

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung mononukleärer Zellen

Gesunden Probanden wurde aus der Vena cubitalis 400 ml heparinisiertes Vollblut abgenommen. Nach Zentrifugation des Vollblutes wurde das Plasma verworfen, die festen Blutbestandteile wurden mit isotonischer NaCl-Lösung verdünnt. Mittels Histo-paque™ 1077-Lösung (Sigma-Aldrich, Deutschland) wurden die mononukleären Zellen isoliert. Nach 60 Minuten Selbstinkubation und weiteren Zentrifugationsschritten wurde aus dem Überstand eine vasokonstringierende Substanz isoliert.

3.2 Kationenaustausch-Chromatographie

Nachdem die mononukleären Zellen durch Zentrifugation und Inkubation bei 25°C für 60 Minuten isoliert worden waren, wurde der Überstand mittels Kationenaustausch-Chromatographie konzentriert und fraktioniert. Ein charakteristisches Chromatogramm zeigt Abbildung 1.

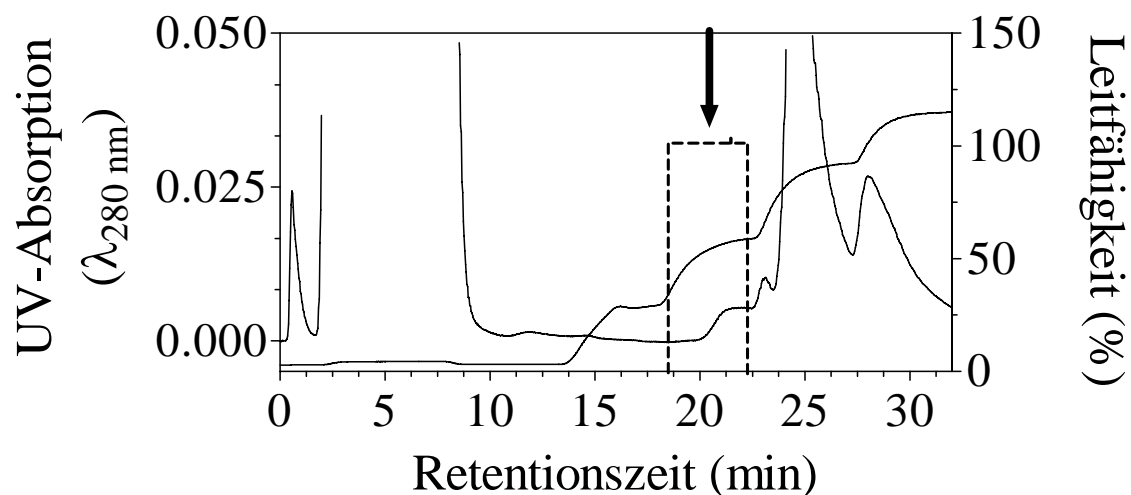


Abbildung 1: Chromatogramm der Kationenaustausch-Chromatographie [Legende siehe S. 26]

Säule:	HiTrap™ SP 1ml; Amersham Pharmacia, Schweden
Probe:	Lymphozytenüberstand nach Aufarbeitung
Eluent A:	10 mmol/l K ₂ HPO ₄ , pH 3.5
Eluent B:	10 mmol/l K ₂ HPO ₄ , pH 3.5 und 2 mol/l NaCl
Fluss:	1 ml/min
UV-Detektion:	280 nm
Fraktionsgröße:	1 ml

