

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

DISSERTATION

Erstellung eines Massenspektrometrie-basierten biostatistischen Modells
zur Identifizierung proteomischer Biomarkerkandidaten für die
Früherkennung der arteriellen Hypertonie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Hanna Schuster

aus Berlin

Datum der Promotion: 05. Juni 2016

Inhaltsverzeichnis

1. Abstrakt	1
2. Einleitung.....	3
2.1 Arterielle Hypertonie.....	3
2.1.1 Bedeutung der arteriellen Hypertonie	3
2.1.2 Klassifikation	3
2.1.3 Ursachen.....	4
2.1.5 Einfluss der arteriellen Hypertonie auf Gefäße	5
2.2 Atherosklerose	6
2.2.1 Risikofaktoren der Atherosklerose	6
2.2.2 Die Entwicklung der atherosklerotischen Plaque	7
2.2.3 Atherosklerose und Entzündung.....	8
2.3 Folgeerkrankungen der arteriellen Hypertonie und Atherosklerose	8
2.4 Biomarker.....	9
2.4.1 Biomarker für die arterielle Hypertonie.....	11
2.4.2 Aktueller Forschungsstand.....	11
2.5 Fragestellung	14
3. Material und Methodik	15
3.1 Material	15
3.1.1 Geräte	15
3.1.2 Chemikalien	16
3.1.3 Software.....	16
3.2 Methodik.....	17
3.2.1 Probandenbeschreibung	17
3.2.2 Plasmaisolierung und Deproteinierung	19
3.2.3 Reversed-Phase-Chromatographie	20
3.2.4 Lyophilisierung	21
3.2.5 Liquid Chromatography-Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie	21
3.2.6 Profile Analysis	22
3.2.7 Biostatistik.....	24
3.2.8 Substanzidentifizierung mittels MALDI Ultraflex TOF/TOF	25

4. Ergebnisse.....	26
4.1 Probandenbeschreibung	26
4.2 RP-Chromatographie	27
4.3 ESI-Massenspektrometrie	28
4.4 Profile Analysis.....	30
4.5 Biostatistik	32
4.6 Substanzidentifikation mittels MALDI Ultraflex TOF/TOF	35
5. Diskussion	38
5.1 Limitationen.....	47
5.2 Ausblick.....	48
6. Anhang	50
6. 1 Literaturverzeichnis	50
6.2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	60
6.2.1 Tabellenverzeichnis	60
6.2.2 Abbildungsverzeichnis	60
7. Abkürzungen	61
8. Eidesstattliche Versicherung	63
9. Lebenslauf	64
10. Danksagung	66

1. Abstrakt

Die essentielle arterielle Hypertonie ist die Ursache schwerwiegender Folgeerkrankungen, die weltweit die häufigsten Todesursachen darstellen. Dennoch gibt es derzeit keine proteomischen Biomarker zur Früherkennung oder Risikoeinschätzung dieser Erkrankung. Diese würden jedoch eine gezielte frühzeitige Therapie zur Verminderung der Risikofaktoren erlauben. Dadurch könnte das Auftreten von Folgeerkrankungen vermieden oder hinausgezögert werden.

Ziel dieser Dissertation war die Suche nach Biomarkerkandidaten für die arterielle Hypertonie. Diese Suche sollte auf der Grundlage eines biostatistischen Modells zur Unterscheidung von Probanden mit und ohne arterielle Hypertonie anhand von Plasmamerkmalen erfolgen. Hierzu wurden 121 Plasmaproben einer Fallgruppe mit arterieller Hypertonie und 82 Plasmaproben einer Kontrollgruppe biochemisch mittels Reversed-Phase-Chromatographie aufbereitet und ESI-massenspektrometrisch analysiert. Aus den resultierenden Daten wurde ein biostatistisches Modell entwickelt, das mit Hilfe von 22 Massensignalen den Fall- oder Kontrollstatus einer Probe vorhersagen konnte. Mittels MALDI-Massenspektrometrie wurden anschließend die Aminosäuresequenzen einiger der für das Modell relevanten Massensignale identifiziert. Nach Abgleich mit der Mascot-Datenbank konnte diesen Sequenzen jeweils ein Proteinkandidat zugeordnet werden. Die identifizierten, für das Modell relevanten Proteinkandidaten sind Mannose-6-Phosphat-Isomerase, Transkriptionsfaktor Dp-2, die regulatorische Untereinheit 1 der Phosphatidylinositol-3-Kinase, kardiales Phospholamban, Rab-13 und Prune Protein.

Die Ergebnisse dieser Dissertation sind die Grundlage für die Validierung der im biostatistischen Modell relevanten Massensignale als diagnostische Biomarkerkandidaten für die arterielle Hypertonie. Die noch nicht identifizierten Massensignale sollen in weiterführenden Studien mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie aufgearbeitet und Proteinkandidaten zugeordnet werden.

Abstract

Essential arterial hypertension is the cause of severe secondary diseases, which are the most frequent causes of death worldwide. Still, there are currently no proteomical biomarkers for early diagnosis or risk evaluation of this illness even though they would make a targeted therapy at an early stage possible. This, in turn, could prevent or delay the occurrence of secondary diseases.

The aim of this dissertation was the search for biomarker candidates for arterial hypertension. This was to be achieved on the basis of a biostatistical model for the distinction of test persons with and without arterial hypertension by plasmatic features. Therefore 121 plasmatic samples of a case group and 82 plasmatic samples of a control group were biochemically processed by reversed-phase chromatography and analysed by ESI-mass spectrometry. The resulting data was used to develop a biostatistical model which could predict the case or control status of a sample by using 22 mass signals. Afterwards, the amino acid sequences of some of the relevant mass signals of the model were identified via MALDI mass spectrometry. After comparing them with the Mascot Database, each of these sequences were able to be related to a protein candidate. The thus identified protein candidates relevant for the biostatistical model are mannose-6-phosphate isomerase, transcription factor dp-2, the regulatory subunit 1 of the phosphatidylinositol 3-kinase, cardiac phospholamban, rab-13 und prune protein.

The results of this dissertation are the basis for the validation of the relevant markers of the biostatistical model as diagnostic biomarker candidates for arterial hypertension. The mass signals which have not been identified yet have to be processed in other studies by gas chromatography - mass spectrometry in order to relate them to protein candidates afterwards.

2. Einleitung

2.1 Arterielle Hypertonie

2.1.1 Bedeutung der arteriellen Hypertonie

Die arterielle Hypertonie ist eine dauerhafte Erhöhung des arteriellen Blutdrucks. Weltweit waren 2008 über 40 % der Menschen älter als 25 Jahre an arterieller Hypertonie erkrankt¹. In Deutschland waren zwischen 2008 und 2011 etwa 20 Millionen, vor allem ältere Menschen, betroffen. Die Prävalenz bei den über 70-jährigen lag bei 66,5 %². Durch die demographische Entwicklung wird die Prävalenz der Erkrankung in Deutschland weiter steigen. Dies ist von Bedeutung, da die arterielle Hypertonie ein wichtiger Risikofaktor für Atherosklerose ist, auf deren Grundlage sich kardiovaskuläre Folgeerkrankungen wie koronare Herzkrankheit oder Schlaganfall entwickeln. Diese stellen die häufigste globale Todesursache dar. Im Jahr 2008 waren 30 % der Todesursachen weltweit kardiovaskulären Ursachen geschuldet¹. Etwa 7,4 Millionen Menschen starben 2012 an den Folgen der koronaren Herzkrankheit und 6,7 Millionen durch einen Schlaganfall³. Die Häufigkeit und die hohe Mortalität ihrer Folgeerkrankungen verdeutlichen die nationale, aber auch globale Bedeutung der arteriellen Hypertonie. Zwar wurde in den Industrieländern die Mortalität durch kardiovaskuläre Erkrankungen gesenkt², doch bleiben die hohen Kosten durch Arbeitsausfälle, medikamentöse Langzeittherapie, (gegebenenfalls interventioneller) Akuttherapie und unter Umständen sekundärer Pflegebedürftigkeit bestehen.

2.1.2 Klassifikation

Arterielle Hypertonie kann mit Hilfe der Weltgesundheitsorganisation (WHO)-Klassifikation von 1999 in verschiedene Grade eingeteilt werden, die in **Tabelle 1** dargestellt sind. Die Einordnung ist von Bedeutung für die Therapie und die Einschätzung des Risikos für Folgeerkrankungen. Gemäß den Leitlinien für das Management der arteriellen Hypertonie sind abhängig vom Grad der Hypertonie und dem Vorliegen zusätzlicher Risikofaktoren zunächst Änderungen des Lebensstils und gegebenenfalls eine medikamentöse Blutdrucksenkung erforderlich. Ziel der Therapie ist, abhängig von Alter und Nebenerkrankungen, in der Regel die Senkung des Blutdrucks auf Werte unter 140/90 mmHg⁴.

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der arteriellen Hypertonie⁴

Kategorie	Systolisch (mmHg)	Diastolisch (mmHg)
Optimal	< 120	< 80
Normal	120 – 129 und/oder	80 – 84
Hoch-normal	130 – 139 und/oder	85 – 89
Hypertonie Grad 1	140 – 159 und /oder	90 – 99
Hypertonie Grad 2	160 – 179 und/oder	100 – 109
Hypertonie Grad 3	≥ 180 und/oder	≥ 110
Isolierte systolische Hypertonie	≥ 140	< 90

2.1.3 Ursachen

Es werden zwei Formen der arteriellen Hypertonie unterschieden. Die primäre oder essentielle Hypertonie ist eine Ausschlussdiagnose ohne eindeutige Ursache. Neunzig Prozent der Patienten erkranken an dieser Hypertonieform. Sie ist multifaktoriell bedingt und abhängig von genetischer Prädisposition und Lebensstil. Den sekundären Hypertonieformen kann dagegen eine bestimmte Krankheitsursache, wie hormonproduzierende Tumore oder Veränderungen der Nierenarterie, zugeordnet werden. Die Therapie besteht in der Behandlung des ursächlichen Faktors⁵. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der primären Hypertonie.

Der Blutdruck wird durch das Herz-Minuten-Volumen (HMV) und den peripheren Gefäßwiderstand (TPR) bestimmt. Das HMV kann durch Zunahme des Blutvolumens, der Kontraktionskraft des Myokards und der Herzfrequenz gesteigert werden. Der periphere Gefäßwiderstand wird durch Vasokonstriktion und –dilatation der Widerstandsgefäße beeinflusst⁶. Diverse Faktoren wirken auf diese Stellgrößen ein. Zu einer Blutdrucksteigerung führen beispielsweise eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems oder des hormonellen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Beide erhöhen den TPR über Beeinflussung der Vasomotorik. Der Sympathikus führt zudem zu einem gesteigerten HMV, das RAAS zu einem vermehrten Blutvolumen über eine intensivierte Natriumretention⁷.

Die Entwicklung einer essentiellen Hypertonie kann durch verschiedenste genetische Polymorphismen begünstigt werden^{8,9}. Zum Beispiel können Genpolymorphismen zur sogenannten Salzsensitivität führen^{10,11}. Hier wird bei gesteigerter Kochsalzaufnahme das überflüssige Salz nicht ausreichend renal eliminiert. Dies führt unter anderem zur Aktivierung des sympathischen Nervensystems und zu Umbauvorgängen in arteriellen Gefäßen mit Einengung des Lumens. Insgesamt

ist ein erhöhter Blutdruck die Folge^{7,12}. Eine gesteigerte Sympathikusaktivität kann außerdem eine Folge chronischen Stresses wie langjähriger psychischer Belastung sein⁷. Auch Übergewicht ist ein Risikofaktor der essentiellen Hypertonie, wobei der Blutdruck linear mit dem Body Mass Index (BMI) steigt^{13,14}. Das vermehrte viszerale Fettgewebe führt zur renalen Natriumretention und das von den Fettzellen freigesetzte Leptin ist mit einer verstärkten Aktivierung von Sympathikus und RAAS assoziiert¹⁵⁻¹⁸. Eine Gewichtsabnahme kann wiederum eine Blutdrucksenkung bewirken¹⁹. Häufig gehen Übergewicht oder Adipositas mit einer Insulinresistenz einher, die ebenfalls eine Natriumretention verursachen kann^{20,21}. Zudem nimmt die vasodilatative Wirkung des Insulins ab, Einschränkungen der endothelialen Funktion sind die Folge^{22,23}.

Des Weiteren besteht ein Zusammenhang zwischen arterieller Hypertonie und entzündlichen Prozessen, wobei die Ursache-Wirkung-Beziehung unklar ist. Hypertone Patienten haben signifikant höhere Spiegel des akute-Phase-Proteins C-reaktives Protein (CrP) als gesunde Probanden²⁴. Dieses wird im klinischen Alltag als Entzündungsmarker genutzt. Inflammatorische Prozesse könnten eine Hypertonie fördern, indem sie die Endothelfunktion beeinträchtigen^{25,26}.

2.1.5 Einfluss der arteriellen Hypertonie auf Gefäße

Der systemische Blutdruck hat großen Einfluss auf das Gefäßendothel. Unter physiologischen Bedingungen ist das Endothel unter anderem an der Anpassung des Gefäßtonus beteiligt, hat einen gerinnungshemmenden und antientzündlichen Einfluss und wirkt der Anhaftung und Einwanderung von Entzündungszellen entgegen. Insgesamt hemmt es die Entstehung einer Atherosklerose²⁷. Chronisch erhöhter Blutdruck schränkt die Funktionalität des Endothels ein. Durch den Einfluss von Hormonen des RAAS wie Angiotensin II, die wichtige Mediatoren der arteriellen Hypertonie sind, aber auch dem vasokonstriktiven Faktor Endothelin-I, werden im Endothel vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet^{28,29}. Das entstehende Ungleichgewicht zwischen dem Vorliegen von ROS und ihrem Abbau durch Antioxidantien wird als oxidativer Stress bezeichnet. ROS akkumulieren und reagieren mit Vasodilatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) oder Prostacyclin, deren Wirkung so vermindert wird, oder auch mit Zellbestandteilen wie DNA oder Lipiden³⁰. Dabei werden im Verlauf auch Entzündungsmediatoren freigesetzt und die Leukozytenadhäsion an das Endothel begünstigt^{31,32}. Oxidativer Stress führt zu strukturellen

Gefäßveränderungen und insgesamt zu einer Verkleinerung des Gefäßlumens³³. Zusätzlich ist die Bildung und die vasomotorische Antwort auf Vasokonstriktoren verstärkt, während vasodilatative Substanzen vermehrt abgebaut werden, sodass ein lokal erhöhter Gefäßwiderstand resultiert. Die Lumeneinengung und der höhere Gefäßtonus vermindern die vaskuläre Reserve, also die Möglichkeit des Gefäßes, bei Bedarf den Blutfluss zu steigern. So verstärkt sich die Hypertonie zusätzlich³⁴. Diese Veränderungen der Gefäßfunktionalität werden als endotheliale Dysfunktion bezeichnet. Sie kann auch durch verminderte Scherkräfte bei verändertem Blutfluss entstehen³⁵. Insgesamt resultiert die endotheliale Dysfunktion in einem Verlust der antiatherosklerotischen Endothel Eigenschaften: Es liegt ein Ungleichgewicht der vasoaktiven Mediatoren mit vermehrtem Einfluss der Vasokonstriktoren vor. Angiotensin II führt zur verstärkten Expression des gerinnungsfördernden Gewebefaktors (tissue factor) und erhöht die Endothelpermeabilität für Lipoproteine durch vermehrte Rezeptorexpression^{36,37}. Die entzündliche Aktivität ist verstärkt, da eine verringerte NO-Bildung eine stärkere Expression von Bindungsproteinen für Leukozyten und Chemokine, die Entzündungszellen anlocken, bewirkt³¹. All diese Effekte fördern die Entwicklung einer Atherosklerose. Die Ursache-Wirkung-Beziehung zwischen arterieller Hypertonie und endothelialer Dysfunktion ist jedoch umstritten, wahrscheinlich führt jeweils der eine Zustand zu einer Verschlechterung des anderen³⁸.

2.2 Atherosklerose

2.2.1 Risikofaktoren der Atherosklerose

Zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Atherosklerose zählen die arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Rauchen und Hypercholesterinämie³⁹. Sie bewirken eine endotheliale Dysfunktion, vor allem über die Induktion oxidativen Stresses, die im Verlauf die Entstehung einer Atherosklerose fördert⁴⁰⁻⁴². Anhaltende Hyperglykämie führt etwa durch Veränderung von Proteinfunktionen durch Proteinglykierung u. a. zur Expression von Adhäsionsrezeptoren und kann so die inflammatorische Aktivität im Endothel verstärken⁴³. Hypercholesterinämie bewirkt über vermehrtes low-density-Lipoprotein (LDL) eine verminderte NO-Bildung⁴². Auch Rauchen induziert oxidativen Stress, zudem begünstigt es die Bildung oxidativ veränderten LDLs^{40,44}. Der Blutfluss selbst beeinflusst das Endothel über Scherkräfte,

die im Gefäßsystem verschieden ausgeprägt sind: In Gefäßen mit geradem Verlauf besteht eine laminare Strömung mit hohen Scherkräften, an Gefäßbifurkationen oder –kurven entstehen Turbulenzen mit niedrigen Scherkräften. Vor allem an letzteren Regionen sind atherosklerotische Läsionen nachzuweisen, da sich unter dem Einfluss geringer Scherkräfte eher eine endotheliale Dysfunktion entwickelt. Hohe Scherkräfte bewirken Genaktivierungen im Endothel, die zu einem antiatherosklerotischen Milieu führen^{35,45}.

2.2.2 Die Entwicklung der atherosklerotischen Plaque

Von der Atherosklerose betroffen sind vor allem die großen und mittleren muskulären Arterien⁴⁶. Es entstehen Veränderungen der Gefäßwand, initial durch das Eindringen cholesterinhaltiger LDL in das subendotheliale Bindegewebe. Diese werden dort durch Oxidation und enzymatische Reaktionen verändert⁴⁷. Die Endothelreaktion auf die abgelagerten Moleküle und anderweitige Stressoren, wie etwa verminderte Scherkräfte, besteht in der vermehrten Präsentation von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen⁴⁸. Diese begünstigen die Einwanderung von Leukozyten wie Monozyten in die Intima, die dort zu Makrophagen aktiviert werden. Über Scavengerrezeptoren phagozytieren diese die modifizierten LDL, können sie aber nicht abbauen^{49,50}. Es kommt zur Überladung der Makrophagen mit Lipiden und zu deren Umwandlung in Schaumzellen⁵¹.

Im weiteren Verlauf findet ein Wachstum der glatten Muskelzellschicht der Gefäßwand, der Media, statt, ausgelöst durch Chemokine aus den Schaumzellen. Die Muskelzellen wachsen von der Media in die Intima ein und synthetisieren vermehrt Proteoglykane und Kollagen^{52,53}. Die so entstehende atherosklerotische Plaque weist einen lipidgefüllten, weichen Kern mit nekrotischen Makrophagen auf, der von einer Hülle aus Bindegewebe und glatten Muskelzellen umgeben ist⁵⁴. Durch diese sogenannte *fibrous cap* wird die Plaque vom Gefäßlumen abgegrenzt^{55,56}. Eine Vergrößerung der Plaque, beispielsweise durch Vaskularisierung oder Einblutungen, führt mit fortschreitender Einengung des Gefäßlumens durch Minderperfusion des abhängigen Gewebes zu Beschwerden^{39,57,58}.

