

Aus dem
CharitéCentrum für Magen-, Darm-, Nieren- und Stoffwechselmedizin
Medizinische Klinik für Endokrinologie
Campus Benjamin Franklin
Direktor: Professor Dr. W. Zidek

Habilitationsschrift

Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung neuer Biomarker und Mediatoren im Rahmen der Niereninsuffizienz und kardiovaskulären Erkrankungen

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach „Experimentelle Medizin“

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. Vera Jankowski
geboren am 05. Juli 1964 in Witten

Eingereicht: Februar 2011

Dekanin: Prof. Dr. med. A. Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. U. Wenzel

2. Gutachter: Prof. Dr. med. C. Werner

**Die in der Habilitationsschrift zusammengefassten Arbeiten
gründen sich auf folgende publizierte Artikel:**

IF

Methodischer Teil

1. **Jankowski V**, Vanholder R, Henning L, Karadogan S, Zidek W, Schlüter H, Jankowski J: **Isolation and quantification of dinucleoside polyphosphates by using monolithic reversed phase chromatography columns.** *Journal of Chromatography B.* 819 (1):131-139 (2005) 2.4

- Angiotensin Peptide (Identifizierung und Detektierung von bekannten und unbekanntem Peptiden)**

2. **Jankowski V**, Vanholder R, van der Giet M, Henning L, Tölle M, Schönfelder G, Krakow A, Karadogan S, Gustavsson N, Gobom J, Webb J, Lehrach H, Giebing G, Schlüter H, Hilgers KF, Zidek W, Jankowski J: **Detection of angiotensin II in supernatants of stimulated mononuclear leukocytes by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight/time-of-flight mass analysis.** *Hypertension* 46(3):591-597 (2005) 6.3

3. **Jankowski V**, Vanholder R, van der Giet M, Tölle M, Karadogan S, Gobom J, Furkert J, Oksche A, Krause E, Tran TN, Tepel M, Schuchardt M, Schlüter H, Wiedon A, Beyermann M, Bader M, Todiras M, Zidek W, Jankowski J: **Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma.** *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27(2):297-302 (2007) 7.4

4. **Jankowski V**, Tölle M, Santos RAS, Günthner T, Krause E, Beyermann M, Welker P, Bader M, Brant SV, Sampaio WO, Queiroga R, Kretschmer A, van der Giet M, Zidek W, Jankowski J. **Angioprotektin: An Ang-like peptide causing vasodilatory effects.** (submitted)

Dinukleosidpolyphosphate (Identifizierung und Charakterisierung von unbekanntem und bekannten Dinukleosidpolyphosphaten)

5. **Jankowski V**, Meyer AA, Schlattmann P, Gui Y, Zheng XL, Stamcou I, Radtke K, Tran TN, van der Giet M, Tölle M, Zidek W, Jankowski J. **Increased uridine adenosine tetraphosphate concentrations in plasma of juvenile hypertensives.** *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27(8):1776-1781 (2007) 7.4

6. **Jankowski V**, Patzak A, Herget-Rosenthal S, Tran TN, Lai EY, Günthner T, Buschmann I, Zidek W, Jankowski J. **Uridine adenosine tetraphosphate acts as an autocrine hormone affecting glomerular filtration** *Journal of Molecular Medicine* 86(3):333-340(2008) 4.3

7. **Jankowski V**, Karadogan S, Vanholder R, Nofer J-R, Herget-Rosenthal S, van der Giet M, Tölle M, Tran TN, Zidek W, Jankowski J. **Paracrine stimulation of vascular smooth muscle proliferation by diadenosine polyphosphates released from proximal tubule epithelial cells.** *Kidney International* 71(10):994-1000 (2007) 4.7

8. Jegutkin GG, Jankowski J, Jalkanen S, Günthner T, Zidek W, **Jankowski V.** **Dinucleotide Polyphosphate contribute to purinergic signaling via inhibition of adenylatkinase activity.** *Bioscience Report* 4, 189-194 (2008) 2.5

9. **Jankowski V**, Tran TN, Lehmann K, Schönfelder G, Zidek W, Jankowski J. **Diuridine tetraphosphate: A potent endothelial-derived angiogenesis-inducing mediator.** (submitted)

Verzeichnis der Abkürzungen

ACE	Angiotensin converting enzym
ADP	Adenosindiphosphat
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
Ang III	Angiotensin III
Ang (1-7)	Angiotensin 1-7
Ang A	Angiotensin A
Ap ₅ A	Diadenosinpentaphosphat
Ap ₆ A	Diadenosinhexaphosphat
CKD	Chronic Kidney Disease
CVD	Cardiovascular Disease
DHB	Dihydroxybenzoesäure
EDCF	Endothelial derived constrictiv factor
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
ESI-MS	Electrosprayionisations-Mass Spectrometry
FT-ICR-MS	Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz Mass Spectrometry
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HMEC	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen
HUVEC	Humane Nabelschnur Endothelzellen
HPLC	High Performance Liquid-Chromatographie
ISH	International Society of Hypertension
MALDI-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation Mass Spectrometry
NTPDase	Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase
NPPase	Nukleotid-Diphosphatase
OAG	Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
OR	Odds Ratio
PCAM	Platelet cell adhesions molecule
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
RAS	Renin-Angiotensin-System
RPC	Reversed-Phase-Chromatography

SEM	Standard error of the mean
TOF	Time-of-flight
TBA	Tributylammoniumhydrogensulfat
TEAA	Triethylammoniumacetat
TFA	Trifluoracetat
Up ₄ A	Uridin adenosine tetraphosphat
VSMC	glatte Gefäßmuskelzellen
WHO	World Health Organisation

Inhaltsverzeichnis

Publikationen, auf denen diese Schrift beruht	2
Verzeichnis der Abkürzungen	4
Inhaltsverzeichnis	6
1. Einleitung	8
1.1 Chronische Niereninsuffizienz	8
1.2 Ätiologie der chronischen Niereninsuffizienz	9
1.3 Chronische Niereninsuffizienz in Deutschland	10
1.4 Sozioökonomische Kosten	11
1.5 Ciculus vitiosus	12
1.6 Biomarker	14
2.0 Technologische Entwicklungen zur Biomolekül-Isolierung und Identifizierung	
2.1 Reversed Phase Chromatographie	16
2.2 Matrix unterstützte Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie	17
2.3 Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie	18
2.4 Fouriertransformations-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie	19
3. Ergebnisse	
Methodischer Teil	
3.1 Rapid, baseline separation of dinculeoside polyphosphates using a monolithic silica C18 column	20
Angiotensin Peptide	
3.2.1 Detection of angiotensin II in supernatants of stimulated	22

	mononuclear leukocytes by MALDI-TOF-TOF-mass spectrometric analysis	
3.2.2	Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma	24
3.2.3	Angioprotektin: An Ang-like peptide causing vasodilatory effects	25
	Dinukleosidpolyphosphate	
3.3.1	Increased uridine adenosine tetraphosphate concentrations in plasma of juvenile hypertensives	27
3.3.2	Uridine adenosine tetraphosphate released by tubule cells acts as an autocrine hormone affecting glomerular filtration rate	29
3.3.3	Paracrine stimulation of vascular smooth muscle proliferation by diadenosine polyphosphates released from proximal tubular cells	30
3.3.4	Diuridine tetraphosphat: A potent endothelium-derived angiogenic factor	31
3.3.5	Dinucleotide Polyphosphate contribute to purinergic signaling via inhibition of adenylatkinase activity	32
4.	Diskussion	
4.1	Methodischer Teil	34
4.2	Angiotensin Peptide	35
4.3	Dinukleosidpolyphosphate	36
5.	Zusammenfassung	39
6.	Literaturverzeichnis	40
7.	Danksagung	48
8.	Eidesstattliche Erklärung	49

1 Einleitung

1.1 Chronische Niereninsuffizienz

Die chronische Niereninsuffizienz (eng: „*chronic kidney disease*“ (CKD)) ist definiert als progrediente, irreversible Schädigung der Nierenfunktion. Die irreversible Schädigung der Niere führt zu einer Insuffizienz des Organs und bedingt eine verringerte Regulation des Wasser-, Elektrolyt-, Säure-Basen-Haushalts und der endokrinologischen Regulationen. Die Schädigung des Nierengewebes führt zu einer eingeschränkten Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, den so genannten Urämietoxinen, wodurch weitere Organschäden bedingt werden (1). Eine Nierenerkrankung manifestiert sich durch eine Proteinurie und/oder einer eingeschränkten glomerulären Filtrationsrate (GFR) unter 60 ml/min pro 1,73m² Körperoberfläche, die mehr als 3 Monate besteht. In **Tabelle 1** sind die Stadieneinteilungen der chronischen Niereninsuffizienz nach der glomerulären Filtrationsrate und das Ausmaß der Niereninsuffizienz in den verschiedenen Stadien der CKD aufgeführt (2).

Tabelle 1: Einteilung der Stadien der chronischen Niereninsuffizienz aufgrund der glomerulären Filtrationsrate laut National Kidney Foundation (2)

Stadium	Glomeruläre Filtrationsrate [ml/min/1,73m ²]	Beschreibung der Stadien
I	≥ 89	Strukturelle oder funktionelle Nierenstörung bei normaler Nierenfunktion
II	60-89	Nierenerkrankung mit reduzierter GFR
III	30-59	Nierenerkrankung mit deutlich reduzierter GFR
IV	15-29	Nierenerkrankung mit stark reduzierter GFR
V	≤ 15	terminale Niereninsuffizienz

Eine frühzeitige Diagnostizierung der Erkrankung ist von besonderer Relevanz, da nur hierdurch frühzeitig eine geeignete Therapie begonnen werden kann (3). Je früher die Erkrankung diagnostiziert wird, desto wahrscheinlicher ist es, eine weitere Progression zu verhindern oder zumindest deutlich zu verlangsamen (4, 5). Bei ausbleibender Therapie führt die terminale Niereninsuffizienz zum Tode des Patienten.

1.2 Atiologie der chronischen Niereninsuffizienz

Eine beginnende Niereninsuffizienz (Stadium I, Stadium II, Stadium III) kann jedoch gegenwärtig aufgrund fehlender Verfügbarkeit valider Biomarker nicht, beziehungsweise nur unzureichend diagnostiziert werden (6). Daher erfolgt die Einteilung gegenwärtig noch symptomatisch, wobei die Niereninsuffizienz in Früh-, Spät-, und terminale Symptome unterteilt wird. Zu den Frühsymptomen gehören eine vermehrte Urinausscheidung, Hypertonie, Ödeme in den unteren Extremitäten und dysurische Beschwerden (7). Zu den Spätsymptomen gehören erhöhte Müdigkeit, Sehstörungen, Erbrechen, Hautjucken, Prästhesien und Muskelfibrillieren. Die terminale Symptomatik ist durch Erbrechen, Atemnot, urämischer Fötor, Rhythmusstörungen, Rückgang der Urinmenge sowie Krämpfen und Koma zu diagnostizieren (7).

Da bei einer großen Anzahl von Erkrankten die bestehende Niereninsuffizienz weiterhin nicht diagnostiziert wird, sind zuverlässige Angaben zur Prävalenz der chronischen Niereninsuffizienz gegenwärtig nicht vorhanden. Die prozentuelle Verteilung der Grunderkrankungen zum Zeitpunkt des Beginns einer Nierenersatztherapie ist in **Abbildung 1** gezeigt.

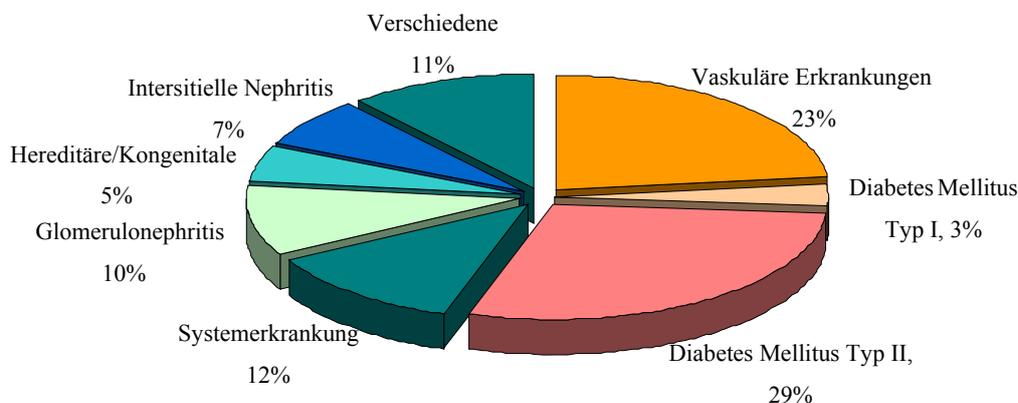


Abbildung 1: Diagnoseverteilung der Erkrankungen von Patienten bei Therapiebeginn (Inzidenz) (8).

Im Jahr 2008 war die diabetische Nephropathie mit 32% die häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz, gefolgt von der vaskulären Nephropathie mit 23%. Die diabetische Nephropathie und die vaskuläre Nephropathie umfasst 55% der Patienten, die mit einer Nierener-

satztherapie beginnen (8). Die diabetische Nephropathie und die vaskuläre Nephropathie sind unter anderem Folge der arteriellen Hypertonie, welche nicht nur ursächlich, sondern auch progressiv für den Verlust der Nierenfunktion verantworten ist. Weitere ursächliche Faktoren der chronischen Nierenerkrankung ist die chronische Glomerulonephritis (9), aus bisher unbekanntem Gründen wird aus einer Entzündung des Nierengewebes eine auf das gesamte Nierengewebe übergreifende Glomerulonephritis. Die Ursachen der chronischen Glomerulonephritis sind weitestgehend ungekannt, sicher ist jedoch, dass die chronische Glomerulonephritis wenn diese nicht therapiert wird, zur chronischen Niereninsuffizienz führt (10, 11). Auch können interstitielle Nephritis, Zystennieren sowie Systemerkrankungen wie z. B. Amyloidose oder systemischer Lupus Erythematodes in einer chronischer Niereninsuffizienz münden (7). In 11% der Fälle kann gegenwärtig keine Ursache der terminalen Niereninsuffizienz diagnostiziert werden (12). Die Progression der chronischen Niereninsuffizienz scheint auch durch genetische Faktoren bestimmt zu sein (13). Des Weiteren können Einflüsse des individuellen Lebensstills wie Adipositas (14), Nikotinabusus (15, 16) oder chronische Einnahme von Medikamenten (Aspirin und/oder Paracetamol) (17) eine Beschleunigung der Progression bewirken. Von Relevanz für den Verlauf der Erkrankung ist neben einer frühzeitigen Diagnose eine geeignete Therapie. Die Therapie ist dabei nicht nur von der Art der Grunderkrankung, sondern auch im Besonderen vom Stadium der chronischen Niereninsuffizienz abhängig (7).

