

#### 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob neben den vaskulären Komponenten die korpuskulären Komponenten des strömenden Blutes in Form der CD8+ (T-Lymphozyten) und der CD19+ (B-Lymphozyten) Lymphozyten an der Bildung des zirkulierenden Angiotensin II beteiligt sind und damit einen vasokonstringierenden Effekt auf das Gefäßsystem haben.

Die CD8+ Lymphozyten und die CD19+ Lymphozyten wurden mit einer Dichtezentrifugation aus menschlichem Blut isoliert. Dazu wurde Blut über eine Lösung aus Polysaccharose und Natriumdiatrizoat geschichtet. Erythrozyten und Granulozyten aggregieren durch Polysaccharose und sedimentieren durch eine anschließende Zentrifugation. Mononukleäre Zellen verbleiben in der Plasma-Dichtemedium-Interphase als milchiger Ring. Thrombozyten konnten durch mehrmalige Wasch- und Zentrifugationsschritte entfernt werden.

Nach Isolierung der mononukleären Leukozyten wurde der Überstand zwecks weiterer Fraktionierung einer Kationenaustausch-Chromatographie unterzogen, um kationische Substanzen aus der Probe zu trennen. Die Trennung erfolgte aufgrund unterschiedlicher Affinität zum Kationenaustauscher. An die stationäre Phase des Kationenaustauschers sind kovalent anionische Gruppen gebunden, so dass sich kationische Substanzen der mobilen Phase an die anionischen Gruppen anlagern. Die Elution der Probensubstanzen erfolgte mittels eines Gradienten durch kontinuierliche Steigerung der Kationenstärke der mobilen Phase.

Um in dem gewonnenen Eluat eine weitere Abtrennung von noch enthaltenen Puffersalzen sowie eine weitere Fraktionierung vorzunehmen, wurde mit den Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie eine Reversed-Phase-Ionenchromatographie durchgeführt. Für die Trennung werden bei diesem Verfahren die Wechselwirkungen zwischen der Einheit Probenmoleküle/Ionenpaarreagenz und der stationären Phase genutzt. Die ionisierten Probenmoleküle bilden mit den organischen Ionen des Ionenpaarreagenz ein Ionenpaar, das sich auf einer Umkehrphase ähnlich

einer neutralen Substanz verzögern lässt. Die in der Probe enthaltenen Moleküle werden aufgrund der unterschiedlich starken Verzögerung der einzelnen Stoffe in der stationären Phase getrennt. Im Durchbruch eluieren bereits stark polare Substanzen, wie zum Beispiel Salze. Je hydrophober der Charakter der Substanz ist, desto länger wird sie in der stationären Phase zurückgehalten.

Durch das Abtrennen von kationischen Substanzen bei einem pH-Wert von 3.5 durch die Kationenaustausch-Chromatographie und durch die Entsalzung und weitere Fraktionierung durch die Reversed-Phase-Chromatographie werden die Proben in eine Form überführt werden, die für den Nierenperfusionstest geeignet ist. Die Abtrennung der Puffersalze, die in der Probe enthalten sind, ist notwendig, um eine physiologische Kochsalzkonzentration der Proben zu erreichen. Hohe Kochsalzkonzentrationen führen aufgrund der höheren Osmolarität zu einer artifiziellen Vasokonstriktion und somit zu einem falsch-positiven Ergebnis. Ebenso macht eine zu hohe Salzkonzentration die Analysierung der Probe durch die MALDI-Massenspektrometrie unmöglich.

Wie in Abbildung 4 des Ergebnisteils dargestellt, kommt es nach Injektion des aufgereinigten Überstandes zu einer konzentrationsabhängigen Drucksteigerung innerhalb der isolierten perfundierten Rattenniere. Beim Durchfließen einer vasostringierenden Substanz verengen sich die Gefäße der Rattenniere und der Perfusionsdruck der Niere steigt an. Die Quantität der Druckänderung ist ein Maß für die Stärke der Vasoaktivität der Substanz in der Niere.

Die im Nierenperfusionstest vasokonstriktiv wirkenden Fraktionen wurden mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie analysiert und identifiziert. Das im Rahmen dieser Arbeit isolierte Molekül bei 1046.54 Da wurde mit Hilfe der MALDI-TOF/TOF Methode fragmentiert, um genauere Informationen über die Aminosäuresequenz zu erhalten.

Die durch das MALDI-TOF/TOF-Verfahren bestimmten Massenspektren wurden mit theoretisch berechneten Fragmentspektren verschiedener Moleküle in der Swissprot Datenbank verglichen. Dieser Vergleich ergab, dass die Masse der gewonnenen

Fragmente des Peptids mit dem Molekulargewicht 1046.54 Da mit den theoretisch berechneten Fragmentmassen von Angiotensin II nahezu identisch ist.

Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion untersucht, ob die CD8+ Lymphozyten und die CD19+ Lymphozyten in der Lage sind, Angiotensin II zu produzieren. Durch die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion kann die Genexpression für Angiotensinogen, Renin und das Angiotensin converting enzym in den CD8+ und CD19+ Lymphozyten nachgewiesen werden.