In dem Chromatogramm sind mehrere UV-Absorptionspeaks zu erkennen. Diese Absorptionsanstiege wurden durch Substanzen verursacht, die vom Gelmaterial eluieren. In dem Retentionszeitintervall zwischen der 20. bis zur 22. Minute, was 37 % Lösungsmittel B entspricht, ist ein Anstieg der UV-Absorption bei 280 nm zu beobachten. Bei diesen, mit den gestrichelten Linien gekennzeichneten Fraktionen, handelt es sich um die Fraktionen, in denen die vasokonstringierende Substanz gefunden wurde, und die mit Hilfe der Reversed-Phase-Chromatographie weiter verarbeitet wurde. In der Retentionszeit von der 22. bis zur 23. Minute, die ebenso 37 % Lösungsmittel B entspricht, folgt ein weiterer Absorptionspeak. In der Zeit von der 24. bis zur 27. Minute, was 50 % Lösungsmittel B entspricht, ist ein starker Anstieg der UV-Absorption bei 280 nm zu sehen. Von der 27. bis zur 31. Minute, was 75 % Lösungsmittel B entspricht, folgt ein weiterer, schwächerer Absorptionspeak.

3.3 Reversed-Phase-Chromatographie

Das Eluat des Stufengradienten der Kationenaustausch-Chromatographie wurde zusammengefasst und durch die Reversed-Phase-Chromatographie chromatographiert. Zum einen wird durch die Reversed-Phase-Chromatographie das Eluat der Kationenaustausch-Chromatographie entsalzt, zum anderen wird eine weitere Fraktionierung des Eluats vorgenommen. Ein charakteristisches Chromatogramm zeigt Abbildung 2.

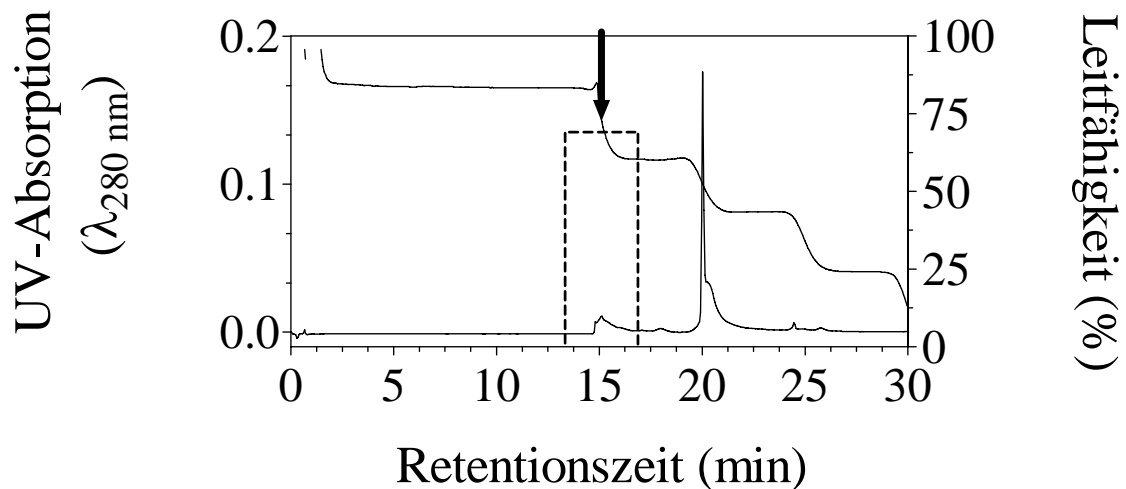


Abbildung 2: Chromatogramm der Reversed-Phase-Chromatographie des Eluats der Kationenaustausch-Chromatographie

Säule:	Poros R2/H; 100 x 2.1 mm I.D., Perseptive Biosystems, Deutschland
Eluent A:	40 mmol/l wässrige TEAA-Lösung
Eluent B:	80 %-iges Acetonitril
Fluss:	500 µl/ml
UV-Detektion:	280 nm
Fraktionsgröße:	1 ml

In der Retentionszeit zwischen der 15. bis 16. Minute, entsprechend 75 % des Lösungsmittel B (Acetonitril), ist ein Anstieg der UV-Absorption bei 280 nm zu sehen. In diesen, auch mit dem Pfeil bzw. mit der gestrichelten Linie gekennzeichneten Fraktionen befanden sich die vasokonstringierenden Substanzen, die mit Hilfe der MALDI-MS weiter aufgetrennt wurden und in Abb.3 dargestellt sind.