1.3 Chronische Niereninsuffizienz in der Bundesrepublik Deutschland

In Deutschland leiden derzeit über 2 Millionen Patienten an einer chronischen Niereninsuffizienz (**Abbildung 2**) (18). Exakte Zahlen liegen hierfür nur bis zum Jahre 2007 vor. In den nächsten Jahren wird ein deutlicher Anstieg der Anzahl der behandlungspflichtigen chronisch-niereninsuffizienter Patienten im Stadium V erwartet (18). Weltweit liegt die Prävalenz von CKD bei 11% der Bevölkerung, mit einer steigender Tendenz (19, 20).

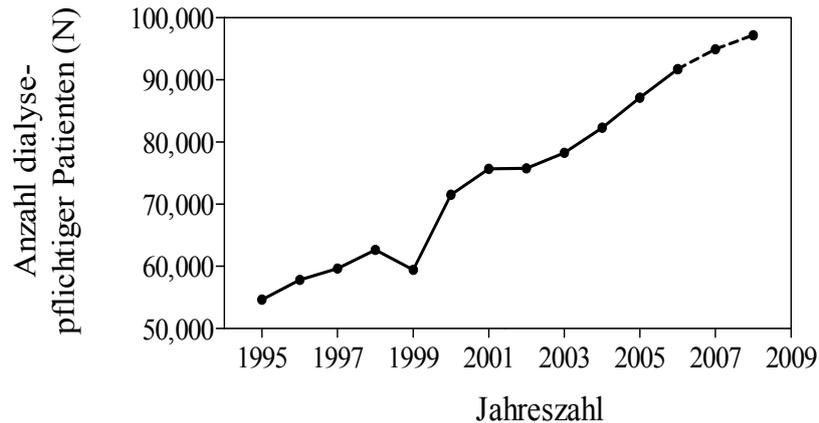


Abbildung 2: Anzahl dialysepflichtiger Patienten in den Jahren 1995 – 2006 (extrapoliert bis zum Jahre 2008) in Deutschland (18)

1.4 Sozioökonomische Kosten

Die Behandlungskosten der chronischen Niereninsuffizienz haben sich in den letzten Jahrzehnten zu einem bedeutsamen sozioökonomischen Problem entwickelt. Die Behandlungskosten der Population mit präterminaler (Stadium III-IV) und terminaler (Stadium V) Niereninsuffizienz mit den gegenwärtigen Therapieoptionen ist sowohl für den einzelnen Patienten, als auch für die Gesamtbevölkerung überproportional hoch. Für Westeuropa entstehen Kosten von bis zu 30.000 € (Transplantation) bzw. 60.000 bis 80.000 € (Dialyse) pro Patientenzahr. **Tabelle 2** zeigt die geschätzten jährlichen Behandlungskosten die in Deutschland 2005 entstanden sind.

Tabelle 2: Geschätzte jährliche Behandlungskosten in Deutschland in 2005 in Euro (€)

Stadium der chronischen Niereninsuffizienz	Kosten/Jahr/Patient	Patienten (n)	Kosten (€)
Stadium III und Stadium IV	6.000	4.000.000	24.000.000.000
Stadium V (vor Dialyse)	60.000	63.000	4.000.000.000
Stadium V (Nierentransplantation)	30.000	24.000	700.000.000
Gesamtpopulation mit Risiko eines CV Todes	1.000	20.000.000	20.000.000.000
TOTAL			48.700.000.000

1.5 Chronische Niereninsuffizienz und kardiovaskuläre Erkrankungen: Ein *Circulus vitiosus*

Die chronische Niereninsuffizienz stellt ein unabhängiges kardiovaskuläres Risiko dar (21), wobei die arterielle Hypertonie einerseits Ursache einer chronischen Niereninsuffizienz ist (22, 23), andererseits eine sekundär Erkrankung der chronischen Niereninsuffizienz darstellt. Abhängig von der renalen Grunderkrankung, dem Alter, dem Schweregrad der Niereninsuffizienz und dem Ausmaß der Proteinurie liegt bei 50-90% der chronisch-niereninsuffizienten Patienten eine arterielle Hypertonie (24) vor. Chronisch-niereninsuffiziente Patienten leiden regelhaft an kardiovaskulären Begleiterkrankungen, die im Vergleich zu den Herz-Kreislauf-Erkrankungen der Allgemeinbevölkerung, eine stark beschleunigte Progredienz zeigen und die Haupttodesursache der chronisch-niereninsuffizienten Patienten darstellt. Trotz Einsetzen antihypertensiver Therapien ist eine kardiovaskuläre Erkrankung in Folge, die häufigste Todesursache chronisch-niereninsuffizienter Patienten (25, 26). So bestätigt eine Metaanalyse von 85 Studien den Zusammenhang zwischen einer Niereninsuffizienz und einer kardiovaskulären Erkrankung (27). Aufgrund der gegenwärtigen Daten- und Erkenntnislage ist davon auszugehen, dass eine bislang nicht identifizierte Gruppe von Mediatoren für die Genese kardiovaskulärer Erkrankungen chronisch-niereninsuffizienter Patienten ursächlich ist. Die Kenntnis der Mediatoren, die an physiologischen und pathophysiologischen Regulationen beteiligt sind, ist wesentlich, um Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz zu finden, um mit diesem Wissen neue Behandlungstherapien zu entwickeln.

Mutmaßlich sind die betreffenden Mediatoren nicht nur für kardiovaskulärer Erkrankungen chronisch-niereninsuffizienter Patienten (28), sondern auch für kardiovaskuläre Erkrankungen nierengesunder Personen von Bedeutung (29), die sich in Krankheitsbilder wie Angina Pectoris, Myokardinfarkt, Herzarrhythmien, Herzinsuffizienz, Schlaganfall und die arterielle Verschlusskrankheit manifestieren. Hierbei ist eine Arteriosklerose der Gefäße mit Verengung einer oder mehrerer das Myokard, Gehirn und Niere versorgende Arterien (Arteriostenose), sowie arterielle Hypertonie die häufigsten Primärursachen der Erkrankung.

Die arterielle Hypertonie ist dabei im besonderen Maße für das Fortschreiten der Niereninsuffizienz bedeutsam (30, 31), wobei die arterielle Hypertonie eine der häufigsten Erkrankungen in Deutschland und in den westlichen Industriestaaten darstellt (32). So haben in Deutschland 53% der Frauen und 67% der Männer im Alter von 18 bis 99 Jahren einen erhöhten arteriellen Blutdruck (33). Über ein Viertel der globalen Bevölkerung und mehr als die Hälfte der über fünfzigjährigen Bevölkerung in den industrialisierten Ländern leiden an einer Hypertonie

(34). Als Hypertonie wird dabei eine dauerhafte Erhöhung des Blutdrucks im arteriellen System bezeichnet. Als „normale Blutdruckwerte“ gelten für den systolischen Blutdruck Werte < 120 mmHg, für den diastolischen Blutdruck < 80 mmHg. Eine Hypertonie liegt vor, wenn bei zwei oder mehr Blutdruckmessungen in Ruhe ein erhöhter Blutdruck gemessen wird. In **Tabelle 3** ist die Klassifikation der arteriellen Hypertonie für Erwachsene älter als 18 Jahre aufgelistet, die von der International Society of Hypertension (ISH) in Kooperation mit der World Health Organisation (WHO) vorgeschlagen wurden (35).

Tabelle 3: Klassifikation der arteriellen Hypertonie nach WHO (35)

Bewertung	systolischer Blutdruck (mmHg)	diastolischer Blutdruck (mmHg)
normaler Blutdruck	120-129	80-84
Hoch-normaler Blutdruck	130-139	85-89
Milde Hypertonie (Stufe 1)	140-159	90-99
mittlere Hypertonie	160-179	100-109
schwere Hypertonie	>180	>110
isolierte systolische Hypertonie	>140	<90

Die Hypertonie wird in zwei Formen eingeteilt, in eine essentielle Hypertonie und in eine sekundäre Hypertonie. Die essentielle Hypertonie ist eine multifaktorielle Erkrankung, die durch genetische, verhaltensbedingte und umweltbedingte Komponenten beeinflusst wird (36, 37). Mehr als 85-95% aller Hypertonie-Erkrankungen werden der essentiellen Hypertonie zugeordnet (38). Die Identifizierung der Faktoren, die zu einer essentiellen Hypertonie führen, ist bis zum heutigen Tage nicht abgeschlossen. Die sekundäre Hypertonie ist als Folgeerkrankung an einer primären Erkrankung charakterisiert. Zu den Ursachen der sekundären Hypertonie zählen Nierenerkrankungen (39), Gefäßanomalien (40) und hormonelle Störungen(39, 41).

Der *Circulus vitiosus* der kardiovaskulären Erkrankungen und der chronischen Niereninsuffizienz ist sowohl ein medizinisches Problem mit deutlichen Einschränkungen in der Lebensqualität der Patienten, als auch ein finanzielles Problem des Gesundheitswesens. Neben der chronischen Niereninsuffizienz gehören die kardiovaskulären Erkrankungen zu den Krankheitsbildern mit enorm epidemiologischer und volkswirtschaftlicher Bedeutung. (42). Diese Tatsachen unterstreicht die Notwendigkeit, Methoden zu etablieren, mit denen eine beginnen-

de kardiovaskuläre Erkrankung so früh wie möglich festgestellt werden kann und die pathophysiologischen Mechanismen aufzudecken, die ursächlich für das Auftreten und Fortschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen chronisch-niereninsuffizienter Patienten sind. Die prognostische Wertigkeit bekannter Mediatoren muss im Detail geklärt und neue frühdiagnostische Biomarker identifiziert werden, damit zukünftig Methoden zur Diagnostik und Therapie der chronischen Niereninsuffizienz entwickelt werden können, sodass kardiovaskulären Komplikationen und der damit verbundenen erhöhten Mortalität der chronischen Niereninsuffizienz entgegengewirkt werden kann.

Der Weg zum Verständnis der vermehrten kardiovaskulären Erkrankungen chronisch-niereninsuffizienter Patienten liegt in der Identifizierung der zugrunde liegenden Mediatoren und in der Entschlüsselung der molekularen Mechanismen, über die diese bisher unbekannt Mediatoren das kardiovaskuläre System beeinflussen.

1.6 Biomarker zur Diagnostik der chronischen Niereninsuffizienz

Nierenschäden werden gegenwärtig labordiagnostisch durch die Kreatinin-Clearance im Serum bestimmt. Jedoch kommt es erst nach einem Verlust der Nierenfunktion von ca. 50% zu einem Anstieg der Kreatinins im Serum (43). Dieser Anstieg ist mit den verfügbaren Methoden zur Bestimmung der Kreatinin-Clearance detektierbar. Hingegen kann eine Niereninsuffizienz Stadium I-III nicht durch die Kreatinin-Clearance diagnostiziert werden. Daher ist es dringend geboten, Biomarker zu identifizieren, durch die eine Niereninsuffizienz im Stadium I-III zu diagnostizieren sind. Obwohl gegenwärtig vielfältige Untersuchungen durchgeführt werden um derartige Biomarker zu identifizieren, (44-46), konnten bisher keine entsprechenden validen Biomarker identifiziert werden. Daher steht eine Therapie der Stadien I-III der chronischen Niereninsuffizienz bis zum heutigen Tage auch, mit der Folge hoher Therapiekosten zur Therapie chronisch-niereninsuffizienter Patienten des Stadium IV-V und hohen körperlichen Belastungen der betroffenen Patienten aus.

2 Technologische Entwicklungen zur Isolierung und Identifizierung von Biomolekülen

In den letzten Jahren wurden auf dem Gebiet der instrumentellen Analytik wesentliche Fortschritte zur Biomolekül-Isolierung und zur Biomolekül-Identifizierung gemacht. Hieraus fol-

gernd bieten die modernen bioanalytischen, instrumentellen Methoden der Chromatographie, NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie gegenwärtig erstmalig die Möglichkeit, die relevanten Biomarker und Biomoleküle z. B. der chronischen Niereninsuffizienz zunächst zu isolieren, und im Anschluss durch Kombinationen der analytischen Methoden zur Strukturanalyse die zugrunde liegenden Substanzen zu identifizieren.

Als erfolgversprechender Ansatz hat sich Rahmen der vorliegenden Arbeit die Isolierung der betreffenden Mediatoren durch chromatographische Techniken in Kombination mit (patho-) physiologischen Bioassay-Systemen bis zur Homogenität erwiesen. Die homogenen Fraktionen mit (patho-) physiologischem Impact werden mittels massenspektrometrischer Methoden wie Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-of-Flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS), Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight - Time of Flight- Massenspektrometrie (MALDI-TOF-TOF-MS), Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS), und Fourier-Transform-Ionencyklotronresonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) analysiert und die zugrunde liegenden molekularen Strukturen der Mediatoren aufgeklärt.