Die Ursache für plötzliche ischämische Ereignisse, wie Myokardinfarkt, ist die Plaqueruptur. Stehen der Auf- und Abbau der *fibrous cap* nicht im Gleichgewicht und überwiegt der Abbau, resultiert eine zunehmende Schwäche dieser Bindegewebshülle und die Plaque kann rupturieren⁵⁹. Die dabei freigelegten nekrotischen Plaqueanteile

wirken thrombogen. Durch die Anlagerung von Thrombozyten und den Anstoß der Gerinnungskaskade kann ein Gefäßverschluss hervorgerufen werden^{54,60}. Kalzifizierungen der Plaque können ebenfalls das Endothel und die Bindegewebsschichten schädigen und so thrombotische Reaktionen zur Folge haben⁵⁴.

2.2.3 Atherosklerose und Entzündung

Inflammatorische Prozesse sind ein wichtiger Aspekt der verschiedenen Stadien der Plaquebildung. Sowohl bei der initialen Zelleinwanderung, als auch bei der Plaquebildung, der Destabilisierung und Ruptur der Formation sind Bestandteile des Immunsystems beteiligt. Zu Beginn werden durch endotheliale Adhäsionsmoleküle T-Zellen und Monozyten gebunden und gelangen in die Intima⁴⁸. Anschließend fördern diese Immunzellen über die Bildung von Zytokinen wie Interferon- γ und Tumornekrosefaktor- β , aber auch Wachstumsfaktoren die Einwanderung glatter Muskelzellen⁶¹. Makrophagen, T-Zellen und glatte Muskelzellen exprimieren inflammatorische Zytokine, die zur anhaltenden Expression der Adhäsionsmoleküle an der Endotheloberfläche führen und so den Prozess der Immunzelleinwanderung und Muskelzellproliferation aufrecht erhalten⁶¹. Zudem synthetisieren Makrophagen Matrixmetalloproteasen, die die bindegewebige *fibrous cap* abbauen⁶². Interferon- γ aus T-Zellen unterdrückt die Kollagenproduktion der glatten Muskelzellen und verhindert so den Erhalt der stabilisierenden Bindegewebshülle⁶³. Diese Mechanismen führen zur Destabilisierung der Plaque und erhöhen das Rupturrisiko⁶⁴.

2.3 Folgeerkrankungen der arteriellen Hypertonie und Atherosklerose

Die arterielle Hypertonie beeinflusst verschiedene Organe in ihrer Funktionalität. Am Herzen bewirkt sie als Reaktion auf die chronisch erhöhte Nachlast eine Myokardhypertrophie, die durch Hormone des RAAS vorangetrieben wird⁶⁵. Im Verlauf erfolgt im Rahmen des sogenannten kardialen Remodelling eine zunehmende Fibrosierung des Myokards mit gleichzeitigen Strukturveränderungen kleiner kardialer Gefäße, deren Funktion beeinträchtigt wird^{66,67}. Dies kann zu einer verminderten Sauerstoffversorgung tieferer Myokardschichten führen. Myokardhypertrophie und -fibrosierung können nach langer Hochdrucksituation in diastolischer und systolischer Funktionseinschränkung mit chronischer Herzinsuffizienz resultieren⁶⁸⁻⁷⁰. Die genannten

Veränderungen begünstigen zudem das Auftreten von Herzrhythmusstörungen wie ventrikulären Arrhythmien⁷¹.

An Nierengefäßen führt die arterielle Hypertonie durch Wandverdickungen zur Verlängerung der Sauerstoffdiffusionsstrecke und so zur Minderversorgung des Gewebes⁷². In glomerulären Gefäßen resultieren Endothelschäden in einer vermehrten Proteinfiltration. Dies hat Bindegewebsablagerungen und Vernarbungen der Glomeruli sowie Tubulusschädigungen durch filtrierte Proteine zur Folge⁷³. Die Nierenfunktion kann so bis zum Nierenversagen beeinträchtigt werden.

An der Retina führt die arterielle Hypertonie zu einem Vasospasmus der Gefäße⁷⁴. Zudem treten neben atherosklerotischen Veränderungen auch Schädigungen der Blut-Retina-Schranke auf, die im Übertritt von Blutplasma in das retinale Gewebe sowie in Lipidablagerungen resultieren⁷⁵. Dies führt zur Minderversorgung der Netzhaut, zu Gesichtsfeldeinschränkungen und Visusverlust⁷⁶.

Atherosklerotische Veränderungen bewirken zunächst eine Stenosierung des Gefäßlumens und damit eine Minderversorgung des abhängigen Gewebes. Bei Verschluss eines Gefäßes durch Plaqueruptur oder –thrombosierung resultiert ein Infarkt mit Gewebnekrose⁴⁶. Klinisch relevant werden atherosklerotische Veränderungen zum Beispiel der Halsschlagadern, da diese zur Minderperfusion abhängiger Hirnareale führen oder auch Schlaganfälle durch Ablösung von Emboli zur Folge haben können⁵. Am Herzen führen atherosklerotische Veränderungen zur koronaren Herzkrankheit mit Angina pectoris- Symptomatik und, bei Plaqueruptur, zum Herzinfarkt. An peripheren Gefäßen, vor allem der Beine, kann die periphere arterielle Verschlusskrankheit entstehen, die durch Schmerzen beim Gehen, und im Verlauf auch mit chronischen Ulcera auffällt.

2.4 Biomarker

Der Begriff Biomarker ist eine Kurzform der Bezeichnung biologischer Marker. Eine erste Definition wurde 2001 durch eine Arbeitsgruppe des nationalen Gesundheitsinstituts der USA veröffentlicht. Danach ist ein Biomarker ein Merkmal, das „als Indikator normaler biologischer Prozesse, pathologischer Prozesse oder pharmakologischer Antworten auf eine therapeutische Intervention objektiv gemessen und evaluiert wird“⁷⁷. Ebenfalls 2001 publizierte die WHO gemeinsam mit dem Umweltprogramm der Vereinten Nationen und der Internationalen Arbeitsorganisation

eine Begriffserklärung, der zu Folge ein Biomarker eine Substanz, Struktur oder Prozess sei, „ der im Körper oder seinen Produkten messbar ist und das Auftreten von Folgen oder Erkrankungen beeinflusst oder vorhersagt“⁷⁸. Zu Biomarkern zählen solche Merkmale, die objektive, genaue und reproduzierbare Aussagen über biologische Prozesse und den medizinischen Zustand eines Patienten treffen. Dazu gehören Merkmale wie Herzfrequenz oder Blutdruck, aber auch Parameter der klinischen Chemie aus Blut, Urin oder Liquor und komplexere Analysemethoden zu Gewebemerkmale⁷⁹.

Verschiedene Biomarker können in unterschiedlichen Gebieten der medizinischen Praxis und Verlaufsstadien einer Erkrankung Anwendung finden. Sie dienen beispielsweise der Einschätzung des Risikos, eine bestimmte Erkrankung zu entwickeln oder werden in der Früherkennung eingesetzt. Zudem können sie zur Prognoseeinschätzung eines Krankheitsverlaufs verwendet werden, zur Vorhersage des Therapieansprechens und zur Kontrolle des Therapieverlaufs. Ebenso dienen sie der Früherkennung von Krankheitsrezidiven.⁸⁰

Biomarker tragen somit zu einer besseren Versorgung der Patienten bei, da gefährdete Personen oder Erkrankte bereits in frühen Stadien behandelt werden und so eventuell ungünstige Folgen vermieden werden können. Außerdem helfen sie bei der Entscheidung für oder gegen bestimmte Therapien, ermöglichen die Kontrolle des Therapieerfolgs und lassen eventuelle Rückfälle frühzeitig erkennen.

Zudem werden sie häufig als sogenannte Surrogatmarker in klinischen Interventionsstudien verwendet. Hier dienen sie als Ersatz für klinische Endpunkte. Studien können so schneller durchgeführt werden, da langfristige Endpunkte wie der Tod des Patienten, nicht abgewartet werden müssen. Zudem bleiben dem Patienten für ihn bedeutsame, aber eventuell unangenehme Endpunkte, wie zum Beispiel Knochenbrüche oder Schlaganfälle, erspart. Diese werden ersetzt durch Surrogatmarker wie die Knochendichte oder Bluthochdruck. Hierbei muss der Surrogatmarker reproduzierbar mit dem klinischen Endpunkt statistisch korrelieren, zudem sollte auf der Grundlage bisheriger Forschung eine Wahrscheinlichkeit bestehen, dass er diesen voraussagt^{77,81}.

Um als Biomarker diagnostisch Anwendung zu finden, sollte der dazugehörige Test möglichst genaue Ergebnisse liefern, kostengünstig sein und nur eine kleine Probenmenge benötigen, da für die Etablierung sehr viele Proben analysiert werden müssen. Biomarker, die in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden, sollten möglichst

spezifisch für das zu bewertende Funktionssystem sein. Sie sollten das untersuchte Kompartiment in detektierbaren Konzentrationen erreichen und dort eine ausreichende Halbwertszeit besitzen, die die Analyse im klinischen Alltag ermöglicht⁸². Zudem sollte sich die Funktionalität bzw. der Zustand eines Organs oder Gewebes sich in der Variabilität des ihm zugeordneten Biomarkers widerspiegeln.

2.4.1 Biomarker für die arterielle Hypertonie

Derzeit gibt es keine in der Praxis relevanten prognostischen plasmatischen Biomarker für die arterielle Hypertonie. Nur der Blutdruck kann gemessen und für Diagnostik und Therapiemonitoring genutzt werden. Die Erkennung eines Frühstadiums der arteriellen Hypertonie ohne eine Erhöhung des Blutdrucks ist nicht möglich. Jedoch gibt es einige Risikofaktoren, die die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie begünstigen können. Dazu gehören vermehrtes abdominelles Fettgewebe und Übergewicht, sowie die Dyslipidämie, also die verringerte Konzentration an *high-density* Lipoprotein (HDL) und vermehrtes Vorkommen von LDL, zudem erhöhte Plasmaglukose bei Diabetes mellitus und Rauchen. Diese Faktoren fördern die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion und Atherosklerose. Durch die Einschränkung der endothelialen Funktion mit vermehrter Vasokonstriktion sowie zunehmender Steifheit der Gefäße, nimmt der periphere Gefäßwiderstand zu und eine arterielle Hypertonie kann induziert werden^{83,84}.

2.4.2 Aktueller Forschungsstand

Zurzeit werden verschiedene Scores zur Prognose kardiovaskulärer Ereignisse verwendet, wie der SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation) der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie⁸⁵, der Framingham Risk Score⁸⁶ und der Procam-Score⁸⁷. Diese basieren auf den wichtigsten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Rauchen, höheres Alter und erhöhte Cholesterinwerte. Sie geben die Wahrscheinlichkeit an, mit der bei einem Patienten in den nächsten 10 Jahren Ereignisse wie Herzinfarkte, Schlaganfälle oder andere Symptome der Atherosklerose wie pAVK oder Stenosen der Carotisarterien auftreten werden.

Um die Vorhersagekraft dieser Scores zu verbessern werden bereits verschiedene Biomarkerkandidaten untersucht. Dazu gehören unter anderem Interleukine und das sogenannte *high-sensitivity* CrP (hsCrP) als Marker der mit der endothelialen

Dysfunktion oder Atherosklerose einhergehenden Entzündung. Die Konzentration von Interleukin-6 ist beispielsweise mit der Zunahme der atherosklerotischen Last assoziiert, sowie mit zunehmender Plaqueinstabilität^{88,89}. Das hsCrP spiegelt minimale Veränderungen des CrP wider, die sich in weit kleineren Konzentrationsbereichen abspielen als bei akuten, beispielsweise infektiösen Erkrankungen des Organismus. Es ist zwar ein unspezifischer Biomarker, konnte jedoch in Studien die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie in Probanden vorhersagen. Die inflammatorischen Prozesse an der Gefäßwand im Rahmen der endothelialen Dysfunktion und Atheroskleroseprogression werden hierin widerspiegelt^{90,91}. Des Weiteren wird die Eignung natriuretischer Peptide wie BNP oder ANP und ihrer Vorstufen geprüft. Diese scheinen vor allem zur Prognose der Herzinsuffizienz geeignet zu sein, hingen in einigen Studien aber auch mit dem Risiko für Herzinfarkte und Tod zusammen⁸⁹.

Die Myeloperoxidase ist ein von Neutrophilen und Makrophagen in Entzündungsmilieus freigesetztes Enzym, das bei koronarer Herzkrankheit und hier vor allem bei instabiler Angina pectoris und akutem Herzinfarkt vermehrt nachgewiesen werden kann⁹². Cystatin C ist ein Protein aus der Familie kompetitiver Inhibitoren lysosomaler Cysteinproteasen. Es wird derzeit vor allem als Biomarker für eine Verminderung der Nierenfunktion diskutiert. Scheinbar besteht jedoch auch ein Zusammenhang zwischen der Cystatin C-Konzentration und arterieller Hypertonie⁹³. Zudem sind hohe Cystatin C-Konzentrationen mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert⁹⁴. Eine Studie von Doganer et al. zeigte, dass bei koronarer Herzkrankheit, niedrigere Cystatin C-Spiegel vorliegen und diese bei akutem Herzinfarkt weiter sinken, sodass Cystatin C eventuell zur Vorhersage kardiovaskulärer Ereignisse beziehungsweise zur Einschätzung der atherosklerotischen Last genutzt werden könnte⁹⁵. Pentraxin-3 (PTX-3) wird nach Stimulation durch inflammatorische Zytokine unter anderem von Endothelzellen und Leukozyten produziert, sodass es möglicherweise als Biomarker eine endotheliale Dysfunktion widerspiegeln kann. Bei stabiler koronarer Herzkrankheit korreliert es mit der endothelialen Funktion⁹⁶. Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen atherosklerotischer Last und erhöhten PTX-3-Konzentrationen⁹⁵. Alles in allem verbessern diese Marker in Studien bisher die oben genannten Scores nur leicht⁹⁷. Zudem dienen sie vor allem der Vorhersage kardiovaskulärer Ereignisse und nicht dem Risiko, eine arterielle Hypertonie zu entwickeln. PTX-3 kommt möglicherweise als Biomarker für die endotheliale Dysfunktion, die unter anderem Folge der arteriellen Hypertonie ist, in Frage. Die

meisten der anderen oben genannten Substanzen weisen die Atherosklerose als Folgeerscheinung verschiedenster Risikofaktoren nach.

Neben dem Nachweis plasmatischer Substanzen gibt es verschiedene bildgebende Methoden, symptomlose Veränderungen des kardiovaskulären Systems nachzuweisen. Hierzu zählt beispielsweise die Messung koronarer Calciumablagerungen mittels CT. Diese sind assoziiert mit koronarer Herzkrankheit und können die Einordnung von Patienten in Risikogruppen mithilfe des Framingham Risk Score verbessern. Zurzeit wird die Messung für die Entscheidung verwendet, welche Patienten innerhalb dieser Risikogruppen einer intensivierten fettsenkenden Therapie bedürfen. Eine weit verbreitete Methode, die atherosklerotische Last zu analysieren, ist die Messung des Knöchel-Arm-Indexes (*ankle-brachial-Index*, ABI). Vor allem ein niedriger ABI ist mit dem Auftreten eines Myokardinfarkts oder dem Risiko, an kardiovaskulären Folgeerkrankungen zu sterben, assoziiert. Bei weniger ausgeprägter, subklinischer Atherosklerose ist die Methode für die Detektion jedoch nicht sensitiv genug⁹⁷.

2.5 Fragestellung

In der klinischen Praxis gibt es derzeit keine Möglichkeit das individuelle Risiko für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie beziehungsweise subklinische Frühstadien der Erkrankung einfach und schnell einzuschätzen. Die plasmatischen Biomarker, die derzeit zur Anwendung kommen, wie Troponin, dienen der Diagnose weit fortgeschrittener Krankheitsstadien. Auch die in der Forschung untersuchten Marker werden oft daraufhin untersucht, ob sie kardiovaskuläre Ereignisse wie Herzinfarkte oder Herzinsuffizienz vorhersagen können, die erst spät im Krankheitsverlauf auftreten. Ziel dieser Studie ist es, eine Grundlage für die Erforschung von Biomarkern zu legen, die das Risiko, eine arterielle Hypertonie zu entwickeln, früh anzeigen. In Zukunft könnte dann möglichst zeitig mit der Therapie und der Reduktion von Risikofaktoren begonnen werden, um schwerwiegende Folgeerkrankungen zu vermeiden oder ihr Auftreten zu vermindern.

Es soll ein biostatistisches Modell auf der Grundlage von massenspektrometrischen Daten entwickelt werden. Dieses Modell soll den Fall- oder Kontrollstatus einer Probe hinsichtlich der arteriellen Hypertonie vorhersagen können. Darüber hinaus soll mit der Identifizierung der dem Modell zugrundeliegenden Substanzen beziehungsweise Biomarkerkandidaten begonnen werden. In weitergehenden Studien muss die Identifizierung dann fortgeführt, die resultierenden Kandidaten weiter untersucht und ihre Eignung als Biomarker zur frühzeitigen Diagnose, Prognose und Therapieentscheidung geprüft werden.

3. Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Automatischer Hochleistungs- und automatischer Probengeber G1377A	Agilent, Deutschland
Drehschieber-Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH&Co KG, Deutschland
HCT ESI MS	Bruker, Deutschland
HPLC-Pumpe, BioLogic-Duo-Flow	BioRad, USA
Kapillar- Pumpe G1376A	Agilent, Deutschland
Kühlfalle, RCT, 4104, Refrigerated Vapor Trap	Thermo Electron Corporation
Kühlung, Unijet II, Refrigerated Aspirator	UniEquip, Deutschland
Leitfähigkeitsmessgerät, LF 39	WTW, Deutschland
Mehrwellenlängen Detektor G1365D	Agilent, Deutschland
Phiole, 2ml	Agilent, Deutschland
Phioleneinsatz 250 µl	Agilent, Deutschland
Phiolenschraubverschlüsse, blau, open top	Agilent, Deutschland
Phiolensepten, Silikon	Agilent, Deutschland
MALDI-Probenträger, MTP-AnchorChip 400/384	Bruker, Deutschland
Mikro Vacuum Degasser G1379B	Agilent, Deutschland
Mikrozentrifuge MC-13, amicon	Heraeus instruments GmbH, Deutschland
pH-Meter, inoLab, pH720	WTW, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Deutschland
Pipettenspitzen, Standard/Buck, Tips	Eppendorf AG, Deutschland
Reinstwasseranlage, Seralpur DELTA UF	ELGA LabWater, Deutschland
RPC-Säule Chromolith@Performance, RP-18e, 100-4,6mm	Merck KG, Deutschland
RPC-Säule, ZORBAX SB Aq 0.5*150, 5µm	Agilent, Deutschland
Thermostatisiereinheit des Probengebers G1330B	Agilent, Deutschland
Thermostatisierter Säulenraum G1316A	Agilent, Deutschland
UV-Detektor, Econo UV-Monitor,	BioRad, USA
Ultraflex III MALDI-TOF-MS	Bruker, Deutschland
Vakuumentrifuge, Univapo 150H	UniEquip GmbH, Deutschland
Vortexer, Combi-Spin	BioRad, USA
Zentrifuge, 4K15C	Sigma, Deutschland

3.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Angiotensin 1	Sigma Aldrich, USA
Azetonitril	Merck, Deutschland
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Fluka Chemie GmbH, Schweiz
Ethanol	Honeywell Burdick and Jackson, USA
Formylsäure	Sigma Aldrich, USA
Kaliumhydroxid	Merck, Deutschland
MSCal1-1KT-ProteoMassTMPeptide and Protein MALDI-MS Calibration Kit	Sigma Aldrich, USA
Optima® LC-MS-Wasser, W6-212 water	Fisher Scientific, USA
Perchlorsäure	Sigma Aldrich, USA
Sar-Angiotensin	Sigma Aldrich, USA
Triflouressigsäure	Sigma Aldrich, USA

3.1.3 Software

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Software

Software	Hersteller
BioTools 3.2	Bruker, Deutschland
Compass 4.0-Software	Bruker, Deutschland
Data.Analysis 4.0 Software	Bruker, Deutschland
Flex.Analysis Software	Bruker, Deutschland
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, USA
Mascot 2.2 Datenbank	Matrix Science, London, UK
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Corporation, USA

3.2 Methodik

Für die Studie wurden Plasmaproben von gesunden Probanden und hypertonen Patienten gesammelt. Diese Proben wurden aufbereitet und mittels liquider Chromatographie (LC)-Massenspektrometrie analysiert. Die Ergebnisse der Massenspektrometrie wurden statistisch ausgewertet. Hierbei wurde ein biostatistisches Modell entwickelt, dass mit Hilfe der massenspektrometrischen Signale gesunde von erkrankten Probanden unterscheiden konnte. Anschließend wurde mit der Identifikation der Signale begonnen, die von Relevanz für das biostatistische Modell waren. **Abbildung 1** zeigt schematisch den Ablauf der Arbeitsschritte, die im Rahmen der Dissertation durchgeführt wurden.

