

## 3. Methodik

### 3.1 Allgemeiner Teil

#### 3.1.1 Chromatographische Methoden

Chromatographische Methoden sind physikalisch-chemische Trennmethode, die zur Auftrennung von Substanzgemischen eingesetzt werden. Die Substanzen werden hierbei zwischen einer stationären und einer mobilen Phase verteilt. Die Substanztrennung basiert auf physikalisch-chemischen Wechselwirkungen der Komponenten des Substanzgemisches der mobilen Phase mit der stationären Phase, wie elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen. Dabei werden die einzelnen Substanzen des Gemisches unterschiedlich stark von der stationären Phase retentiert. Die stationäre Phase kann fest oder flüssig, die mobile Phase flüssig oder gasförmig sein. Die mobile Phase enthält das zu trennende Substanzgemisch. Es werden bei der stationären Phase Normal- und Umkehrphasen (Reversed-Phase) unterschieden. Bei einer Normalphase ist die stationäre Phase polarer als die mobile Phase. Bei der Umkehrphase wird der Träger mit lipophiler (apolarer) stationärer Phase belegt und hat somit eine geringere Polarität.

Die Elution der Substanzen, die von dem Trenngel retentiert werden, kann durch unterschiedliche Methoden erfolgen. Bei der isokratischen Elution bleibt die Zusammensetzung der mobilen Phase während eines chromatographischen Trennvorganges unverändert. Durch diese Methode ist die Trennung komplexer Substanzgemische nur begrenzt möglich, da nur eine geringe Auflösung und eine breite, flache Elution der retentierten Moleküle erfolgt.

Die Gradiententechnik ist eine alternative Elutionsmöglichkeit, mit der eine höhere Auflösung beziehungsweise Trennleistung als bei der isokratischen Elution erreicht wird. Während der Chromatographie verändert sich die Zusammensetzung der mobilen Phase. Es wird mit einem Eluenten mit geringer Elutionskraft begonnen, damit auch früh eluierende Substanzen voneinander getrennt werden. Im Verlauf der chromatographischen Trennung wird die Elutionskraft des Eluenten durch Erhöhung der Konzentration gesteigert.

### 3.1.1.1 Kationenaustausch-Chromatographie

Kationenaustauscher sind Chromatographie-Gele mit Polyelektrolyt-Charakter, die aus Elektrolytlösungen Kationen aufnehmen und äquivalente Mengen Kationen abgeben. Sie resultieren durch Einführung von  $\text{SO}_3\text{H}$  bzw.  $\text{COOH}$ -Gruppen in Phenylreste (starke beziehungsweise schwache Kationenaustauscher).

Kationische Substanzen der mobilen Phase lagern sich hierbei an das Gelmaterial an, das kovalent gebundene anionische Gruppen besitzt. Bei Auftragung des Probengemisches werden die kationischen Substanzen von kationischen Probenmolekülen verdrängt. Durch Erhöhung der Kationenstärke in der mobilen Phase wird erreicht, dass bei der Elution die Probenmoleküle durch den Kationenüberschuss von der stationären Phase verdrängt werden. Dabei eluieren zunächst Substanzen mit geringer Ladungsdichte beziehungsweise Affinität zu den anionischen Gruppen der stationären Phase. Moleküle mit höherer Ladungsdichte beziehungsweise Affinität binden stärker an die Matrix und eluieren entsprechend erst bei höherer Kationenstärke.

### 3.1.1.2 Reversed-Phase-Chromatographie

Das Prinzip der Reversed-Phase-Chromatographie beruht auf hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der stationären Phase und dem Substanzgemisch. Hydrophile, stark polare Substanzen werden nur schwach oder nicht retendiert und eluieren im Durchfluss. Apolare, hydrophobe Moleküle retendieren an der stationären Phase. Ionische Probenmoleküle können mit gegensätzlich geladenen Ionen ein Ionenpaar bilden. Dieses Ionenpaar ist bezüglich seiner Ladung und Polarität nach außen neutral und lässt sich daher auf der stationären Umkehrphase adsorbieren.