In der Retentionszeit zwischen der 19. bis zur 21. Minute, was den Übergang von 50% Acetonitril zu 75 % Acetonitril darstellt, ist ein ausgeprägter Absorptionspeak bei 280 nm zu erkennen. In der Retentionszeit bei 25 Minuten sind weitere minimale Absorptionspeaks zu erkennen.

3.4 MALDI-Massenspektrometrie

Mit Hilfe der MALDI-TOF-TOF-Massenspektrometrie wurde versucht, die vaso-konstriktive Substanz der vasoaktiven Fraktion der Reversed-Phase-Chromatographie (siehe Abbildung 2) zu identifizieren. In dieser Fraktion wurde unter anderem ein Peptid mit einem Molekulargewicht von 1046.54 Da identifiziert.

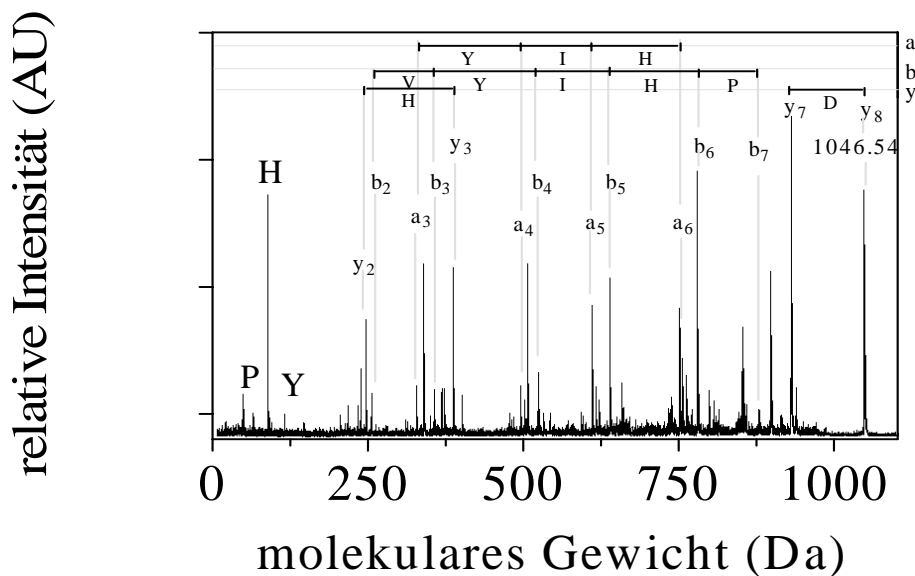


Abbildung 3: MALDI-TOF-TOF-Massenspektrum
Massenspektren der vasoaktiven Fraktion der Reversed-Phase-Chromatographie (Abbildung 3). Matrix: Zimtsäure, Abszisse: Massenzahl pro Ladung, Ordinate: relative Intensität

Dieses bei 1046.54 Da isolierte Peptid wurde mit Hilfe der MALDI-TOF-TOF Methode weiter fragmentiert, um genauere Informationen über dessen Sequenz zu erhalten. Die durchgeführte Fragmentierung ermöglichte die Identifizierung des Peptids durch vergleichende Suche in der Gendatenbank Swissprot database. Menschliches Angiotensin II war dem Peptid mit m/z 1046.54 nach einem kompletten Aminosäuresequenzvergleich deckungsgleich. Dieses Resultat wurde durch einen Vergleich mit

„Ionenfragmentspektren“ von gereinigtem humanem Angiotensin II bestätigt (Bachem, Deutschland).

3.5 Bioassay-Nierenperfusionstest

Die Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie wurden an der isolierten perfundierten Rattenniere auf ihre Vasoaktivität getestet. Abbildung 4 zeigt die Wirkung einer charakteristischen vasokonstringierenden Fraktion auf den Perfusionsdruck der Rattenniere. Die Fraktionen, die vasokonstringierende Wirkung zeigten, sind in Abbildung 1 und in Abbildung 2 durch einen Pfeil bzw. durch einen gestrichelten Rahmen gekennzeichnet.