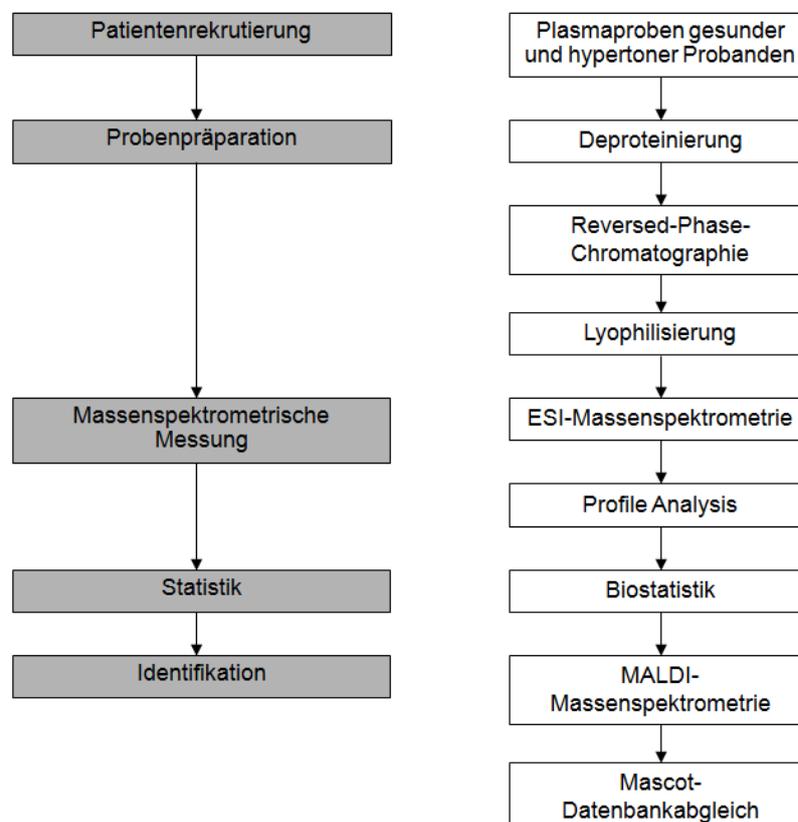


Abbildung 1: Übersicht über den Ablauf der Arbeitsschritte

3.2.1 Probandenbeschreibung

Diese Studie ist ein Teilprojekt des europäischen MASCARA-Programms. Dieses erfolgt in Zusammenarbeit von 15 Instituten aus ganz Europa und hat das Ziel, die Diagnosestellung kardiovaskulärer Erkrankungen und die Vorhersage kardiovaskulären

Risikos, zu verbessern. Die Proben für diese Dissertation wurden im Istituto Auxologico Italiano, Mailand, Italien, zusammengetragen, nachdem die örtliche Ethikkommission das Projekt genehmigt und die Probanden ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie abgegeben hatten. Die Proben entstammen der InGenious HyperCare Kohorte, die sich aus Patienten mit arterieller Hypertonie zusammensetzt. In der Kohorte sind 1925 Personen aus 460 Familien registriert. Die Einschlusskriterien für Indexpatienten waren folgende: Hypertonus vor dem 50. Lebensjahr, aktueller Blutdruck $\geq 160/95$ mmHg zu 2 verschiedenen Messzeitpunkten oder Therapie mit mindestens zwei antihypertensiven Medikamenten. Um auch die Familie in die Kohorte einzuschließen, musste ein weiteres Familienmitglied zu zwei verschiedenen Zeitpunkten einen Blutdruck oberhalb von 140/90 mmHg aufweisen oder mit mindestens einem antihypertensiven Medikament behandelt werden. Es galten die gleichen Altersvorgaben. Normotension war definiert als ein Blutdruck $< 140/90$ mmHg.

Es wurden folgende Untersuchungen zur Charakterisierung der Probanden durchgeführt: Der biochemische Parameter Kreatinin wurde mit handelsüblichen Analyseautomaten bestimmt. Die Körperoberfläche wurde mit der Dubois-Formel berechnet. Die kardialen Parameter linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser und Volumen, endsystolisches Volumen, Ejektionsfraktion, interventrikuläre Septumdicke und hintere Wanddicke in der Diastole wurden echokardiographisch bestimmt. Die linksventrikuläre Masse wurde mit der American Society of Echocardiography (ASE)-Formel berechnet und auf die Körperoberfläche (KOF) bzw. Größe mit dem Exponenten 2,7 normalisiert, um die linksventrikuläre Hypertrophie zu bestimmen. Eine linksventrikuläre Hypertrophie wurde diagnostiziert ab einer auf die Körperoberfläche normalisierten linksventrikulären Masse von ≥ 104 g/m² bei weiblichen und ≥ 116 g/m² bei männlichen Probanden. Die Auswertung der Echokardiographie und der 24 h-Blutdruckprotokolle fanden jeweils in einem Zentrum statt, um die Qualität zu sichern und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Die statistische Beschreibung der Fall- und Kontrollgruppe erfolgte mit dem Mittelwert \pm Standardfehler, die statistische Analyse mit dem t-Test für unabhängige Stichproben bzw. bei nominalskalierten Variablen mit dem exakten Fisher Test. Unterschiede zwischen den Stichproben wurden ab $p \leq 0,05$ als signifikant betrachtet.

3.2.2 Plasmaisolierung und Deproteinierung

Im Istituto Auxologico Italiano in Mailand, Italien, wurde den Probanden mit Hilfe eines peripheren Venenkatheters jeweils 2 ml peripher-venöses Vollblut entnommen und in handelsübliche EDTA- Vacutainer mit 18 mg K_2 -EDTA überführt. Die Proben wurden dann bei 2.500 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert, das Plasma isoliert und bei -20 °C eingefroren. Anschließend wurden die auf Trockeneis gefrorenen Plasmaproben nach Deutschland transportiert. Für die Deproteinierung wurden die Proben hier aufgetaut und für 1 min bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde isoliert, das Plasma weiterverwendet.

Den 400 µl Plasma wurden zwei interne Standards hinzugefügt. Diese dienen der Bestimmung der Verluste an Probenmaterial, die während der Präparation und Messung entstehen können. Für die 20 %-Elutionsstufe der Reverse Phase (RP)-Chromatographie wurde Sar-Angiotensin als interner Standard verwendet, für die 40 %-Elutionsstufe Angiotensin I. Die Standards wurden mit LC-MS-Wasser auf eine Konzentration von 1 µg/µl der Stammlösungen verdünnt. Jeweils 1 µl der Stammlösung, also je 1 µg beider Standards, wurde jeder Probe zusetzt. Es wurde je 1 µl der Stammlösung in Eppendorfgefäße pipettiert und bei -20 °C eingefroren, um damit später regelmäßig die Chromatographieanlage zu überprüfen. Dazu wurde der Inhalt von 5 dieser Eppendorfgefäße in 5 ml Ameisensäure aufgenommen, in die Schleife der HPLC-Anlage injiziert und mit dem unter RP-Chromatographie beschriebenen Gradienten von der Säule eluiert.

Den 400 µl Plasmaproben wurde unter Kühlung in einem Eisbad 26 µl 70% Perchlorsäure (PCA 70%) zugefügt. Anschließend wurden die Proben für 30 s mit dem Vortexer durchmischt und die Proteine für 2 min bei 4 °C und 8.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde unter Kühlung in einem Eisbad mit 26 µl 15 M Kaliumhydroxidlösung versetzt. Anschließend wurden die Proben für 30 s durchmischt und bei -80 °C eingefroren.

Direkt vor der chromatographischen Auftrennung wurden die Proben aufgetaut und bei 3.000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert, um das ausgefallene Kaliumperchlorat ($KClO_4$) abzutrennen. Nur der Überstand wurde anschließend für die Chromatographie verwendet.

3.2.3 Reversed-Phase-Chromatographie

Während der Reversed Phase (RP)-Chromatographie wurden die Proben entlang eines Lipophilitätsgradienten aufgetrennt und fraktioniert. Hierbei werden als flüssige Phase ein polarer Eluent A, ein unpolarer, organischer Eluent B und als stationäre Phase eine lipophile Säule verwendet. Vor allem die unpolaren Probenbestandteile, z. B. Peptide adsorbieren an der Säule. Anschließend werden steigende Konzentrationen des unpolaren Eluenten über die Säule gegeben. Bei hohem Anteil des Eluenten A lösen sich hydrophile Substanzen wie Salze, während bei steigendem Anteil des Eluenten B zunehmend lipophile Moleküle wie Peptide eluieren. Je nach angelegter Konzentration des Eluenten B eluieren Substanzen ähnlicher Eigenschaften zu bestimmten Retentionszeiten und können gemeinsam in Fraktionen gesammelt und weiter untersucht werden⁹⁸.

Als Eluent A wurde 0,2 % Ameisensäure, als Eluent B wurde 80 % Ethanol verwendet. Der pH-Wert von Eluent B wurde mit 150 µl 1 % Trifluoressigsäure (TFA) auf 5,6 eingestellt. Der pH-Wert beider Eluenten wurde vor Verwendung bestimmt.

Zunächst erfolgte die Äquilibrierung der Säule (Chromolith® Performance, RP-18e, 100-4,6 mm) mit Eluent A. Dann wurden die 400 µl der Probe in 5 ml 0,2 % Ameisensäure aufgenommen und in die Schleife der Anlage injiziert. Anschließend wurde die Säule mit Eluent A bei einer Flussrate von 1 ml/min mit der Probe beladen. Die Elution der gebundenen Plasmabestandteile von der Säule erfolgte mit dem in **Tabelle 5** beschriebenen Stufengradienten des Eluenten B.

Tabelle 5: Stufengradientenprogramm der RP-HPLC

Zeit min	Anteil am Elutionsvolumen	
	Eluent A %	Eluent B %
0-6,0	100	0
6,0-14,0	80	20
14,0-22,0	60	40
22,0-27,0	40	60
27,0-29,5	0	100
29,5-38,0	100	0

Während der Auftrennung wurde die Absorption kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Pro Gradientenstufe wurden 3 Fraktionen von je 2 bis 3 ml gesammelt, die während der Auftrennung auf 4 °C gekühlt wurden. Anschließend wurden die Fraktionen bei -80 °C eingefroren.

3.2.4 Lyophilisierung

In einer gekühlten Vakuumzentrifuge wurden die chromatographischen Fraktionen gefriergetrocknet. In einem ersten Schritt wurde nicht bis zur vollständigen Trocknung lyophilisiert, sodass die drei Fraktionen einer Gradientenstufe einer Probe in einem zweiten Schritt mit Hilfe einer Ethanolspülung zusammengefasst werden konnten. Anschließend erfolgte die endgültige Lyophilisierung.

3.2.5 Liquid Chromatography-Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie

Die lyophilisierten Proben wurden mittels Flüssigkeitschromatographie (LC)-Elektrosprayionisation (ESI) –Massenspektrometrie (MS) analysiert. Mit Hilfe des Massenspektrometers kann das Masse-Ladungsverhältnis (m/z) ionisierter Probenbestandteile bestimmt werden. Des Weiteren kann durch die Kopplung der massenspektrometrischen Detektion an die vorgeschaltete Chromatographie (LC-ESI-MS) ebenfalls eine Quantifizierung des Analyten erfolgen. Bei der LC-ESI-MS erfolgt zunächst die Auftrennung der Proben durch eine RP-Chromatographie. Danach werden die eluierten Probenbestandteile direkt in das Massenspektrometer weitergeleitet. Es folgt die Ionisation der Moleküle in der Lösung an der Ionenquelle durch ein anliegendes elektrisches Feld. Dieses führt zusammen mit zugeleitetem Stickstoff zur Zerstäubung der Lösung. Die vernebelte Lösung wird dann durch eine erhitzte Kapillare verdampft und erreicht den Massenanalysator. Hier werden die Ionen anhand ihrer Masse-Ladung-Verhältnisse aufgetrennt und zum Detektor transportiert, der die Signale verstärkt und an einen Computer weiterleitet^{98,99}.

Die lyophilisierten Proben wurden in 50 µl 0,1 % Ameisensäure resuspendiert. Anschließend wurden sie für 1 min bei 3.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Zur Analyse wurden 2 µl der jeweiligen Probe injiziert. In der, der massenspektrometrischen Messung vorgeschalteten RP-Chromatographie, wurden die Proben mittels eines linearen Gradienten aufgetrennt. Hierbei wurde 0,1 % Ameisensäure in LC-MS-Wasser

als Eluent A und 0,1 % Ameisensäure in Azetonitril als Eluent B verwendet. Eluent B wurde mit steigenden Konzentrationen über die Säule (ZORBAX SB Aq 0.5*150, 5 µm) gepumpt. Die Flussrate betrug 60 µl/min. Die Auftrennung erfolgte mittels des in **Tabelle 6** dargestellten linearen Gradienten.

Tabelle 6: Lineares Gradientenprogramm der der MS vorgeschalteten RP-HPLC

Zeit min	Anteil am Elutionsvolumen Eluent A %	Anteil am Elutionsvolumen Eluent B %
0-8,0	100-70	0-30
8,0-11,5	70-0	30-100
11,5-13,5	0	100
13,5-14,0	0-100	100-0
14,0-20,0	100	0

Es folgte die Analyse der aufgetrennten Proben mittels ESI-MS. Die Massenspektren wurden in einem Massenintervall von 100 bis 2.800 m/z bei einer Scan-Geschwindigkeit von 8.100 m/z in der Sekunde gemessen. Die Spannung an der Kapillare betrug 1.500-4.500 V. Zum Trocknen des Sprays wurden 8 l/min Stickstoff zugeführt. Der Vernebelungsdruck betrug 20 psi, die Temperatur zur Desolvatisierung an der Transferkapillare betrug 300 °C. Die Proben wurden im positiven Modus gemessen. Das Massenspektrometer arbeitete in hochauflösendem Modus (*enhanced wide*), um eine möglichst hohe Massenauflösung zu gewährleisten. Die Akkumulationszeit in der Ionenfalle wurde auf 200 ms eingestellt. Über einen Computer mit der integrierten Compass-4.0-Software erfolgte die Steuerung der Chromatographieanlage und des Massenspektrometers.

3.2.6 Profile Analysis

3.2.6.1 Selektion der Daten

Vor der eigentlichen statistischen Auswertung der Proben erfolgte zunächst eine grobe Selektion der Daten mit Hilfe der Data.Analysis-4.0-Software. Dies diente der Reduktion der Datenmenge sowie der Eliminierung von massenspektrometrischen Zufallssignalen. Bei dem Prozess handelt es sich um ein Kompromiss aus möglichst vielen massenspektrometrischen Signalen und einer ausreichenden Qualität der Daten.

In Vorversuchen wurden deshalb die Einstellungen für die Signal-zu-Rausch-Schwelle (S/N-Schwelle) und die Korrelationskoeffizientenschwelle ermittelt, um falsch-positive Ergebnisse in den anschließenden Probemessungen zu vermeiden.

Des Weiteren wurde festgelegt, dass sich ein Signal bzw. Peak über mindestens 10 aufeinanderfolgende Spektren einer Probe erstrecken muss, um als solcher erkannt zu werden. Dies entspricht der Mindestdauer eines Signals (*Minimum compound length*). Die Glättungsbreite (*Smoothing width*) wurde auf 2 gesetzt, um die Fragmentierung eines Signals in mehrere Peaks durch das Programm zu vermeiden. Zudem wurde eine Option ausgewählt, die die Peaks zusätzlich glättet.

3.1.6.2 Simplifikation der Daten

Da es sich bei den massenspektrometrischen Daten um eine sehr große und dreidimensionale Datenmenge handelt, wurde diese vor der statistischen Analyse mit Hilfe von sogenanntem Bucketing simplifiziert. Die drei Dimensionen sind die Intensität, das Masse-Ladung-Verhältnis und die Retentionszeit. Die dreidimensionalen Daten werden beim Bucketing in zwei Dimensionen übertragen, die dann zur Visualisierung in einer sogenannten Buckettabelle dargestellt werden. In dieser Tabelle entspricht jedes Feld (*Bucket*) einem erkannten Signal. Jedes Signal wird über seine Masse und Retentionszeit definiert, dies entspricht der ersten Dimension. Darüber hinaus wird als zweite Dimension mit Farben die Signalintensität dargestellt. Für die Tabelle wurde ein Retentionszeitbereich von 0,7 min bis 12 min und ein Massenbereich von 100 m/z bis 1.500 m/z ausgewählt. Signale außerhalb dieser Bereiche wurden nicht berücksichtigt. Ein Feld (*Bucket*) schließt einen Retentionszeitbereich von 0,3 min und einen Massenbereich von maximal 0,3 Da ein, um kleinere Verschiebungen zwischen den Proben auszugleichen und Signale gleichen Ursprungs nicht verschiedenen Feldern zuzuordnen.

Anschließend wurden die Werte auf den internen Standard der jeweiligen Elutionsstufe normalisiert, um Materialverluste und dadurch Unterschiede in den Signalintensitäten rechnerisch auszugleichen. Die Tabellen der Proben wurden anschließend für die Auswertung durch die Biostatistik verwendet.

3.2.7 Biostatistik

Die biostatistischen Algorithmen wurden bei Ao. Univ. Prof. Dr. Georg Heinze am Zentrum für medizinische Statistik, Informatik und intelligente Systeme, Institut für Klinische Biometrie der Medizinischen Universität Wien entwickelt. Dort wurden die MS-Signale zunächst gefiltert. Signale, die in weniger als 16,7% aller Proben vertreten waren, wurden nicht verwendet. Die Variabilität dieser Signale in den Proben reicht nicht aus, um den Fall- oder Kontrollstatus zu bestimmen. Anschließend wurde jeder Intensitätswert eines Massensignals in 2 Komponenten geteilt: X ist \log_2 des normalisierten Intensitätswertes, wenn ein Massensignal detektiert wurde oder 0; D ist 1, wenn ein Massensignal detektiert wurde oder 0.

Die Auswahl der Massensignale erfolgte auf Basis der LASSO logistic regression¹⁰⁰, wobei nur X als Prädiktor genutzt wurde. Für jedes Massensignal wurden die 0-Werte auf einen bestimmten Wert gesetzt. Dieser wurde definiert als der kleinste gefundene nicht-0-Wert X dieses Massensignals minus einer globalen Konstanten d, die über eine Vergleichsprüfung optimiert wurde. Nach der Signalauswahl wurde das Modell mit den X- und D-Komponenten für jedes Massensignal überarbeitet. Hierbei wurde *ridge regression* angewendet und der Lambda-Parameter, der der Stabilisierung der Regressionsparameter dient, wurde mit einer Vergleichsprüfung eingestellt.