Diese Kombinationen von jüngst entwickelten chromatographischen und im besonderen massenspektrometrischer Techniken werden dazu beitragen, neuen Biomarker, Mediatoren und Targets der chronischen Niereninsuffizienz zu isolieren und zu identifizieren. Die Kombination unterschiedlicher Auswerte-Algorithmen bietet dabei die weitere Möglichkeit, spezifischer Profile der identifizierten Biomarker und Mediatoren zu akquirieren und dadurch einerseits die Validität der Substanzen zu prüfen, und andererseits zukünftig die betreffenden Substanzen zu Diagnostik in die klinische Routine einzubringen.

2.1 Reversed-Phase-Chromatographie

Das Prinzip von Reversed-Phase-Chromatographie beruht auf hydrophobe Wechselwirkung der zu isolierenden Substanzen mit einer unpolaren stationären Phase und unterschiedlich polaren, mobilen Phasen. Klassisch wurden zur Reversed-Phase-Chromatographie Kieselgelpartikel eingesetzt, die jedoch durch starke Limitierungen bezüglich Trennleistung und Gegendruck aufwiesen. Weiterhin weisen die betreffenden Säulen eine geringe chemische Stabilität auf. Silika-basierte Reversed-Phase-Phasen können nur in einem pH-Bereich von $2 < \text{pH} < 8$ betrieben werden (47); bei einem pH-Wert unterhalb von 2 werden die Liganden von dem Trägermaterial hydrolysiert (48).

Aufgrund der limitierten chemischen Stabilität können diese Chromatographie-Phasen nur begrenzt in der Bioanalytik eingesetzt werden, die Standzeiten der Säulen sind hierdurch bedingt insgesamt begrenzt. Daher wurden jüngst neuartige Säulenmaterialien entwickelt, die aus hochreinem, monolithischem Kieselgel mit einer bimodalen Porenstruktur bestehen. Die betreffenden monolithischen Chromatographie-Säulen ermöglichen chromatographische Auftrennungen mit einer deutlich verbesserten Chromatographieleistung, bezüglich Sensitivität, Stabilität und Reproduzierbarkeit. Die Monolithe der betreffenden Reversed-Phase-Chromatographie-Säulen bestehen aus einem Geflecht von Poren mit einem Durchmesser von $2 \mu\text{m}$. Durch diese Porenstrukturen können aufgrund des im Vergleich zu konventionellen Reversed-Phase-Chromatographie-Gelen geringeren Rückdrucks die jeweiligen Eluenten mit hohen Fluss-Geschwindigkeiten von bis zu 10 ml/min durchströmen. Die höheren Fluss-Geschwindigkeiten bedingen eine höhere Sensitivität und eine höhere Auflösung der betreffenden monolithischen Reversed-Phase-Säulen. Weiterhin werden die Analysenzeiten deutlich verringert (49), was im Besonderen in der klinischen Routine bedeutsam ist.

Die deutlich höheren Trennleistungen monolithischer Säulen im Vergleich zur konventionellen Reversed-Phase-Chromatographie-Säulen wird im Besonderen auch bei der Verwendung von Ionenpaar-Reagenzien deutlich. Ionenpaar-Reagenzien werden der mobilen Phase zugesetzt, binden an ionischen Gruppen der Biomoleküle und verstärken dadurch die Hydrophobizität des Biomoleküls, wodurch das betreffende Biomolekül stärker an das Chromatographie-Säulematerial adsorbiert wird. Die Elution von Reversed-Phase-Materialien erfolgt durch Verwendung hydrophober Eluenten, die die adsorbierten Substanzen von den Adsorptionsstellen freisetzen. Zur Maximierung der erzielten Auflösung wird die Konzentration der

jeweiligen Eluentsen graduell gesteigert. Da die Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie salzfrei sind, können die betreffenden Substanzen direkt der massenspektrometrischen Analyse zugeführt werden, wie beispielsweise der Matrix unterstützten Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (50).

2.2 Matrix unterstützte Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie

Bei der Matrix unterstützten Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) handelt sich um eine massenspektrometrische Methode, bei der die Analyten mit einer Matrix auf einer Metallprobenträger aufgetragen und mit einem kurzwelligem Laserlicht beschossen werden. Als Matrix werden aromatische Säuren verwendet (wie z. B. 2,5-Dihydroxy-benzoensäure), die einerseits stark die Laserenergie absorbieren und andererseits die Protonen für die Ionisierung bieten. Die Ionen werden in einem elektrischen Feld im Hochvakuum beschleunigt. Die Trennung der Ionen erfolgt nach deren Flugzeit (engl. „*time of flight*“ (TOF)). Durch die Laserimpulse wird Energie mit gleichem Betrag auf die Ionen übertragen, aufgrund dessen deren Geschwindigkeit lediglich von dem m/z Verhältnis abhängt. Zur Erhöhung der Auflösung wird zusätzlich ein Ionenreflektor-Feld verwendet. Dieses befindet sich am Ende des ersten Flugrohrs und erzeugt ein den Teilchen gleichgeladenes Bremsfeld. Die Eindringtiefe der Ionen ist proportional zu der Masse der Ionen. Hierdurch verweilen schwere Ionen länger in dem Reflektorfeld als leichtere Ionen, die aufgrund ihrer geringen kinetischen Energie unmittelbar reflektiert werden. Sie werden abgebremst, umgelenkt und erneut in die Richtung des Detektors beschleunigt (51, 52).

Durch Verwendung der *LIFT*-Technik in der MALDI-Massenspektrometrie ist es darüberhinaus möglich, Fragmentspektren von den Biomolekülen zu akquirieren. Bei der *LIFT*-Technik wird der Analyt mit stärkerem Laser-Impuls beschossen, sodass die beschleunigten Ionen fragmentieren. Die Fragmente besitzen die Fluggeschwindigkeit des ursprünglichen Mutter-Ions und können mit Hilfe eines elektrischen Gitters von anderen Fragmenten getrennt werden. Nach dem Passieren des Gitters werden diese Fragment-Ionen erneut beschleunigt, aufgetrennt und detektiert. Anhand der Fragmente kann mit Hilfe eines Datenabgleich oder durch eine *de-novo*-Sequenzierung die molekulare Struktur des zugrunde liegenden Biomoleküls identifiziert werden (53).

2.3 Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie

Bei der Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) erfolgt die Ionisierung durch die, an einer beheizten Transferkapillare angelegte Hochspannung, die zum Versprühen der Lösung unter atmosphärischen Druck führt. Diese führt zur Desolvatisierung des Analyten. Die geladenen Teilchen werden durch ein elektrisches Feld in Richtung des Detektors beschleunigt. Zur Unterstützung der Desolvatisierung und Ionisierung wird erhitztes Trägergas eingesetzt. Durch Verdampfen des Lösungsmittels nimmt die Ladungsdichte innerhalb der Teilchen zu, und bedingt hierdurch Coulomb-Explosionen. Hierbei werden mehrfach geladene Gas-Ionen generiert, die entweder durch Aufnahme eines Protons $[M+H]^+$ aus dem Lösungsmittel positiv oder durch Verlust eines Protons $[M-H]^-$ negativ geladen werden. Ein Vorteil der Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie gegenüber anderen Massenspektrometrie-Messtechniken bildet die direkte Kopplung mit einem HPLC-System, wodurch Nebenbestandteile der jeweiligen Probe unmittelbar vor der Analyse abgetrennt werden können, und dadurch die Sensitivität nochmals verbessert werden kann (54, 55).

Die Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie bietet darüberhinaus die Möglichkeit, höher auflösende Fragmentspektren von Biomolekülen zu generieren. Hierbei wird das zu fragmentierende Biomolekül in einer Ionenfalle durch eine Kombination von hochfrequenten elektrischen Feldern und einem Gleichstrom zur Oszillation gebracht. Durch Frequenz-Modulationen werden Ionen gefiltert und fragmentiert. Hierfür werden die selektierten Ionen in eine Kollisionskammer geleitet, wo unter Hochvakuum ein Kollisionsgas geleitet wird. Dieser führt zum Zusammenstoßen der Moleküle und deren Fragmentierung. Die Akquisition von Fragmentspektren ist bei der Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie nicht auf Fragmente limitiert, die durch einen einzelnen Bindungsbruch entstehen, sondern es können auch Fragmente analysiert werden, die durch mehrere Bindungsbrüche im Gesamtmolekül entstehen. Die resultierenden MS^n -Fragmentspektren mit (n = Ordnung des Fragmentspektrums) sind durch eine hohe Komplexität und daher hohem Informationsgehalt charakterisiert. So können auch Biomoleküle mit geringen Unterschieden der molekularen Struktur, die in den ersten Fragmentierungen nahezu identisches Fragmentmuster zeigen, durch Aufnahme von MS^3 - oder höheren aufgelösten MS^n -Fragmentspektren zweifelsfrei identifiziert werden.

2.4 Fouriertransformations-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometer (FT-ICR)

Die Fouriertransformations-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) basiert auf dem Prinzip der Ionen Zyklotron-Resonanz (ICR). Die FT-ICR Technik hat eine 100-fache höhere Massenauflösung und Genauigkeit als andere massenspektrometrische Techniken. Extern generierte Ionen werden in einer Zyklotron-Zelle, die sich in dem starken homogenen Magnetfeld befindet, gespeichert. Das Magnetfeld und die Verbindung mit einem elektrischen Feld, zwingen die Ionen auf eine Kreisbahn, deren Frequenzen vom Masse/Ladungsverhältnis und der Magnetfeldstärke abhängen. Wird die Magnetfeldstärke erhöht, steigt die Scangeschwindigkeit an. Gleichzeitig steigt die kinetische Energie der Ionen, die Anzahl der eingefangenen Ionen, die Ionenfangzeit und die Obermassengrenze quadratische mit steigendem Magnetfeld an. Die Ionendetektion erfolgt im Gegensatz zur ESI- und MALDI-Massenspektrometrie nicht direkt, sondern nach erfolgter Anregung der Ionen durch die Aufnahme von Energie aus dem Wechselfeld. Diese Änderungen des Cyclotronradius führen zu elektrischen Signalen an den Detektorplatten des FT-ICR-Massenspektrometers. Um Ionen mit unterschiedlicher Masse zu erfassen, wird das eingestrahelte Wechselfeld variiert und das gemessene Signal fouriertransformiert. Zur parallelen Messung von Ionen unterschiedlichen Masse/Ladungsverhältnisses wird die Fourier Transformation genutzt, die das resultierende komplexe Signal von einer zeit- in eine frequenzabhängige Funktion umgerechnet, aus der letztendlich das Massenspektrum generiert wird (56, 57). Da Frequenzen derzeit mit höherer Genauigkeit bestimmt werden können als jeder andere physikalische Parameter, sind FT-ICR-Massenspektrometer durch sehr hohe Auflösungen und Massegenauigkeiten charakterisiert. Mit dieser hohen Messgenauigkeit besteht die Möglichkeit kleine Unterschiede in der Masse zu detektieren und somit zu einer Identifizierung von Peptiden. Die exakte Bestimmung der molekularen Masse von 1 ppm erlaubt eine direkte Bestimmung von Peptidstrukturen und/oder die Modifizierungen von Peptiden.

3 Ergebnisse

3.1 Methodischer Teil

3.1.1 Isolierung und Quantifizierung von Dinukleosidpolyphosphaten mittels monolithischer Reversed-Phase Chromatographie-Säulen

Hintergrund: Aufgrund der chromatographischen Limitierungen konventionell verfügbarer Chromatographie-Medien konnten Dinukleosidpolyphosphate in den vergangenen Jahren nur mit Hilfe von Reversed-Phase Perfusionsschromatographie-Säulen in Gegenwart nichtflüchtiger Ionenpaar-Reagenzien quantifiziert werden. Hierdurch bedingt lagen die betreffenden Nachweisgrenzen im unteren μ molaren Konzentrationsbereich. Aufgrund der fehlenden Flüchtigkeit der für die Reversed-Phase Perfusionsschromatographie notwendigen Ionenpaar-Reagenzien konnten die resultierenden Fraktionen der Chromatographie nicht massenspektrometrisch analysiert werden.

Aufgrund dieses Hintergrunds war das Ziel der Studie, eine chromatographische Methodik zu etablieren, die (1) eine höhere Auflösung der Dinukleosidpolyphosphate ermöglicht, (2) eine Sensitivität im nmolen-Konzentrationsbereich aufweist, und (3) die kompatibel zu massenspektrometrischen Methoden wie beispielsweise der MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie ist.

Methode und Ergebnisse: Im Rahmen der Studie wurden die Trennleistungen konventioneller Silika-Reversed-Phase Chromatographie-Säulen, Reversed-Phase Perfusionsschromatographie-Säulen, sowie monolithischen Reversed-Phase Chromatographie-Säulen miteinander verglichen.

Es wurden Effekte unterschiedlicher Ionenpaar-Reagenzien, Flussraten, sowie unterschiedliche Gradienten auf die erzielte chromatographische Auflösung der Dinukleosidpolyphosphate bestimmt. Es wurden sowohl Mischungen synthetischer Dinukleosidpolyphosphate als auch - als „*proof-of-concept*“- aus Thrombozyten isolierte Dinukleosidpolyphosphate verwendet.

Im Rahmen der Studie konnte gezeigt werden, dass monolithische Reversed-Phase Chromatographie-Säulen im Vergleich zu konventionellen Silika-Reversed-Phase Chromatographie-Säulen und Reversed-Phase Perfusionsschromatographie-Gele eine deutlich höhere Sensitivität

und eine höhere Auflösung bei der Chromatographie sowohl von synthetischen als auch von endogenen Dinukleosidpolyphosphaten aufweisen.

Synthetische und endogene Dinukleosidpolyphosphate konnten sowohl in Anwesenheit des bisher konventionell verwendeten, nicht-flüchtigen Ionenpaar-Reagenz Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBA) als auch in Anwesenheit des flüchtigen Ionenpaar-Reagenz Triethylammoniumacetat (TEAA) mittels monolithischer Reversed-Phase Chromatographie-Säulen mit hoher Sensitivität und Auflösung basisliniengetrennt fraktioniert werden.