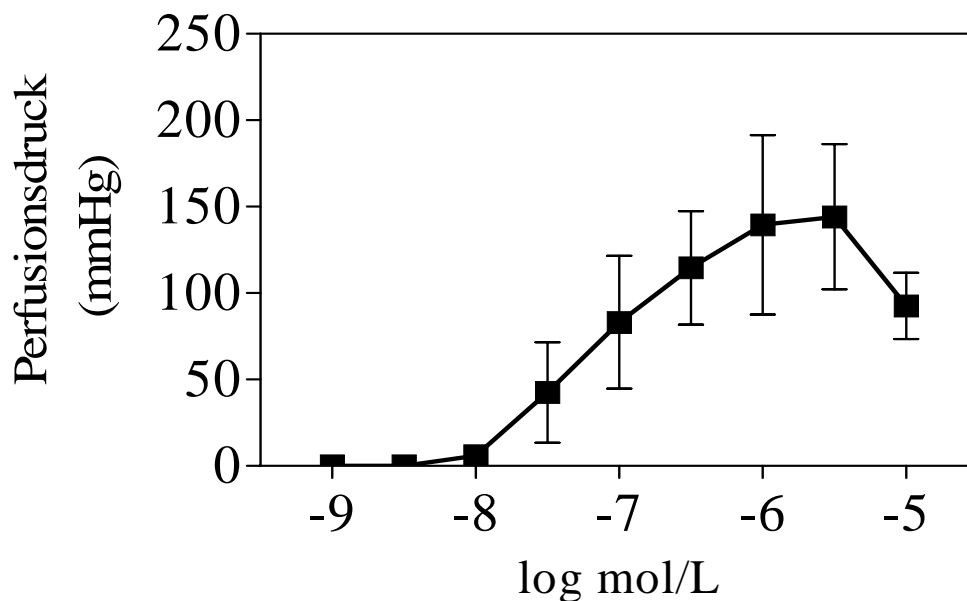


Abbildung 4: Wirkungen von Bolusinjektionen der vasokonstringierenden Substanz auf den Perfusionsdruck der isolierten perfundierten Rattenniere. Injektionsvolumen: 100 μ l. Probe: Eluat aus Reversed-Phase-Chromatographie

Mit steigender Konzentration der einzelnen getesteten Fraktionen kommt es zu einem deutlichen Anstieg des Perfusionsdrucks an der isolierten perfundierten Rattenniere. Maximal steigt der Perfusionsdruck auf etwa 150 mmHg. Bei noch höheren Konzentrationen der getesteten Fraktionen kommt es zu einem Abfall des Perfusionsdrucks auf ca. 100 mmHg.

3.6 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

Im Anschluß an den Nierenperfusionstest wurde untersucht, welcher Anteil der mononukleären Zellen in der Lage ist, Angiotensin II zu produzieren. Hierfür wurden die Fraktionen der CD8+ (T-Lymphozyten) und CD19+ (B-Lymphozyten) Lymphozyten mit Hilfe der Reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion aufgetrennt und auf ihre Expressionsfähigkeit hinsichtlich Angiotensinogen, Renin und Angiotensin-Converting-Enzym getestet. Zunächst wurde die RNA der CD8+ (T-Lymphozyten) und der CD19+ (B-Lymphozyten) Lymphozyten durch die Reverse Transkriptase in complementary DNA (cDNA) transkribiert. Durch die Polymerasekettenreaktion wurde eine Vervielfältigung, das heißt Amplifizierung dieses cDNA Abschnitts erreicht.

Mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese wurden die Produkte der RT-PCR aufgetrennt und sichtbar gemacht. Wie in Abbildung 5 dargestellt, exprimieren CD8+ (T-Lymphozyten) und CD19+ (B-Lymphozyten)-Lymphozyten neben Angiotensinogen, auch Renin und ACE. Auf diese Weise sind sie in der Lage, selbstständig Angiotensin II zu produzieren, ohne dabei auf Vorläufer-Moleküle von außerhalb angewiesen zu sein.