## 3.1.2 Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-Massenspektrometrie)

Mit einem Massenspektrometer werden aus einer gasförmigen Probe Ionen erzeugt und nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis getrennt und registriert. Mit der Matrix-unterstützten

Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie können Molekularbestimmungen und Sequenzanalysen von Peptiden und Proteinen durchgeführt werden. Die Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie zeichnet sich durch hohe Nachweisempfindlichkeit aus. Molekülmassen können bis zu mehreren kDa bestimmt werden.

Zur MALDI-massenspektrometrischen Analyse wird die Probe mit einer definierten Matrix kristallisiert. Die Probe wird in das Vakuum des Massenspektrometers eingebracht und einem intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung von wenigen Nanosekunden ausgesetzt. Die Wahl der Desorptionsmatrix richtet sich nach ihrem UV-Absorptionsmaximum, das in den Bereich der Wellenlänge des verwendeten Lasers fallen muss. Die Matrixmoleküle absorbieren die Energie des Lasers, die für die Desorption der Ionen notwendig ist. Hierbei relaxiert die in den Matrixmolekülen deponierte elektrostatische Anregungsenergie in das Gitter des Festkörpers, sodass es zu einer Störung und Aufweitung der Gitterstruktur kommt. Es kommt zur Freisetzung der Matrix- und Probenmoleküle, die in die Gasphase übertreten und durch den Laserimpuls ionisiert werden. Die ionisierten Moleküle werden mit Hilfe eines elektrostatischen Feldes in Richtung des Analysators beschleunigt. Die Massenbestimmung erfolgt über eine elektronische Messung der Zeit, die zwischen der Desorption der Ionen bis zum Eintreffen am Detektor vergeht. Nach der Beschleunigung der Ionen auf einige keV kinetische Energie durchlaufen diese eine feldfreie Driftstrecke von 0,5-2 m Länge. Bei gleicher kinetischer Energie haben Ionen unterschiedlicher Masse damit unterschiedliche Flugzeiten. Leichte Ionen durchfliegen die Driftstrecke in kürzerer Zeit als schwere Ionen. Durch Vergleich mit bekannten Referenzmassen ergibt sich aus der gemessenen Flugzeit die Masse des Probenmoleküles.

Mit der Post-Source-Decay- (PSD) MALDI-Massenspektrometrie ist es möglich, die beim Laser-Beschuss gebildeten Molekülfragmente zu detektieren und so Informationen über die Struktur des Moleküls zu erhalten (Schrattenholz, 2001).

### **3.1.3 Elektrospray Ionisation (ESI-Massenspektrometrie)**

Die Elektrospray Ionisation ist eine Ionisierungsmethode zur Analyse von Proteinen, Oligonukleotiden und Metallkomplexen. Hierzu muss die Probe in einem niedrig siedenden Lösungsmittel, wie Acetonitril, Methanol, Chloroform oder Wasser, gelöst werden. Die Probenlösung wird unter Atmosphärendruck durch eine Kapillare gesprüht. Dieser mündet in eine Metallkapillare, die mit einem Potentialdifferenz von ca. 3-5 kV gegen eine wenige Millimeter entfernte Elektrode liegt. Aufgrund des hydrodynamischen Sprühvorgangs, der durch die Potentialdifferenz ausgelöst wird, werden sehr kleine, geladene Lösungsmitteltropfen erzeugt, aus denen nach Verdampfen des Lösungsmittels Ionen zurückbleiben.

### **3.1.4 Zellkultur und Transfektionsmethoden**

Bei der Zellkulturtechnik werden Einzelzellen in einer Petrischale kultiviert und zur Vermehrung gebracht. Die Einzelzellen können dabei aus verschiedensten Geweben gewonnen werden. Für das Wachsen der Primärkultur ist zum einen eine geeignete Oberfläche zur Anheftung der Zellen, und zum anderen ein geeignetes Kulturmedium notwendig. Kulturmedien bestehen aus einer mit Aminosäuren und Vitaminen versetzten Salzlösung, die von den Zellen benötigte Wachstums- und Differenzierungsfaktoren in gereinigter Form enthalten. In Anwesenheit eines geeigneten Kulturmediums teilen sich die Zellen und bilden einen Zellrasen. Zellen aus einem Kulturschälchen können nach Vermehrung von der Oberfläche abgelöst und über Wochen und Monate am Leben erhalten werden.