Anschließend erfolgte eine zweite Massensignalauswahl. Hierfür wurden sämtliche in der Planungsphase des ersten Modells ausgewählten Massensignale entfernt und ein Vorhersagemodell neu berechnet.

Die Methode wurde mehrfach wiederholt, um auf diese Weise vergleichsgeprüfte lineare Vorhersagewerte zu erhalten. Bei jedem Durchlauf wurde eine Probe weggelassen und mit dem dabei erstellten Modell der Vorhersagewert für diese ausgeschlossene Probe berechnet. Die vergleichsgeprüften linearen Vorhersagewerte der Fälle und Kontrollen wurden verglichen und die Überschneidung mit Hilfe des Raumes unter der ROC (*receiver operating characteristic*) Statistik beschrieben. Die Gesamtaussagekraft des Modells wurde auch eingeschätzt, indem die Fall- oder Kontroll-Zugehörigkeiten vertauscht, der Prozess der Modellentwicklung erneut durchlaufen und ein globaler p-Wert als die Anzahl an Zeitpunkten definiert wurde, bei denen ein besseres Modell entstand als das ursprüngliche. Dieser p-Wert testet die Nullhypothese dafür, dass kein Massensignal eine Vorhersage ermöglicht.

Die Gesamtleistung des Modells wurde mit einem pseudo R^2 -Wert eingeschätzt. Dieser beschreibt das Ausmaß, mit dem der Fall- bzw. Kontrollstatus durch die für das Vorhersagemodell ausgewählten Massensignale bestimmt wird. Es wurde der Einfluss jedes einzelnen Massensignals eingeschätzt, indem ein partielles pseudo R^2 berechnet wurde. Dieses wurde definiert als das Abfallen von R^2 durch Überprüfen des Modells unter Ausschluss dieses Massensignals.

3.2.8 Substanzidentifizierung mittels MALDI Ultraflex TOF/TOF

Mittels matrix assistance laser desorptions/ionisation-(MALDI)-Massenspektrometrie wurde begonnen, jene Massensignale aus der ESI-Massenspektrometrie zu analysieren, die im biostatistischen Modell zur Unterscheidung der Fall-oder Kontroll-Zugehörigkeit beitrugen. Um die zugrunde liegenden Substanzen zu identifizieren, wurden sie fragmentiert. Peptide können an verschiedenen Stellen ihrer molekularen Bindungen brechen. Je nach Ort der Bruchstelle werden die Fragmente als a-, b-, c- und x-, y-, oder z-Fragmente bezeichnet. Oft brechen Peptide an ihren Amidbindungen. Dabei entstehen zwei Aminosäureketten: das aminoternale Fragment, das als b-Ion bezeichnet wird, wenn es geladen ist und das carboxy-terminale Fragment, das als y-Ion bezeichnet wird, wenn es eine Ladung trägt. Jedes Fragment wird mit einer Zahl versehen, die beschreibt, wie viele Aminosäurereste es enthält. Massenunterschiede zwischen Fragmenten entsprechen einer oder mehreren Aminosäuren¹⁰¹.

Für die Identifikation wurden Proben, in denen entscheidende Massensignale detektiert wurden, mit LC-MS-Wasser auf 1:21 verdünnt. Auf einen Spot des MALDI-Tellers wurden 1 μ l 20 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure und 1 μ l der verdünnten Probe pipettiert. Die Kalibrierung des Massenspektrometers erfolgte mit dem MSCal1-1KT-ProteoMassTMPeptide and Protein MALDI-MS Calibration Kit, das entsprechend der Anleitung verwendet wurde.

Analysiert wurden die Proben in einem Massenbereich von 40 - 4.500 m/z. Die Laserenergie betrug 70 - 80 kJ. Zunächst wurde im Vollspektrummodus ein Massenspektrum erzeugt. Im anschließenden LIFT-Modus wurde dann ein MS/MS-Spektrum der entsprechenden Muttermassen aufgenommen. Die resultierenden Massensignale der einzelnen Fragmente wurden mittels BioTools 3.2 von Bruker, Germany markiert. Die Mascot 2.2 Datenbank wurde genutzt, um die generierten Daten mit Peptidmassen aus der Datenbank zu vergleichen und zu identifizieren.

4. Ergebnisse

4.1 Probandenbeschreibung

Die klinische Charakterisierung der Probanden ist in **Tabelle 7** dargestellt. Unterschiede zwischen den Stichproben wurden ab $p \leq 0,05$ als signifikant betrachtet.

Tabelle 7: Klinische und biochemische Charakteristika der Fall- und Kontrollgruppe (dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler)

Parameter	gesunde Kontrollgruppe	erkrankte Fallgruppe	Signifikanz p
Alter, Jahre	37 \pm 1	56 \pm 1	<0,0001
Geschlecht, m/w	44/38	62/59	n. s.
Hypertonus, ja/nein	0/82	118/3	<0,0001
D. mellitus, ja/nein	0/82	12/108	0,0018
Koronare Herzkrankheit, ja/nein	0/82	9/112	0,0118
Myokardinfarkt, ja/nein	0/82	6/115	n. s.
Herzinsuffizienz, ja/nein	0/82	0/121	
Größe, cm	171 \pm 1	169 \pm 1	n. s.
Gewicht, kg	76,7 \pm 1,5	87 \pm 1,5	<0,0001
BMI, kg/m ²	26,3 \pm 0,5	30,5 \pm 0,5	<0,0001
Körperoberfläche, m ²	1,89 \pm 0,02	1,97 \pm 0,02	0,0031
systol. Blutdruck, mmHg	131 \pm 2	150 \pm 2	<0,0001
diastol. Blutdruck, mmHg	80 \pm 1	88 \pm 1	<0,0001
Herzfrequenz, Schläge/min	70 \pm 1	69 \pm 1	n. s.
Kreatinin, μ mol/l	72,8 \pm 1,2	79,2 \pm 2,5	0,0435
linksventrikuläre Hyper- trophie_KOF, ja/nein	5/77	37/84	<0,0001
linksventrikulärer enddiastol. Durchmesser, mm	47,2 \pm 0,6	48 \pm 0,5	n. s.
interventrikuläre Septumdicke (Diastole), mm	9,4 \pm 0,2	10,9 \pm 0,2	<0,0001
hintere Wanddicke (Diastole), mm	9,3 \pm 0,1	10,5 \pm 0,2	<0,0001
Linksventrikuläres enddiastol. Volumen, ml	103,8 \pm 3,6	112 \pm 5	n. s.
linksventrikuläres endsystol. Volumen, ml	38,1 \pm 1,4	43,6 \pm 2,6	n. s.
Ejektionsfraktion, %	63,6 \pm 0,7	62,4 \pm 0,7	n. s.
linksventrikuläre Masse, g	153,1 \pm 4,2	190,5 \pm 5,2	<0,0001
linksventrikuläre Masseindex_KOF, g/m ²	80,7 \pm 1,7	96,3 \pm 2,3	<0,0001
Linksventrikuläre Masseindex_Größe, g/m ^{2,7}	35,8 \pm 0,8	46,3 \pm 1,2	<0,0001

Die statistisch ausgewertete Fallgruppe dieser Arbeit schloss 121 Probanden ein, von denen 118 an arterieller Hypertonie, 12 an Diabetes mellitus, 9 an koronarer Herzkrankheit erkrankt waren und 6 bereits einen Myokardinfarkt hatten. Die Kontrollgruppe bestand aus 82 gesunden Probanden.

4.2 RP-Chromatographie

Die deproteinisierten Plasmaproben wurden mittels RP-Chromatographie entsalzt, aufgereinigt und nach ihren hydro- bzw. lipophilen Eigenschaften fraktioniert. Ein charakteristisches Chromatogramm einer aufgetrennten Probe ist in **Abbildung 2** dargestellt. Es zeigt einen UV-Absorptionspeak bei einer Retentionszeit von ca. 9,32 min, der mit dem Pfeil 1 gekennzeichnet ist. Weitere kleine UV-Absorptionssignale sind bei 10,32 min (Pfeil 2), 16,97 min (Pfeil 3), 17,23 min (Pfeil 4) sowie 19,14 min (Pfeil 5) zu sehen. Bei einer Retentionszeit von 25,79 min erscheint nochmals ein UV-Absorptionspeak (Pfeil 6), ebenso nach 32,5 min (Pfeil 7). Der Anteil des Eluent B, also Ethanol, am Elutionsvolumen ist dargestellt. In den ersten 6 min der Chromatographie ist kein Eluent B im Elutionsvolumen enthalten. Ab der Retentionszeit von 6,0 min beträgt der Anteil 20 %, ab 14,0 min 40 % und ab 22,0 min 60 %. Zwischen der Retentionszeit von 27,0 min bis 29,5 min besteht das Elutionsvolumen zu 100 % aus Eluent B. Danach liegt der Anteil bis zur Retentionszeit von 38,0 min bei 0%.

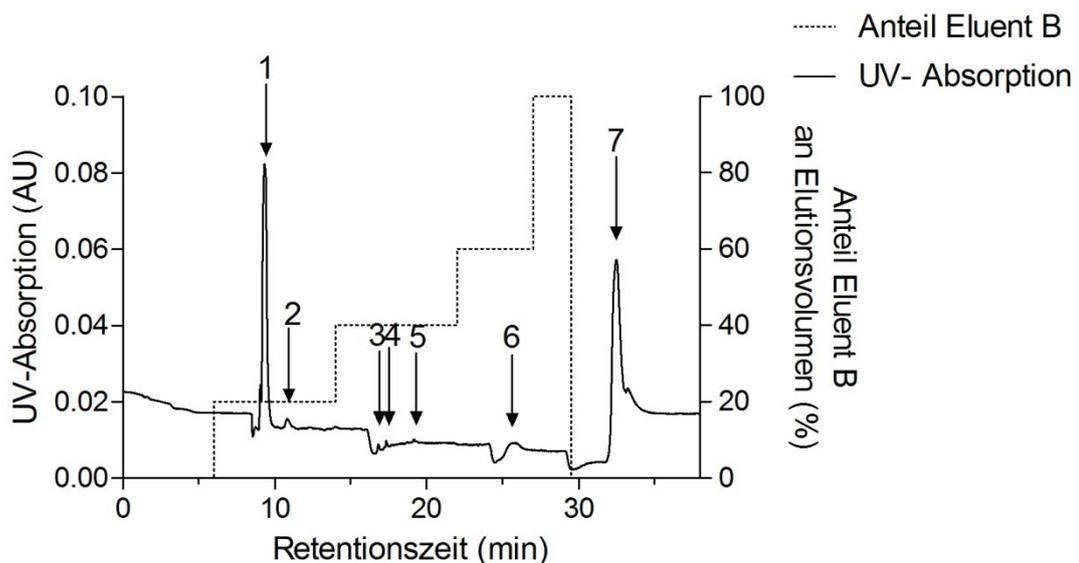


Abbildung 2: Repräsentatives Chromatogramm der RP-HPLC

Die Fraktionen der 20%-Elutionsstufe von Eluent B, die im Retentionszeitbereich von 6 min bis 15 min entstanden, wurden zusammengefasst, ebenso die Fraktionen der 40%-Elutionsstufe aus dem Retentionszeitbereich von 15 min bis 24 min. Die zusammengefassten und gefriergetrockneten Proben wurden anschließend massenspektrometrisch gemessen.

4.3 ESI-Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Analyse wurde je ein Aliquot der resuspendierten Fraktionen injiziert und zunächst noch einmal durch eine, dem Massenspektrometer vorgeschaltete, RP-Chromatographie aufgetrennt. Anschließend wurden die aufgetrennten Substanzen einer Fraktion in das Massenspektrometer überführt und analysiert. In **Abbildung 3** ist das Basispeak-Chromatogramm einer repräsentativen Probe dargestellt. Es zeigt, wann im Verlauf der Messung einer Probe, Peaks mit welcher Intensität detektiert wurden. Es stellt somit eine Übersicht der massenspektrometrischen Analyse einer Probe dar.

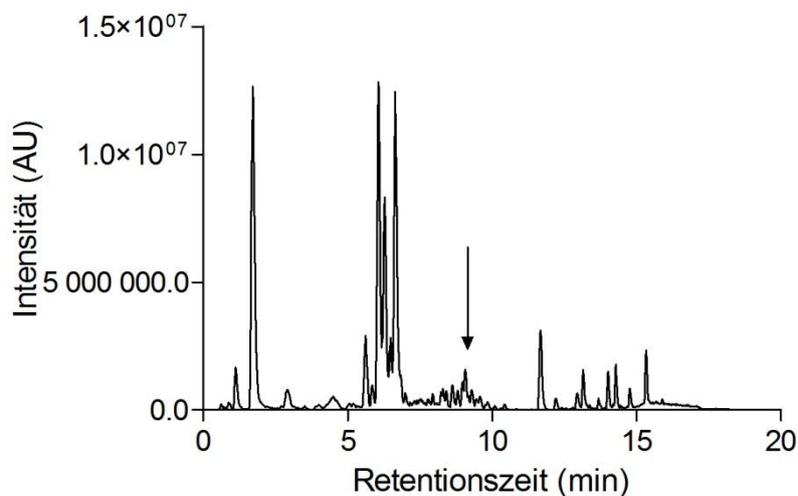


Abbildung 3: Basispeak-Chromatogramm der 20 %-Fraktion der präparativen RP- HPLC

Aus dem Basispeak-Chromatogramm können Informationen über einzelne Analyten aus dem gesamten Datenmaterial einer Probe herausgefiltert und jeweils in weiteren, sogenannten extrahierten-Ionen-Chromatogrammen dargestellt werden. Dies soll im Folgenden am Massensignal $358,23 \text{ m/z}$ beispielhaft demonstriert werden. Der pfeilmarkierte Peak in **Abbildung 3** ist als extrahiertes Ionenchromatogramm in

Abbildung 4 dargestellt. Der Peak hier entspricht dem Massensignal 358,23 m/z. Das extrahierte Ionen-Chromatogramm gibt an, zu welchen Retentionszeiten dieses Massensignal detektiert wurde. Der mit einem Pfeil markierte Hauptintensitätspeak liegt bei einer Retentionszeit von 9,08 min mit einer Intensität von 1.656.786. Ein weiteres Signal wird mit einer Intensität von 425.119 bei 9,45 min detektiert.

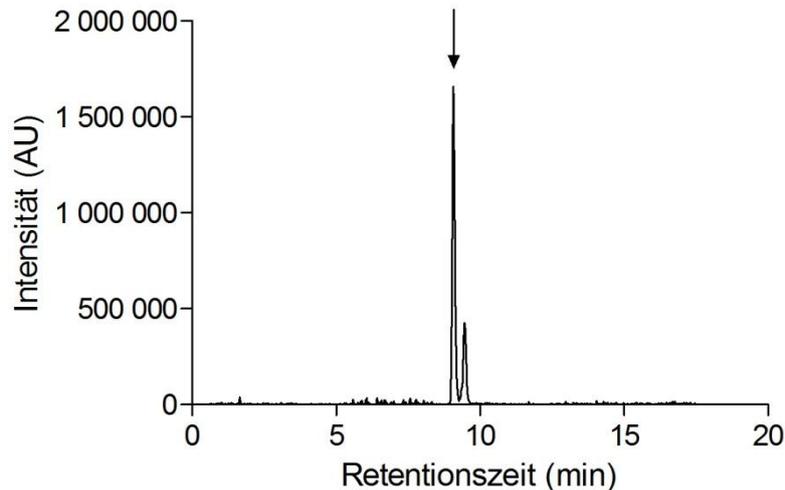


Abbildung 4: Extrahiertes-Ionen-Chromatogramm von 358,23 m/z

Darüber hinaus kann in einem Massenspektrum dargestellt werden, welche Massensignale die gleiche Retentionszeit haben. In **Abbildung 5** ist dies für die Retentionszeit von 9,08 min dargestellt. Der pfeilmarkierte Peak entspricht dem Massensignal 358,23 m/z mit einer Signalintensität von 321.788. Die Peaks geringerer Intensität entsprechen Bruchstücken der Substanz dieses Massensignals oder ihren Isotopen.

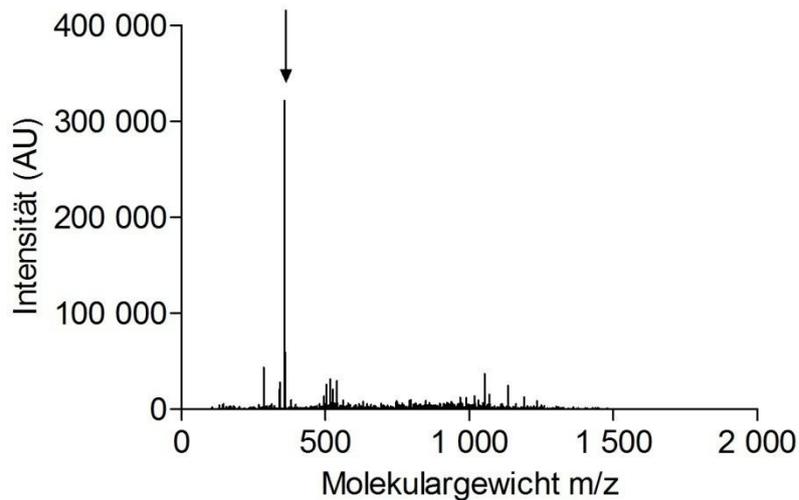


Abbildung 5: Massenspektrum bei der Retentionszeit von 9,08 min

Sowohl die 20 %- als auch die 40 %- Elutionsstufe der RP-Chromatographie wurde massenspektrometrisch analysiert. Die Analyse der 40 % Proben ergaben jedoch lediglich Signale geringer Intensität, sodass nur die Daten der 20 %-Elutionsstufe in der Profile Analysis und der biostatistischen Analyse berücksichtigt wurden.

4.4 Profile Analysis

Während der Profile Analysis werden Parameter angewandt, um Störsignale von Massensignalen bzw. Peaks zu unterscheiden. Hierfür müssen Einstellungen vorgenommen werden, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Nach der Durchführung von Vorversuchen wurde die S/N- Schwelle, die festlegt, um welchen Faktor die Intensität eines Signals die Intensität des Grundrauschens übertreffen muss, auf 3 gesetzt. Die Korrelationskoeffizienten-Schwelle, für die Abgrenzung einzelner Isotope voneinander, wurde auf 0,7 eingestellt.

Anschließend werden Signale, die in einer Probe detektiert wurden, im sogenannten *Density view* dargestellt. In **Abbildung 6** ist ein Ausschnitt aus diesem Diagramm gezeigt. Hier entspricht die Abszisse der Retentionszeit in Minuten und die Ordinate dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis in m/z. Die Intensität des Signals wird über die Farbgebung dargestellt. Die blauen Markierungen spiegeln Masse-zu-Ladung-Verhältnisse bzw. Massensignale wider, die in dieser Probe detektiert wurden. Mit dieser Darstellung der Daten wird die Qualität der Profile Analysis, also die richtige Anwendung der Parameter zur Datenselektion, untersucht. So müssen als Zeichen für

die Güte der Datenselektion, Isotope mit einem Abstand von 1 m/z zueinander abgebildet sein. Beispielhaft wurde das bereits genannte Massensignal von 358,23 m/z und dessen Isotope markiert, die bei einer Retentionszeit von 9,08 min gemessen wurden.