Die Produkte der PCR, die cDNA von Angiotensin converting enzyme, Renin und Angiotensinogen, konnten mit Hilfe einer Agarose-Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 5).

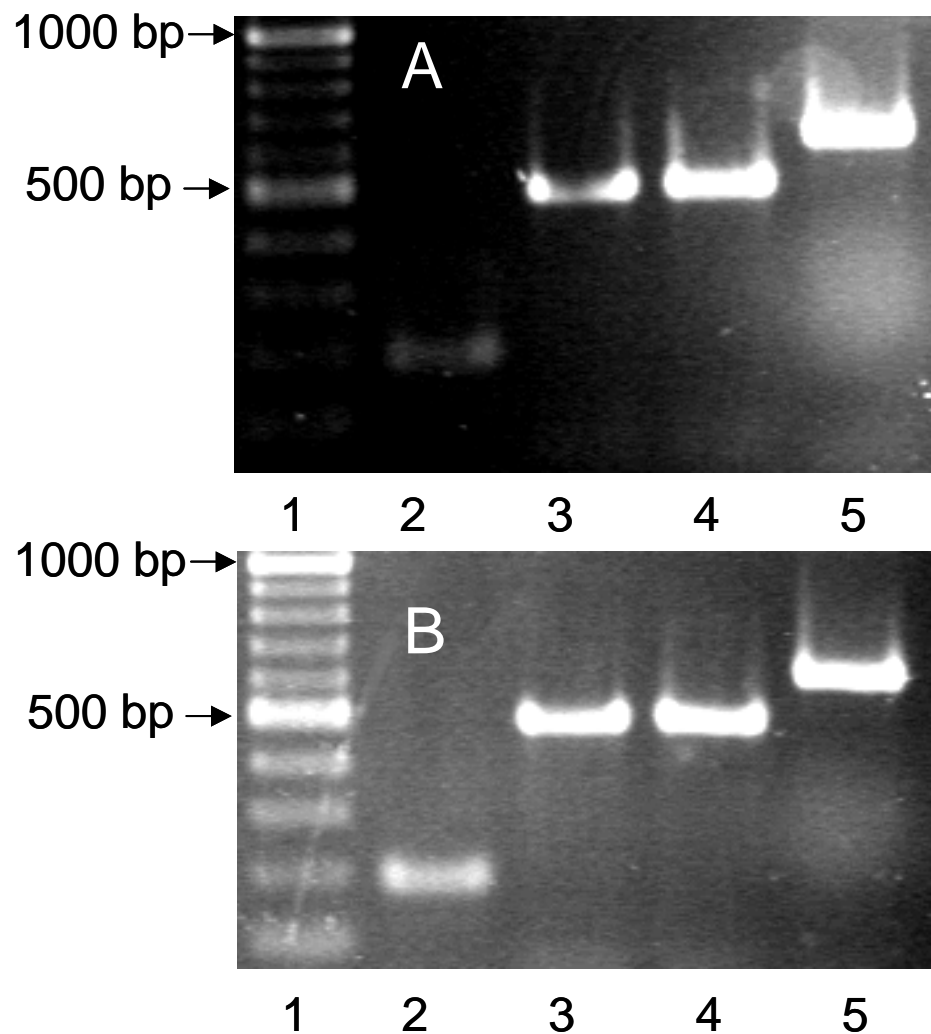


Abbildung 5A und B: Repräsentative Gel-Elektrophorese der Produkte der Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion;
 5A: CD8+ Zellen, 5B: CD19+ Zellen
 1.Spalte: 100 bp-Leiter (Marker)
 2.Spalte: cDNA von Renin
 3.Spalte: cDNA von ACE
 4.Spalte: cDNA von Angiotensinogen
 5.Spalte: β -Actin (Positivprobe)