Bei der Transfektion handelt es sich um eine Methode, die zur Einschleusung von heterologer Desoxyribonukleinsäure (DNA) in Zellen dient. Die Gene die auf dem Vektor (DNA-Stück zum Einschleusen von Fremdgenen) liegen, werden in der Zelle durch zelluläre Enzyme in eine Aminosäureabfolge, ein Protein, übersetzt. Der Mechanismus der Aufnahme ist noch unbekannt. Es wird vermutet, dass die transfizierte DNA in das Zytoplasma der Zellen über Endozytose gelangt und in den Nukleus (Zellkern) transportiert wird. Dort wird die DNA transkribiert, von DNA in Ribonukleinsäure (RNA) übersetzt, wobei eine komplementäre

(spiegelbildliche) messenger RNA (mRNA) entsteht. Diese wird aus dem Nukleus zu den Ribosomen im Zytoplasma transportiert und dort in ein Protein übersetzt.

Für die Transfektion existieren verschiedene Zelllinien. Eine der häufigsten transfizierten Zelllinien, die hohe Transfektionseffizienzen erbringt, sind COS-7-Zelllinien (Gluzman, 1981). Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze, die aus der Zelllinie CV-1 durch Transfektion mit Sequenzen des Simian Virus 40 hervorgegangen ist und das SV 40-T-Antigen exprimiert. Zellen können dadurch Plasmide, die den SV 40-Replikationsursprung tragen, unabhängig von der zelleigenen DNA replizieren (Gluzman, 1981). Eine andere etablierte Zelllinie stellen die HEK 293 Zellen dar. Diese Zellen stammen aus humanen embryonalen Nierenzellen (Graham et al., 1977).

### **3.2 Spezieller Teil**

Die Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendeten Arbeitsschritte.

Die ersten Arbeitsschritte (im Schema übereinander angeordnet) erfolgten sukzessiv und dienten der Isolierung eines vasokonstriktiv-wirkenden Peptids. Die weiteren Arbeitsschritte (im Schema nebeneinander dargestellt) dienten der Identifizierung der isolierten Substanz. Sie erfolgten parallel.