Zunächst wurde eine Reverse Transkription mit Hilfe einer Reversen Transkriptase durchgeführt. Ursprünglich verwenden Retroviren dieses Enzym, um bei der Replikation ihres RNA-Genoms ein DNA-RNA-Hybrid zu bilden [Stryer, 1996]. Die Reverse Transkriptase ist in der Lage, aus der mRNA eines Organismus einen gegengleichen DNA Strang, das heißt, einen komplementären DNA Strang (cDNA) herzustellen [Brown, 1993]. Voraussetzung war, dass ein Primer zur Verfügung stand, der durch Basenpaarung mit der RNA verbunden war und eine freie 3'-OH-Gruppe besitzt. Der neu entstandene cDNA-Einzelstrang kann nachfolgend mit Hilfe einer DNA-Polymerase zu einem DNA-Doppelstrang synthetisiert werden. Nachdem die Gesamt-RNA mit Hilfe des Qiagen RNeasy-Mini-Kit extrahiert worden war, wurde an der Ziel-RNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase eine Reverse Transkription durchgeführt. Bei jeder Reaktionsreihe wurde an einer RNA-Probe keine Superscript II RT-Reverse Transkriptase durchgeführt, um eine Negativ-Kontrolle für die nachfolgenden PCR-Reaktionen zu erhalten. Parallel wurden stets Kontroll-PCR-Reihen durchgeführt, um einerseits die entstehende cDNA-Menge zu bestimmen, andererseits um die Effizienz der Reversen Transkriptase und die Qualität der cDNA zu bestimmen. Anschließend wurde eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt.

Es wurden Kontroll-Reaktionen durchgeführt, indem Wasser anstatt mRNA und cDNA in die Reaktionslösung dazugegeben wurde. Die Existenz und die Größe der gewonnenen PCR-Produkte wurden anhand Ethidiumbromid-gefärbtem Agarosegel (2%) nachgewiesen. Des Weiteren wurde die Spezifität der neu gewonnenen cDNA getestet, indem die amplifizierte cDNA mit Restriktionsendonukleasen versetzt wurde.

Mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese wurden die Ergebnisse der RT-PCR qualitativ und quantitativ sichtbar gemacht.

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass humane CD8+ Lymphozyten (T-Lymphozyten) und CD19+ Lymphozyten (B-Lymphozyten) in der Lage sind, Angiotensin II in das zirkulierende Blut zu sezernieren. Weiter konnte gezeigt werden, dass die CD8+ Lymphozyten und die CD19+ Lymphozyten in der Lage sind, eine ausreichende Menge an Angiotensin II zu sezernieren, um Angiotensin-Rezeptoren zu stimulieren. Laut gegenwärtigen Schätzungen können die Lymphozyten, die in 1 ml Blut enthalten sind, 40 fmol/l Angiotensin II pro Minute bis hin zu 40 pmol/l pro Minute produzieren. Ausgehend von einer durchschnittlichen Angiotensinproduktion der Lymphozyten im Nanobereich, ist die Menge an Angiotensin II nach 30 Minuten ausreichend, um einen Effekt an der glatten Muskulatur der Gefäße zu erzielen. Es ist schwierig, einen „Steady State“ der Angiotensin II-Konzentration, die aus der Produktion der Blut-Lymphozyten resultiert, zu postulieren, da unter anderem dem Verlust von Angiotensin II während der Aufarbeitung Rechnung getragen werden muss. Ungeachtet dessen unterstützt die Abschätzung, dass die Angiotensin II-Produktion durch die Lymphozyten ausreicht, um eine klare funktionelle Relevanz zu besitzen.

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist nachgewiesen worden, dass Gewebe wie die Gefäßendothelzellen [Leung et al., 1998], Fettzellen [Goossens et al., 2003] und Makrophagen [Potter et al., 1998] in der Lage sind, Angiotensin II zu bilden. Diese lokale Angiotensin II-Produktion durch die Gewebszellen wurde als ein Bestandteil in der Regulation des Gefäßtonus im menschlichen Gefäßsystem angesehen.

In Publikationen wurde beschrieben, dass in Immunzellen von Tieren Angiotensin II produziert wird. Von Gomez konnte gezeigt werden, dass Leukozyten von Ratten mRNA von Angiotensinogen exprimieren und Proteine des Angiotensinogens synthetisieren [Gomez, 1993]. Zusätzlich wurde bei Ratten eine Freisetzung von Angiotensin-Proteinen aus Alveolarmakrophagen beobachtet [Dezso, 1989].