In der ersten Spalte ist die 100 bp-Leiter zu erkennen, ein Längenstandard (Marker), dessen DNA-Fragmente sich jeweils um 100 bp unterscheiden. In der zweiten Spalte ist auf der Höhe von ca. 200 bp jeweils ein DNA-Fragment zu erkennen. Vergleiche

mit der Basenpaarlänge, die aus der Gendatenbank (siehe Tabelle 1) gewonnen wurden, zeigen, dass diese mit der Basenpaarlänge von Renin korreliert, die bei exakt 195 bp liegt. In der dritten Spalte erscheinen die DNA-Fragmente jeweils auf der

Höhe von 500 bp. Damit entsprechen sie der Länge der Basenpaarsequenz des Angiotensin-Converting-Enzyms, das bei 500 bp liegt. In der vierten Spalte sind die Fragmente wiederum auf der Höhe von 500 bp zu erkennen. Der Vergleich mit den Sequenzen aus der Gendatenbank zeigt, dass diese der Basenpaarlänge von Angiotensinogen, 500 bp entsprechen. In der fünften Spalte wurde die Positivprobe β -Actin aufgetragen, die auch zu ihrer bekannten Höhe von ca. 630 bp wanderte.

Nachfolgend wurde untersucht, inwieweit mononukleäre Leukozyten nicht nur Angiotensin II produzieren, sondern dieses auch in den Blutkreislauf sezernieren. Hierfür wurden die mononukleären Leukozyten nach der Isolierung mit Lipopolysaccharid stimuliert. Danach wurde der Überstand der mononukleären Zellen vor der Inkubation und 60 Minuten nach der Inkubation mit Hilfe der MALDI Massenspektrometrie bestimmt. Wie in Abbildung 6A und 6B dargestellt, stiegen die sezernierten Angiotensinmengen nach der Stimulation und Inkubation im Vergleich zum Ausgangswert deutlich an.