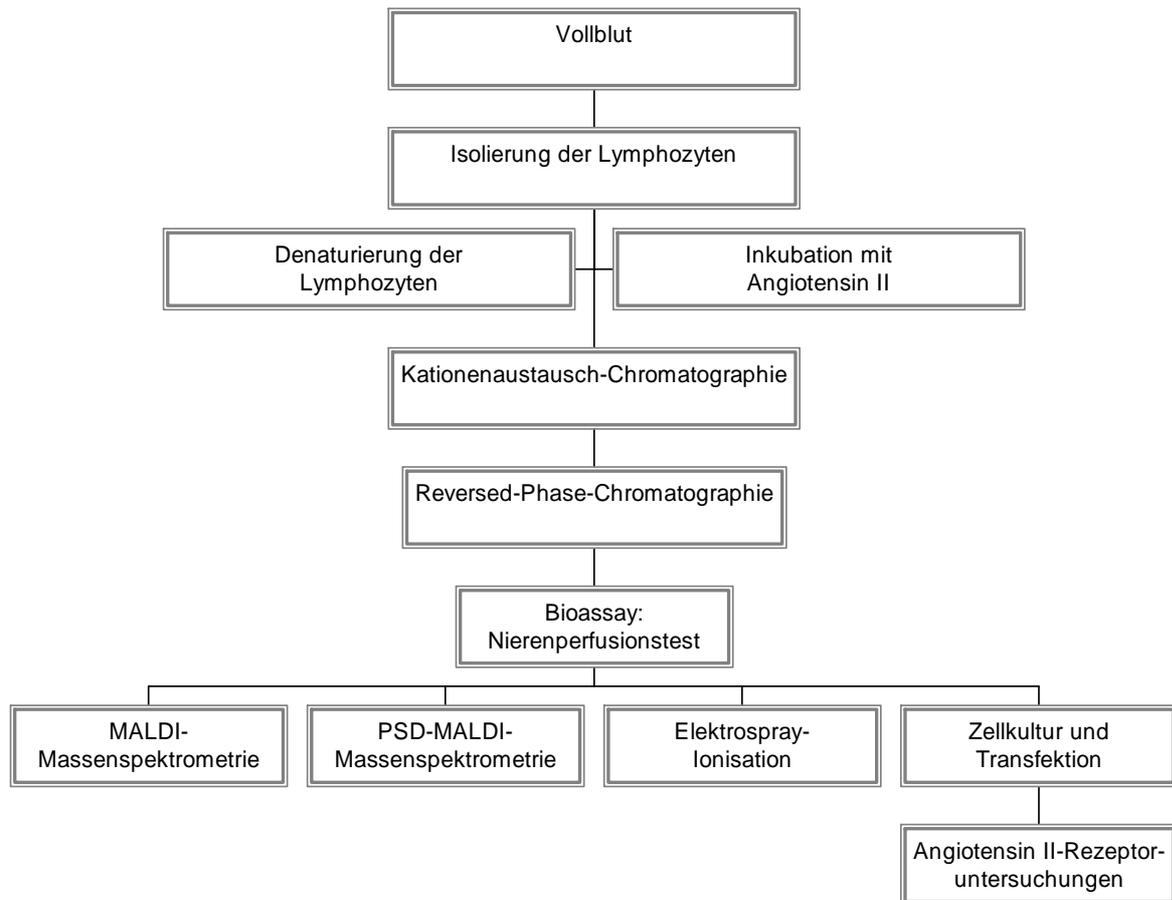


Abbildung 1: Arbeitsschritte zur Isolierung und Identifizierung eines vasokonstriktiv-wirkenden Peptids aus humanen Lymphozyten

### 3.2.1 Isolierung humaner Lymphozyten

50 ml Perfusorspritzen wurden mit 0,1 ml Heparin versetzt. Anschließend wurde gesunden, normotensiven Spendern nach Punction einer peripheren Vene der oberen Extremität 400 ml Vollblut mit 50 ml Perfusorspritzen abgenommen.

Je 50 ml heparinisiertes Vollblut wurde in 50 ml Kunststoff-Röhrchen umgefüllt und bei 240 g 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde entfernt und der Rückstand mit isotonischer Kochsalzlösung 1:1 verdünnt. 3 ml Histopaque-1077 (5/6 % wt/vol Ficoll; Dichte 1,077 g/cm<sup>3</sup>) wurde in ein 50 ml Kunststoff-Röhrchen vorgelegt und mit

5 ml verdünntem Blut überschichtet. Anschließend wurde bei 240 g 20 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildeten sich drei Schichten. Die Lymphozyten sammelten sich in der mittleren Schicht. Diese wurde abpipettiert und in einem Kunststoff-Röhrchen mit 10 ml wässriger 0,9 % Natriumchlorid-Lösung (NaCl) verdünnt. Anschließend wurde bei 400 g 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml 0,9 % iger NaCl-Lösung resuspendiert. Dieser wurde bei 400 g 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut mit 5 ml 0,9 % iger NaCl-Lösung resuspendiert und bei 400 g 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml isotonischer Kochsalzlösung resuspendiert Die isolierten Lymphozyten wurden bei Raumtemperatur 1 h inkubiert und zentrifugiert.

