1633-4.
- 55.) Pang PK, Hong BS, Yen L, Yang MC (1984) Parathyroid hormone. A specific potent vasodilatator. *Contrib Nephrol* 1984; 41:137-45.
- 56.) Pang PK, Lewanczuk RZ. Parathyroid origin of a new hypertensive Factor in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1989; 2:898-902.
- 57.) Pang PK, Kaneko T, Lewanczuk RZ. Parathyroid origin of a new hypertensive factor. *Exp Gerontol* 1990; 25(3-4):269-77.

- 58.) Petrides PE. Wasser- und Elektrolythaushalt - Calcium. In: Löffler G, Petrides PE, Biochemie und Pathobiochemie. 6. Auflage, Berlin, Deutschland: Springer Verlag, 1998: 695-5.
- 59.) Pintor J, Rotllan P, Torres M, Miras-Portugal MT. Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. *Anal Biochem* 1992; 200(2):296-300.
- 60.) Pohl U, Ogilvie A, La montagne D, Busse R. Potent effects of  $Ap_3A$  and  $Ap_4A$  on coronary resistance and autacoid release of intact rabbit hearts. *Am J Physiol* 1991; 260:1692-7.
- 61.) Puepet FH, Agaba EI, Chuhwak EK, Ugoya SO. Primary hyperparathyroidism presenting with severe hypertension in a middle aged Nigerian--a case report. *Niger Postgrad Med J*. 2008; 15(1):58-60.
- 62.) Rambašek M, Rutz E, Rascher W, et al. Vascular effects of parathyroid hormone (PTH). *Adv Exp Med Biol* 1982; 151:616-32.
- 63.) Riehl J, Spüntrup E, Heintz B, Günther RW, Floege J. Renovasculäre Hypertonie. *Internist* 2005; 46:509-19.
- 64.) Ripoll C, Martin F, Manuel Rovira J, Pintor J, Miras-Portugal MT, Soria B. Diadenosine polyphosphates. A novel class of glucose-induced intracellular messengers in the pancreatic beta-cell. *Diabetes* 1996; 45(10):1431-4.
- 65.) Rodriguez del Castillo A, Torres M, Delicado EG, Miras-Portugal MT. Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates -  $Ap_4A$  and  $Ap_5A$  - in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *J of Neurochem* 1988; 51:1696-703.
- 66.) Sacerdote A, Weiss K, Trann T, Rokeya Noor B, McFarlane SI. Hypertension in patients with Cushing's disease: pathophysiology, diagnosis, and management. *Curr Hypertens Rep* 2005; 7:212-8.

- 67.) Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K. Organe des Halses. In: Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K, Anatomie. 7. Auflage, Berlin, Deutschland: Springer Verlag, 1997:458-9.
- 68.) Schlüter H, Offers E, Bruggemann G, et al. Diadenosine phosphates and the physiological control of blood pressure. *Nature* 1994; 367:186-8.
- 69.) Schlüter H, Tepel M, Zidek W. Vascular actions of diadenosine phosphates. *J Auton Pharmacol* 1996; 16:357-62.
- 70.) Schlüter H, Grobeta I, Bachmann J, et al. Adenosine (5') oligophospho – (5') guanosines and guanosine (5') oligophospho – (5') guanosines in human platelets. *J Clin Invest* 1998; 101:682-8.
- 71.) Schulze-Lohoff E, Zanner S, Ogilvie A, Sterzel RB. Extracellular ATP stimulates proliferation of cultured mesangial cells via P2-purinergic receptors. *Am J Physiol* 1992; 263(3 Pt 2):374-83.
- 72.) Shan J, Benishin CG, Lewanczuk RZ, Pang PK. Mechanism of the vascular action of parathyroid hypertensive factor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 23:1-8.
- 73.) Tepel M, Jankowski J, Schlüter H, et al. Diadenosine polyphosphates' action on calcium and vessel contraction. *Am J Hypertens* 1997; 10:1404-10.
- 74.) Unger N, Petersenn S, Mann K. Diagnosis and therapy of endocrine hypertension. *Med Klin* 2006; 101 Suppl.1:170-2.
- 75.) Uzu T, Kimura G, Yamauchi A, et al. Enhanced sodium sensitivity and disturbed circadian rhythm of blood pressure in essential hypertension. *J Hypertens* 2006; 24(8): 1627-32.
- 76.) Vartanian A, Prudovsky I, Suzuki H, Dal Pra I, Kisselev L. Opposite effects of cell differentiation and apoptosis on Ap<sub>3</sub>A/Ap<sub>4</sub>A ratio in human cell cultures. *FEBS Lett* 1997; 415(2):160-2.

- 
- 77.) Verspohl EJ, Johannwille B. Diadenosine polyphosphates in insulin-secreting cells: interaction with specific receptors and degradation. *Diabetes* 1998; 47(11):1727-34.
- 78.) Wang Y, Wang QJ. The prevalence of prehypertension and hypertension among US adults according to the new joint national committee guidelines: new challenges of the old problem. *Arch Intern Med* 2004; 164(19):2126-34.
- 79.) Whitworth JA; WHO, International Society of Hypertension Writing Group. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens* 2003; 21(11):1983-92.