Aufgrund der Flüchtigkeit des TEAA ist dieses Ionenpaar-Reagenz im Gegensatz zu TBA kompatibel zu massenspektrometrischen Methoden. Dementsprechend ist das Ionenpaar-Reagenz TEAA auch zum Einsatz im Rahmen von massenspektrometrischer Identifizierungen unbekannter Nukleosidpolyphosphate geeignet.

Weiterhin können aufgrund niedrigen Gegendrücke monolithischer Reversed-Phase Chromatographie-Säulen die jeweiligen Flussraten signifikant erhöht werden, wodurch die Laufzeit der betreffenden chromatographischen Methoden im Rahmen der Studie um bis zu 50% verkürzt werden können. Dies wiederum bedingt einen geringen Lösungsmittelverbrauch und längere Standzeiten der Chromatographie-Säulen.

Schlussfolgerung: Insgesamt konnte im Rahmen der Untersuchungen durch den Einsatz monolithischer Reversed-Phase Chromatographie-Säulen im Vergleich zu konventionellen Silika-Reversed-Phase Chromatographie-Säulen und Reversed-Phase Perfusionschromatographie-Säulen eine deutlich höhere Sensitivität und Auflösung bei der Chromatographie von Dinukleosidpolyphosphaten erzielt werden. Daraus folgernd sollten zukünftige Assays zur Quantifizierung von Dinukleosidpolyphosphaten auf monolithische Reversed-Phase Chromatographie-Säulen basieren. Aufgrund der exzellenten Kompatibilität von TEAA zu massenspektrometrischen Methoden sollte TEAA als Ionenpaar-Reagenz bei der Chromatographie von Dinukleosidpolyphosphaten mittels monolithischer Reversed-Phase Chromatographie-Säulen als Ionenpaar-Reagenz der Wahl verwendet werden.

3.1.1 Jankowski V, Vanholder R, Henning L, Karadogan S, Zidek W, Schlüter H, Jankowski J: Isolation and quantification of dinucleoside polyphosphates by using monolithic reversed phase chromatography columns. *Journal of Chromatography B*. 819(1):131-139 (2005)

3.2 Angiotensin Peptide

Wie bereits in Kapitel 1.5 ausgeführt, ist die chronische Niereninsuffizienz gleichzeitig Ursache und Folge der arteriellen Hypertonie. So liegt die Prävalenz der Hypertonie bei chronisch niereninsuffizienten Patienten bei 50-90% (24).

Im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz als auch im Rahmen der Hypertonie kommen den Angiotensin-Peptiden exponierte Funktionen zu. So ist das Peptidhormon Angiotensin II (Ang II) des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) das bislang zur Aufrechterhaltung und Regulierung des Blutdrucks, sowie des Wasserhaushalts bedeutsamste Peptid. Ang II ist ein Octapeptid mit der Aminosäuresequenz Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe und gilt als der bisher bekannte potenteste Vasokonstriktor. Für die Biosynthese des Ang II ist das RAS ursächlich (58). Jedoch wird das Ang II auch durch lokale Systeme in unterschiedlichen Geweben aus dem Angiotensinogen dargestellt (59-61); diese lokalen Systeme sind von dem endokrinen RAS-System unabhängig (62). Bei sinkendem Blutdruck und der darauf folgenden Verringerung der Nierenperfusion, wird Renin von der Niere ins Blut sezerniert. Renin spaltet in Folge das Glykopeptid Angioteninogen in das vasoinactive Angiotensin I (Ang I). Das vaso-konstriktorisch-inaktive Angiotensin-I wird durch das Angiotensin-Converting Enzym (ACE) proteolytisch zum vasokonstringierenden Ang II gespalten (63).

3.2.1 Isolierung und Identifizierung des Angiotensin II aus dem Sekretom stimulierter mononukleärer Leukozyten mittels MALDI-TOF/TOF-Massen-spektrometrie

Hintergrund: Angiotensin II (Ang II) konnte als bedeutsamste vasoregulatorische Komponente in verschiedenen humanen Geweben nachgewiesen werden. Während die Funktion des Renin-Angiotensin-Systems im Gewebe in Detail untersucht worden ist, konnte bisher nur ungenügend geklärt werden, ob und welche korpuskulären Elemente des zirkulierenden Bluts zur Produktion von Ang II beisteuern. Ziel der Studie war es, einen Beitrag zur Klärung der Bedeutung von korpuskulären Elementen des Blutes zu leisten.

Methode und Ergebnisse: Zur Klärung dieser Frage wurden mononukleäre Leukozyten aus Vollblut gesunder Probanden isoliert und anschließend durch Selbstinkubation bei 37°C sti-

muliert. Die hieraus resultierenden Sekretome der stimulierten mononukleären Leukozyten wurden chromatographisch fraktioniert. Die resultierenden Fraktionen der chromatographischen Aufreinigung wurden mittels des Bioassays der perfundierten isolierten Rattenniere auf vasokonstriktorische Effekte hin untersucht. Die chromatographischen Fraktionen die vasokonstriktorische Effekte im Bioassay bedingten, wurden chromatographisch bis zur Homogenität aufgereinigt. Anschließend wurden die zugrunde liegenden molekularen Strukturen massenspektrometrisch aufgeklärt. Hierzu wurden sowohl MS-Daten als auch MS/MS-Daten von den jeweiligen Substanzen erhoben. Mit Hilfe von *de-novo*-Sequenzierungen in Kombination mit Datenbank-Abfragen von Genom-Datenbanken wurden die zugrunde liegenden Substanzen anhand der MS-Daten identifiziert.

In einer stark vasokonstriktorisch-wirkenden Fraktion konnte das bekannte Peptid-Hormon Ang II identifiziert werden. Die Menge des von den mononukleären Leukozyten gebildeten Ang II lag im picomolaren Konzentrationsbereich und war damit zur Stimulation des AT1-Rezeptors ausreichend. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass mononukleären Leukozyten neben Ang II auch Angiotensin I und Angiotensinogen sowie die Enzyme Renin und das Angiotensin-Konvertierungsenzym (ACE) enthalten und somit Ang II aus Angiotensinogen bilden können.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse der Studie belegen erstmalig, dass Ang II durch mononukleäre Leukozyten als korpuskulärer Bestandteil des zirkulierenden Bluts gebildet und sezerniert wird. Die Ergebnisse der Studie legen die Vermutung nahe, dass neben der systemischen Ang-II-Bildung auch die lokale Ang II-Bildung zur Regulierung des Blutdrucks beiträgt. Zukünftig Untersuchungen werden notwendig sein, um die Potenz des lokalen RAS-Systems im Vergleich zu dem systemischen RAS-System im Rahmen der Hypertonie im Detail zu bestimmen.

3.2.1 Jankowski V, Vanholder R, van der Giet M, Henning L, Tölle M, Schönfelder G, Krakow A, Karadogan S, Gustavsson N, Gobom J, Webb J, Lehrach H, Giebing G, Schlüter H, Hilgers KF, Zidek W, Jankowski J: *Detection of angiotensin II in supernatants of stimulated mononuclear leukocytes by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight/time-of-flight mass analysis. Hypertension 46(3):591-597 (2005)*

3.2.2 Massenspektrometrische Identifizierung eines Angiotensin-Peptids im humanen Plasma

Hintergrund der Arbeit: Es wird zunehmend deutlich, dass neben dem Ang II auch weiteren Angiotensin-Peptide eine wesentliche Bedeutung in der kardiovaskulären Physiologie und im Besonderen in der Pathophysiologie der Hypertonie und der chronischen Niereninsuffizienz zukommt. Zu den bisher bekannten Angiotensin-Peptiden gehört neben dem Ang II das Angiotensin 1-7 (64), Angiotensin III (65, 66) und Angiotensin IV (67). Diesen Angiotensin-Peptiden kommen im Rahmen der vaskulären Regulation jeweils sehr spezifische Bedeutungen zu.

Nachdem sich die Hinweise auf die Existenz weiterer Angiotensin-Peptide mehrten, konnte im Rahmen der Untersuchung ein weiteres vasoregulatorisch-wirkendes Angiotensin-Peptid des Renin-Angiotensin-Systems im humanen Plasma nachgewiesen werden. Im Rahmen der Studie wurden deutliche Konzentrationsunterschiede im Plasma gesunder Probanden und im Plasma chronisch niereninsuffizienter Patienten nachgewiesen. Da kommerzielle ELISA-Assay nicht zwischen Ang II und dem im Rahmen dieser Studie identifizierten Angiotensin-Peptid unterscheiden, erfolgte die betreffende Quantifizierung massenspektrometrisch.

Methode und Ergebnisse: Im Rahmen der Studie wurde Plasma mittels präparativer und analytischer chromatographischer Methoden (Größenausschluss-Chromatographie, Reversed-Phase-Chromatographie, Anionenaustausch-Chromatographie) zunächst bis zur Homogenität fraktioniert. Die resultierenden Fraktionen wurden MALDI-TOF/TOF-massenspektrometrisch analysiert. Die Aminosäuresequenz des isolierten Peptides und der entsprechenden Sequenz des Ang II wies eine hohe Homologie auf. Durch MS/MS-Daten konnte im Folgenden die Aminosäuresequenz Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe bestimmt werden. Diese Sequenz unterscheidet sich nur bezüglich der ersten Aminosäure von der Aminosäuresequenz des Ang II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe). Aufgrund des Alanins am N-Terminus des Peptids wurde das entsprechende Peptid im folgenden Angiotensin A (Ang A) genannt. Es konnte im Rahmen der Untersuchungen gezeigt werden, dass das Ang A in Gegenwart mononuklearer Leukozyten enzymatisch durch Decarboxylierung des N-terminalen Asparats des Ang II aus diesem gebildet wird. Ang A hat eine vergleichbare Affinität zu dem AT₁ Rezeptor wie Ang II, jedoch eine deutlich höhere Affinität zu dem AT₂ Rezeptor.

Da konventionell verfügbare ELISA-Assays nicht zwischen Ang II und Ang A diskriminieren, wurden die betreffenden Konzentrationen durch einen massenspektrometrischen Assay bestimmt, der im Rahmen der Untersuchungen entwickelt wurde. Bei gesunden Probanden liegt weniger als 20% des Ang II decarboxyliert als Ang A vor, jedoch vergrößert sich das Ang A/Ang II-Verhältnis im Plasma chronisch-niereninsuffizienter Patienten deutlich auf rund 40 %.

Schlussfolgerung: Ang A ist ein neues, vasokonstriktorisches Angiotensin-Peptid, das durch Aspartat-Decarboxylierung aus Ang II gebildet wird. Die Ang A-Plasmakonzentration steigt im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz deutlich an. Aufgrund der höheren Affinität zum AT₂-Rezeptor kann vermutet werden, dass das Ang A die vasokonstiktiven Effekte des Ang II modulieren.

3.2.2 Jankowski V, Vanholder R, van der Giet M, Tölle M, Karadogan S, Gobom J, Furkert J, Oksche A, Krause E, Tran TN, Tepel M, Schuchardt M, Schlüter H, Wiedon A, Beyermann M, Bader M, Todiras M, Zidek W, Jankowski J: *Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27(2):297-302 (2007)

3.2.3 Angioprotektin: Angiotensin-Peptid mit vasodilatatorischen Effekten

Hintergrund der Arbeit: Die Ergebnisse der in Kapitel 3.2.2 genannten Untersuchungen wiesen daraufhin, dass im Plasma neben Ang A weitere bisher unbekannte Angiotensin-Peptide nachweisbar sind. In logischer Konsequenz wurde begonnen, humanes Plasma nach entsprechenden Angiotensin-Peptiden zu screenen. Es wurde Plasma mit orthogonal angeordneten chromatographischen Isolierungsschritten chromatographiert und die resultierenden Fraktionen jeweils mit MALDI-TOF/TOF- und LC-ESI-massenspektrometrisch analysiert. Im Rahmen einer sehr aktuellen, gegenwärtig noch nicht publizierten Studie konnte mit dem betreffenden Ansatz ein Oktapeptid isoliert und identifiziert werden, dessen Aminosäuren 3-8 identisch zu den Aminosäuren 3-8 des Ang-II sind. Aufgrund dieser Aminosäuresequenz-Homologie und der von diesem Peptid bedingten protektiven Eigenschaften wurde das betreffende Peptid in Folge *Angioprotektin* genannt.

Methoden und Ergebnisse: Humanes Plasma wurde mittels Größenausschuß-Chromatographie und analytischen Reversed-Phase-Chromatographien fraktioniert und

MALDI-TOF/TOF- und LC-ESI massenspektrometrisch analysiert. Hierbei konnte eine Fraktion bestimmt werden, die ein Hormon mit einer molekularen Masse von 1001,5 Da aufwies. Durch nachfolgende MS/MS-Massenspektrometrien und einer anschließenden „*de novo*“ Sequenzierung konnte die Aminosäuresequenz des betreffenden Peptids mit Pro-Glu-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe bestimmt werden. Die Aminosäuren 3-8 des isolierten Peptids ist mit den entsprechenden Sequenz des Ang II identisch, jedoch die Aminosäuren 1-2 des Angiotensin II und des Ang II unterschiedlich (Pro-Glu vs. Asp-Arg). Da verfügbare Antikörper nicht zwischen Angiotensin II und Ang II unterscheiden, wurden zur Quantifizierung des Angiotensin II massenspektrometrische Methoden eingesetzt. Die Angiotensin II-Konzentration im menschlichen Plasma beträgt ca. 20% der Ang II-Konzentration. Angiotensin II besitzt eine vasoprotektive Wirkung, indem es den vasokonstriktiven Effekten von Ang II entgegenwirkt.

Hierbei zeigte sich, dass Angiotensin II durch die Stimulation des MAS-Rezeptors die vasokonstriktiven Wirkungen des Ang II moduliert. Die MAS-Rezeptor-Stimulation durch Angiotensin II bedingt (A) einen verminderten, durch Ang II-bedingten Ca^{2+} -Einfluss in glatte Gefäßmuskelzellen und (B) stimuliert die NO-Freisetzung, wodurch ein direkter vasodilatatorischer Effekt durch das Peptid bedingt wird.