### 3.2.2 Kationenaustausch-Chromatographie

Der resultierende Überstand des letzten Zentrifugationsschrittes wurde nach der Inkubation der Lymphozyten mit einem Kationenaustauscher (HiTrap<sup>TM</sup> SP 1ml; Amersham Pharmacia, Schweden) chromatographiert. Als Laufmittel diente wässriges 20 mmol/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 3,5 und als Elutionsmittel wässriges 20 mmol/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 2 mol/l NaCl, pH 3,5. Es wurde ein Stufengradient zur Elution verwendet, der in Tabelle 1 genannt ist. Die Flussgeschwindigkeit betrug 1ml/min bei einer Fraktionsgröße von 1 ml. Die Leitfähigkeit und die UV-Absorption wurden bei 280 nm detektiert. Die Fraktionen wurden entsprechend ihrer UV-Absorption bei 280 nm und Leitfähigkeit gesammelt.

Tabelle 6: Gradient der Kationenaustausch-Chromatographie (Säule: HiTrap<sup>TM</sup> SP 1 ml; Amersham Pharmacia, Schweden; Eluent A: 20 mmol/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in Wasser, pH 3,5; Eluent B: 20 mmol/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 2 mol/l NaCl in Wasser, pH 3,5; Fluss: 1 ml/min; UV-Detektion: 280 nm; Fraktionsgröße 1 ml)

Zeit (in min)	0-5	5-10	15-20	25-30	30-35	35-40
Gehalt Lösungsmittel B (in %)	0	5	25	50	75	100

### 3.2.3 Reversed-Phase-Chromatographie

Die Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie wurden mit 1 mol/l Triethylammoniumacetat-Lösung (TEAA) auf eine TEAA-Endkonzentration von 40 mmol/l gebracht und auf eine Reversed-Phase-Chromatographie-Säule (Poros R2/H; 100 x 2.1 mm I.D., Perseptive Biosystems, Deutschland) aufgetragen. Als Laufmittel diente 40 mmol/l TEAA und als Elutionsmittel 80 % wässriges Acetonitril. Zur Elution wurde ein Stufengradient verwendet, der in Tabelle 2 genannt ist. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min bei einer Fraktionsgröße von 1 ml. Die Leitfähigkeit und die UV-Absorption wurden bei 280 nm detektiert. Die Fraktionen wurden entsprechend ihrer UV-Absorption bei 280 nm und Leitfähigkeit gesammelt. Sämtliche Fraktionen mit einer deutlichen UV-Absorption bei 280 nm wurden in einer Vakuumzentrifuge eingedampft und bis zur weiteren Bearbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Tabelle 7: Gradient der Reversed-Phase-Chromatographie; (Säule: Poros R2/H; 100 x 2.1 mm I.D., Perseptive Biosystems, Deutschland; Eluent A: 40 mmol/l TEAA; Eluent B: 80 % Acetonitril; Fluss: 0,5 ml/min; UV-Detektion: 280 nm; Fraktionsgröße 1 ml)

Zeit (in min)	0-10	10-15	15-20	20-25	25-30
Gehalt Lösungsmittel B (in %)	0	25	50	75	100

### 3.2.4 Bestimmung der Wirkung der isolierten Substanzen auf den Perfusionsdruck einer isolierten, perfundierten Niere

Die Effekte der Aliquots der entsalzten und lyophilisierten Proben der Kationenaustausch-Chromatographie auf den Gefäßtonus wurden mittels eines Nierenperfusionstests bestimmt. Hierzu wurde einer Ratte die Niere entnommen. Die Arterie der Niere wurde an ein Perfusionssystem angeschlossen und mit einer Lösung perfundiert. Die Perfusionslösung setzte sich aus 115 mmol/l NaCl; 4,6 mmol/l KCl; 1 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ ; 1,2 mmol/l  $\text{MgSO}_4$ ; 1,2 mmol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 22 mmol/l  $\text{NaHCO}_3$ ; 49 mmol/l Glukose und 35 g Gelatine/l zusammen. Die Niere wurde mit einem konstanten Fluss von 8 ml/min perfundiert. Der Perfusionsdruck wurde kon-

tinuierlich bestimmt. Die Perfusionslösung und die Niere wurden bei einer Temperatur von 37° C gehalten.