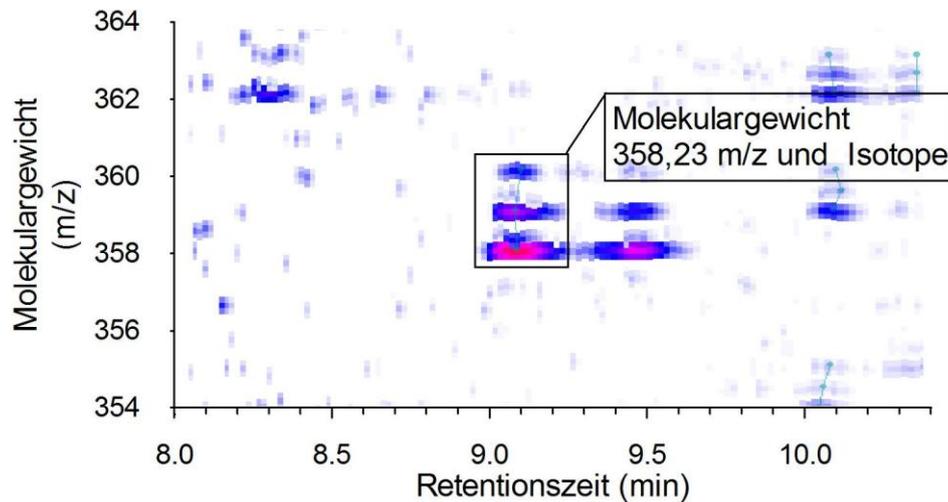


Abbildung 6: Repräsentativer Ausschnitt des *Density views* mit beispielhafter Isotopenmarkierung

Jedes Signal ist charakterisiert durch die 3 Dimensionen Masse-Ladung-Verhältnis, Retentionszeit und Intensität. Für die biostatistische Auswertung ist es sinnvoll, die Parameter in sogenannten Buckettabellen anzuordnen. Dabei wird jedem Signal einer Probe ein Bucket, bestehend aus Retentionszeit und Masse-Ladung-Verhältnis zugeordnet. Alle 12.926 durch die Profile Analysis erkannten Signale aller Proben wurden mit ihrem entsprechenden Bucket in die erste Spalte der Buckettabelle eingetragen. Die weiteren Spalten entsprechen den einzelnen Proben und geben an, ob und mit welcher Intensität dieses Signal in jeder einzelnen Probe detektiert wurde. In **Tabelle 8** ist ein beispielhafter Ausschnitt dieser Buckettabelle dargestellt. Die erste Spalte gibt 3 ausgewählte Signale wieder, wobei das dritte Signal dem internen Standard zugeordnet ist. Die 3 letzten Spalten entsprechen 3 Proben. Zu jedem gegebenem Massensignal werden die in den Proben gemessenen Intensitäten eingetragen, wobei eine Intensität von Null die Abwesenheit des Massensignals in der Probe wiedergibt. Der interne Standard in Zeile 3 konnte dagegen in allen Proben nachgewiesen werden. Die massenspektrometrischen Daten wurden der Biostatistik in dieser Form zur Verfügung gestellt.

Tabelle 8: Repräsentativer Ausschnitt aus der Buckettabelle zur Darstellung der detektierten Signale je Probe

Massensignal	Probe 1	Probe 2	Probe 3
1,8 min...956,08 m/z	0	41.146	0
6,7 min...956,44 m/z	0	0	981.993
6,1 min...956,6 m/z	23.916.804	23.916.804	23.916.804

4.5 Biostatistik

Die für die biostatistischen Berechnungen verwendeten Daten stammten von 203 Proben mit insgesamt 12.926 Massensignalen. Zunächst wurden die 12.926 Massensignale gefiltert. Hierbei wurden Signale, die in weniger als 16,7% aller Proben vertreten waren verworfen, da angenommen wurde, dass ihre Variabilität für die Vorhersage des Fall-/Kontrollstatus nicht ausreichen würde. Von den 12.926 Massensignalen waren 403 in mehr als 16,7% der Proben nachweisbar. Diese 403 Signale wurden für die biostatistische Berechnung herangezogen. Ein Massensignal ist hier definiert durch sein Masse-Ladung-Verhältnis und Retentionszeit. Es konnten 22 Massensignale bestimmt werden, die eine Vorhersage hinsichtlich der Zugehörigkeit eines Probanden zur Fall- oder Kontrollgruppe ermöglichen. Diese Prädiktoren sind in der linken Spalte von **Abbildung 7** aufgelistet. Hier wird zudem jedem Signal der Koeffizient *Nonzero vs. Zero* zugeordnet, dessen Wert für das jeweilige Signal der Abszissenachse entnommen werden kann. Bei dieser Achse handelt es sich um eine logit-Skala (*log of odds*). Der *Nonzero vs. Zero*-Koeffizient in dieser Abbildung entspricht dem Einfluss der D-Komponente des Signals in der Vorhersageformel und vergleicht den durchschnittlichen Intensitätswert des Signals mit den nicht vorhandenen Intensitäten. Beispielhaft soll ausgeführt werden, dass für das Massensignal mit der Retentionszeit von 8,1 min und dem Masse-Ladung-Verhältnis von 344,21 m/z der *Nonzero vs. Zero*-Koeffizient ca. -0,85 beträgt.

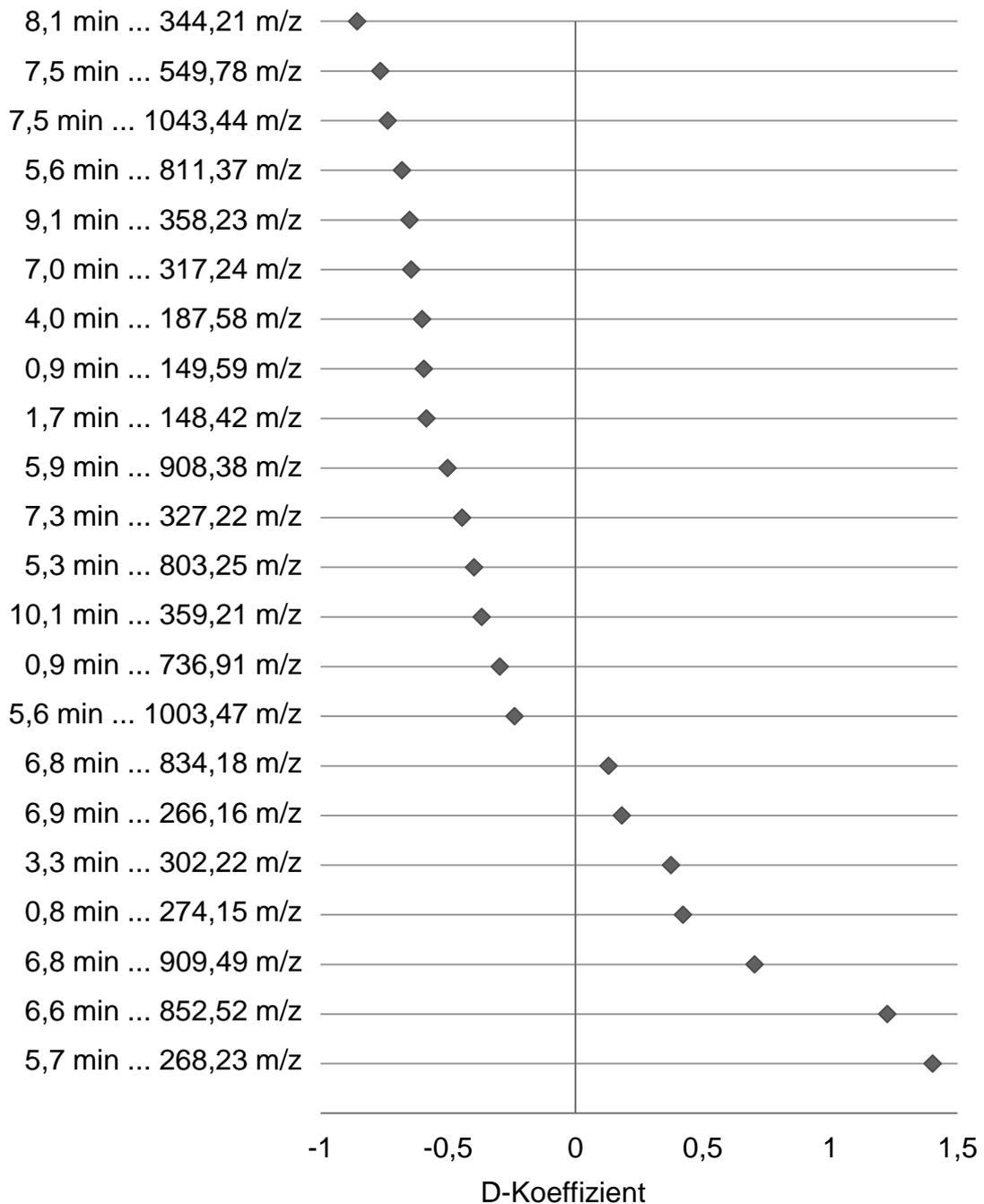


Abbildung 7: Darstellung des Einflusses des D-Koeffizienten (*Nonzero vs. Zero*) jedes Massensignals in der Vorhersageformel auf einer logit-Skala

In **Tabelle 9** ist neben den Koeffizienten X und D noch der R^2 -Senkung-Koeffizient für die 22 Prädiktoren aufgeführt. Dieser Wert gibt an, wie sehr R^2 sinkt, wenn das Massensignal für die Vorhersage nicht berücksichtigt wird. Er trifft somit eine Aussage über die Bedeutung jedes einzelnen Prädiktors in der Vorhersageformel.

Tabelle 9: Koeffizienten der für die Vorhersage relevanten Massensignale

Massensignale	X-Koeffizient	D-Koeffizient	R ² -Senkung
8,1min...344,21 m/z	-0,695	-0,857	0,010
7,5min...549,78 m/z	-0,645	-0,766	0,007
7,5min...1043,44 m/z	-0,452	-0,737	0,017
5,6min...811,37 m/z	-0,551	-0,681	0,011
9,1min...358,23 m/z	-0,525	-0,651	0,004
7,0min...317,24 m/z	-0,461	-0,645	0,030
4,0min...187,58 m/z	-0,609	-0,602	0,004
0,9min...149,59 m/z	-0,630	-0,595	0,005
1,7min...148,42 m/z	-0,409	-0,585	0,006
5,9min...908,38 m/z	-0,412	-0,502	0,007
7,3min...327,22 m/z	-0,439	-0,445	0,040
5,3min...803,25 m/z	-0,278	-0,398	0,020
10,1min...359,21 m/z	-0,272	-0,368	0,006
0,9min...736,91 m/z	-0,332	-0,297	0,012
5,6min...1003,47 m/z	-0,156	-0,239	0,013
6,8min...834,18 m/z	0,115	0,130	0,010
6,9min...266,16 m/z	0,137	0,182	0,005
3,3min...302,22 m/z	0,312	0,375	0,009
0,8min...274,15 m/z	0,406	0,422	0,012
6,8min...909,49 m/z	0,434	0,703	0,012
6,6min...852,52 m/z	0,758	1,224	0,017
5,7min...268,23 m/z	0,693	1,402	0,007

Der pseudo R²-Wert für dieses Vorhersagemodell mit allen 22 Massensignalen liegt bei 0,38, der c-Index, also der Bereich unter der receiver-operating-characteristic-Kurve (ROC) bei 0,88 und der permutation p-Wert für das Vorhersagemodell bei 0,01.

Der Boxplot in **Abbildung 8** zeigt die Verteilung der Fälle (1) und der gesunden Kontrollen (0) nach Anwendung der Vorhersageformel mit den 22 Prädiktoren auf der logit-Skala. Es ist ein deutlicher Unterschied in der Verteilung der Gruppen zu erkennen. Der Median der Kontrollen liegt bei ca. -1,5, das untere Quartil bei ca. -3,7, das obere Quartil bei 0, das Minimum bei ca. -8,3 und das Maximum bei ca. 7,2. Der Median der Fälle liegt bei ca. 2,8, das untere Quartil bei ca. 1,2, das obere Quartil bei ca. 4,5, das Minimum bei ca. -3,3 und das Maximum bei ca. 9,7.

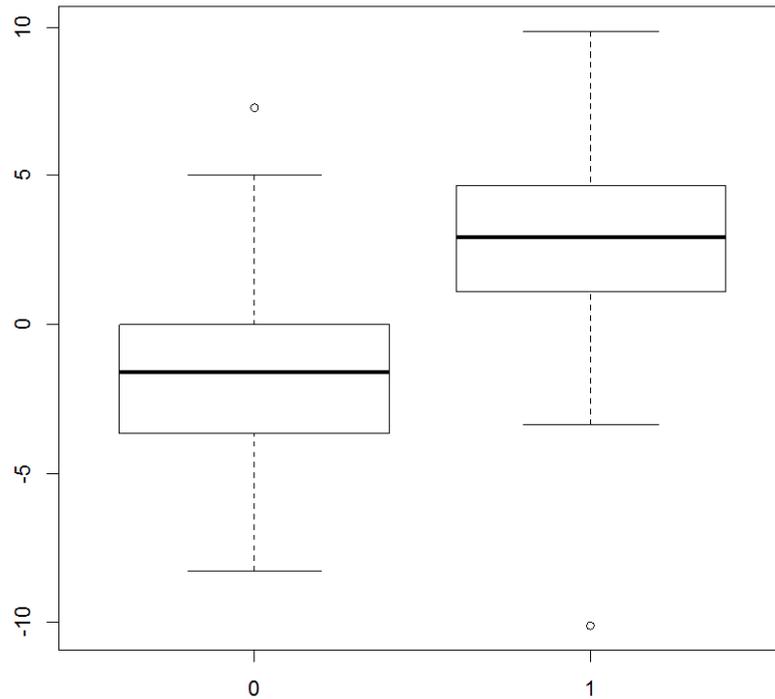


Abbildung 8: Boxplot mit der Verteilung der Fälle (1) und Kontrollen (0) nach Anwendung des Vorhersagemodells mit den relevanten Prädiktoren auf der logit-Skala

4.6 Substanzidentifikation mittels MALDI Ultraflex TOF/TOF

Von den 22 zu identifizierenden Massensignalen wurden mittels MALDI-Massenspektrometrie Fragmentspektren aufgenommen und mit Einträgen der Mascot-Datenbank verglichen. Diese Datenbank ermöglicht es, von Aminosäurefragment-signalen aus massenspektrometrischen Analysen wahrscheinlichkeitsbasiert auf Proteinkandidaten rückzuschließen, und so Signale zu identifizieren. Hierbei geht nicht allein die Abfolge der Aminosäuren in die Berechnung der Datenbank ein, sondern alle während der Identifizierung mittels MALDI-MS/MS gebildeten Fragmente und ihre Signalintensitäten. So wird eine höhere Genauigkeit der Zuordnung erreicht. Die Aminosäuresequenzen wurden aufgrund eines von der Datenbank errechneten Scores auf Basis dieser Fragmentspektren mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit den genannten Proteinkandidaten zugeordnet. Die Wahrscheinlichkeit ist sehr hoch, sobald der Score einen Schwellenwert überschreitet, der für jedes Fragmentspektrum einen anderen Wert annimmt.

In **Tabelle 10** sind beispielhaft die Masse-zu-Ladung-Verhältnisse der b- und y-Fragmente des Massensignals 358,23 m/z zusammengefasst.

Tabelle 10: Fragmentdarstellung des Massensignals 358,23 m/z

b-Fragmente	Massensignal m/z	y-Fragmente	Massensignal m/z
b1	72,044	y5	
b2	129,066	y4	286,931
b3	226,119	y3	230,340
b4	283,140	y2	133,295
b5	340,162	y1	75,958

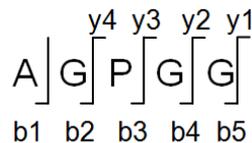


Abbildung 9: Identifizierte Aminosäuresequenz des Massensignals 358,23 m/z

Dem Massensignal 358,23 m/z wurde die Aminosäuresequenz AGPGG, also Alanin-Glycin-Prolin-Glycin-Glycin zugeordnet. Diese ist in **Abbildung 9** dargestellt. Nach Abgleich mit Datenbankeinträgen konnte dieser Sequenz die NIK-related Proteinkinase (NRK, auch: NESK für NIK-like embryo specific kinase) zugeordnet werden. Die Aminosäuresequenzen aller bisher weiter untersuchten Substanzen sind mit den zugehörigen Massensignalen in **Tabelle 11** aufgelistet. Die dritte Spalte enthält den durch die Datenbank jeweils zugeordneten Proteinkandidaten.

Tabelle 11: Massensignale mit zugehörigen identifizierten Aminosäuresequenzen und Proteinkandidaten

Massensignal der ESI-MS	Aminosäuresequenz	Proteinkandidaten
9,1 min 358,23 m/z	AGPGG	NIK-related Proteinkinase
7,0 min 317,24 m/z	MGSNSEVAR	Mannose-6-Phosphat-Isomerase
5,3 min 803,25 m/z	ITDISTGP	Transkriptionsfaktor Dp-2
0,9 min 736,91 m/z	PAAVYSE	regulatorische Untereinheit 1 der Phosphatidylinositol-3-Kinase
5,6 min 1003,47 m/z	QKLQNLFI	Kardiales Phospholamban
6,8 min 909,49 m/z	FSSLARDI	Rab-13
6,6 min 852,52 m/z	LDRASNSLISGLSQDE	Prune Protein

Die NRK, die dem Massensignal 358,23 m/z zugeordnet wurde, ist an der Signaltransduktion in Zellen beteiligt, indem sie den c-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Signalweg aktiviert¹⁰². Die Mannose-6-Phosphat-Isomerase (Massensignal 317,24 m/z) ist ein Enzym, das Mannose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat ineinander umwandelt. Fructose-6-Phosphat ist ein Bestandteil der Glycolyse¹⁰³.

Der Sequenz, die dem Massensignal 803,25 m/z entspricht, wurde der Proteinkandidat Transkriptionsfaktor dp-2 zugeordnet. Dieser bildet einen Heterodimer mit dem Transkriptionsfaktor E2F, der anschließend an die DNA bindet und so durch Steuerung der Genexpression an der Zellzykluskontrolle beteiligt ist¹⁰⁴.

Die regulatorische Untereinheit 1 der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3KR1) wurde dem Massensignal 736,91 m/z zugeordnet. Es handelt sich hier um die p85 Untereinheit, die in Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) der Klasse 1A auftritt. Diese Kinasen katalysieren die Phosphorylierung des Inositolrings des membranständigen Phospholipids Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat an dritter Stelle, so dass Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (kurz: PIP3) entsteht. Sie initiieren so verschiedenste intrazelluläre Signalkaskaden, die verschiedene zelluläre Funktionen, wie beispielsweise Proliferation oder Proteinsynthese, regulieren¹⁰⁵.

Kardiales Phospholamban, das dem Massensignal 1003,47 m/z zugeordnet wurde, ist ein myokardiales Enzym, das über Inhibition der sarkoplasmalen Retikulum Calcium-ATPase (SERCA) an der Regulation des Calciumtransports innerhalb der Herzmuskelzelle beteiligt ist¹⁰⁶.

Dem Massensignal 909,49 m/z wurde die GTPase Rab-13 zugeordnet. Diese gehört zur Familie der RAS-GTPasen und ist unter anderem in Vesikelbildung, -transport, und -fusion in Zellen und in der Bildung von Zell-Zell-Kontakten von Relevanz¹⁰⁷.

Der Aminosäuresequenz des Massensignals 852,52 m/z kann die Prune Protein Familie zugeordnet werden. Diese Enzyme sind Phosphodiesterasen und spalten zyklische Nukleotide wie cAMP. Zugleich können sie Polyphosphate hydrolysieren und wirken so als Polyphosphatasen^{108,109}.