Schlussfolgerung: Aufgrund der Modulation des Ca^{2+} -Einstroms sowie der NO-Freisetzung, wirkt das Angiotensin II den vasokonstriktiven Effekten des Ang II entgegen und kann somit als vasoprotektiv angesehen werden. Aufgrund dieser protektiven Eigenschaften kann dem Peptid eine pharmakologische Wirkung zukünftig zukommen. Dem folgend wurde das Peptid patentrechtlich geschützt (EP 09171773.6).

3.2.3 Jankowski V, Tölle M, Santos RAS, Günthner T, Krause E, Beyermann M, Welker P, Bader M, Brant SV, Sampaio WO, Queiroga R, Kretschmer A, van der Giet M, Zidek W, Jankowski J. Angiotensin II: An Ang-like peptide causing vasodilatory effects. (submitted)

3.3 Dinukleosidpolyphosphate

Dinukleosidpolyphosphate sind neben Mononukleosidpolyphosphaten und Mononukleotiden Agonisten der Purinrezeptoren. Die betreffenden Komponenten bilden in Summe das sogenannte „purinerge System“. Die Dinukleosidpolyphosphate wurden in den letzten 15 Jahren in zahlreichen humanen Zellen, korpuskulären Bestandteilen des Blutes und Geweben, wie in Thrombozyten (86-89), in Erythrozyten (90), in Kardiomyozyten (91), Plazentagewebe (92) und in Endothelzellen (93) nachgewiesen.

Es wird zunehmend deutlich, dass das purinerge System stark an der kardiovaskulären Homöostase beteiligt ist (94). In Abhängigkeit der Phosphatkettenlängen und der jeweils beteiligten Base wirken Dinukleosidpolyphosphate vasokonstringierend, vasodilatorisch und/oder proliferativ (94). Die diese Wirkungen vermittelnden Purinrezeptoren können in zwei Subgruppen unterteilt werden: den *P2X*- und den *P2Y*-Rezeptoren.

Die sieben Untereinheiten der *P2X*-Rezeptoren sind Liganden-gesteuerte Kationkanäle der Plasmamembran. Die Stimulation der *P2X*-Rezeptoren führt zur Erhöhung der Membranpermeabilität für Na^+ - und Ca^{2+} -Kationen. Diese Ionenerhöhung bedingt wiederum eine Öffnung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle, einer Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und nachfolgender Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen (94, 95).

Die *P2Y*-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit insgesamt acht Untereinheiten. Über die P2Y_2 und P2Y_8 -Untereinheiten werden vasokonstriktorische Effekte vermittelt, die Stimulation der P2Y_1 -, P2Y_2 -, P2Y_4 - und P2Y_{11} -Subtypen bedingen vasodilatorische Effekt. Die Stimulation der P2Y_1 und P2Y_2 -Untereinheiten bedingen starke proliferative Wirkungen auf Endothelzellen (95, 96), glatten Gefäßmuskelzellen (95) und Mesangialzellen (97).

3.3.1 Erhöhte Uridin-Adenosin-Tetraphosphat-Konzentrationen in Plasma von jugendlichen Hypertonikern

Hintergrund der Arbeit: Da Dinukleosidpolyphosphate vasokonstriktorische Effekte bedingen, wurde im Rahmen dieser Studie der Frage nachgegangen, ob und wenn ja wie Dinukleosidpolyphosphate zur Hypertonie beitragen.

Aufgrund der vorhergehenden Identifizierung des Uridin-Adenosin-Tetraphosphat (Up_4A) (93) als ein starker, endothelial-sezernierter Vasokonstriktor, wurden Up_4A -Konzentrationen im Plasma jugendlicher hypertonen Patienten und gesunder Probanden quantifiziert. Es wurden ausschließlich jugendliche Personen in die Studie eingeschlossen, da hierdurch der Ein-

fluss von Komorbiditäten, wie bei dem Einschluss erwachsener Probanden vorhanden, minimiert werden konnten.

Methoden und Ergebnisse: Das Plasma der hypertonen Patienten und der gesunden Probanden wurde mittels einer präparativen Reversed-Phase-Chromatographie, einer Affinitätschromatographie und einer analytischen Reversed-Phase-Chromatographie bis zur Homogenität aufgereinigt. Die Quantifizierung des Dinukleosidpolyphosphats Up₄A erfolgte UV-spektroskopisch. Es konnte gezeigt werden, dass die Up₄A-Konzentrationen im Plasma von hypertonen Jugendlichen signifikant erhöht sind (33.0 ± 25.4 vs. 3.7 ± 0.9 nmol/L; Mean \pm SEM, n = 40 and 38; p < 0.005). Die Up₄A-Konzentrationen korreliert mit der linksventrikulären Muskelmasse (Kendall- τ Korrelation Koeffizient 0.220, n = 40; p < 0.05) und der Intima-Media-Dicke (Kendall- τ Korrelation Koeffizient 0.296, n = 40; p < 0.05) bei den entsprechenden Patienten. Es konnte im Zellkultur-Assay gezeigt werden, dass Up₄A einen starken proliferativen Effekt auf kultivierte glatte Gefäßmuskelzellen ausübt. Der maximal proliferative Effekt des Up₄A wurde bei einer Konzentration von $80.0 \pm 24.0\%$ über den Kontrollwerten erreicht, der EC-Wert betrug $-5,9 \log \text{ mol/L}$. Da die erhöhten Up₄A-Konzentrationen mit der Intima-Media-Dicke korrelierten, und Up₄A einen direkten proliferativen Effekt im physiologisch bedeutsamen Konzentrationsbereich bedingt, kann von einer Kausalität zwischen Up₄A-Konzentration und Intima-Media-Dicke ausgegangen werden.

Schlussfolgerung: Die Studie zeigt, dass offenbar eine enge Beziehung zwischen der Up₄A-Plasmakonzentration und dem Blutdruck hypertoner Patienten besteht. Da Up₄A einen direkten proliferativen Effekt auf glatte Gefäßmuskelzellen bedingt, und die entsprechenden Plasmakonzentrationen mit der Intima Media Dicke korrelieren, kann Up₄A als ursächlich für die Hypertonie bei diesem Patientenkontext angesehen werden. Inwieweit die Substanz zu der Hypertonieentstehung adulter Patienten beiträgt, wird in zukünftigen Studien zu untersuchen sein.

3.3.1 Jankowski V, Meyer A, Schlattmann P, Gui Y, Zheng XL, Stamcou I, Radtke K, Tran ATN, van der Giet M, Tölle M, Zidek W, Jankowski J. Increased uridine adenosine tetraphosphate concentrations in plasma of juvenile hypertensives. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 8, 1776-1781 (2007)

3.3.2 Uridin-Adenosin-Tetraphosphat beeinflusst als autokrines Hormon die glomeruläre Filtrationsrate

Hintergrund: Nachdem Up_4A als ein starker systemischer Vasokonstriktor identifiziert worden war, stellte sich die Frage, ob Up_4A auch (a) Bestandteil der Niere als blutdruckregulierendes Organ ist und (b) inwieweit Up_4A endokrin auf die Nierenperfusion wirkt. Zur Beantwortung dieser Fragen, wurden verschiedene Nierengewebe chromatographisch aufgereinigt und anschließend die Wirkungen des Up_4A auf isolierte afferente und efferente Arteriolen bestimmt.

Methode und Ergebnisse: Nierengewebe sowohl des Schweins als auch des Menschen wurden zunächst mittels Größenausschuss-Chromatographie, Affinitätschromatographie, Anionenaustausch- und Reversed-Phase-Chromatographie bis zur Homogenität aufgereinigt. Es wurden durch Retentionszeit-Vergleich die Fraktionen ausgewählt, die mutmaßlich Up_4A enthalten könnten. Die betreffenden Fraktionen wurden massenspektrometrisch nach der Existenz des Up_4A analysiert. Durch diesen Screening Ansatz konnte in einer der betreffenden Fraktionen Up_4A sowohl mittels unterschiedlicher massenspektrometrischer Verfahren, als auch durch Retentionszeit-Vergleiche und enzymatischer Analytik nachgewiesen werden. Nach erfolgreichem Nachweis des Up_4A in den betreffenden Nierengeweben wurde geprüft, ob Stimulation der Proteinkinase C durch Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) zu einem Anstieg der Up_4A -Sekretion proximaler Tubuluszellen führt. Durch eine 10-minütige Stimulation konnte im resultierenden Überstand ein 10-facher Anstieg der Up_4A -Konzentration bestimmt werden.

Im Anschluss wurde zur Prüfung des Up_4A -Effekts auf die glomeruläre Filtrationsrate die Wirkung des Up_4A auf isolierte afferente und isolierte efferente Arteriolen bestimmt. Up_4A bedingte keinen Effekt auf efferente Arteriolen, jedoch einen starken vasokonstriktorisches Effekt auf afferente Arteriolen. Unter *in-vivo*-Bedingungen wird der vasokonstriktorisches Effekt des Up_4A auf afferente Arteriolen zu einem Absinken der glomerulären Perfusionsdrucks und hierdurch in Folge zu einem Absinken der glomerulären Filtrationsrate führen.

Schlussfolgerung: Aufgrund des Up_4A -Nachweises im Nierengewebe sowie der Effekte des Up_4A auf die renalen Hämodynamik ist davon auszugehen, dass das Up_4A als autokrines Hormon der Niere den systemischen Blutdruck über die Modulation der renalen Hämodynamik beeinflusst.

3.3.2 Jankowski V, Patzak A, Herget-Rosenthal S, Tran TN, Lai EY, Günthner T, Buschmann I, Zidek W, Jankowski J. Uridine adenosine tetraphosphate acts as an autocrine hormone affecting glomerular filtration *Journal of Molecular Medicine* 83:333-340(2008)

3.3.3. Parakine Stimulation des Wachstums glatter Gefäßmuskelzellen durch proximal-sezernierte Diadenosinpolyphosphate

Hintergrund: Die oben aufgeführten Studien zeigen, dass das purinerge Rezeptorsystem der Niere insgesamt für die tubulären Funktionen und auch für systemische Gefäßfunktionen bedeutsam ist. Nachdem die ATP-Sezernierung durch das Nierengewebe umfangreich beschrieben worden ist z.B: (98, 99), wurde im Rahmen dieser Studie der Frage nachgegangen, ob auch die wesentlich hydrolysestabileren Diadenosinpolyphosphaten von Nierengewebe sezerniert werden, und dadurch länger-anhaltende physiologische und pathophysiologische Wirkungen wie proliferative Effekte bedingen. Zur Klärung dieser Frage wurde Nierengewebe stimuliert, chromatographisch fraktioniert und anschließend die Wirkungen der sezernierten Mediatoren auf die Proliferationsrate glatte Gefäßmuskelzellen charakterisiert.

Methode und Ergebnisse: Es wurden lyophilisierte Schweinenieren mittels einer perchlorsäurehaltigen Lösung von Proteinen befreit und mittels präparativer und analytischer chromatographischer Techniken (Reversed-Phase, Anionenaustausch- und Affinitätschromatographie) bis zur weitestgehender Homogenität aufgereinigt. In den resultierenden Fraktionen konnte MALDI-TOF/TOF-massenspektrometrisch und durch enzymatische Analytik das Diadenosinpentaphosphat (Ap_5A) und das Diadenosinhexaphosphat (Ap_6A) nachgewiesen werden.

Zur Beantwortung der Frage, ob Nierenzellen diese Diadenosinpolyphosphate nach Stimulation sezernieren, wurde in einem parallelen Ansatz LLC-PK Zellen mit OAG inkubiert. In einem Inkubationsintervall von 0-10 min wurden Aliquote des Überstandes asserviert und massenspektrometrisch analysiert. Durch die resultierenden Massenspektren konnte gezeigt werden, dass LLC-PK Zellen die betreffenden Dinukleosidpolyphosphate sezernieren. Anhand einer Zellkultur glatter Gefäßmuskelzellen konnte weiterhin gezeigt werden, dass sowohl Ap_5A als auch Ap_6A wachstumsstimulierend auf die durch *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF)-bedingte Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen wirken.

Schlussfolgerung: Die Identifizierung und der Nachweis der Sezernierung des Ap₅A und Ap₆A zeigen, dass diese Mediatoren als endogene purinerge Agonisten der Niere einen direkten Einfluss auf die Gefäßwanddicke ausüben, wodurch den Substanzen eine hohe physiologische und pathophysiologische Wertigkeit zukommt.

3.3.3 Jankowski V, Karadogan S, Vanholder R, Nofer J-R, Herget-Rosenthal S, van der Giet M, Tölle M, Tran TN, Zidek W, Jankowski J. Diadenosine pentaphosphate and diadenosine hexaphosphate released by proximal tubular cells provoke vascular smooth muscle cell proliferation. *Kidney International* 10, 994-1000 (2007)

3.3.4 Endothelial-sezernierte Diuridintetraphosphat wirkt *in-vitro* und *in-vitro* angiogen (Journal of Molecular Medicine, 2010, submitted)

Hintergrund: Da die Angiogenese für zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse bedeutsam ist, wird seit einigen Jahren intensiv an der Identifizierung der zugrunde liegenden Mechanismen der Angiogenese gearbeitet. Im Besonderen stehen hierbei Endothelzellen im Fokus des Interesses, da diese Zellen mutmaßlich bisher unbekannte Angiogenese-Faktoren sezernieren.

Methode und Ergebnisse: Um einen Beitrag zur Identifizierung bisher unbekannter Angiogenese-Faktoren zu leisten, wurden im Rahmen dieser Studie humane Endothelzellen kultiviert, mit Schubspannung zur Sezernierung von regulatorischen Faktoren angeregt. Anhand der Kultivierung von Chorion-Allantois-Membranen der Ratte konnte gezeigt werden, dass im endothelialen Sekretom Mediatoren nachweisbar sind, die starke angiogene Effekte bedingen. Diese angiogenese-induzierenden Wirkungen des endothelialen Sekretoms konnten durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase reduziert, und durch Suramin aufgehoben werden.