Von Weinstock et al. konnte schon 1989 gezeigt werden, dass nach Zugabe von Angiotensinogen oder Angiotensin I zu Immunzellen die Angiotensin II-Produktion anstieg. Er isolierte aus menschlichen Lebern, die mit dem Parasit *Schistosoma Mansoni* infiziert und aufgrund dessen entzündet war, Granulome und fraktionierte diese in makrophagenreiche und eosinophile leukozytenreiche Populationen [Weinstock, Blum, 1984]. In dem Homogenat der Makrophagen wurden Angiotensin I, II und III nachgewiesen. Diese Zellen gaben die Angiotensinpeptide spontan in das Kulturmedium ab. Im Homogenat der eosinophilen Leukozyten konnten keine Angiotensine nachgewiesen werden. Wurde von außen Angiotensinogen oder Angiotensin I in die Medien der beiden Kulturen eingebracht, resultierte daraus eine zusätzliche Konzentrationssteigerung an Angiotensin I, Angiotensin II und Angiotensin III in den Kulturmedien. Granulome Makrophagen können demnach Angiotensine sowohl aus endogenen als auch aus exogenen Substraten bilden [Weinstock, 1989]. Es war somit zu vermuten, dass die Enzyme, die für die Angiotensin II-Produktion benötigt werden, in den Immunzellen vorhanden sind. Es ist jedoch noch nicht klar, ob die Angiotensin II-Produktion wie im klassischen Weg durch Renin und Angiotensin converting enzym (ACE) vermittelt wird oder ob dies durch Renin- und ACE-unabhängige Enzyme geschieht.

Nataraj et. al. konnte 1999 an Mäusen, welche einen Mangel an AT1A-Rezeptoren für Angiotensin II aufwiesen, zeigen, dass Angiotensin II, welches über Typ 1-Rezeptoren (AT1) auf Immunzellen wirkt, die Proliferation von Lymphozyten in der Milz fördert [Nataraj et al., 1999]. Möglicherweise ist dieser Mechanismus des Renin-Angiotensin-Systems (RAS), die Lymphozytenaktivität zu unterstützen, ein Weg, Entzündungsprozesse zu fördern.

In tierexperimentellen Versuchen mit experimentell ausgelöster mesangio-proliferativer Glomerulonephritis an Mäusen mit Fc-Rezeptor-Mangel, konnte gezeigt werden, dass der ursprünglich tödliche Verlauf der Erkrankung durch Angiotensin II-AT1-Blocker abgewehrt werden konnte [Suzuki, 1998]. Bei der Untersuchung von Knochenmarks-Chimärismus zwischen Mäusen mit Fc-Rezeptor-Mangel und Mäusen mit AT1-Rezeptor-Mangel konnte gezeigt werden, dass glomeruläre Erkrankungen bei

Mäusen mit Fc-Rezeptor-Mangel mit einer AT1-Rezeptor-abhängigen CD4+-T-Zell-Infiltration assoziiert waren. Diese CD4+-T-Zell-Infiltration wurde durch Angiotensin II-aktivierte renale mesangiale Zellen ausgelöst, welche die chemotaktische Aktivität der T-Zellen anregen [Suzuki 2002].

Es scheint, dass das in den Lymphozyten gebildete Angiotensin II bei der Steuerung immunologischer Vorgänge eine wichtige Rolle spielt. Es gibt Indizien dafür, dass Angiotensin II das Immunsystem auf verschiedenen Wegen beeinflusst. Es ist bekannt, dass Angiotensin II als Zytokin die Interleukinsekretion stimuliert. In diesem Zusammenhang kann die Angiotensin II-Produktion der Lymphozyten als Teil eines „autokrinen Kreislaufes“ bei der Regulation der lymphatischen Immunantwort angesehen werden.

Weiterhin konnte die Rolle des RAS bei der Interleukin-12-Sekretion durch Makrophagen demonstriert werden [Constantinescu, 1998]. Ebenso konnte die Rolle des RAS bei haematopoetischen Prozessen in den verschiedenen Blutzelllinien inklusive der haematopoetischen Vorläuferzellen nachgewiesen werden [Rodgers, 2002; Rodgers, 2003]. Des Weiteren konnte dem RAS eine regulierende Funktion bei der TGF $\beta$ 1-Sekretion durch CD4<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden [Chen, 2002].

Unklar bleibt, durch welchen Stimulus die Lymphozyten zur Angiotensin II-Produktion angeregt werden. Während der Stimulus für die Renin-Sekretion, der wiederum der limitierende Faktor für die Angiotensin II-Produktion aus zirkulierendem Angiotensinogen darstellt, bekannt ist, ist die Regulation der lymphozytischen Angiotensin-II-Produktion bis heute noch unbekannt. Man weiß, dass Lymphozyten  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren exprimieren, welche im juxtaglomerulären Apparat der Niere die Renin-Sekretion stimulieren. Es bereitet Schwierigkeiten, weitere Analogieschlüsse zwischen der lymphozytischen und der renalen Renin-Sekretion zu ziehen. Es sind weitere Studien durchzuführen, um die physiologische Regulation der lymphozytischen Angiotensin II-Sekretion aufzuklären.

---

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass menschliche CD8+ (T-Lymphozyten) und CD19+ (B-Lymphozyten) Lymphozyten in der Lage sind, Angiotensin II sowohl zu produzieren als auch zu sezernieren. Diese Entdeckung erschließt somit eine weitere physiologische Quelle für Angiotensin II. Es ist anzunehmen, dass die Mengen an Angiotensin II, die aus Lymphozyten sezerniert werden, in der Lage sind, AT-Rezeptoren zu stimulieren und somit einen vaskulären Effekt auszulösen.