## 7. ANHANG

### 7.1 Chemikalien/Enzyme

|                      |   |
|----------------------|---|
| Acetonitril          | Firma Merck, Deutschland                        |
| HPLC Wasser          | Firma Merck, Deutschland                        |
| Sonstige Chemikalien | Firma Sigma-Aldrich, Deutschland                |
| EC 3.1.3.1           | Firma Roche Molecular Biochemicals, Deutschland |
| EC 3.1.16.1          | Firma Roche Molecular Biochemicals, Deutschland |
| EC 3.1.15.1          | Firma Roche Molecular Biochemicals, Deutschland |

### 7.2 Geräte

#### Chromatographiesäulen:

|                                      |                                  |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| LiChroprep, 310 mm x 65 mm, 65-40 µm | Firma Merck, Deutschland         |
| Supersphere, 2,1 mm x 100 mm, 4 µm   | Firma Merck, Deutschland         |
| Mono Q HR 5/5, 50 mm x 5 mm, 10 µm   | Firma Pharmacia Biotech, USA     |
| Supersphere, 250 mm x 4 mm, 4 µm     | Firma Merck, Deutschland         |
| Poros, R 2/H, 2,1 mm x 100 mm        | Firma Perseptive Biosystems, USA |
| LiChroprep, 310 mm x 25 mm, 65-40 µm | Firma Merck, Deutschland         |
| Supersphere, 300 mm x 8 mm, 4 µm     | Firma Merck, Deutschland         |
| Mono Q, 100 x 10 mm                  | Firma Pharmacia Biotech, USA     |

#### Sonstiges:

|                               |                               |
|-------------------------------|-------------------------------|
| Massenspektrometer Reflex II  | Firma Bruker, Deutschland     |
| Stickstoff-Lasers, VSL-337 ND | Firma Laser Science Inc., USA |

### 7.3 Abkürzungen

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| ACN                             | Acetonitril  |
| al.                             | alteri   |
| AMP                             | Adenosinmonophosphat                                   |
| Ap <sub>2</sub> A               | Diadenosindiphosphat                                   |
| Ap <sub>4</sub> A               | Diadenosintetraphosphat                                |
| Ap <sub>6</sub> A               | Diadenosinhexaphosphat                                 |
| Ap <sub>2</sub> G               | Adenosinguanosindiphosphat                             |
| AU                              | Absorptionseinheit                                     |
| Da                              | Dalton   |
| EDTA                            | Ethylendiamintetraessigsäure                           |
| EPH                             | Ödem (Edema), Proteinurie, Hypertonie                  |
| GMP                             | Guanosinmonophosphat                                   |
| Gp <sub>2</sub> G               | Diguanosindiphosphat                                   |
| HCL                             | Salzsäure  |
| HEPES                           | N-([2-hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]) |
| H <sub>2</sub> O                | Wasser   |
| HPLC                            | High Performance Liquid Chromatographie                |
| KDa                             | Kilodalton   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Kaliumhydrogenphosphat                                 |
| K <sub>2</sub> ClO <sub>4</sub> | Kaliumperchlorat                                       |
| KHK                             | Koronare Herzkrankheit                                 |
| KOH                             | Kaliumhydroxid   |
| MALDI                           | Matrix-assisted laser desorption/ionisation            |
| MgCl <sub>2</sub>               | Magnesiumchlorid                                       |
| µl                              | Mikroliter   |
| µm                              | Mikrometer   |
| mm                              | Millimeter   |
| mM                              | Millimolar   |
| mmol                            | Millimolar   |
| µmol                            | Mikromol   |
| mU                              | Milliunit  |

---

|                    |   |
|--------------------|---|
| NaCl               | Natriumchlorid  |
| NaOH               | Natriumhydroxid   |
| NH <sub>4</sub> Ac | Ammoniumacetat  |
| nm                 | Nanometer   |
| NO                 | Stickstoffmonoxid   |
| ns                 | Nanosekunden  |
| pAVK               | peripher arterielle Verschlusskrankheit                       |
| PPADS              | Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2;4-disulfonsäure               |
| PSD-MALDI          | post-source-decay Matrix-assisted laser desorption/ionisation |
| TBA                | Tetrabutyl-Ammoniumhydrogensulfat                             |
| TEAA               | Triethylammoniumacetat  |
| U                  | Umdrehungen   |

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

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

## **9. DANKSAGUNG**

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Walter Zidek für die Bereitstellung seines Forschungslabors in der Ruhr-Universität Bochum für die Durchführung der für diese Arbeit notwendigen Untersuchungsschritte im Zeitraum 1999-2001.

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Joachim Jankowski für die konstruktive und geduldige Betreuung bei der Durchführung der Arbeit. Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei Arkadius Pacha, Anna Cyrek und Dr. rer. nat. Vera Jankowski für ihre tatkräftige Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern Sigrid Stoll und Werner Kathemann, ohne die mein Studium und damit auch meine Dissertation nicht möglich gewesen wären.

„Ich, Simone Kathemann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

**Isolierung und Identifizierung von  
Adenosinguanosintriphosphat, Adenosinguanosinpentaphosphat und  
Diguanosindiphosphat  
aus menschlichem Nebenschilddrüsengewebe**

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.“

**11.11.2008**

**Simone Kathemann**