5. Diskussion

In Deutschland lag die Prävalenz der arteriellen Hypertonie 2011 in der volljährigen Bevölkerung bei ca. 26 %². Da die arterielle Hypertonie unter anderem über die Begünstigung der Entwicklung einer Atherosklerose einen bedeutenden Risikofaktor für kardiovaskuläre Späterkrankungen darstellt, ist diese hohe Prävalenz von Relevanz. Folgeerkrankungen wie die koronare Herzkrankheit und der Schlaganfall waren 2012 die beiden häufigsten Todesursachen weltweit³. Eine Therapie wird oft erst eingeleitet, wenn der Blutdruck messbar zu hoch ist. Es ist jedoch davon auszugehen, dass bereits vorher nachweisbare Veränderungen vorliegen, die auf das Risiko hinweisen, eine Hypertonie zu entwickeln. Deshalb ist es das Ziel dieser Studie, neue prädiktive Biomarkerkandidaten der arteriellen Hypertonie im Blutplasma zu identifizieren. Hierzu wurde das Plasma von Probanden mit und ohne arterieller Hypertonie aufbereitet, um Unterschiede in der Proteinexpression zu finden. Diese könnten beispielsweise auf Stoffwechselveränderungen im Endothel, Veränderungen im Hormonhaushalt oder inflammatorische Prozesse zurückzuführen sein. Diese treten bereits in frühen Stadien der arteriellen Hypertonie auf, oder rufen sie selbst hervor^{32,110-112}.

Im folgenden Teil der Diskussion werden die Probandenauswahl, die methodischen Ansätze und die Ergebnisse erörtert. Anschließend soll auf Limitationen der Studie eingegangen und in einem Ausblick die nötigen, sich anschließenden Untersuchungen erläutert werden.

Die verwendeten Plasmaproben entstammen einer Kohorte aus Indexpatienten mit arterieller Hypertonie und ihren Familien. Die Kohorte und diese Studie sind Teil des EU-MASCARA-Projekts, das sich der Erforschung von Biomarkern für kardiovaskuläre Risiken und Diagnostik auf genetischer, proteomischer und metabolomischer Ebene widmet. Die Fallgruppe der vorliegenden Studie ist recht heterogen. Ein Teil der in dieser Gruppe eingeschlossenen Probanden hat nicht nur eine arterielle Hypertonie, sondern bereits Folgeerscheinungen in Form einer Linksherzhypertrophie entwickelt. **Tabelle 7** zeigt, dass die durchschnittliche interventrikuläre Septumdicke und hintere ventrikuläre Wanddicke der Fallgruppe in der Echokardiographie bereits im pathologischen Bereich liegen (Normwerte: jeweils 6 bis 10 mm¹¹³). Diese beiden Parameter sind die echokardiographischen Zeichen einer Linksherzhypertrophie. Auch

die linksventrikulären Masseindices, bei denen die linksventrikuläre Masse auf die Größe mit dem Exponenten 2,7 oder auf die KOF normalisiert wird, ist signifikant verteilt und in der Fallgruppe jeweils leicht erhöht (Linksventrikuläre Masseindex_Größe, $\text{g/m}^{2,7}$, linksventrikuläre Masseindex_KOF), was für eine Größenzunahme des linken Ventrikels spricht. Diese Linksherzhypertrophie kann zu einer Herzinsuffizienz führen, die jedoch bei den Probanden dieser Studie noch nicht aufgetreten ist. Die Hypertrophie stellt eine Form der Anpassung des Herzmuskels an den gestiegenen Blutdruck dar und führt durch Strukturveränderungen des Myokards ebenfalls zur Freisetzung von Substanzen in die Blutbahn. So ist beispielsweise Cardiotrophin 1, ein von Kardiomyozyten unter mechanischem Stress oder Angiotensin II-Einfluss freigesetztes Zytokin der Interleukin 6-Superfamilie, vermehrt messbar¹¹⁴. Des Weiteren wird bei myokardialer Fibrose die im Verlauf einer Herzhypertrophie auftritt, verstärkt das carboxy-terminale Propeptid des Kollagen Typ I (PICP) produziert¹¹⁵. Diese Substanzen könnten das Ergebnis der biostatistischen Analyse beeinflussen. Das Modell wäre durch diese später auftretenden Verlaufsmarker nicht mehr ausschließlich auf die Erkennung der arteriellen Hypertonie ausgerichtet. Zudem hat ein Teil der Probanden der Fallgruppe eine koronare Herzkrankheit, von denen einige einen Herzinfarkt erlitten. Andere Probanden sind zusätzlich an Diabetes mellitus erkrankt. Auch diese Erkrankungen können Veränderungen der Proteinzusammensetzung im Plasma hervorrufen. So deutet beispielsweise ein erhöhter Spiegel an Lipoprotein assoziierte Phospholipase A2 in den Koronarien auf eine frühe koronare Herzkrankheit hin¹¹⁶. Transthyretin aus den Inselzellen des Pankreas, das zur Insulinausschüttung beiträgt, wird bei Typ II Diabetes vermindert gebildet¹¹⁷. Allerdings wurden für die biostatistische Analyse nur Substanzen bzw. Massensignale betrachtet, die in mehr als 16,7 % der Proben nachgewiesen wurden. Seltener detektierte Signale weisen nicht genug Variabilität auf, um den Fall- bzw. Kontrollstatus vorherzusagen. Da die genannten Erkrankungen bei jeweils weniger als 16,7 % der Probanden diagnostiziert wurden, sollten sie keinen Einfluss auf das Ergebnis der Studie haben.

Des Weiteren besteht eine signifikante Verteilung der Probanden hinsichtlich Alter, Gewicht und BMI. Das Modell könnte auch aufgrund dieser Parameter korrekt zwischen Fall- und Kontrollgruppe unterscheiden. Jedoch wurde bei Erstellung der biostatistischen Algorithmen untersucht, ob eine Diskriminierung zwischen den Gruppen auch aufgrund anderer Faktoren als der kardiovaskulären Erkrankungen gelingt. Dies

war nicht möglich, sodass die Verteilung der Parameter Alter, Gewicht und BMI mit großer Wahrscheinlichkeit keine Auswirkungen auf das Modell hat.

Das in dieser Studie untersuchte Blutplasma ist durch seine Zusammensetzung aus Substanzen sehr hoher und sehr geringer Konzentrationen ein hochkomplexes Untersuchungsmedium. Über die Hälfte des Proteinanteils im Plasma bildet Albumin, viele weitere Proteine, wie akute-Phase-Proteine (z. B. Fibrinogen und Ferritin) oder Peptidhormone wie Insulin oder Glucagon sowie Zytokine, kommen hingegen nur in sehr geringen Konzentrationen vor¹¹⁸. Andererseits ist es (auch später im klinischen Alltag) relativ einfach und kostengünstig zu gewinnen, sodass auch wiederholte Messungen möglich sind¹¹⁹. Des Weiteren enthält es eine große Menge verschiedenster Proteine, die durch posttranslationale Modifikationen zusätzlich abgewandelt sein können. Dies ist von Vorteil, wenn ohne vorherige Filterung nach Biomarkern gesucht wird, da eine große Proteinviefalt zur Verfügung steht, deren Konzentrationen zwischen Fall- und Kontrollgruppe diskriminieren lassen können. So ist es zudem möglich, noch unbekannte Substanzen nachzuweisen.

Die im Folgenden diskutierte Probenaufbereitung und -analyse erfolgte mittels allgemein anerkannter Techniken und Arbeitsschritte zur Biomarkeridentifizierung^{119,120}. Die massenspektrometrische Detektion von Plasmaproteinen geringer Konzentration wird durch einige wenige Proteine erschwert, die 99 % der Gesamtproteinkonzentration ausmachen und auch nach der Deproteinierung noch dominieren. Deshalb werden die Proben mittels präparativer RP-Chromatographie entlang eines Lipophilitätsgradienten aufgetrennt und fraktioniert. In den einzelnen Fraktionen werden so Substanzen mit ähnlichen polaren Eigenschaften zusammengefasst. Der Probeninhalt wird dabei auf mehr Volumen aufgeteilt¹¹⁹. Die Messung der UV-Absorption bei 280 nm ermöglichte die Detektion aromatischer Aminosäuren in Peptiden. Durch die RP-Chromatographie werden die Proben zudem entsalzt, woraus eine höhere Messgenauigkeit in der nachfolgenden Massenspektrometrie resultiert.

Vor der massenspektrometrischen Messung wurden die Probenbestandteile mit der Elektrospray-Ionisationsmethode ionisiert. Dies ist eine sogenannte milde Ionisationsmethode, da Moleküle hierbei nicht zu stark fragmentiert werden. Zudem kann die Ionisation über einen sehr breiten Massenbereich erfolgen und eignet sich somit für die Analyse von Peptiden. Diese Methode zeichnet sich durch eine sehr hohe

Empfindlichkeit in der Moleküldetektion aus. Dies führt jedoch auch zu einer erhöhten Störanfälligkeit gegenüber Salzen und der Bildung von Addukten⁹⁸. Hierbei reagieren Kalium- oder Natriumionen gelöster Salze mit freien funktionellen Gruppen der Peptidketten⁹⁹. Durch die Adduktbildung werden zum Einen mehr Signale generiert, was die Interpretation der Messwerte erschwert, außerdem sinken die Intensitäten der einzelnen Signale. Zum Anderen führen Salzionen zum Ladungsausgleich von vormals geladenen Substanzen in der Probe, die dann nicht mehr detektiert werden können^{98,121}.

Aus der Menge an detektierten Signalen können anschließend Ionenchromatogramme extrahiert und Massen zugeordnet werden. Extrahierte Ionenchromatogramme stellen die Detektion eines Massensignals während der gesamten Messung dar, wobei die Retentionszeit der Substanzen in der vorgeschalteten RP-Chromatographie durch ihre Polarität bestimmt wird. In Massenspektren sind alle detektierten Massensignale eines Messzeitpunkts, also einer Retentionszeit und somit sehr ähnlicher Polarität, dargestellt. Es handelt sich hierbei um Bruchstücke einer Substanz, die zum Beispiel während der Aufbereitung der Proben oder während der Ionisation entstanden sind, oder um Isotope. Diese entstehen vor allem durch das Kohlenstoffisotop ^{13}C , das mit einer Häufigkeit von etwa 1 % des normalerweise in der Natur vorkommenden ^{12}C aufzufinden ist¹²². Die ESI-MS wurde zur Detektion und Massenzuordnung der vorhandenen Substanzen in den Fraktionen der RP-Chromatographie durchgeführt.

Mittels der genannten Software für die Profile Analysis konnte die große Menge der massenspektrometrischen Daten aufgearbeitet und gefiltert werden. Zudem ermöglichte sie die Einschätzung der Qualität der MS-Analyse, z. B. über die richtige Erkennung von Isotopen, wie sie **Abbildung 6** zeigt. Isotope einer Substanz haben einen Abstand von 1 m/z zueinander. Sollten diese hier gut unterscheidbaren Einzelsignale ineinander übergehen oder Signale sich über einen weiten Retentionszeitbereich ausdehnen, ist die Qualität der Probe eingeschränkt und die Ergebnisse sind schlecht interpretierbar. Weiterhin kann mit dem Programm die Güte der Parameteranpassung der Profile Analysis kontrolliert und verbessert werden. Erst wenn möglichst viele echte Massensignale auch als solche erkannt und möglichst wenige falsch-positive Ergebnisse angezeigt werden, werden alle erkannten Signale aller Proben in der Buckettable aufgelistet und in dieser Form der Biostatistik zur

Verfügung gestellt. Auf den internen Standard wurden die Intensitäten normalisiert, um so während der Messungen entstandene Probenverluste herausrechnen zu können.

Für die Aufstellung des statistischen Modells zur Vorhersage des Fall- oder Kontrollstatus der Proben wurden 22 der in der Profile Analysis gefundenen Massensignale verwendet. Jedem dieser Massensignale sind 2 Koeffizienten zugeordnet (X und D), die das Gewicht des Massensignals in der Vorhersageformel beeinflussen. In **Abbildung 7** ist der Einfluss des D-Koeffizienten für jedes dieser Signale dargestellt. Die Werte der Abszisse geben das Gewicht eines Massensignals in der Vorhersageformel wieder. Je höher der Betrag des Koeffizienten, desto größer ist der Einfluss des Massensignals. Ist der Koeffizient positiv, so ist das Massensignal als Risikofaktor, also als Anzeichen für Krankheit zu werten. Ist der Koeffizient negativ, so handelt es sich um einen protektiven Faktor, der auf die Abwesenheit von Krankheit hindeutet. Ein Wert von 0 bedeutet, dass Fall- und Kontrollzugehörigkeit durch das Massensignal nicht zu unterscheiden sind. Die Koeffizienten aller Signale sind ungleich 0 und können daher zur Unterscheidung der beiden Probandengruppen beitragen.

Da für die Berechnung des Vorhersagemodells logistische Regression verwendet wurde, dient der pseudo- R^2 -Wert als Bestimmtheitsmaß. Dieser kann zwischen 0 und 1 liegen, je höher der Wert, desto besser ist das Modell an die Daten angepasst¹²³. Da pseudo- R^2 -Werte schon ab Werten von 0,2 als akzeptabel gelten, kann der Wert von 0,38 hier als eine gute Anpassung des Modells an die Daten gewertet werden. Der R^2 -Senkung-Koeffizient besagt, um wie viel sich das Bestimmtheitsmaß R^2 verringert, wenn ein Massensignal nicht für die Vorhersageformel verwendet wird¹²⁴. Der Koeffizient trifft somit eine Aussage über die Bedeutung jedes einzelnen Massensignals für das Modell. Die R^2 -Senkung-Werte aller Massensignale sind sehr klein. Das bedeutet, dass nicht ein einzelnes Massensignal den Fall- oder Kontrollstatus vorhersagen kann, sondern dass erst die Betrachtung aller Massensignale zusammen den Fall-/Kontroll-Status schätzen lässt.

Der c (concordance)-Index entspricht dem Bereich unter der ROC-Kurve (area under the curve, AUC) und trifft eine Aussage über die Vorhersagefähigkeit eines Modells, also über die Wahrscheinlichkeit, dass die vorhergesagte und beobachtete Antwort übereinstimmen. Der c-Index kann zwischen 0 und 1 liegen. Hierbei bedeutet 0,5, dass keine Vorhersagefähigkeit besteht. Je höher der Wert, desto besser die Fähigkeit des Modells, zwischen Antworten zu unterscheiden¹²⁵. In diesem Fall beträgt der c-Index 0,88, was einer ausreichenden Vorhersagefähigkeit des entwickelten

Modells entspricht. Der p-Wert dieses Modells wurde mittels eines Permutationstests errechnet. Hierbei wird betrachtet, wie oft, trotz Aufhebung des Zusammenhangs zwischen Massensignalen und Fall- oder Kontrollzugehörigkeit, die Gruppen mittels Modellen unterschieden werden können¹²⁶. Der p-Wert testet die Nullhypothese, dass keines der Massensignale eine Vorhersagefähigkeit besitzt. Für dieses Modell liegt der p-Wert unter 0,01. Deshalb wird davon ausgegangen, dass die beiden Gruppen anhand der 22 massenspektrometrischen Signale unterschieden werden können.

Für den Boxplot in **Abbildung 9** wurde das errechnete Modell angewandt, um mittels der 22 Massensignale und ihren jeweiligen Expressionswerten den Fall- oder Kontrollstatus aller Probanden vorherzusagen. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu erkennen. Werte > 0 bedeuten, dass die Probanden wahrscheinlich erkrankt sind. Bei Werten < 0 ist die Chance größer, dass der Proband gesund ist. Etwas mehr als 75 % der Fälle liegen im positiven, 75 % der Kontrollen im negativen Bereich. Die meisten Probanden konnten somit korrekt ihrem Fall- oder Kontrollstatus zugeordnet werden.

Anschließend wurden die Aminosäuresequenzen einiger der für das Modell relevanten Massensignale mittels MALDI TOF-Massenspektrometrie aufgeschlüsselt und mit Hilfe der Mascot-Datenbank einem Proteinkandidaten zugeordnet. Mittels Score-Systemen wird die Wahrscheinlichkeit eingeschätzt, dass es sich bei einem Fragmentspektrum um ein bestimmtes Protein handelt. Alle in dieser Arbeit genannten Proteinkandidaten wurden mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit einem Fragmentspektrum zugeordnet. So auch die Mannose-6-Phosphat-Isomerase. Deren Reaktionsprodukt Fructose-6-Phosphat ist Bestandteil der Glycolyse. Für das andere Reaktionsprodukt, Mannose-6-Phosphat, wurde nachgewiesen, dass es in Zellen zur posttranslationalen Proteinmodifikation verwendet wird^{103,127}. Zudem konnte gezeigt werden, dass in knock-out Mäusen ohne dieses Enzym, die Extravasation von Neutrophilen herabgesetzt ist, was auf eine verminderte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen zurückgeführt wird¹²⁸. Auch im Rahmen einer endothelialen Dysfunktion beispielsweise unter arterieller Hypertonie oder in der Genese der Atherosklerose ist die Endotheldurchwanderung von Leukozyten von Bedeutung und wird unter diesen Bedingungen eher begünstigt. Dies könnte eine Erklärung sein für die Relevanz der Mannose-6-Phosphat-Isomerase im biostatistischen Modell dieser Studie. Wie genau die Endothelpermeabilität für Leukozyten durch dieses Enzym beeinflusst werden und

ob es als Biomarkerkandidat für die arterielle Hypertonie geeignet ist, muss in weiterführenden Studien untersucht und validiert werden.

Für den Transkriptionsfaktor dp-2 wurde ein Zusammenhang mit der Erythrozytendifferenzierung während der Erythropoese aufgezeigt. Wird das zugehörige Gen ausgeschaltet, ist eine verminderte Proliferationsrate und geringere Größe der Erythrozyten die Konsequenz¹²⁹.

Es gilt als gesichert, dass kardiales Phospholamban in desphosphoryliertem Zustand am Myokard einen inhibitorischen Einfluss auf die sarkoplasmale Retikulum Calcium-ATPase (SERCA) hat. Es verringert dadurch die Geschwindigkeit der Wiederaufnahme von Calcium in das sarkoplasmatische Retikulum (SR). Ebenso konnte gezeigt werden, dass unter β -adrenergem Einfluss des sympathischen Nervensystems durch Phosphorylierung des Phospholambans dessen Inhibition stattfindet. Dadurch steigt die Geschwindigkeit der Calciumaufnahme in das SR und die Relaxationsfähigkeit des Myokards nimmt zu. Dies wird als positive Lusitropie bezeichnet^{106,130}. Da während des nächsten Kontraktionszyklus des Myokards mehr Calcium aus dem SR freigesetzt werden kann, hat die Inhibition des Phospholambans so auch einen positiv inotropen Effekt. Phospholambandefiziente Mäuse hatten in einer Studie von Lorenz et al. erhöhte systolische Blutdruckwerte im Vergleich zu Tieren des Wildtyps¹³¹. Zudem wird das Enzym im Zusammenhang mit Herzinsuffizienz erforscht^{132,133}. Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass Phospholamban der Regulation der Myokardrelaxation und -kontraktilität in Abhängigkeit von Einflüssen des sympathischen Nervensystems dient und so auch den Blutdruck beeinflusst. Ob sich eine chronische Steigerung des Blutdrucks beispielsweise durch erhöhte Sympathikusaktivität bei langjähriger psychischer Belastung in veränderten Phospholambankonzentrationen im Plasma äußert, sollte in weiterführenden Studien validiert werden.

Proteine der Prune Protein-Familie werden derzeit vor allem im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym gehäuft in metastasierten Brustkrebszellen überexprimiert ist. Es ist mit erhöhter Zellmotilität und -migration im Rahmen von Tumorerkrankungen wie Brustkrebs oder Sarkomen assoziiert und deutet auf eine höhere Aggressivität der Tumorzellen hin^{108,134}.