Das Sekretom der stimulierten Endothelzellen wurde im Anschluss mittels chromatographischer Methoden bis zur Homogenität chromatographiert. Jede Fraktion der chromatographischen Aufreinigung wurde mittels des Bioassay nach angiogenese-induzierenden Wirkungen gescreent. Die nachgeschalteten massenspektrometrischen Analysen zeigten, dass das Diuridintetraphosphat (Up₄U) Bestandteil des endothelialen Sekretoms ist und dass von diesem

endothelialen Mediator die starke angiogenese-induzierende Wirkung ausgeht. Der Einfluss des Up_4U auf die drei Hauptmechanismen der Angiogenese (a) Proliferation, (b) Migration und (c) Röhrenformation wurde bestimmt.

Das Up_4U erhöhte direkt die Proliferationsrate glatter Gefäßmuskelzellen und potenziert im Besonderen die proliferativen Effekte des PDGF auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Der endotheliale Mediator Up_4U stimuliert darüber hinaus die endotheliale Migration und trägt zur Röhrenformation bei. Die Up_4U -Plasmakonzentration gesunder Probanden beträgt 1.34 ± 0.26 nmol/L die betreffende Up_4U -Konzentration ist für die beobachteten *in-vitro*-Effekte ausreichend.

Schlussfolgerung: Mit dem Nachweis des Up_4U im endothelialen Sekretom ist es gelungen, einen bisher unbekanntem endothelialen, stark angiogenese-induzierenden Mediator zu identifizieren, wodurch ein Beitrag zu der Klärung der Angiogenese geleistet werden konnte.

3.3.4 Jankowski V, Tran TNA, Lehmann K, Schönfelder G, Zidek W, Jankowski J. Diuridine tetraphosphate: A potent endothelial-derived angiogenesis-inducing mediator” (eingereicht bei Journal of Molecular Medicine, 2010, submitted)

3.3.5 Dinukleosidpolyphosphate beeinflussen Adenylatzyklen-Aktivitäten

Hintergrund der Arbeit: Nach der Identifizierung der Dinukleosidpolyphosphate als direkte Vasoregulatoren und Mediatoren mit stark proliferativen Eigenschaften, mehrten sich die Hinweise, dass die Gruppe der Dinukleosidpolyphosphate auch Effekte auf nukleotidabbauende Enzyme aus Endothelzellen und aus Serum zukommen könnten. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden den Effekten des Ap_4A , Up_4A , Ap_5A und dem nicht-selektiven P2-Antagonisten Suramin auf die Aktivitäten der Adenylatkinasen und NDP-Kinasen nachgegangen.

Methode und Ergebnisse: Humanes Serum und humane, primäre Endothelzellen wurden mit den Dinukleosidpolyphosphaten Ap_4A , Up_4A und Ap_5A in An- bzw. Abwesenheit von Suramin für 20 min inkubiert. Daraufhin wurden die Aktivitäten der Adenylatkinase und der NDP-Kinase durch die ATP-induzierte von $[^3H]$ -AMP und $[^3H]$ -ADP zu 3H -Phosphaten mittels Dünnschicht-Chromatographie radiochemisch quantifiziert. Zudem wurde die Aktivität der

endothelialen NTPDase mit [³H]-ADP und [³H]-ATP als Substrat in Ab- und Anwesenheit von Ap₄A, Up₄A und Ap₅A bestimmt.

Die Dinukleosidpolyphosphate Ap₄A, Up₄A und Ap₅A inhibieren die Serum-Adenylatkinase, als auch die endotheliale Adenylatkinase, die Substanzen haben jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Serum-NDP-Kinase. Des Weiteren inhibieren Ap₄A, Up₄A, Ap₅A und Suramin konzentrationsabhängig die Hydrolyse von [³H]-ADP und [³H]-ATP in kultivierten humanen, primären Endothelzellen. Up₄A hat keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität der endothelialen NTPDase. Die Halbwertszeiten von Ap₄A, Up₄A und Ap₅A im Serum liegen in dem Bereich von 9.8 ± 4.6 , 4.4 ± 2.1 und 10.4 ± 3.5 Minuten; die Metaboliten der betreffenden Substanzen haben keinen Effekt auf die inhibitorischen Eigenschaften der Dinukleosidpolyphosphate.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse dieser vergleichenden Studie legt den Verdacht nahe, dass Ap₄A und Ap₅A über Inhibition des Adenylatkinase-vermittelten Umsatz von endogenem ADP in die purinerge Stimulation eingreifen, während der vasoregulatorische Effekt des Up₄A über Mechanismen der direkten Bindung an purinergen Rezeptoren bedingt wird.

3.3.5 Yegutkin GG, Jankowski J, Jalkanen S, Gunthner T, Zidek W, **Jankowski V. Dinucleotide polyphosphates contribute to purinergic signalling via inhibition of adenylylate kinase activity.** *Biosci Rep.* (2008); 189-194.

4. Diskussion

4.1 Methodischer Teil

Die chronische Niereninsuffizienz und die kardiovaskulären Erkrankungen stehen in einem engen Zusammenhang; beide Erkrankungen haben einen enormen Einfluss auf die Sterblichkeit der Bevölkerung in den Industriestaaten (8, 12). Ätiologie und Pathogenese der chronischen Niereninsuffizienz und kardiovaskulären Erkrankungen wie Hypertonie sind nach wie vor Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen.

Im Besonderen scheint das Renin-Angiotensin-System und das purinerge System maßgeblich an der Entstehung der Niereninsuffizienz und den kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt zu sein. Jedoch mehren sich die Hinweise, dass bisher noch unbekannte Mediatoren bei der Genese dieser Erkrankungen involviert sind. Diese Mediatoren gilt es zu identifizieren, da hierdurch nur die Ursachen der Erkrankungen aufgeklärt werden können und letztendlich durch die Identifizierungen der betreffenden Mediatoren neue Therapien und Therapiekonzepte entwickelt werden können. Für die Isolierung der betreffenden Mediatoren ist die Verfügbarkeit, effizienter chromatographischer Trennmedien und chromatographischer Methoden von grundlegender Bedeutung. Die betreffenden Methoden sollten durch hohe Trennkapazität, hohe Trennleistung, hohe Reproduzierbarkeit bei insgesamt geringen Chromatographiezeiten charakterisiert sein.

Um hierzu einen Beitrag zu leisten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Methode zur Isolierung und Identifizierung von Dinukleosidpolyphosphate entwickelt, die auf Kombination verschiedener chromatographischer Medien und chromatographischen Bedingungen basiert. Diese Methode ist im Besonderen durch die Kompatibilität zu massenspektrometrischen Methoden charakterisiert (**Kap. 3.1**). Die Kompatibilität zu massenspektrometrischen Methoden ist zur Identifizierung der betreffenden Mediatoren substantiell.

Das entwickelte analytische Verfahren ermöglicht die Isolierung und Quantifizierung von Dinukleosidpolyphosphate in nmolaren Konzentrationsbereich (49). Da die in **Kap 3.1** beschriebenen monolithischen Reversed-Phase Chromatographie-Säulen einen niedrigen Gegendruck aufweisen, kann die jeweilige Flussrate signifikant erhöht werden und die Laufzeit der chromatographischen Trennung bis zu 50% reduziert werden. Auf Grund dessen, verringert sich der Lösungsmittelverbrauch und führt zu einer effektiveren Ausnutzung der Chro-

matographie-Säulen und zu einer Reduzierung der Kosten für die chromatographischen Auftrennung bei gleichzeitiger hoher Trennleistung und Trennkapazität.

4.2 Angiotensin-Peptide

Die Gruppe der Angiotensin-Peptide und das zugehörige RAS-System stehen seit Jahren in dem Fokus der chronischen Niereninsuffizienz und kardiovaskulären Erkrankungen. Im primären Fokus der betreffenden Studien stand dabei das bisher systemische RAS-System, welches die Niere als Quelle des Renin, die Leber als Quelle des Angiotensinogens sowie der Endothelzellen des Lungen- und der Nierengefäße als Quelle des ACE umfasst (100, 101). Lokale RAS-Systeme waren bisher nur wenig beschrieben.

Im Rahm der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass auch lokale RAS-Systeme zur Steuerung des Blutdrucks beitragen. Wie in **Kapitel 3.2.2.** aufgezeigt, weisen mononukleäre Leukozyten ein lokales RAS-System auf, das Ang II nach Stimulation ins Plasma sezernieren.

Im Rahmen der Arbeit wurden auch bisher unbekannte Angiotensin-Peptide isoliert und identifiziert. Zu diesen neu-identifizierten Angiotensin-Peptiden gehört das Angiotensin A (Ang A), dessen Aminosäuresequenz mit der Aminosäuresequenz des Angiotensin II vergleichbar ist. Der Unterschied der betreffenden Aminosäuresequenzen besteht einzig in der ersten Aminosäure; im Falle des Angiotensin II beginnt die Sequenz mit Aspartat, im Fall des Ang A mit Alanin.

Ang A wird durch die Aspartat-Decarboxylase aus Ang II synthetisiert. Ang A und Ang II haben gleiche Affinitäten zu dem AT1-Rezeptor, jedoch hat Ang A eine höhere Affinität zu dem AT2-Rezeptor als Ang II. Es kann somit vermutet werden, dass das Ang A die pathophysiologischen Effekte des Ang II moduliert (**Kap 3.2.2.**).

Während der Isolierung und Identifizierung des Ang A wurde ein weiteres Peptid massenspektrometrisch detektiert, dessen Aminosäuresequenz Analogien zum Ang A bzw. zum Ang II aufzeigt. Die Aminosäuresequenz des isolierten Peptids lautet **Pro-Glu-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe** und zeigt somit eine hohe Sequenzübereinstimmung zu der Aminosäuresequenz des Ang II (**Arg-Asp-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe**) bzw. des Ang A (**Ala-Asp-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe**). Der Unterschied der betreffenden Aminosäuresequenz liegt in den zwei N-terminalen Aminosäuren. Da dieses Angiotensin-Peptid vasodilatorisch und damit protektiv

im Rahmen der Hypertonie ist, wurde diese Substanz *Angioprotektin* genannt. Diese vasoprotektive Wirkung wirkt den vasokonstriktorisches Effekten des Ang II entgegen. Angioprotektin wirkt über Stimulation des MAS-Rezeptors, wodurch sowohl der Ca^{2+} -Efflux und die Stickstoffmonoxid-Freisetzung moduliert wird.

Die Plasma-Konzentration des Angioprotektins beträgt ca. 20% der betreffenden Plasma-Konzentration des Ang II und ist bei niereninsuffizienten Patienten deutlich erhöht. Durch Angioprotektin wird offenbar ein Kompensationsmechanismus des ansteigenden Blutdrucks im Rahmen der Niereninsuffizienz initiiert. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen die Möglichkeit auf, Angioprotektin als Biomarker der chronischen Niereninsuffizienz zu verwenden (**Kap 3.2.3**).

Aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmung zwischen Ang II, Ang A und Angioprotektin ist es jedoch nicht möglich, diese Angiotensin-Peptide mit kommerziell erhältlichen monoklonalen Ang II-Antikörper zu quantifizieren (71, 102). Aufgrund dessen wird in einem seit 2009 beförderten Bundesministerium für Wirtschaft (BMWi)-Antrag ein auf „massenspektrometrie-basierendes Immuncapturing Assay“ entwickelt, dass eine valide Alternative zu den derzeit verwendeten, nicht ausreichenden Bestimmungsmethoden darstellt. Das massenspektrometrie-basierten Immuncapturing-Assay soll eine zuverlässige und dabei schnell durchzuführende Quantifizierung der betreffenden Angiotensin-Peptide gewährleisten.

4.3 Dinukleosidpolyphosphate

Im Rahmen meiner Dissertation konnte ich im Jahr 2005 aus dem endothelialen Sekretom einen bisher unbekanntes endothelium-derived constricting factor (EDCF) isolieren. Dieser Vasokonstriktor wurde als Uridinadenosintetraphosphat (Up_4A) identifiziert. Up_4A war das erste isolierte Dinukleosidpolyphosphat mit einem Purin- und einem Pyrimidinrest. Es ist ein Stimulator von P2X- und P2Y-Rezeptoren (103, 104).

Up_4A ist im Plasma gesunder Probanden in Konzentrationen quantifizierbar, durch die eine Vasokonstriktion der Gefäße ausreichend ist. Hierdurch kann von einer Relevanz des Up_4A als physiologischer Vasoregulator ausgegangen werden. Diese Arbeit wurde im Jahre 2005 in *Nature Medicine* publiziert (93).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass im Plasma hypertoner Jugendlichen die Up_4A -Konzentration ansteigt (104) (**Kap 3.3.1**). Neben den vasokonstriktorisches Wirkungen des Up_4A bedingt Up_4A auch proliferative Wirkungen an der glatten Gefäßmuskulatur, der Intima-Media-Dicke und der links-ventrikulären-Masse. Es ist daher zu

vermuten, dass neben der direkten vasokonstriktorischen Wirkung Up_4A auch zu einer Modulation der Proliferationsrate glatter Gefäßmuskelzellen beiträgt.

Neben der systemischen Wirkung wirkt Up_4A offenbar auch endokrin. Es wird von der Niere sezerniert und wirkt unterschiedlich auf afferente und efferente Arteriolen, diese lokalen Up_4A -Wirkung kommt im besonderen im Kontext der chronischen Niereninsuffizienz und der Hyertoniegenese eine bedeutsame Funktion zu. Die Ergebnisse zu den Wirkungen des Dinukleosidpolyphosphates (**Kap. 3.3.2; Kap 3.3.3**) zeigen, dass diese Substanzklasse von Relevanz in der Nierenphysiologie sind und Up_4A als Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen und der Niereninsuffizienz in Frage kommen könnte. Die Validierung der Bedeutung des Up_4A als Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen bei chronisch niereninsuffizienten Patienten wird gegenwärtig im Rahmen einer longitudinalen Studie mit 400 Patienten im Rahmen eines NGFN/BMBF-geförderten Projekts bestimmt (eigenes Teilprojekt: TP-1). Die Studie befindet sich im 2. Jahr und ist auf insgesamt 6 Jahre ausgelegt.