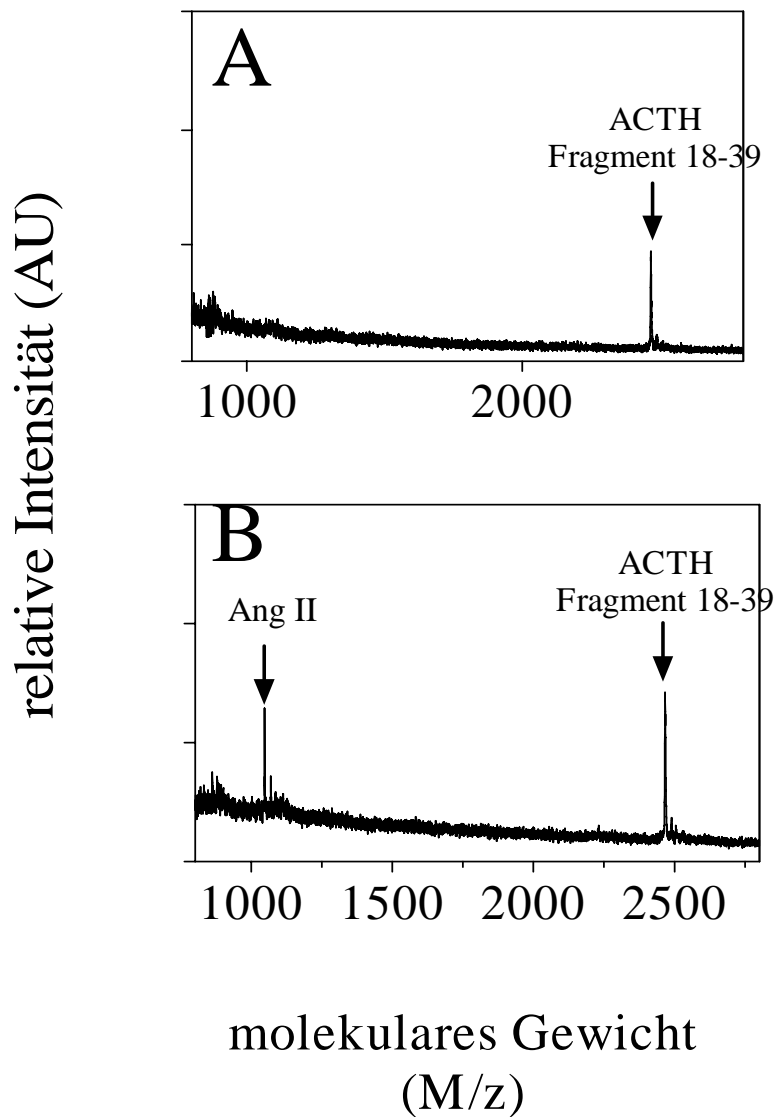


Abbildung 6A und 6B: MALDI-Massenspektrum
Massenspektrometrie des Überstandes der mono-
nukleären Zellen vor (Abb.6A) und 60 min. nach
(Abb.6B) der Inkubation mit Lipopolysaccharid.
Matrix: Zimtsäure
Abszisse: Massenzahl pro Ladung
Ordinate: relative Intensität

Nachdem die Produktion und Sekretion von Angiotensin II durch die CD8+ (T-Lymphozyten) und die CD19+ (B-Lymphozyten) Lymphozyten gezeigt werden kann-

te, wurde nachfolgend untersucht, ob eine ausreichende Menge an Angiotensin II von den zirkulierenden Lymphozyten produziert werden konnte, um einen Effekt auf den Gefäßtonus zu haben. Dafür wurden die von den Lymphozyten sezernierten Mengen an Angiotensin II mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie abgeschätzt. Es wurde ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Amplitude des massenspektrometrischen Signals und der zugrundeliegenden Menge des Angiotensin II hergestellt. Es konnte abgeschätzt werden, dass nach der Stimulation mit Lipopolysaccharid 9.9 ± 6.6 fmol Angiotensin II/ 10^6 Lymphozyten/min nach den ersten 24 Stunden Inkubationszeit sezerniert wurden.

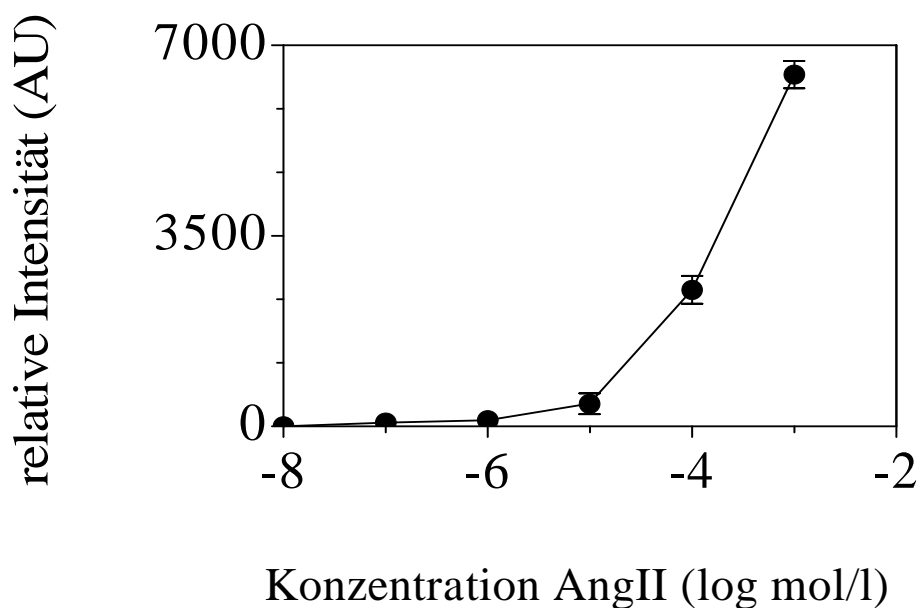


Abbildung 7: Zunahme des massenspektrometrischen Signals bei zunehmender Angiotensin II-Konzentration.

Abszisse: Konzentration des Angiotensin II (log mol/l)

Ordinate: relative Intensität