Rab-13 ist eine GTPase der Rab-Familie. Es konnte dargelegt werden, dass einige dieser GTPasen, wahrscheinlich durch ihre Funktion beim intrazellulären

Vesikeltransport, Einfluss auf die Regulation von Ionenkanälen, wie beispielsweise epithelialer Natriumkanäle (ENaC) haben. Diese werden bedarfsgerecht zur Zellmembran transportiert¹³⁵. ENaC dienen der Natriumrückresorption, beispielsweise am Nierenepithel, und können bei der medikamentösen Blutdrucksenkung gezielt gehemmt werden. Sie werden durch hormonellen Einfluss reguliert, etwa durch Aldosteron^{136,137}. Dieses ist Teil des RAAS, welches große Bedeutung bei der Blutdruckregulation innehat. Ob Rab-13 eine konkrete Funktion beim Einbau oder Transport blutdruckrelevanter Ionenkanäle in die Zellmembran hat und dies seiner Bedeutung als Risikofaktor in dieser Studie zugrunde liegt, sollte weiter untersucht werden.

Das der PI3KR zugrunde liegende Gen wird derzeit als Onkogen in der Tumorforschung diskutiert. Mutationen dieser regulatorischen Untereinheit p85 konnten beispielsweise in Urothel- und Endometriumkarzinomzellen nachgewiesen werden^{138,139}. Zudem kann durch Mutationen im Gen PI3KR das sogenannte Short-Syndrom resultieren. Betroffene Personen sind unter anderem klein, die Zahnung setzt verspätet ein, sie haben überstreckbare Gelenke und neigen zur Entwicklung von Hernien¹⁴⁰. Die Kinasen, mit denen diese Untereinheit assoziiert ist, scheinen eine Funktion als Signalüberträger der Leptinwirkung inne zu haben. Dieses Hormon wird vor allem in Fettgewebe gebildet. Die Leptinkonzentration im Plasma steigt mit zunehmendem Fettgewebsanteil wie beispielsweise bei Adipositas. Es konnte gezeigt werden, dass in hypothalamischen Zellen die PI3K der Signaltransduktor für den steuernden Effekt des Leptin auf Nahrungsaufnahme und Hungergefühl ist. Leptin führt jedoch auch zu einer verstärkten renalen Sympathikusaktivität und dadurch zu einem erhöhten Blutdruck bei Adipositas. Auch diese Einwirkung am Leptinrezeptor wird über den PI3K-Signalweg übertragen^{141,142}. Dieser Zusammenhang mit arterieller Hypertonie könnte die Rolle der regulatorischen Untereinheit 1 von PI3K im biostatistischen Modell erklären. Sie ist als protektiver Faktor in das biostatistische Modell eingegangen. Dies könnte darauf hinweisen, dass die regulatorische Untereinheit die Signaltransduktion der Leptinwirkung am Leptinrezeptor vermindert und so die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie durch verstärkte renale Sympathikusaktivierung vorbeugt. Der BMI war zwar signifikant zwischen den Probandengruppen verteilt, die Unterscheidung der Probanden mittels PI3KR1 könnte also aufgrund des BMI und nicht der arteriellen Hypertonie erfolgt sein. In biostatistischen Kontrollmodellen konnte jedoch keine Probandendiskriminierung aufgrund des BMI erfolgen, so dass eher nicht

von einem Einfluss des BMI im biostatistischen Modell auszugehen ist. Der Einfluss der PI3KR1 sollte demnach nur auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen sein.

Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass die PI3K α , eine PI3K der Klasse 1A, im Zusammenhang mit dem Myokardwachstum steht. Sie wird nicht nur nach Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren in Endothelzellen und glatten Muskelzellen aktiviert, sondern ist auch an der Regulierung des Herzwachstums beteiligt¹⁴³. Eine Überaktivität der PI3K α hatte in Tierexperimenten eine geringere Fibrosierung und verminderte pathologische Herzhypertrophie bei erhöhter kardialer Nachlast zur Folge¹⁴⁴. Ebenfalls in Tierexperimenten wurde gezeigt, dass eine temporäre Überexpression von PI3K α im Mausherz zu einer verstärkten Myokardkontraktilität führte¹⁴⁵. Da die PI3KR1 mit PI3K der Klasse 1A assoziiert ist, könnte auch sie eine Funktion in der Regulation von Myokardwachstum und – kontraktilität inne haben.

Insgesamt hat die PI3KR durchaus eine Funktion im Zusammenhang mit arterieller Hypertonie: Sie wird in Endothelzellen exprimiert, steht mit verstärkter Sympathikusaktivität unter Leptineinfluss in Zusammenhang und ist im Myokard an der Kontrolle von Wachstum und Kontraktilität beteiligt. Ob sie als Biomarkerkandidat zwischen Probanden mit und ohne arterielle Hypertonie diskriminieren kann, sollte in weiterführenden Studien validiert werden. Für diese Studien sollte dann eine gleichmäßige Verteilung der Probanden hinsichtlich ihres BMI auf Fall- und Kontrollgruppen erfolgen.

Die NIK related Proteinkinase (NRK) wurde auf der Grundlage von 5 Aminosäuren identifiziert. Dies ist zwar eine kurze Sequenz, wurde aber in der Datenbankabfrage mit großer Wahrscheinlichkeit als korrekte Zuordnung angegeben. Das Ergebnis sollte in weiterführenden Studien validiert werden. Zudem sollte versucht werden, weitere Peptide dieses Proteins zu identifizieren. In jedem Fall ist erwähnenswert, dass die NRK an der Aktivierung des c-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Signalwegs beteiligt ist¹⁰², der eine Stressantwort der Zelle darstellt, ausgelöst etwa durch UV-Strahlung, proinflammatorische Zytokine oder oxidativen Stress¹⁴⁶. Es wurde gezeigt, dass JNK im Gefäßendothel und in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird, wenn der Blutdruck und der mechanische Stress auf die Gefäßwand steigen¹⁴⁷. Ein Zusammenhang mit der Genese von Bluthochdruck ist demnach möglich. Warum NRK mit einem negativen D-Koeffizienten als protektiver Faktor in die biostatistische Analyse eingeflossen ist, bleibt zu untersuchen.

Insgesamt muss in weiterführenden Studien untersucht werden, inwiefern die genannten Peptide und Proteine im Zusammenhang mit arterieller Hypertonie stehen. In dieser Studie trugen sie jedoch zur Diskriminierung zwischen Fall- und Kontrollgruppe bei.

5.1 Limitationen

Limitationen der Studie bestehen zunächst vor allem in der geringen Probandenzahl, sodass die Ergebnisse auf Zufällen beruhen könnten. Somit stellt die Studie einen ersten Überblick dar. Zur Validierung der Ergebnisse müssen weitere Studien mit größeren Probandenzahlen durchgeführt werden.

Eine weitere Einschränkung besteht in die Heterogenität der Fallgruppe. Zwar leiden fast alle Patienten an Hypertonie, einige sind jedoch zusätzlich an Diabetes mellitus oder hypertensiven Folgeerscheinungen wie koronarer Herzkrankheit erkrankt oder hatten bereits einen Myokardinfarkt. Diese Erkrankungen können eigene Produkte im Blut hinterlassen, die die Interpretation der nachgewiesenen Substanzen erschweren. Andererseits wurden während der biostatistischen Auswertung Massensignale, die nur in wenigen Proben nachzuweisen waren, nicht betrachtet. Die Auswirkungen solcher Substanzen auf das Ergebnis könnten also vermindert worden sein. Um Marker nur für die arterielle Hypertonie zu erhalten, sollten die Probanden der Fallgruppe möglichst nicht von Folgeerkrankungen oder anderen kardiovaskulären Risikofaktoren betroffen sein.

Das biostatistische Modell kann zwar zwischen Fall- und Kontrollgruppe diskriminieren, jedoch könnte die Zuordnung auch aufgrund des Parameters Linksherzhypertrophie gelingen, da dieser zwischen den Gruppen statistisch signifikant verteilt ist (siehe **Tabelle 7**). Um Biomarkerkandidaten zu finden, die direkt der arteriellen Hypertonie zuzuordnen sind, müsste eine Studie durchgeführt werden, in der der Einfluss anderer Größen wie Neben- oder Folgeerkrankungen möglichst minimiert wird. Es wäre eine homogene Probanden Klientel notwendig, in der sich Fall- und Kontrollgruppe nur in der zu untersuchenden Größe unterscheiden. Die ebenfalls statistisch signifikant verteilten Parameter Gewicht, Alter und BMI hatten in biostatistischen Kontrollmodellen keinen Einfluss auf die Zuordnung der Proben zur Fall- oder Kontrollgruppe.

Problematisch ist zudem, dass es nur einen Zeitpunkt der Blutentnahme gab. Die Plasmakonzentrationen vieler Substanzen variieren jedoch im Tagesverlauf, abhängig von Umwelteinflüssen oder dem Lebensalter. Hier wären Blutentnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten nötig, um ein Abbild des Proteoms zu erhalten.

Eine weitere Einschränkung entsteht durch die Kürze der Peptide. Eine entschlüsselte Sequenz ist sehr kurz. Einige der noch nicht identifizierten Massensignale sind sehr klein, sodass auch diese wahrscheinlich eher wenige Aminosäuren enthalten. Eine Zuordnung zu Proteinen auf Grundlage so kurzer Sequenzen ist nicht sicher. Jedoch trugen diese Signale zur Differenzierung der Probandengruppen bei und wurden mittels Datenbankabgleich mit hoher Wahrscheinlichkeit einem Proteinkandidaten zugeordnet. Die Identifizierung sollte hier fortgeführt werden. Die Identifikation weiterer Peptidsequenzen der Proteinkandidaten würde die Ergebnisse unterstützen.

5.2 Ausblick

Aus dieser Studie ergeben sich mehrere Fragestellungen, denen in weiteren Studien nachgegangen werden sollte. Zunächst sollte die 40 %-Fraktion der RP-Chromatographie weiter untersucht werden, um mehr mögliche Biomarkerkandidaten zu erhalten. Zudem wurden 15 Massensignale, die im biostatistischen Modell dieser Arbeit von Relevanz waren noch nicht identifiziert, da deren Masse-zu-Ladung-Verhältnis für die MALDI-MS nicht ausreichend ist. Hier steht die Identifizierung mittels Gaschromatographie noch aus. Des Weiteren sollten, wenn möglich, weitere Peptide der identifizierten Proteinkandidaten in den Proben identifiziert werden.

Anschließend müssen die Biomarkerkandidaten in weiteren Studien mit großen Probandenkollektiven bestätigt werden. Sollte die Validierung der Biomarkerkandidaten erfolgreich sein, müssen Nachweismethoden entwickelt werden, die ebenfalls zu validieren sind. Zudem sollte untersucht werden, in welchem Zusammenhang die Kandidaten mit dem Gefäßsystem, arterieller Hypertonie und der Entwicklung von Atherosklerose stehen. Dies kann in weiteren Plasmamessungen in verschiedenen Probandenkollektiven erfolgen. Als Voraussetzung für die Verwendung als Biomarker, müssten Konzentrationsnormwerte und pathologische Grenzwerte der Substanzen im Plasma ermittelt werden. Gleichzeitig müssen vor allem prospektive oder retrospektive Langzeitstudien erfolgen. Diese sollten untersuchen, ob die Biomarkerkandidaten die

Entwicklung einer arteriellen Hypertonie auch wirklich vorhersagen. Dann könnte ein Scoresystem zur Früherkennung entwickelt werden, das das Risiko für die Erkrankung an arterieller Hypertonie vorhersagt. Damit wäre eine zielgerichtete Primärprävention möglich, um den Erkrankungsbeginn hinauszuzögern.

6. Anhang

6. 1 Literaturverzeichnis

1. A A. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011.
2. Neuhauser H, Thamm M, Ellert U. [Blood pressure in Germany 2008-2011: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 2013;56:795-801.
3. The 10 leading causes of death in the world-2000 and 2012-Fact sheet N°310. Geneva: World Health Organization, updated 2014. (Accessed 2015-11-19, 2015, at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.)
4. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al. 2013 ESH/ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. Blood Press 2014;23:3-16.
5. Herold G. Innere Medizin 2012. Köln: Dr. med. Gerd Herold; 2012.
6. Maack C, Böhm M. 23.1 Physiologische Grundlagen. In: Siegenthaler W, Blum HE, eds. Klinische Pathophysiologie. 9. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2006:662-7.
7. Maack C, Böhm M. 23.3 Spezielle Pathophysiologie der Hypertonie. In: Siegenthaler W, Blum HE, eds. Klinische Pathophysiologie. 9. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2006:670-1.
8. Fujimaki T, Oguri M, Horibe H, et al. Association of a transcription factor 21 gene polymorphism with hypertension. Biomed Rep 2015;3:118-22.
9. Chandra S, Narang R, Sreenivas V, Bhatia J, Saluja D, Srivastava K. Association of angiotensin II type 1 receptor (A1166C) gene polymorphism and its increased expression in essential hypertension: a case-control study. PLoS One 2014;9:e101502.
10. Rayner B, Ramesar R. The importance of G protein-coupled receptor kinase 4 (GRK4) in pathogenesis of salt sensitivity, salt sensitive hypertension and response to antihypertensive treatment. Int J Mol Sci. Switzerland2015:5741-9.
11. Sanada H, Yatabe J, Midorikawa S, et al. Single-nucleotide polymorphisms for diagnosis of salt-sensitive hypertension. Clin Chem 2006;52:352-60.
12. Blaustein MP, Leenen FH, Chen L, et al. How NaCl raises blood pressure: a new paradigm for the pathogenesis of salt-dependent hypertension. Am J Physiol Heart Circ Physiol. United States2012:H1031-49.
13. Jones DW, Kim JS, Andrew ME, Kim SJ, Hong YP. Body mass index and blood pressure in Korean men and women: the Korean National Blood Pressure Survey. J Hypertens 1994;12:1433-7.
14. Foulds HJ, Bredin SS, Warburton DE. The relationship between hypertension and obesity across different ethnicities. J Hypertens 2012;30:359-67.
15. Strazzullo P, Barba G, Cappuccio FP, et al. Altered renal sodium handling in men with abdominal adiposity: a link to hypertension. J Hypertens 2001;19:2157-64.

16. Hall JE. Mechanisms of abnormal renal sodium handling in obesity hypertension. *Am J Hypertens* 1997;10:49s-55s.
17. Schorr U, Blaschke K, Turan S, Distler A, Sharma AM. Relationship between angiotensinogen, leptin and blood pressure levels in young normotensive men. *J Hypertens* 1998;16:1475-80.
18. Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WI. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest* 1997;100:270-8.
19. Stevens VJ, Obarzanek E, Cook NR, et al. Long-term weight loss and changes in blood pressure: results of the Trials of Hypertension Prevention, phase II. *Ann Intern Med* 2001;134:1-11.
20. Miyazaki Y, Shimamoto K, Ise T, et al. Effects of hyperinsulinaemia on renal function and the pressor system in insulin-resistant obese adolescents. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996;23:287-90.
21. Viner RM, Segal TY, Lichtarowicz-Krynska E, Hindmarsh P. Prevalence of the insulin resistance syndrome in obesity. *Arch Dis Child* 2005;90:10-4.
22. Potenza MA, Marasciulo FL, Chieppa DM, et al. Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between NO and ET-1 production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H813-22.
23. Li R, Zhang H, Wang W, et al. Vascular insulin resistance in prehypertensive rats: role of PI3-kinase/Akt/eNOS signaling. *Eur J Pharmacol* 2010;628:140-7.
24. Bautista LE, Atwood JE, O'Malley PG, Taylor AJ. Association between C-reactive protein and hypertension in healthy middle-aged men and women. *Coron Artery Dis* 2004;15:331-6.
25. Madhur MS, Lob HE, McCann LA, et al. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension* 2010;55:500-7.
26. Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000;102:1000-6.
27. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci* 2013;9:1057-69.
28. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996;97:1916-23.
29. Sedeek MH, Llinas MT, Drummond H, et al. Role of reactive oxygen species in endothelin-induced hypertension. *Hypertension* 2003;42:806-10.
30. Chrissobolis S, Faraci FM. The role of oxidative stress and NADPH oxidase in cerebrovascular disease. *Trends Mol Med* 2008;14:495-502.
31. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:4651-5.
32. Crowley SD. The cooperative roles of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:102-20.

33. Korsgaard N, Aalkjaer C, Heagerty AM, Izzard AS, Mulvany MJ. Histology of subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension. *Hypertension* 1993;22:523-6.
34. Schiffrin EL. Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. *Am J Hypertens* 2002;15:115s-22s.
35. De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, Griendling KK. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res* 1998;82:1094-101.
36. Nishimura H, Tsuji H, Masuda H, et al. Angiotensin II increases plasminogen activator inhibitor-1 and tissue factor mRNA expression without changing that of tissue type plasminogen activator or tissue factor pathway inhibitor in cultured rat aortic endothelial cells. *Thromb Haemost* 1997;77:1189-95.
37. Morawietz H, Rueckschloss U, Niemann B, et al. Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Circulation* 1999;100:899-902.
38. Dharmashankar K, Widlansky ME. Vascular endothelial function and hypertension: insights and directions. *Curr Hypertens Rep* 2010;12:448-55.
39. Hoffmann U, Tatò F. 25.2 Spezielle Pathophysiologie des arteriellen Systems. In: Siegenthaler W, Blum HE, eds. *Klinische Pathophysiologie*. 9. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2006:701-3.
40. Garbin U, Fratta Pasini A, Stranieri C, et al. Cigarette smoking blocks the protective expression of Nrf2/ARE pathway in peripheral mononuclear cells of young heavy smokers favouring inflammation. *PLoS One* 2009;4:e8225.
41. Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, Dominguez C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med* 2003;34:1563-74.
42. Pritchard KA, Ackerman AW, Ou J, et al. Native low-density lipoprotein induces endothelial nitric oxide synthase dysfunction: role of heat shock protein 90 and caveolin-1. *Free Radic Biol Med* 2002;33:52-62.
43. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, et al. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 1995;96:1395-403.
44. Scheffler E, Wiest E, Woehrle J, et al. Smoking influences the atherogenic potential of low-density lipoprotein. *Clin Invest* 1992;70:263-8.
45. Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA, Jr. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:10417-22.