### **3.2.5 Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-Massenspektrometrie)**

Die lyophilisierten Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie wurden in 5 µl bidestilliertes Wasser gelöst. Anschließend wurde 1,5 µl der UV-absorbierenden Desorptionsmatrix (Zimtsäure mit 50 Vol-% Wasser/50 Vol-% ACN gesättigt) auf die Oberfläche eines metallenen Probentellers pipettiert und dort mit 1,5 µl der Proben-Lösung versetzt. Die Probe wurde getrocknet und der Probenteller über die Vakuumschleuse in das Massenspektrometer eingesetzt. Die Desorption der Probenionen erfolgte durch Beschuss mit einem Laserstrahl bei 337 nm Wellenlänge und einer Energie von  $10^6$ - $10^7$  W/cm<sup>2</sup> bei einer kreisförmigen Bestrahlungsfläche von 50-100 µm Durchmesser.

### **3.2.6 Post-source-decay-Massenspektrometrie (PSD-MALDI)**

Die Probenvorbereitung für die Post-source-decay-Massenspektrometrie war identisch mit der Probenvorbereitung für die MALDI-Massenspektrometrie. Aliquots der Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie wurden lyophilisiert und der massenspektrometrischen Untersuchung zugeführt. Die Proben wurden in 5 µl Wasser gelöst. 1,5 µl der UV-absorbierenden Desorptionsmatrix (Zimtsäure) auf die Oberfläche eines metallenen Probentellers pipettiert und dort mit 1,5 µl der Proben-Lösung versetzt und anschließend zur Trocknung eingedampft. Für die Detektion wurde ein MALDI-RETOF (reflectron type time-of-flight)-Massenspektrometer mit zweistufiger Reflexion benutzt. Die Ionisation der Proben erfolgte mit einem Stickstofflaser (337 nm, 3 ns Pulsdauer). Für die Sequenzierung wurde eine Beschleunigungsspannung von  $U = 10$  kV und ein Druck von  $6-8 \times 10^{-7}$  bar gewählt. Es erfolgte eine Aufsummierung von 10-20 Spektren.

### 3.2.7 Elektrospray Ionisation (ESI-Massenspektrometrie)

Elektrospray Ionisations-Massenspektrometrie-Messungen wurden mit einem orthogonal gerichteten Beschleunigungs-time-of-flight Gerät durchgeführt. Zur Chromatographie wurde eine Kapillarsäule (0,3 mm x 100 m) verwendet, die mit einer stationären Phase mit nichtporösem C-18 beschichtet war. Als Eluent A diente 0,1 % ige wässrige Ameisensäure, als Eluent B 0,1 % ige Ameisensäure in Acetonitril. Die Kapillare der Elektrospray Ionisations-Massenspektrometrie wurde auf 190° C erhitzt. Stickstoff wurde sowohl als Vertrocknungsgas mit einer Flussrate von 350 l/min als auch als Verneblungsgas mit einer Flussrate von 10 l/min verwendet.

### 3.2.8 Inkubation von Lymphozyten mit Angiotensin II

Nach Isolierung von Lymphozyten wurde der Überstand mit  $10^{-6}$  mol/l Angiotensin II versetzt. Nach 0 min, 10 min, 30 min, 1 h und 3 h wurden Aliquots von dem Überstand abgenommen. Nach anschließender Chromatographie mit einem Kationenaustauscher und einer Reversed-Phase-Säule wurden die Fraktionen mittels MALDI-Massenspektrometrie analysiert. Der MALDI-Matrix wurde Adrenokortikotropes Hormon (ACTH,  $10^{-5}$  mol/l) als interner Standard hinzugefügt. Die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte mit den in Abschnitt 3.2.5 beschriebenen Bedingungen.