Neben der Identifizierung und Charakterisierung des Up_4A als eventueller Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen und der Niereninsuffizienz sind auch im Besonderen Angiogenese-induzierte Faktoren von Bedeutung.

Daher wurde mit dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten Ansatz aus chromatographischen und massenspektrometrischen Methoden das endotheliale Sekretom nach Angiogenese-induzierenden Faktoren untersucht. Es konnte hierbei das Up_4U als Angiogenese-induzierender Faktor identifiziert werden.

Up_4U besteht aus zwei Uridin-Gruppen die mit vier Phosphatketten verbunden sind. Up_4U beeinflusst sowohl die Migration, die Proliferation und die Gefäßausbildung. Das Up_4U erhöht direkt die Proliferationsrate, stimuliert die Migration, die Röhrenformation und potenziert die stimulierenden Effekte des peptidischen Wachstumsfaktors PDGF auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Der angiogene Effekt wird durch den $P2Y_2$ -Rezeptor vermittelt. (**Kap 3.3.4**).

Die Dinukleosidpolyphosphate sind als direkte Vasokonstriktoren, Mediatoren mit stark proliferativen und als Angiogenese-induzierenden Eigenschaften beschrieben worden. Der Abbauweg der betreffenden Dinukleosidpolyphosphate ist jedoch weitgehend unbekannt.

Um die Abbauwege der Dinukleosidpolyphosphate aufzuklären, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch die Wirkungen von Ap_4A , Up_4A , Ap_5A und dem nicht-selektiven $P2$ -Antagonisten Suramin auf Nukleotid-abbauende Enzyme aus Endothelzellen und des Serums

bestimmt (**Kap 3.3.5**). Im Besonderen wurde die Metabolisierung der Dinukleosidpolyphosphate durch membrangebundene endotheliale und lymphoide Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolasen (NTPDase, früher: ekto-ATPDase, CD39) und der ekto-5'-Nukleotidase (CD73) untersucht.

Entgegen der traditionellen Paradigmen wurde im Rahmen von Studien jüngst gezeigt, dass die Nukleotid-Phosphorylierungsenzyme Adenylatkinase und NDP-Kinase ebenfalls an der Zelloberfläche exprimiert werden. Die purinerge Signalübertragung wird über zwei gegenläufig wirkende Signalkaskaden gesteuert, A) einer Nukleosidpolyphosphat-inaktivierenden und B) einer Nukleosidpolyphosphat-regenerierenden Signalkaskade. Durch die Identifizierung einer komplexen Mischung von Enzymen wie der Nukleotid-Diphosphatase (NPPase), der NTPDase, der Adenylatkinase und anderen löslichen purinergen Enzymen, die frei im Blut zirkulieren, wurde die Komplexität zum Verständnis der Regulationsmechanismen der vaskulären Purinhomeostase noch weiter erhöht (105-107).

Dinukleosidpolyphosphate potenzieren die purinergen Effekte des ATP in Astrozyten und erhöhen deutlich deren Empfindlichkeit. Diese Effekte kann einerseits durch Bindung an einen für Dinukleosidpolyphosphate spezifischen Rezeptor erklärt werden, andererseits durch Aktivierung einer ERK-Signalübertragungskaskade (Extracellular Signal Regulated Kinase) (108). Die Identifizierung von membrangebundener und ungebundener Varianten der Adenylatkinase (105) und der wirkungsvollen Inhibierung dieser katalytischen Reaktion der Dinukleosidpolyphosphate (109) könnte als ein weiteres Erklärungsmodell für die agonistischen Effekte der Dinukleosidpolyphosphate dienen.

Insgesamt zeigen die Studien, dass Dinukleosidpolyphosphate in einer Vielzahl unterschiedlicher physiologischer und pathophysiologischer Prozesse eingebunden sind, und dass möglicherweise nicht sämtliche Dinukleosidpolyphosphate identifiziert worden sind.

Offenbar ist unser Wissen in diesem Bereich noch begrenzt; die methodischen Arbeiten der vorliegenden Schrift sollen jedoch einen Beitrag leisten, die betreffenden Mediatoren zu isolieren, identifizieren und zu charakterisieren.

Diese Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass Dinukleosidpolyphosphate neben ihren deutlichen direkten Effekten einen Teil ihrer Effekte innerhalb des (patho-) physiologischen Wirkungsbereichs anscheinend auch über eine wirkungsvolle Inhibierung der membrangebundenen und freien Adenylatkinase vermitteln, und dabei den verbundenen ADP-Abbau unterbinden.

5. Zusammenfassung

Die chronische Niereninsuffizienz betrifft weltweit ca. 1,5 Millionen Patienten. Bei zunehmender Lebenserwartung wird die Anzahl der niereninsuffizienten Patienten weiter ansteigen. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind dabei gleichzeitig Ursache und Folge der chronischen Niereninsuffizienz. Im Besonderen die arterielle Hypertonie ist für die Progression der Niereninsuffizienz bedeutsam (30, 31). Über 25% der globalen Bevölkerung und mehr als 50% der über fünfzigjährigen Bevölkerung in den industrialisierten Ländern leiden an einer Hypertonie (34). Bislang sind jedoch letztendlich die Ursachen der kardiovaskulären Erkrankungen, wie der arteriellen Hypertonie und der chronischen Niereninsuffizienz in weiten Teilen noch ungeklärt. Daher kommt der Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung der Mediatoren, die ursächlich an der Entstehung der chronischen Niereninsuffizienz und den kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt sind, eine sehr hohe Bedeutung zu.

Die hier vorgelegte Arbeit möchte hierzu einen Beitrag dazu leisten, die Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz zu klären, indem sie die in den letzten Jahren verbesserten chromatographische und massenspektrometrische Methoden zur chromatographischen Isolierung und massenspektrometrischen Identifizierung der betreffenden Mediatoren einsetzt. Die gegenwärtig zur Verfügung stehenden Methoden bieten gegenwärtig erstmalig die Möglichkeit, die betreffenden Biomoleküle zu isolieren, zu identifizieren und unbekannte Pathomechanismen aufzuklären (Kap. 3.1).

Durch den gezielten Einsatz dieser Techniken konnte im Rahmen der Arbeit gezeigt werden, dass den Dinukleosidpolyphosphate Up_4A , Ap_5A und Ap_6A sowie bisher unbekanntem angiotensin-ähnlichen Peptiden eine besondere Bedeutung in der Genese der chronischen Niereninsuffizienz und kardiovaskulärer Erkrankungen zukommt. Im Rahmen der Studie wurde bisher unbekanntes, lokales RAS-System beschrieben werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen vasoregulatorisch-wirksamen beziehungsweise wachstumstimulierenden Mediatoren sollen zur Vervollständigung des komplexen Bildes der Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz sowie der kardiovaskulären Erkrankungen auf molekularer Ebene beitragen.

Die durch diese Arbeit bedingten Kenntnisse der zugrunde liegenden Regulationssysteme sollen zukünftig bei der Etablierung neuer therapeutischer Ansätze in der chronischen Niereninsuffizienz und kardiovaskulärer Erkrankungen Verwendung finden. Um dieses Ziel in den nächsten Jahren zu erreichen, wurden aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mehrere Drittmittel-geförderte Projekte (BMW, BMBF, BMBF/NGFN, EU-FP7 etc.) mit entsprechenden national und international agierenden Großunternehmen (z.B. Bayer Schering Pharma AG, Fresenius Medical Care Deutschland GmbH, Roche AG) als auch einigen KMUs (z. B. Excorlab GmbH, Mosaiques Diagnostics GmbH, Navtec GmbH) initiiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie die daraus resultierenden Kooperationen mit kommerziellen Partnern mündeten bereits in zwei klinische Studien der Med. Klinik IV, der Charité. Im Rahmen dieser Studien sollen neue Konzepte zur Behandlung chronisch-niereninsuffizienter Patienten mit dem Ziel geprüft werden, kardiovaskuläre Erkrankungen chronisch-niereninsuffizienter Patienten zu verringern.

6. Literatur

1. Vanholder R, Argiles A, Baurmeister U, Brunet P, *et al.* Uremic toxicity: present state of the art. *Int J Artif Organs* 2001; **24**: 695-725.
2. Eckardt KU, Berns JS, Rocco MV, Kasiske BL. Definition and classification of CKD: the debate should be about patient prognosis--a position statement from KDOQI and KDIGO. *Am J Kidney Dis* 2009; **53**: 915-920.
3. Locatelli F, Vecchio LD, Pozzoni P. The importance of early detection of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002; **17 Suppl 11**: 2-7.
4. Kimura G. [Integrated care and expected outcomes over the progression of CKD (chronic kidney disease)]. *Nippon Rinsho* 2008; **66**: 1807-1813.
5. Fogo AB. Progression and potential regression of glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2001; **59**: 804-819.
6. Krol E, Rutkowski B, Czarniak P, Kraszewska E, *et al.* Early detection of chronic kidney disease: results of the PolNef study. *Am J Nephrol* 2009; **29**: 264-273.
7. Schölmerich J. *Medizinische Therapie 3.ed.* Springer Berlin Heidelberg, 2007/2008, 1000-1003pp.

8. Kramar R OR. Oesterreichisches Dialyse und Transplantationsregister ÖDTR. *Jahresbericht 2008 der Österreichischen Gesellschaft für Nephrologie* 2008.
9. Schmidt UF TJ, Mann U Der Internist. *Glomerulonephritiden* 2002; **43**: 749-759.
10. Idasiak-Piechocka I, Krzymanski M. [The role of tubulointerstitial changes in progression of kidney function failure in patients with chronic glomerulonephritis (GN)]. *Przegl Lek* 1996; **53**: 443-453.
11. Ohashi R, Kitamura H, Yamanaka N. Peritubular capillary injury during the progression of experimental glomerulonephritis in rats. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**: 47-56.
12. Nakayama M, Sato T, Sato H, Yamaguchi Y, *et al.* Different clinical outcomes for cardiovascular events and mortality in chronic kidney disease according to underlying renal disease: the Gonryo study. *Clin Exp Nephrol* 2010; **14**: 333-339.
13. Tepel M vdGM, Zidek W, . Praktische Therapie der chronischen Niereninsuffizienz durch Progressionshemmung. *Dt Ärzteblatt* 1997; **94**: 2648-2652.
14. Gelber RP, Kurth T, Kausz AT, Manson JE, *et al.* Association between body mass index and CKD in apparently healthy men. *Am J Kidney Dis* 2005; **46**: 871-880.
15. Halimi JM, Mimran A. Renal effects of smoking: potential mechanisms and perspectives. *Nephrol Dial Transplant* 2000; **15**: 938-940.
16. Briganti EM, Branley P, Chadban SJ, Shaw JE, *et al.* Smoking is associated with renal impairment and proteinuria in the normal population: the AusDiab kidney study. Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study. *Am J Kidney Dis* 2002; **40**: 704-712.
17. Ford CM, Ejerblad E, Lindblad P, Fryzek JP, *et al.* Acetaminophen, aspirin, and chronic renal failure. *N Engl J Med* 2001; **345**: 1801-1808.
18. Schober-Halstenberg HJF, U. Nierenersatztherapie in Deutschland Quasi-Niere 2006-2007: 1-64.
19. John R, Webb M, Young A, Stevens PE. Unreferred chronic kidney disease: a longitudinal study. *Am J Kidney Dis* 2004; **43**: 825-835.
20. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, *et al.* Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 2000; **342**: 1478-1483.
21. Vanholder R, Massy Z, Argiles A, Spasovski G, *et al.* Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2005; **20**: 1048-1056.
22. Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, Neaton JD, *et al.* Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N Engl J Med* 1996; **334**: 13-18.
23. Tozawa M, Iseki K, Iseki C, Kinjo K, *et al.* Blood pressure predicts risk of developing end-stage renal disease in men and women. *Hypertension* 2003; **41**: 1341-1345.

24. Ridao N, Luno J, Garcia de Vinuesa S, Gomez F, *et al.* Prevalence of hypertension in renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2001; **16 Suppl 1**: 70-73.
25. Collins AJ, Li S, Gilbertson DT, Liu J, *et al.* Chronic kidney disease and cardiovascular disease in the Medicare population. *Kidney Int Suppl* 2003; S24-31.
26. Foley RN, Murray AM, Li S, Herzog CA, *et al.* Chronic kidney disease and the risk for cardiovascular disease, renal replacement, and death in the United States Medicare population, 1998 to 1999. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 489-495.
27. Caulfield M PJ, Dominiczak A, *et al.* The MRC British Genetics of Hypertension Study - Genome-wide screen results. *Journal of Hypertension* 2002; **20**: 5-7.
28. Edwards NL. The role of hyperuricemia in vascular disorders. *Curr Opin Rheumatol* 2009; **21**: 132-137.
29. David S, Kumpers P, Lukasz A, Kielstein JT, *et al.* Circulating angiotensin-2 in essential hypertension: relation to atherosclerosis, vascular inflammation, and treatment with olmesartan/pravastatin. *J Hypertens* 2009; **27**: 1641-1647.
30. Quack I, Rump LC. [Kidney and hypertension]. *Internist (Berl)* 2009; **50**: 410-422.
31. Pruijm MBE, Burnier M. Arterielle Hypertonie und Niereninsuffizienz. *Schweiz Med Forum* 2009; **9**: 497.
32. Hense HW. Risk factor scoring for coronary heart disease. *BMJ* 2003; **327**: 1238-1239.
33. Moebus S, Hanisch JU, Lössch C, Bramlage P, *et al.* Arterial Hypertension and abdominal obesity are the most important factors of the metabolic syndrome in a cohort of 35,869 patients in primary care. *J Hypertension* 2008; **12**: 7-11.
34. Deutschland G. Gesundheit in Deutschland, GBE. 2006.
35. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, *et al.* The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *Jama* 2003; **289**: 2560-2572.
36. Scinicariello F, Yesupriya A, Chang MH, Fowler BA. Modification by ALAD of the Association between Blood Lead and Blood Pressure in the U.S. Population: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Environ Health Perspect* 2010; **118**: 259-264.
37. Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 1996; **272**: 676-680.
38. Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation* 2000; **101**: 329-335.
39. London GM. Cardiovascular disease in chronic renal failure: pathophysiologic aspects. *Semin Dial* 2003; **16**: 85-94.