46. Lüllmann-Rauch R. 11.1 Blutgefäße. Histologie. 1. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2003:213-4.
47. Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 1984;4:357-64.
48. Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1994;94:885-91.
49. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1993;268:11811-6.
50. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:333-7.
51. Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K, Tang CK. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2013;424:245-52.
52. Clowes AW, Schwartz SM. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Circ Res* 1985;56:139-45.
53. Jimi S, Saku K, Uesugi N, Sakata N, Takebayashi S. Oxidized low density lipoprotein stimulates collagen production in cultured arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1995;116:15-26.
54. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie F, Virmani R. Pathophysiology of Atherosclerosis Plaque Progression. *Heart, Lung and Circulation* 2013;22:399-411.
55. Stary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 1989;9:119-32.
56. Richardson PD, Davies MJ, Born GV. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 1989;2:941-4.
57. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* 2003;349:2316-25.
58. Staub D, Patel MB, Tibrewala A, et al. Vasa vasorum and plaque neovascularization on contrast-enhanced carotid ultrasound imaging correlates with cardiovascular disease and past cardiovascular events. *Stroke* 2010;41:41-7.
59. Kolodgie FD, Virmani R, Burke AP, et al. Pathologic assessment of the vulnerable human coronary plaque. *Heart* 2004;90:1385-91.
60. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:C13-8.
61. Kaperonis E, Liapis C, Kakisis J, Dimitroulis D, Papavassiliou V. Inflammation and Atherosclerosis. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2006;31:386–93.
62. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T

- lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res* 1997;81:448-54.
63. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1991;11:1223-30.
 64. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994;89:36-44.
 65. Malmqvist K, Ohman KP, Lind L, Nystrom F, Kahan T. Relationships between left ventricular mass and the renin-angiotensin system, catecholamines, insulin and leptin. *J Intern Med* 2002;252:430-9.
 66. Eleftheriades EG, Durand JB, Ferguson AG, Engelmann GL, Jones SB, Samarel AM. Regulation of procollagen metabolism in the pressure-overloaded rat heart. *J Clin Invest* 1993;91:1113-22.
 67. Krams R, Kofflard MJ, Duncker DJ, et al. Decreased coronary flow reserve in hypertrophic cardiomyopathy is related to remodeling of the coronary microcirculation. *Circulation* 1998;97:230-3.
 68. Shapiro LM, McKenna WJ. Left ventricular hypertrophy. Relation of structure to diastolic function in hypertension. *Br Heart J* 1984;51:637-42.
 69. Drazner MH, Rame JE, Marino EK, et al. Increased left ventricular mass is a risk factor for the development of a depressed left ventricular ejection fraction within five years: the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:2207-15.
 70. Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *Jama* 1996;275:1557-62.
 71. McLenachan JM, Dargie HJ. Ventricular arrhythmias in hypertensive left ventricular hypertrophy. Relationship to coronary artery disease, left ventricular dysfunction, and myocardial fibrosis. *Am J Hypertens* 1990;3:735-40.
 72. Edgley AJ, Kett MM, Anderson WP. Evidence for renal vascular remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *J Hypertens* 2003;21:1401-6.
 73. Mennuni S, Rubattu S, Pierelli G, Tocci G, Fofi C, Volpe M. Hypertension and kidneys: unraveling complex molecular mechanisms underlying hypertensive renal damage. *J Hum Hypertens*. England2014:74-9.
 74. Klein R, Klein BE, Moss SE, Wang Q. Hypertension and retinopathy, arteriolar narrowing, and arteriovenous nicking in a population. *Arch Ophthalmol* 1994;112:92-8.
 75. Pogrzebielski A, Lubaszewski W, Starzycka M, Kawecka-Jaszcz K. Fluorophotometric evaluation of blood-retinal barrier permeability in patients with essential hypertension. *Ophthalmologica* 2004;218:180-4.
 76. Wong TY, Mitchell P. The eye in hypertension. *Lancet*. England2007:425-35.
 77. Atkinson Jr A, Colburn W, DeGruttola V, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2001;69:89-95.

78. Biomarkers In Risk Assessment: Validity And Validation (EHC 222, 2001). Geneva: United Nations Environment Programme, International Labour Organization, WHO, 2001. (Accessed 2014/04/07, at <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm#4.1>)
79. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 2010;5:463-6.
80. Težak Ž, Kondratovich MV, Mansfield E. US FDA and Personalized Medicine: In vitro Diagnostic Regulatory Perspective. *Personalized Medicine* 2010;7:517-30.
81. Manns B, Owen WF, Jr., Winkelmayr WC, Devereaux PJ, Tonelli M. Surrogate markers in clinical studies: problems solved or created? *Am J Kidney Dis. United States* 2006;159-66.
82. Lock EA, Bonventre JV. Biomarkers in translation; past, present and future. *Toxicology* 2008;245:163-6.
83. Mundal R, Kjeldsen SE, Sandvik L, Erikssen G, Thaulow E, Erikssen J. Predictors of 7-year changes in exercise blood pressure: effects of smoking, physical fitness and pulmonary function. *J Hypertens* 1997;15:245-9.
84. de Simone G, Devereux RB, Chinali M, et al. Risk factors for arterial hypertension in adults with initial optimal blood pressure: the Strong Heart Study. *Hypertension* 2006;47:162-7.
85. Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 2003;24:987-1003.
86. D'Agostino RB, Sr., Vasan RS, Pencina MJ, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;117:743-53.
87. Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation* 2002;105:310-5.
88. Kuo LT, Yang NI, Cherng WJ, et al. Serum interleukin-6 levels, not genotype, correlate with coronary plaque complexity. *Int Heart J* 2008;49:391-402.
89. Battistoni A, Rubattu S, Volpe M. Circulating biomarkers with preventive, diagnostic and prognostic implications in cardiovascular diseases. *International Journal of Cardiology* 2012:160-8.
90. Sesso HD, Buring JE, Rifai N, Blake GJ, Gaziano JM, Ridker PM. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *Jama* 2003;290:2945-51.
91. Chuang SY, Hsu PF, Chang HY, Bai CH, Yeh WT, Pan HW. C-reactive protein predicts systolic blood pressure and pulse pressure but not diastolic blood pressure: the Cardiovascular Disease Risk Factors Two-Township Study. *Am J Hypertens* 2013;26:657-64.
92. Ndrepepa G, Braun S, Mehilli J, von Beckerath N, Schomig A, Kastrati A. Myeloperoxidase level in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes. *Eur J Clin Invest* 2008;38:90-6.
93. Kestenbaum B, Rudser KD, de Boer IH, et al. Differences in kidney function and incident hypertension: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Ann Intern Med* 2008;148:501-8.

94. Taglieri N, Koenig W, Kaski JC. Cystatin C and cardiovascular risk. *Clin Chem* 2009;55:1932-43.
95. Doganer YC, Aydogan U, Aparci M, et al. Comparison of cystatin-C and pentraxin-3 in coronary atherosclerosis. *Coron Artery Dis* 2014;25:589-94.
96. Yasunaga T, Ikeda S, Koga S, et al. Plasma pentraxin 3 is a more potent predictor of endothelial dysfunction than high-sensitive C-reactive protein. *Int Heart J* 2014;55:160-4.
97. Koenig W. Update on integrated biomarkers for assessment of long-term risk of cardiovascular complications in initially healthy subjects and patients with manifest atherosclerosis. *Ann Med* 2009;41:332-43.
98. Allwood JW, Goodacre R. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochem Anal* 2010;21:33-47.
99. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int J Anal Chem* 2012;2012:282574.
100. R T. Regression Shrinkage and Selection via the Lasso. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* 1996;58:267-88.
101. Steen H, Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:699-711.
102. Nakano K, Yamauchi J, Nakagawa K, Itoh H, Kitamura N. NESK, a member of the germinal center kinase family that activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and is expressed during the late stages of embryogenesis. *J Biol Chem* 2000;275:20533-9.
103. Sharma V, Ichikawa M, Freeze HH. Mannose metabolism: more than meets the eye. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;453:220-8.
104. Zhang Y, Chellappan SP. Cloning and characterization of human DP2, a novel dimerization partner of E2F. *Oncogene* 1995;10:2085-93.
105. Ghigo A, Li M. Phosphoinositide 3-kinase: friend and foe in cardiovascular disease. *Front Pharmacol* 2015;6:169.
106. Kim HW, Steenaart NA, Ferguson DG, Kranias EG. Functional reconstitution of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase with phospholamban in phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 1990;265:1702-9.
107. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:513-25.
108. D'Angelo A, Garzia L, Andre A, et al. Prune cAMP phosphodiesterase binds nm23-H1 and promotes cancer metastasis. *Cancer Cell* 2004;5:137-49.
109. Tammenkoski M, Koivula K, Cusanelli E, et al. Human metastasis regulator protein H-prune is a short-chain exopolyphosphatase. *Biochemistry* 2008;47:9707-13.
110. Fyhrquist F, Metsarinne K, Tikkanen I. Role of angiotensin II in blood pressure regulation and in the pathophysiology of cardiovascular disorders. *J Hum Hypertens* 1995;9 Suppl 5:S19-24.

111. Marchesi C, Ebrahimian T, Angulo O, Paradis P, Schiffrin EL. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. *Hypertension* 2009;54:1384-92.
112. Magen E, Feldman A, Cohen Z, et al. Potential link between C3a, C3b and endothelial progenitor cells in resistant hypertension. *Am J Med Sci* 2010;339:415-9.
113. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr* 2006;7:79-108.
114. Kuwahara K, Saito Y, Harada M, et al. Involvement of cardiotrophin-1 in cardiac myocyte-nonmyocyte interactions during hypertrophy of rat cardiac myocytes in vitro. *Circulation* 1999;100:1116-24.
115. Querejeta R, Varo N, Lopez B, et al. Serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I is a marker of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Circulation* 2000;101:1729-35.
116. Packard CJ, O'Reilly DS, Caslake MJ, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 2000;343:1148-55.
117. Sundsten T, Zethelius B, Berne C, Bergsten P. Plasma proteome changes in subjects with Type 2 diabetes mellitus with a low or high early insulin response. *Clin Sci (Lond)* 2008;114:499-507.
118. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:845-67.
119. Pernemalm M, Lehtiö J. Mass spectrometry-based plasma proteomics: state of the art and future outlook. *Expert Rev Proteomics* 2014.
120. Hawkrigde AM, Muddiman DC. Mass spectrometry-based biomarker discovery: toward a global proteome index of individuality. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 2009;2:265-77.
121. Constantopoulos TL, Jackson GS, Enke CG. Effects of salt concentration on analyte response using electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 1999;10:625-34.
122. Kim SH, Chuang JC, Kelly PB, Clifford AJ. Carbon isotopes profiles of human whole blood, plasma, red blood cells, urine and feces for biological/biomedical ¹⁴C-accelerator mass spectrometry applications. *Anal Chem* 2011;83:3312-8.
123. Sachs L, Hedderich J. 8.4.6 Pseudo-Bestimmtheitsmaße (Pseudo-R²). *Angewandte Statistik - Methodensammlung mit R*. 13. Auflage ed. Heidelberg/Berlin: Springer; 2009:687-8.
124. Sachs L, Hedderich J. 8.2.1 Die einfach lineare Regression. *Angewandte Statistik - Methodensammlung mit R*. 13. Auflage ed. Heidelberg/Berlin: Springer; 2009:650-4.
125. Sachs L, Hedderich J. 4.5.1 ROC-Analyse. *Angewandte Statistik - Methodensammlung mit R*. 13. Auflage ed. Heidelberg/Berlin: Springer; 2009:159.

126. Sachs L, Hedderich J. 7.4.10.2 Permutationstest, Randomisierungstest. *Angewandte Statistik - Methodensammlung mit R*. 13. Auflage ed. Heidelberg/Berlin: Springer; 2009:477-9.
127. Rachmawati H, Reker-Smit C, Lub-de Hooge MN, van Loenen-Weemaes A, Poelstra K, Beljaars L. Chemical modification of interleukin-10 with mannose 6-phosphate groups yields a liver-selective cytokine. *Drug Metab Dispos* 2007;35:814-21.
128. He P, Srikrishna G, Freeze HH. N-glycosylation deficiency reduces ICAM-1 induction and impairs inflammatory response. *Glycobiology* 2014;24:392-8.
129. Chen C, Lodish HF. Global analysis of induced transcription factors and cofactors identifies Tfdp2 as an essential coregulator during terminal erythropoiesis. *Exp Hematol* 2014;42:464-76.e5.
130. Kuschel M, Karczewski P, Hempel P, Schlegel WP, Krause EG, Bartel S. Ser16 prevails over Thr17 phospholamban phosphorylation in the beta-adrenergic regulation of cardiac relaxation. *Am J Physiol* 1999;276:H1625-33.
131. Lorenz JN, Kranias EG. Regulatory effects of phospholamban on cardiac function in intact mice. *Am J Physiol* 1997;273:H2826-31.
132. Dash R, Frank KF, Carr AN, Moravec CS, Kranias EG. Gender influences on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-handling in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1345-53.
133. Schmitt JP, Kamisago M, Asahi M, et al. Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science* 2003;299:1410-3.
134. Kobayashi T, Hino S, Oue N, et al. Glycogen synthase kinase 3 and h-prune regulate cell migration by modulating focal adhesions. *Mol Cell Biol* 2006;26:898-911.
135. Saxena S, Singh M, Engisch K, Fukuda M, Kaur S. Rab proteins regulate epithelial sodium channel activity in colonic epithelial HT-29 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337:1219-23.
136. Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 1999;104:R19-23.
137. Loffing J, Zecevic M, Feraille E, et al. Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F675-82.
138. Urick ME, Rudd ML, Godwin AK, Sgroi D, Merino M, Bell DW. PIK3R1 (p85alpha) is somatically mutated at high frequency in primary endometrial cancer. *Cancer Res* 2011;71:4061-7.
139. Ross RL, Burns JE, Taylor CF, Mellor P, Anderson DH, Knowles MA. Identification of mutations in distinct regions of p85 alpha in urothelial cancer. *PLoS One* 2013;8:e84411.
140. Barcena C, Quesada V, De Sandre-Giovannoli A, et al. Exome sequencing identifies a novel mutation in PIK3R1 as the cause of SHORT syndrome. *BMC Med Genet* 2014;15:51.

141. Harlan SM, Rahmouni K. PI3K signaling: A key pathway in the control of sympathetic traffic and arterial pressure by leptin. *Mol Metab* 2013;2:69-73.
142. Rahmouni K, Haynes WG, Morgan DA, Mark AL. Intracellular mechanisms involved in leptin regulation of sympathetic outflow. *Hypertension* 2003;41:763-7.
143. Shioi T, Kang PM, Douglas PS, et al. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *Embo j* 2000;19:2537-48.
144. McMullen JR, Amirahmadi F, Woodcock EA, et al. Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:612-7.
145. Yano N, Tseng A, Zhao TC, Robbins J, Padbury JF, Tseng YT. Temporally controlled overexpression of cardiac-specific PI3Kalpha induces enhanced myocardial contractility--a new transgenic model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H1690-4.
146. Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:205-19.
147. Xu Q, Liu Y, Gorospe M, Udelsman R, Holbrook NJ. Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin Invest* 1996;97:508-14.

6.2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

6.2.1 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** WHO-Klassifikation der arteriellen Hypertonie
- Tabelle 2:** Übersicht der verwendeten Chemikalien
- Tabelle 3:** Übersicht der verwendeten Geräte
- Tabelle 4:** Übersicht der verwendeten Software
- Tabelle 5:** Stufengradientenprogramm der RP-HPLC
- Tabelle 6:** Lineares Gradientenprogramm der der MS vorgeschalteten RP-HPLC
- Tabelle 7:** Klinische und biochemische Charakteristika der Fall- und Kontrollgruppe
- Tabelle 8:** Repräsentativer Ausschnitt aus der Buckettabelle zur Darstellung der detektierten Signale je Probe
- Tabelle 9:** Koeffizienten der für die Vorhersage relevanten Massensignale
- Tabelle 10:** Fragmentdarstellung des Massensignals 358,23 m/z
- Tabelle 11:** Massensignale mit zugehörigen identifizierten Aminosäuresequenzen und Proteinkandidaten

6.2.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2:** Übersicht über den Ablauf der Arbeitsschritte
- Abbildung 2:** Repräsentatives Chromatogramm der RP-HPLC
- Abbildung 3:** Basispeak-Chromatogramm der 20%-Fraktion der präparativen RP-HPLC
- Abbildung 4:** Extrahiertes-Ionen-Chromatogramm von 358,23 m/z
- Abbildung 5:** Massenspektrum bei der Retentionszeit von 9,08 min
- Abbildung 6:** Repräsentativer Ausschnitt des *Density views*, mit beispielhafter Isotopenmarkierung
- Abbildung 7:** Darstellung des Einflusses des D-Koeffizienten (*Nonzero vs. Zero*) jedes Massensignals in der Vorhersageformel auf einer logit-Skala
- Abbildung 8:** Boxplot mit der Verteilung der Fälle (1) und Kontrollen (0) nach Anwendung des Vorhersagemodells mit den relevanten Prädiktoren auf der logit-Skala
- Abbildung 9:** Identifizierte Aminosäuresequenz des Massensignals 358,23 m/z

7. Abkürzungen

ASE	Amerikanische Gesellschaft für Echokardiographie
AU	relative Intensität
BMI	Body Mass Index
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoffatom
CrP	C-reaktives Protein
Da	Dalton
ENaC	epithelialer Natriumkanal
ESI	Elektrosprayionisation
g	Erdschwerebeschleunigung
HDL	High Density Lipoprotein
hs	high sensitivity
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KClO ₄	Kaliumperchlorat
KOF	Körperoberfläche
Logit	<i>log of odds</i>
HMV	Herz-Minuten-Volumen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
K ₂ - EDTA	Kalium- Ethylendiamintetraessigsäure
KOH	Kaliumhydroxid
LC	Flüssigkeitschromatographie
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
M	mol/l
m	Masse
mm	Millimeter
m/w	männlich/weiblich
MALDI	matrixunterstützte UV-Laser-Desorption/Ionisation
MS	Massenspektrometrie
NO	Stickstoffmonoxid
n. s.	nicht signifikant
NRK	NIK related Proteinkinase
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit

PCA	Perchlorsäure
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI3KR1	regulatorische Untereinheit 1 der Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP	Reversed-Phase
rpm	<i>rounds per minute</i>
R ²	Bestimmtheitsmaß
s	Sekunde
SERCA	sarkoplasmatisches Retikulum Calcium-ATPase
S/N	Signal-zu-Rausch
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TFA	Trifluoressigsäure
TIA	transiente ischämische Attacke
TOF	<i>Time of Flight</i>
TPR	totaler peripherer Gefäßwiderstand
UV	ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z	Ladung

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Hanna Schuster, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Erstellung eines Massenspektrometrie-basierten biostatistischen Modells zur Identifizierung proteomischer Biomarkerkandidaten für die Früherkennung der arteriellen Hypertonie

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 25.11.2015

Hanna Schuster

9. Lebenslauf

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

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med Walter Zidek für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Nephrologie der IV. Medizinischen Klinik der Charité Berlin zu realisieren.

Danken möchte ich auch Frau PD Dr. rer. nat. Vera Jankowski für die Durchführung der Massenidentifizierung mittels MALDI-MS und der Mascot-Datenbank, sowie für die stets freundliche Unterstützung und Beratung bei Fragen oder sich stellenden Problemen. Herzlichen Dank für das Begleiten meiner Arbeit auch über den Weggang aus Berlin hinaus.

Danken möchte ich auch Herrn Univ. -Prof. Dr. rer. nat. Joachim Jankowski für seine vielseitige wissenschaftliche Unterstützung im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Alberto Zanchetti und den Mitarbeitern des Istituto Auxologico Italiano, Mailand, für die Akquise der Probanden, die Durchführung der Untersuchungen zur Probandencharakterisierung sowie für die Abnahme und Verschickung der Plasmaproben.

Darüber hinaus möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Georg Heinze danken für die Entwicklung des biostatistischen Modells in seiner Arbeitsgruppe am Zentrum für medizinische Statistik, Informatik und intelligente Systeme, Institut für Klinische Biometrie der Medizinischen Universität Wien.

Frau Dr. rer. nat. Anna Marta Schulz gilt mein Dank für die Durchführung der ESI-massenspektrometrischen Analyse der Proben, sowie der Profile Analysis und für ihre stets konstruktiven Hilfestellungen und verständlichen Erklärungen bei allen Fragestellungen rund um die Massenspektrometrie.

Frau Dr. rer. nat. Katharina Krüger danke ich für ihre Bereitschaft, diese Arbeit Korrektur zu lesen und ihre konstruktiver Kritik dabei. Zu wissen, dass ich bei ihr stets einen Ansprechpartner finde, hat mir in schwierigen Phasen sehr geholfen.

Zudem möchte ich Frau Brigitte Egbers meinen Dank aussprechen für ihre tatkräftige Unterstützung und ihre Ratschläge im Rahmen der chromatographischen Arbeiten

Ich danke meinem Vater für das Lesen meiner Arbeit, seine kompetenten Vorschläge und Anmerkungen sowie seine Bereitwilligkeit, sich dafür viel Zeit zu nehmen.

Meinem Lebenspartner danke ich für seine vielfältige Unterstützung und unendliche Hilfsbereitschaft über den gesamten Zeitraum der Erstellung dieser Arbeit.