### 3.2.9 Denaturierung von Lymphozyten und Inkubation mit Angiotensin II

Lymphozyten wurden nach Abschnitt 3.2.1 isoliert. Anschließend wurden die Lymphozyten für 10 Minuten bei 100° C erhitzt. Der Lymphozytenüberstand wurde mit Angiotensin II versetzt und inkubiert. Nach definierten Zeitabständen wurden Proben abgenommen. Nach anschließender Chromatographie mit einem Kationenaustauscher und einer Reversed-Phase-Säule wurden die Fraktionen mittels MALDI-Massenspektrometrie analysiert. Zusätzlich wurde ein Versuch mit Perchlorsäure denaturierten Lymphozyten durchgeführt. Nach Isolierung von Lymphozyten wurde 0,6 mol Perchlorsäure hinzugefügt und der Überstand erneut

mit Angiotensin II versetzt. Die Lymphozyten wurden inkubiert und nach definierten Zeitabständen wurden Aliquots abgenommen. Nach anschließender Chromatographie mit einem Kationenaustauscher und einer Reversed-Phase-Säule wurden die Fraktionen mittels MALDI-Massenspektrometrie analysiert.

### **3.2.10 Zellkultur und Transfektionsmethoden**

HEK 293 Zellen wurden in Kulturflaschen aus mit Poly-L-Lysin beschichteten plastischem Material gezüchtet. Das Kulturmedium enthielt 10 % hitzeinaktiviertes Rinderserum, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml).  $5 \times 10^4$  HEK 293 Zellen wurden mit 250 ng Plasmid DNA und 2 ml Lipofectamin transfiziert und für 48 Stunden inkubiert.

### **3.2.11 Membranvorbereitung für die Rezeptor-Bindung**

HEK 293 wurden mit humanen AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptoren transfiziert. Die cDNA Verschlüsselung von humanen AT<sub>1</sub>(pcDNA3.AT I)- und AT<sub>1</sub> (pcDNA3.AT II)-Rezeptoren wurde von Tadashi Inagami (Department of Biochemistry, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA) zur Verfügung gestellt. HEK 293 Zellen, die entweder AT<sub>1</sub>- oder AT<sub>2</sub>-Rezeptoren exprimieren, wuchsen auf 100 mm großen Petrischalen. Nach zweimaligem Waschvorgang mit 5 ml Phosphatpuffer (PBS) (137 mmol/l NaCl; 2,7 mmol/l KCl; 1,5 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8,0 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4) wurde bei 400 g 10 Minuten zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde mit Tris-BAME-Puffer (50 mmol/l Tris; 0,15 mmol/l Bacitracin; 0,0015 % Aprotinin; 10 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol/l Ethylenglutaminsäure (EGTA); pH 7,3) resuspendiert. Die Suspension wurde mit einem Glas/Teflon-Rührstab homogenisiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 26.000 g. Das Pellet wurde mit Tris-BAME rehomogenisiert. Die Aliquots der resultierten Suspension wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -70° C aufbewahrt.

### 3.2.12 Angiotensin II-Rezeptoruntersuchungen

Die Membranen (5 µg) wurden in 200 µl Tris/BAME-Puffer in Gegenwart von 1 µmol/l  $^{125}\text{I}$ -Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>-Ang II beziehungsweise mit ansteigenden Konzentrationen ( $1^{-12}$  bis  $10^{-6}$  mol/l) des ungelabelten Liganden für 2 h bei 25° C im Wasserbad inkubiert. GF/C Filter wurden mit 0,1 % iger Polyethylenimin vorbehandelt. Nach der Inkubation wurden die Proben auf diese GF/C Filter übertragen und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Filter in 5 ml Gefäße verlegt und die Radioaktivität mit einem Szintillationsmesser bestimmt. Die Daten wurden mittels RadLig Software 4,0 (Cambridge, UK) analysiert.

### 3.2.13 Berechnung der Verdrängungskurven

Zur Bestimmung der AT-Rezeptor-Verdrängungskurven, wurde zunächst die nicht- spezifische Bindung in Gegenwart von 1 µmol/l Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>-Ang II bestimmt. Diese Werte wurden von den Werten der Bestimmungen der spezifischen Bindung subtrahiert.

### 3.2.14 Statistik

Sämtliche Daten sind  $\pm$  der Standardabweichung wiedergegeben. Der Vergleich der 100 % - Werte der Mittelwerte der Kontrollen der Bindungsversuche mit den Verdrängungsversuchen erfolgte unter Zuhilfenahme des Friedman-t-Tests.