40. Belov YV, Stepanenko AB, Gens AP, Radnaev Ch D, *et al.* Staged surgical treatment of vasorenal hypertension in the long-term period after repair of the thoracoabdominal aorta. *Angiol Sosud Khir* 2006; **12**: 127-131.
41. Wofford MR, King DS, Wyatt SB, Jones DW. Secondary Hypertension: Detection and Management for the Primary Care Provider. *J Clin Hypertens* 2000; **2**: 124-131.
42. K/DOQI. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; **39**: S1-266.
43. Nitschke M, Meier M, Steinhoff J. [Acute and chronic renal insufficiency. Diagnostics and practical implications]. *Med Klin (Munich)* 2008; **103**: 500-511; quiz 512-503.
44. Lemley KV. An introduction to biomarkers: applications to chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2007; **22**: 1849-1859.
45. Perco P, Pleban C, Kainz A, Lukas A, *et al.* Protein biomarkers associated with acute renal failure and chronic kidney disease. *Eur J Clin Invest* 2006; **36**: 753-763.
46. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2008; **241**: 89-94.
47. Kirkland JJ, Henderson JW, DeStefano JJ, van Straten MA, *et al.* Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1997; **762**: 97-112.
48. Glajch JL, Kirkland JJ, Kohler J. Effect of column degradation on the reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of peptides and proteins. *J Chromatogr* 1987; **384**: 81-90.
49. Jankowski V, Vanholder R, Henning L, Karadogan S, *et al.* Isolation and quantification of dinucleoside polyphosphates by using monolithic reversed phase chromatography columns. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; **819**: 131-139.
50. Meyer VR. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, 2009.
51. Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass spectrometry. *Anal Chem* 1991; **63**: 1196A-1203A.
52. Nordhoff E, Ingendoh A, Cramer R, Overberg A, *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of nucleic acids with wavelengths in the ultraviolet and infrared. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1992; **6**: 771-776.
53. Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M, Hufnagel P, *et al.* A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* 2003; **376**: 952-965.
54. Mann M, Wilm M. Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**: 219-224.

55. McCormack AL, Schieltz DM, Goode B, Yang S, *et al.* Direct analysis and identification of proteins in mixtures by LC/MS/MS and database searching at the low-femtomole level. *Anal Chem* 1997; **69**: 767-776.
56. Marshall AG, Hendrickson CL, Jackson GS. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass Spectrom Rev* 1998; **17**: 1-35.
57. Solouki T, Reinhold BB, Costello CE, O'Malley M, *et al.* Electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of permethylated oligosaccharides. *Anal Chem* 1998; **70**: 857-864.
58. Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* 1977; **57**: 313-370.
59. Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* 1987; **79**: 1-6.
60. Dell'Italia LJ, Meng QC, Balcells E, Wei CC, *et al.* Compartmentalization of angiotensin II generation in the dog heart. Evidence for independent mechanisms in intravascular and interstitial spaces. *J Clin Invest* 1997; **100**: 253-258.
61. Müller DN, Bohlender J, Hilgers KF, Dragun D, *et al.* Vascular angiotensin-converting enzyme expression regulates local angiotensin II. *Hypertension* 1997; **29**: 98-104.
62. Wolf G. [The renin-angiotensin-aldosterone system -- more complex as previously thought]. *Med Klin (Munich)* 2005; **100**: 471-477.
63. Dorer FE, Kahn JR, Lentz KE, Levine M, *et al.* Purification and properties of angiotensin-converting enzyme from hog lung. *Circ Res* 1972; **31**: 356-366.
64. Leung PS. The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs. *Curr Protein Pept Sci* 2004; **5**: 267-273.
65. Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, *et al.* Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 11968-11973.
66. Rebas E, Lachowicz-Ochedalska A. The effect of angiotensin III on protein tyrosine kinase activity in rat pituitary. *Regul Pept* 2005; **130**: 14-18.
67. Le MT, Vanderheyden PM, Szaszak M, Hunyady L, *et al.* Angiotensin IV is a potent agonist for constitutive active human AT1 receptors. Distinct roles of the N- and C-terminal residues of angiotensin II during AT1 receptor activation. *J Biol Chem* 2002; **277**: 23107-23110.
68. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, *et al.* International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; **52**: 415-472.
69. Santos RA, Ferreira AJ, Simoes ESAC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol* 2008; **93**: 519-527.

70. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept* 2000; **91**: 45-62.
71. Jankowski V, Vanholder R, van der Giet M, Tolle M, *et al.* Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 297-302.
72. Gobom J, Schuerenberg M, Mueller M, Theiss D, *et al.* Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics. *Anal Chem* 2001; **73**: 434-438.
73. Jankowski V, Vanholder R, van der Giet M, Henning L, *et al.* Detection of angiotensin II in supernatants of stimulated mononuclear leukocytes by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight/time-of-flight mass analysis. *Hypertension* 2005; **46**: 591-597.
74. Orzechowski HD, Gunther A, Menzel S, Zimmermann A, *et al.* Transcriptional mechanism of protein kinase C-induced isoform-specific expression of the gene for endothelin-converting enzyme-1 in human endothelial cells. *Mol Pharmacol* 2001; **60**: 1332-1342.
75. Beyermann M, Fechner K, Furkert J, Krause E, *et al.* A single-point slight alteration set as a tool for structure-activity relationship studies of ovine corticotropin releasing factor. *J Med Chem* 1996; **39**: 3324-3330.
76. Douglas SA, Sulpizio AC, Piercy V, Sarau HM, *et al.* Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey. *Br J Pharmacol* 2000; **131**: 1262-1274.
77. Pesquero JB, Lindsey CJ, Zeh K, Paiva AC, *et al.* Molecular structure and expression of rat bradykinin B2 receptor gene. Evidence for alternative splicing. *J Biol Chem* 1994; **269**: 26920-26925.
78. Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, *et al.* Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 1986; **45**: 711-719.
79. Jackson TR, Blair LA, Marshall J, Goedert M, *et al.* The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* 1988; **335**: 437-440.
80. Ambroz C, Clark AJ, Catt KJ. The mas oncogene enhances angiotensin-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1133**: 107-111.
81. Ardaillou R. Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10 Suppl 11**: S30-39.
82. Walther T, Balschun D, Voigt JP, Fink H, *et al.* Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J Biol Chem* 1998; **273**: 11867-11873.

83. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, *et al.* Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 8258-8263.
84. Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; **289**: H1560-1566.
85. Sampaio WO, Henrique de Castro C, Santos RA, Schiffrin EL, *et al.* Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension* 2007; **50**: 1093-1098.
86. Lüthje J, Ogilvie A. The presence of diadenosine 5',5'''-P₁,P₃-triphosphate (Ap₃A) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; **115**: 253-260.
87. Schlüter H, Tepel M, Zidek W. Vascular actions of diadenosine phosphates. *J Auton Pharmacol* 1996; **16**: 357-362.
88. Jankowski J, Tepel M, van der Giet M, Tente IM, *et al.* Identification and characterization of P(1), P(7)-Di(adenosine-5')- heptaphosphate from human platelets. *J Biol Chem* 1999; **274**: 23926-23931.
89. Jankowski J, Hagemann J, Yoon MS, Van Der Giet M, *et al.* Increased vascular growth in hemodialysis patients induced by platelet- derived diadenosine polyphosphates. *Kidney Int* 2001; **59**: 1134-1141.
90. Luo J, Jankowski J, Tepel M, von der Giet M, *et al.* Identification of diadenosine hexaphosphate in human erythrocytes. *Hypertension* 1999; **34**: 872-875.
91. Luo J, Jankowski J, Knobloch M, van der Giet M, *et al.* Identification and characterization of diadenosine 5',5'''-P₁,P₂ - diphosphate and diadenosine 5',5'''-P₁,P₃-triphosphate in human myocardial tissue. *Faseb J* 1999; **13**: 695-705.
92. Jankowski J, Yoon MS, Stephan N, Zidek W, *et al.* Vasoactive diadenosine polyphosphates in human placenta: possible candidates in the pathophysiology of pre-eclampsia? *J Hypertens* 2001; **19**: 567-573.
93. Jankowski V, Tolle M, Vanholder R, Schonfelder G, *et al.* Uridine adenosine tetraphosphate: a novel endothelium- derived vasoconstrictive factor. *Nat Med* 2005; **11**: 223-227.
94. Jankowski V, van der Giet M, Mischak H, Morgan M, *et al.* Dinucleoside polyphosphates: strong endogenous agonists of the purinergic system. *Br J Pharmacol* 2009.
95. Wang L, Karlsson L, Moses S, Hultgardh-Nilsson A, *et al.* P₂ receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; **40**: 841-853.
96. Bobbert P, Schluter H, Schultheiss HP, Reusch HP. Diadenosine polyphosphates Ap₃A and Ap₄A, but not Ap₅A or Ap₆A, induce proliferation of vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 2008; **75**: 1966-1973.

97. Vonend O, Grote T, Oberhauser V, Von Kugelgen I, *et al.* P2Y-receptors stimulating the proliferation of human mesangial cells through the MAPK42/44 pathway. *Br J Pharmacol* 2003; **139**: 1119-1126.
98. Lu M, MacGregor GG, Wang W, Giebisch G. Extracellular ATP inhibits the small-conductance K channel on the apical membrane of the cortical collecting duct from mouse kidney. *J Gen Physiol* 2000; **116**: 299-310.
99. Turner CM, Vonend O, Chan C, Burnstock G, *et al.* The pattern of distribution of selected ATP-sensitive P2 receptor subtypes in normal rat kidney: an immunohistological study. *Cells Tissues Organs* 2003; **175**: 105-117.
100. Muller AM, Gruhn K, Lange S, Franke FE, *et al.* [Angiotensin converting enzyme (ACE, CD143) in the regular pulmonary vasculature]. *Pathologe* 2004; **25**: 141-146.
101. Siegenthaler W BHE. *Klinische Pathophysiologie*. 2006: 665.
102. Jankowski V TM, van der Giet M, Zidek W, Jankowski J, . Angioprotektin: An Ang-like peptide causing vasodilatory effects. *JCI* 2010.
103. Jankowski V, Patzak A, Herget-Rosenthal S, Tran TN, *et al.* Uridine adenosine tetraphosphate acts as an autocrine hormone affecting glomerular filtration rate. *J Mol Med* 2008; **86**: 333-340.
104. Jankowski V, Meyer AA, Schlattmann P, Gui Y, *et al.* Increased uridine adenosine tetraphosphate concentrations in plasma of juvenile hypertensives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 1776-1781.
105. Yegutkin GG, Samburski SS, Jalkanen S. Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase and phosphotransfer reactions. *FASEB J* 2003; **17**: 1328-1330.
106. Yegutkin GG, Samburski SS, Mortensen SP, Jalkanen S, *et al.* Intravascular ADP and soluble nucleotidases contribute to acute prothrombotic state during vigorous exercise in humans. *J Physiol* 2007; **579**: 553-564.
107. Birk AV, Bubman D, Broekman MJ, Robertson HD, *et al.* Role of a novel soluble nucleotide phospho-hydrolase from sheep plasma in inhibition of platelet reactivity: hemostasis, thrombosis, and vascular biology. *J Lab Clin Med* 2002; **139**: 116-124.
108. Delicado EG, Miras-Portugal MT, Carrasquero LM, Leon D, *et al.* Dinucleoside polyphosphates and their interaction with other nucleotide signaling pathways. *Pflugers Arch* 2006; **452**: 563-572.
109. Yang G, Yu X, Wu Z, Xu J, *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel adenylate kinase 3 gene from *Clonorchis sinensis*. *Parasitol Res* 2005; **95**: 406-412.

7. Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. med. W. Zidek, Med. Klinik IV, für die nachhaltige Unterstützung, zahlreichen Anregungen, konstruktive Zusammenarbeit und hervorragende Motivation auf dem Weg meiner bisherigen wissenschaftlichen Tätigkeit.

Mein tiefer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. J. Jankowski, meinem Ehemann und Arbeitsgruppenleiter, für seinen Rat, seiner Hilfe und die tatkräftigen Unterstützungen während meiner gesamten wissenschaftlichen Laufbahn. Der rege Erfahrungs- und Gedankenaustausch und ebenso die Diskussionen haben wesentlich zu meiner wissenschaftlichen Ausbildung beigetragen. Vielen Dank für Deine Ratschläge und Deine Liebe.

Herrn Prof. Dr. med. M. van der Giet und Herrn Dr. med. M. Tölle möchte ich besonders für die Durchführung einiger physiologischer Experimente, die Anregungen und für die Diskussionen der Ergebnisse danken.

I am grateful to the members of the EUTox-Group for their discussions and suggestions, especially to Prof. Dr. R. Vanholder, Prof. Dr. Á. Argilés, Prof. Dr. H. Mischak and PD. Dr. S. Hergeth-Rosenthal.

Danken möchte ich auch besonders Frau B. Egbers, Frau Dipl.-Biochem. A. Schulz, Herrn Dipl.-Biochem. F. Bretschneider, Frau S. Salem, Frau Dipl.-Biotech. K. Krüger, Frau Dr. med. S. Asan, Frau A. Tran, Frau I. Stamcou und allen nicht genannten Kollegen der Arbeitsgruppe Jankowski.

Meinem Sohn Christian Breden möchte ich von ganzen Herzen danken, für seine ständige Aufmunterungen, Liebe und sein Verständnis für meine Arbeit.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, das

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift