

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

DISSERTATION

„Angioprotektin“:
Ein vasoprotektives Angiotensin - Peptid

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Thomas Günthner

aus Leonberg

Gutachter: 1.: Prof. Dr. rer. nat. J. Jankowski
2.: Prof. Dr. med. K. Kisters
3.: Priv.-Doz. Dr. med. I. Buschmann

Datum der Promotion: 29.01.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Herz-Kreislauf-Erkrankungen	1
1.1.1	Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei chronischer Niereninsuffizienz	2
1.1.2	Endothelzellen	3
1.1.3	Endotheliale Dysfunktion	4
1.1.4	Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen	6
1.1.5	Hypertensive Herzkrankheit	7
1.2	Das Renin-Angiotensin-System (RAS).....	8
1.2.1	Angiotensin II	9
1.2.2	Angiotensin III.....	10
1.2.3	Angiotensin IV	10
1.2.4	Angiotensin 1-7	11
1.2.5	Angiotensin A.....	11
1.2.6	AT-Rezeptoren	12
2	Zielsetzung der Arbeit	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Material	15
3.1.1	Geräte.....	15
3.1.2	Puffer und Chemikalien.....	16
3.1.3	Versuchstiere	16
3.2	Methoden – Allgemeiner Teil	17
3.2.1	Chromatographische Methoden.....	17
3.2.2	MALDI - Massenspektrometrie.....	18
3.2.3	Bioassay der isolierten perfundierten Rattenniere	18
3.3	Methoden – Spezieller Teil	20
3.3.1	Plasma-Aufbereitung	20
3.3.2	Größenausschluss-Chromatographie	21
3.3.3	Analytische Reversed-Phase-Chromatographie	21
3.3.4	MALDI – Massenspektrometrie	21
3.3.5	Bioassay 1 - Isolierte perfundierte Rattenniere.....	22
3.3.6	Peptidsynthese	22

3.3.7	Bioassay 2 - Isolierte Aortenringe der Ratte.....	23
3.3.8	Rezeptor-Charakterisierung.....	24
3.3.9	Kommerzielle Ang-II-Assay-Kits.....	25
4	Ergebnisse.....	26
4.1	Plasma-Aufbereitung.....	26
4.2	Größenausschluss-Chromatographie.....	26
4.3	Analytische Reversed-Phase-Chromatographie.....	27
4.4	MALDI – Massenspektrometrie.....	28
4.5	Bioassay 1.....	30
4.6	Peptidsynthese.....	30
4.7	Bioassay 2.....	31
4.8	Rezeptor-Charakterisierung.....	32
4.9	Angioprotektin-Plasmakonzentrationen / Ang-II-Assay-Kits.....	37
5	Diskussion.....	39
5.1	Isolierung des Angioprotektins.....	40
5.2	Mechanismus des Angioprotektin-Effekts.....	42
5.3	Rezeptor-Charakterisierung.....	43
5.4	Syntheseweg.....	44
5.5	ACE-Hemmer und AT ₁ -Antagonisten.....	45
5.6	Angioprotektin als Biomarker.....	47
6	Zusammenfassung.....	49
7	Anhang.....	50
7.1	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	50
7.2	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	60
7.3	Abkürzungen.....	61
7.4	Lebenslauf.....	62
7.5	Publikationsliste.....	63
7.6	Danksagung.....	64
7.7	Erklärung.....	65

1 Einleitung

1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Aufgrund der Vielfältigkeit der bisher bekannten Risikofaktoren für die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen [1] liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Risikofaktoren und den dazugehörigen Pathomechanismen möglicherweise nur um einen Bruchteil aus der Gesamtheit der ätiologischen Faktoren bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen handelt. Daraus ergibt sich ein großes Potential pharmakologischer Angriffspunkte beziehungsweise Optimierungsmöglichkeiten der bisherigen medikamentösen Therapieformen. Im Zusammenhang mit der Pathophysiologie der Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind Atherosklerose, endotheliale Dysfunktion, Dyslipoproteinämie, Hyperurikämie, Hyperinsulinämie und die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems von besonderer Bedeutung. Des Weiteren spielt die genetische Disposition eine entscheidende Rolle. Bei den bisher bekannten habituellen Risikofaktoren handelt es sich um Bewegungsarmut, schlechte Ernährung, Übergewicht und Stress. Diese Risikofaktoren bedingen das metabolische Syndrom [2]. Weiterhin gewinnt der schädliche Einfluss des Nikotinabusus zunehmend an Bedeutung.

Der Forschungsbedarf auf dem Gebiet der Herz-Kreislauf-Erkrankungen wird zudem durch die Positionierung auf dem ersten Platz der Liste der Todesursachen deutlich. Nach wie vor stirbt nahezu jeder zweite Deutsche an den Folgen einer Herz-Kreislauf-Erkrankung. Im Jahre 2007 betrug der Prozentsatz dieser Todesfälle 43,4% aller Todesfälle der Gesamtbevölkerung mit leicht rückläufiger Tendenz (Statistisches Bundesamt, www.destatis.de). Einem Todesfall aufgrund einer Herz-Kreislauf-Erkrankung geht die Hypertonie in den meisten Fällen voraus. In 90-95% der Hypertoniefälle liegt eine primäre oder essentielle Hypertonie vor, bei der kein konkretes pathologisches Korrelat zu finden ist und die sich dadurch von der sekundären Hypertonie unterscheidet [3]. Zu den Ursachen der sekundären Hypertonie zählen Nierenerkrankungen (z.B. renoparenchymatöse Hypertonie, Nierenarterienstenose), Gefäßanomalien (z.B. Aortenisthmusstenose, Vaskulitiden, Kollagenosen), hormonelle Störungen (z.B. Hyperthyreose, Adrenogenitales Syndrom, Conn-Syndrom, Cushing-Syndrom, Phäochromozytom) sowie medikamenteninduzierte und neurogene Hypertonien (z.B. neurovaskuläre Kompression, Polyneuropathie, Meningitis) [4].

1.1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei chronischer Niereninsuffizienz

Die Hypertonie ist eng mit nephrologischen Erkrankungen vergesellschaftet. In 80% der Fälle eines hypertensiven Notfalls ist eine fortgeschrittene Niereninsuffizienz ursächlich beteiligt [5]. Umgekehrt begünstigen Bluthochdruck und Atherosklerose die Entstehung chronischer Nierenerkrankungen. 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 in der Gruppe dieser Patienten darstellt. Die auslösenden Faktoren sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen auf dem Gebiet der allgemeinen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, da davon auszugehen ist, dass auch nicht-niereninsuffiziente Personen zu einem gewissen Ausmaß einer urämischen Belastung ausgesetzt sind und, unter Berücksichtigung ihres eindeutigen pathogenetischen Potentials, die urämischen Faktoren allgemeine degenerative Risikofaktoren in der Entstehung der Atherosklerose und Koronarsklerose darstellen [6]. Darüberhinaus besteht die Möglichkeit, auf dem Umwege der Urämie bisher unbekannte Pathomechanismen in der Entstehung der Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu erschließen, die sich in der Allgemeinbevölkerung auch unabhängig von der Urämie vollziehen. Die jüngsten Daten aus dem Bereich der Urämieforschung belegen, dass Urämietoxine einen direkt schädigenden Einfluss auf Endothelzellen haben und dass dies vermutlich der Ausgangspunkt für den beschleunigten Verlauf der kardiovaskulären Erkrankungen innerhalb der Gruppe der niereninsuffizienten Patienten ist [7]. Weiterhin wurde den Urämietoxinen mehrfach ein stimulierender Effekt auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen nachgewiesen (siehe Kapitel 1.1.4).

In besonderem Maße ist die Gruppe der niereninsuffizienten Patienten der unweigerlichen Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) ausgesetzt [8]. Die Ursachen hierfür sind vielfältig. Einer der bedeutendsten Faktoren ist die Mikroalbuminurie, die bei vorgeschädigtem glomerulären Endothel zunehmend auftritt [9]. Dabei kommt es im Mesangium des Glomerulums durch die pathologische Proteinfiltration zu Proteinablagerungen und Glomerulosklerose. Im proximalen Tubulus, wo Albumin von den Tubuluszellen reabsorbiert und zu Fragmenten bis hin zu den einzelnen Aminosäuren gespalten wird, verursacht das Proteinüberangebot eine interstitielle Entzündungsreaktion. Durch beide Pathomechanismen erfolgt letztlich ein sklerotischer Umbau des gesamten

Nephrons. Die anfängliche Drucksteigerung in den Vasa afferentia führt zunächst zu einer Senkung der Reninsekretion, langfristig jedoch aufgrund der Minderperfusion und Hypoxie des Nierenparenchyms und des sklerotischen Umbaus der Vasa afferentia zu einer verstärkten Reninfreisetzung aus den Zellen des juxtaglomerulären Apparates. Durch den Anstieg des Angiotensin-II-Spiegels (Ang-II) im Plasma kommt es neben einem allgemeinen Blutdruckanstieg zur weiteren Progredienz der Nephropathie sowohl über den Umweg der endothelialen Dysfunktion (siehe Kapitel 1.1.3) als auch direkt über eine Stimulation der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (siehe Kapitel 1.1.4).

1.1.2 Endothelzellen

Neben ihrer Barrierefunktion spielen die Endothelzellen eine bedeutende Rolle bei der Steuerung entzündlicher Prozesse, des Gefäßtonus, der Angiogenese, der Hämostase sowie bei antimikrobiellen und metabolischen Prozessen. Unter physiologischen Bedingungen inhibieren Endothelzellen die Koagulation, indem sie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin freisetzen sowie mithilfe membranständiger Faktoren wie den Heparinoiden, Thrombomodulin oder Gewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA). Im aktivierten Zustand, wie bei Gewebsverletzungen, Hypoxie, mechanischer Stimulation oder unter Zytokinvermittlung begünstigen Endothelzellen jedoch die Thrombenbildung, indem sie den von-Willebrand-Faktor oder den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) an das Blutplasma abgeben. Neben ihren antikoagulativen Eigenschaften wirken Prostacyclin und NO vasodilatativ, weswegen NO nach seiner Entdeckung ursprünglich als EDRF (Endothelial Derived Relaxing Factor) bezeichnet worden war [10]. Beim NO handelt es sich um ein L-Arginin-Derivat, welches *per diffusionem* einen Anstieg des cGMP in glatten Gefäßmuskelzellen bewirkt und so zur Vasodilatation führt. Die endotheliale Freisetzung des NO erfolgt über eine Stimulation durch unterschiedliche Faktoren wie Thrombin, Bradykinin, Thromboxan A₂, Histamin, Adenin-Nukleotide, Acetylcholin, Substanz P, Thrombozytenaggregate sowie durch Scherkräfte, wobei zwei unterschiedliche Signalkaskaden bekannt sind. Zum einen erfolgt eine Kalzium- und Calmodulin-abhängige Aktivierung der endothelialen NO-Synthetase (eNOS) nach G-Protein-induziertem intrazellulären Kalziumeinstrom. Andererseits kann die eNOS durch eine Proteinkinasen-vermittelte Phosphorylierung aktiviert werden, was beispielsweise bei der Induktion durch Scherkräfte der Fall ist.

Endothelzellen synthetisieren vasodilatative Faktoren wie den EDHF (Endothelial Derived Hyperpolarisation Factor) sowie das CNP (C-type Natriuretic Peptide). Zu den synthetisierten

vasokonstriktiven Substanzen zählen das Endothelin-I, das Urotensin-II sowie einige Mono- und Dinukleotide [11] [12]. Die genannten vasodilatativen Substanzen zeichnen sich zudem dadurch aus, dass sie einer Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen entgegenwirken, die genannten vasokonstriktiven Substanzen hingegen eine Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen begünstigen. Durch weitere membranständige Faktoren aktivieren und deaktivieren Endothelzellen eine Reihe von Hormonen und Mediatoren. Dazu zählen Bradykinin, Serotonin, Noradrenalin und unterschiedliche Prostaglandine, die an der Membranoberfläche deaktiviert werden [13]. Aktivierend wirkt das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), das Ang-II aus Ang-I abspaltet. Im Bereich der Skelettmuskulatur und des Fettgewebes befindet sich die Lipoproteinlipase an der Oberfläche der Endothelzellen, die Fettsäuren aus ihren Transportvesikeln freisetzt, um sie nachfolgend in das Gewebe aufnehmen zu können. Auch ist die Barrierefunktion der Endothelzellen eine anspruchsvolle Aufgabe, die auf die unterschiedlichen Organe abgestimmt sein muss und sich beispielsweise bei Entzündungszuständen aktiv anpassen muss.

1.1.3 Endotheliale Dysfunktion

Verschiedene Funktionsstörungen des menschlichen Endothels konnten im Zusammenhang mit der Urämie nachgewiesen werden: Veränderungen der Gefäßpermeabilität, der Thrombogenität, der Angiogenese und der endothelabhängigen Vasodilatation [14]. Hinsichtlich der Komorbidität von chronischer Niereninsuffizienz und kardiovaskulären Erkrankungen sind die Interaktionen von Urämietoxinen, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen von großem Interesse. Die endotheliale Dysfunktion führt schrittweise zu irreversiblen Schäden des kardiovaskulären Systems. Ein entscheidender Faktor hierbei ist der zunehmende Funktionsverlust der NO-Synthetase und der damit verbundenen Abnahme der vasodilatativen NO-Freisetzung. Dadurch unterbleibt ebenso die Inhibierung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen [15]. Zudem führt die endotheliale Dysfunktion zu einer exzessiven Freisetzung parakriner Faktoren, die ihrerseits wiederum als Wachstumsfaktoren die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen anregen oder in Form von Chemokinen die Chemotaxis zirkulierender Entzündungszellen vermitteln. Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob es sich bei der endothelialen Dysfunktion um den auslösenden Mechanismus bei der Entstehung der Herz-Kreislauf-Erkrankungen handelt oder um deren Folge aufgrund struktureller vaskulärer Veränderungen. Bei terminal niereninsuffizienten Patienten wurde eine verminderte NO-Produktion für eine eingeschränkte endothelabhängige Vasodilatation

im Zusammenhang mit der Urämie verantwortlich gemacht [16]. Weiterhin besteht ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der endothelialen Dysfunktion und dem Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen und damit der Lebenserwartung von niereninsuffizienten Patienten [17].

Die Bedeutung der Endothelzellen für die Steuerung der Vasoaktivität wird am Beispiel des Acetylcholins verdeutlicht. Acetylcholin bewirkt über endotheliale Muskarinrezeptoren eine Vasodilatation, in Abwesenheit von Endothelzellen hingegen eine Vasokonstriktion über Muskarinrezeptoren an glatten Gefäßmuskelzellen [18]. Dieses Phänomen wurde ebenso im Falle des Bradykinins, des Thrombins, des Serotonins und des ATP's beobachtet [18].

Neben den direkten vasokonstriktorisches Eigenschaften wird dem Ang-II eine Rolle bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion zugeschrieben. Hierfür gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Eines der Erklärungsmodelle beruht auf einer Aktivierung der Nicotinamadenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase), die zur Reduktion des NADPH ein Elektron aufnimmt und dieses auf ein Sauerstoffmolekül überträgt, wodurch ein Superoxid-Anion entsteht, ein reaktives freies Radikal [19]. Dieses Radikal bewirkt neben seiner direkten toxischen Wirkung auf Endothelzellen eine Monozyten-Bindung an deren Oberfläche und eine Migration der Monozyten in die Gefäßwand, wo sie in Form von Schaumzellen akkumulieren und die Basis für atherosklerotische Plaques bilden [20]. Zuvor erfolgt eine gesteigerte rezeptorvermittelte Aufnahme von oxidiertem und glykosyliertem „*Low Density Lipoprotein*“ (LDL) [21]. Durch Oxidation und Glykosylierung wird das LDL dem regulären Metabolismus entzogen. Beide Modifikationen unterliegen gleichermaßen einer Urämie- wie auch Ang-II-bedingten Beeinflussung. Auch werden Monozytenbindung und -migration sowie die LDL-Aufnahme vom Ang-II stimuliert [22].

Bereits vor über 10 Jahren konnte gezeigt werden, dass die Endothel-vermittelte Vasorelaxation nach Ang-II-vermittelter Aktivierung der NADPH-Oxidase abgeschwächt ist [23]. Die Hypothese, dass Ang-II die endotheliale Dysfunktion durch erhöhten oxidativen Stress verursacht, wurde im Tierversuch durch den Nachweis der Abschwächung eines Ang-II-provozierten Blutdruckanstiegs mithilfe von Antioxidantien untermauert [24]. Ein alternatives Erklärungsmodell der Ang-II-induzierten endothelialen Dysfunktion geht von einer Aktivierung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) aus, zum einen ausgelöst durch DNA-Schädigung aufgrund gesteigerter Belastung durch reaktive Sauerstoffverbindungen, zum anderen direkt über eine AT₁-Rezeptor-Aktivierung. Die PARP gehört zur Gruppe der

zellschützenden DNA-Reparaturenzyme, deren Aktivität jedoch gleichzeitig eine Abnahme des intrazellulären Bestands an NAD^+ und ATP bedingt. Der verstärkte Umsatz dieser Faktoren wiederum führt zur Apoptose, die sinnvollste Konsequenz bei stark DNA-geschädigten Zellen. Die Ang-II-induzierte PARP-Aktivierung signalisiert der Zelle also fälschlicherweise das Vorliegen eines ausgeprägten DNA-Schadens [25] [26]. Die erwähnten Hypothesen der Ang-II-induzierten endothelialen Dysfunktion werden von zahlreichen Studien unterstrichen, in denen der präventive Charakter der AT_1 -Rezeptorenblocker und der ACE-Hemmer gegenüber der endothelialen Dysfunktion in tierexperimentellen Versuchen [27] [28] [29] oder in klinischen Studien [30] [31] nachgewiesen wird.

Ein weiteres Urämietoxin, anhand dessen der Zusammenhang zwischen der Urämie und der Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion sowie der Stimulation der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und damit dem Fortschreiten der kardiovaskulären Erkrankungen offenbar wird, ist das Indoxylsulfat. Auffällig dabei sind Parallelen zum Ang-II. So bewirken beide Substanzen die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wie auch die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), die zur Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen führt [32]. Auch erhöhen beide Substanzen die Aktivität der NADPH-Oxidase, die ebenfalls den oxidativen Stress erhöht und die endotheliale Dysfunktion dadurch weiter beschleunigt. Zudem senkt das Indoxylsulfat die systemische Glutathion-Synthese und beeinflusst so das Gleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Mechanismen ungünstig [33].

1.1.4 Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen

Eine wesentliche Gemeinsamkeit in der physiologischen beziehungsweise pathophysiologischen Wirkung des Ang-II und einiger Urämietoxine ist die Induktion der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen [34]. Bei den glatten Gefäßmuskelzellen handelt es sich um die vorwiegende Zellart der Media. Ihre physiologische Bedeutung liegt in der Gewährleistung von Dilatation und Konstriktion des Gefäßes. Sie sind zirkulär angeordnet und umgeben von elastischen und kollagenen Fasern, eingebettet in eine Proteoglykanmatrix. Im Gegensatz zur Herzmuskelzelle und der quergestreiften Muskelzelle verfügen die glatten Gefäßmuskelzellen über die Möglichkeit der Zellteilung. Sie werden innerviert durch sympathische und parasympathische Nervenfasern. Zur Bereitstellung von Sauerstoff und Nährstoffen dienen die Vasa vasorum, die sich hauptsächlich in der Adventitia, der äußeren Schicht der Gefäßwand befinden und bis in die äußere Schicht der Media vordringen. An dieser Stelle vollzieht sich die Angiogenese im Rahmen unterschiedlicher physiologischer

und pathologischer Prozesse wie beispielsweise beim physiologischen Wachstum, bei der Tumorgenese, der Endometriumproliferation, der Wundheilung, der Kollateralisierung, der Mediaverdickung und der Plaque-Vaskularisierung. Ferner sind an der Kapillarsprossung weitere Schritte beteiligt wie die proteolytische Spaltung der extrazellulären Matrix, die Migration und Proliferation von Endothelzellen beziehungsweise die Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. Eine Reihe unterschiedlicher Hormone und Wachstumsfaktoren ist bekannt, die die Migration der glatten Gefäßmuskelzellen von der Media in die Intima und hier deren Proliferation bewirken, die ihrerseits wiederum zur Sekretion von Strukturproteinen der extrazellulären Matrix und damit zur Ausbildung einer Neointima führen. Damit ist die Ausgangsbasis in der Entstehung der Atherosklerose gegeben. Bei diesen Hormonen und Wachstumsfaktoren handelt es sich um den „*Epidermal Growth Factor*“ (EGF), den „*Platelet Derived Growth Factor*“ (PDGF), den „*Basic Fibroblast Growth Factor*“ (bFGF) und den „*Insulin Like Growth Factor*“ (IGF-1) [35]. Weiterhin wurde eine proliferative Wirkung dem Ang-II, dem Endothelin-1, dem 5-Hydroxytryptamin (5-HT), dem Noradrenalin, dem Neuropeptid Y und dem Acetylcholin zugeschrieben [36]. Auch die Urämietoxine rücken zunehmend in den Fokus der Aufmerksamkeit im Zusammenhang mit der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Im Besonderen handelt es sich hierbei um das Homozystein, die Dinukleotid-Polyphosphate, das β_2 -Mikroglobulin, das Interleukin-18, die „*Advanced Glycosylation Endproducts*“ (AGE) und das C-Peptid [37].

1.1.5 Hypertensive Herzkrankheit

Neben der Zunahme des Risikos für thromboembolische Komplikationen und degenerative Endorganschäden wird bei einer Zunahme der Rigidität der Widerstandsgefäße und einem dauerhaft gesteigerten peripheren Widerstand allmählich auch die Funktionstüchtigkeit des Herzens in Mitleidenschaft gezogen. Da das Herz dauerhaft gegen einen erhöhten Gefäßdruck arbeiten muss, stellt sich nach einer gewissen Zeit eine hypertensive Herzkrankheit ein. Analog der Pathomechanismen beim sklerotischen Gefäßumbau wird die chronische Druckbelastung des Herzens gefolgt von einer pathologischen Kaskade irreversibler Folgeerscheinungen. Durch Aktivierung von Wachstumshormonen erfolgt eine veränderte Synthese von Matrixproteinen, insbesondere eine verstärkte Kollagensynthese durch interstitielle Fibroblasten, wodurch die diastolische Compliance gestört wird und dadurch die Voraussetzungen für die Entstehung einer diastolischen Linksherzinsuffizienz geschaffen

werden. Ebenso wird die Gefahr von Infarzierungen, Vorhofflimmern und weiteren Rhythmusstörungen bis hin zum plötzlichen Herztod gefördert. Unabhängig von diesen strukturellen Umbaumechanismen besitzt auch das Ang-II eine wachstumsfördernde Wirkung auf das Myokard [38]. Zum einen besteht ein Proteinkinase-Akt-, sowie PDGF-A- und „*Transforming-Growth-Factor-beta*“-vermittelter (TGF-beta) stimulativer Effekt auf die Proliferation kardialer Fibroblasten. Zum anderen führt eine AT₁-Rezeptoraktivierung an Kardiofibroblasten zu einer Matrix-Metalloproteinase-abhängigen Aktivierung des EGF-Rezeptors (*Endothelial Growth Factor*) mit nachfolgender Aktivierung von ERK's (extrazelluläre signalregulierte Kinasen) und MAPK's, die eine direkte Hypertrophie der Kardiomyozyten bewirken [39] [40].

1.2 Das Renin-Angiotensin-System (RAS)

Die Gruppe der Bluthochdruck-Patienten wird in Hoch-Renin-, Normal-Renin- und Niedrig-Renin-Hypertoniker in Abhängigkeit der Plasma-Renin-Aktivität subklassifiziert, wobei Hoch-Renin-Hypertoniker therapeutisch gut auf Betablocker, ACE-Hemmer und AT₁-Antagonisten ansprechen, Niedrig-Renin-Hypertoniker hingegen auf Diuretika und Kalziumantagonisten. Neben Adiuretin, natriuretischem Peptid und dem Kallikrein-Kinin-System gehört das Renin-Angiotensin-System (RAS) zu den wirksamsten der bisher bekannten Mechanismen der Volumenregulation. Der Gegenstand der Forschung geht inzwischen weit über die bekannten Eigenschaften der Vasokonstriktion und der Aldosteron vermittelten Natrium- und Wasserretention hinaus. Die primären Aufgaben des RAS sind jedoch die Regulation des Gefäßtonus, im Besonderen der Nierenperfusion und des glomerulären Perfusionsdrucks, sowie die Steuerung des systemischen Wasserhaushalts. Hierzu erfolgt die Renin-Freisetzung aus Zellen des juxtaglomerulären Apparates, der sich am Gefäßpol des Glomerulums befindet. Neben einem proteolytischem Grundumsatz von Renin aus Prorenin im Plasma existiert hier ein bedeutender Speicher von aktivem Renin. Die Freisetzung erfolgt aufgrund einer Minderdurchblutung des Glomerulums gleichgültig welcher Ursache. Als Protease wandelt Renin das inaktive Angiotensinogen aus der Leber in Ang-I um. Das ACE, das hauptsächlich an der Oberfläche von Endothelzellen der Lungen- und Nierengefäße als membranständiger Faktor vorkommt, aktiviert das Ang-I zu dem stark vasokonstriktiven Ang-II, indem es zwei C-terminale Aminosäuren abspaltet. Ang-II

stimuliert die Freisetzung von ADH (Antidiuretisches Hormon) und Aldosteron, wobei das ADH sogenannte Aquaporine in den Sammelrohren des Nephrons öffnet, wodurch verstärkt Wasser aus dem Primärharn rückresorbiert wird. Das Aldosteron bewirkt im distalen Tubulus und dem Sammelrohr eine gesteigerte Natriumrückresorption und dadurch eine gesteigerte Wasserretention. Kalium wird hingegen vermehrt ausgeschieden. Weiterhin wirkt ADH vasokonstriktiv, wodurch zusammen mit dem Ang-II bei Volumenmangel der arterielle Blutdruck aufrecht erhalten und schockähnlichen Zuständen entgegengesteuert werden soll. In den Industriestaaten spielt dieser Mechanismus eine zunehmend untergeordnete Rolle. Vielmehr überwiegt die Pathophysiologie des RAS im Zusammenhang mit Nierenerkrankungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Ang-II wird über die Aminopeptidase A in Ang-III abgebaut, welches über die Aminopeptidase B in Ang-IV umgewandelt wird. Endopeptidasen und Carboxypeptidasen bauen das Ang-IV in weitere, biologisch inaktive Fragmente ab. Alternativ können aus dem Ang-II die biologisch aktiven Peptide Ang-(1-7) sowie Ang-A gebildet werden. Die Synthese des Ang-(1-7) wird vom ACE-2 katalysiert, die Synthese des Ang-A von der Aspartat-Decarboxylase [41] [42].

1.2.1 Angiotensin II

Hinsichtlich seiner bereits erwähnten Beteiligung an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion und der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen mit den progredienten Herz-, Kreislauf-, Nieren- und Stoffwechselerkrankungen in der Folge wird dem Ang-II nach wie vor eine verstärkte Aufmerksamkeit gewidmet. Ang-II besitzt prothrombotische Eigenschaften indem es die Thrombozytenaggregation und -adhesion und die PAI-I- und PAI-II-Synthese in Endothelzellen stimuliert [43]. Weiterhin wird eine Beteiligung des Ang-II bei der Progredienz des Diabetes mellitus Typ 2 diskutiert [44] sowie bei der Generierung freier Sauerstoffradikale. Eines der Zielmoleküle der freien Sauerstoffradikale ist das LDL, das im oxidierten Zustand besonders unter dem Einfluss von Ang-II in Makrophagen angereichert wird [45]. Dadurch bilden sich Schaumzellen, die in der Intima akkumulieren und auf diesem Wege der Bildung atherosklerotischer Plaques Vorschub leisten. Außerdem verstärkt Ang-II die Monozytenbindung und -migration vom Gefäßlumen in die Intima [22]. Folglich trägt es zur Genese der kardiovaskulären Erkrankungen auf vielfältige Weise bei. Weitere Effekte des Ang-II können der **Tabelle 2** summarisch entnommen werden.

1.2.2 Angiotensin III

Beim Ang-III handelt es sich nach dem gegenwärtigen Wissensstand um eine in seiner Wirkung abgeschwächte Variante des Ang-II. Neben der Vasokonstriktion, der Vasopressinsekretion und der Wasserretention [46] geht es dabei um die chemotaktischen und proinflammatorischen Eigenschaften des Ang-II, die durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB vermittelt werden [47] [48] [49]. Auch hinsichtlich einiger Mechanismen der Signalübertragung gibt es Gemeinsamkeiten mit dem Ang-II. Hierzu zählen der intrazelluläre Kalziumanstieg, die Induktion der c-fos-Genexpression sowie die Aktivierung einiger Transkriptionsfaktoren [50]. In Mesangiumzellen wurde eine Hochregulation wachstumsinduzierender, profibrotischer und proinflammatorischer Gene beobachtet [51]. Ob die Effekte über einen eigenständigen AT₃-Rezeptor oder die bekannten AT₁- und AT₂-Rezeptoren vermittelt werden, ist gegenwärtig nicht eindeutig geklärt.

1.2.3 Angiotensin IV

Das biologisch aktive Ang-IV bindet mit hoher Affinität an den AT₄-Rezeptor, dessen Exprimierung sich besonders im Gehirn [52] sowie in koronaren und aortalen Endothelzellen [53] nachweisen ließ und dementsprechend neurophysiologische beziehungsweise vasoregulatorische Eigenschaften aufzeigt. Sie beziehen sich auf eine verbesserte Kognition und Gedächtnisleistung auf dem Boden einer Dilatation zerebraler Arteriolen und gesteigerter neuronaler Glukoseaufnahme [54] [55] [56]. Außerdem wurde ein proliferativer Effekt des Ang-IV bei Epithelzellen der Prostata beschrieben, bei Kardiofibroblasten, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen [57] [58] [59] [60]. Beim AT₄-Rezeptor handelt es sich um das Enzym „*Insulin Regulated Aminopeptidase*“ (IRAP), welches durch das Ang-IV gehemmt wird [61] [62]. Neben der Vasodilatation zählen zu den dabei beobachteten Phänomenen die Modulation der Synthese von extrazellulären Matrixmolekülen sowie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB, die zur gesteigerten Expression des PAI-1, des „*Monocyte Chemoattractant Protein*“ (MCP-1), des Interleukin-6 und des Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) führt [63] und an der Steuerung entzündlicher Prozesse beteiligt ist. Entgegen der überwiegenden Berichte über vasodilatative Wirkungen konnte bei transgenen Mäusen, die speziell im Hirngewebe erhöhte Mengen an Ang-IV produzierten, ein Blutdruckanstieg beobachtet werden [64], der durch einen AT₁-Antagonisten gesenkt werden konnte, nicht jedoch durch einen ACE-Hemmer. Weiterhin konnten AT₄-Rezeptoren neben

verschiedenen Bereichen des Gehirns in der Niere, der Harnblase, dem Herzen, der Milz, der Prostata, der Nebenniere und im Dickdarm nachgewiesen werden [65].

1.2.4 Angiotensin 1-7

Ein halbes Jahrhundert nach Entdeckung des ACE wurde ein weiteres Angiotensin-Converting-Enzym entdeckt, das ACE-2. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass das Ang-(1-7) mithilfe der Carboxypeptidase ACE-2 aus Ang-II gebildet wird [41]. Das ACE-2 ist ebenso in der Lage, aus dem Ang-I das Ang-(1-9) abzuspalten [66], welches weiterhin durch das ACE zu Ang-(1-7) metabolisiert wird [67]. Unterschiedliche Auswirkungen wurden für das Ang-(1-7) beschrieben. So wird über eine Ang-(1-7) vermittelte Stimulation des zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) und eine Koronardilatation berichtet [68]. Des Weiteren aktiviert Ang-(1-7) über den Mas-Rezeptor die eNOS und führt über eine NO-Freisetzung zur protektiven Vasodilatation [69]. Neben den vasodilatativen Eigenschaften wirkt das Ang-(1-7) antiproliferativ, antifibrotisch sowie antithrombotisch [70] und wirkt insgesamt den ungünstigen Effekten des Ang-II entgegen. Das Ang-(1-7) ist zudem Substrat des ACE und wird von diesem abgebaut [71].

1.2.5 Angiotensin A

Im Jahre 2006 konnte ein weiteres biologisch aktives Peptid aus der Gruppe der Angiotensine aus menschlichem Plasma isoliert werden. Das Ang-A, bei dem die n-terminale Aminosäure des Ang-II, die Asparaginsäure, durch das Alanin ausgetauscht ist, entfaltet eine vasokonstriktorische Wirkung über den AT₁- und AT₂-Rezeptor. Seine vasokonstriktorische Potenz ist niedriger als die des Ang-II entsprechend einer schwächeren Affinität zum AT₁-Rezeptor und einer stärkeren zum AT₂-Rezeptor. Das Ang-A wird von der Aspartat-Decarboxylase aus dem Ang-II synthetisiert. Nach dieser Modifizierung steht das Molekül der Aminopeptidase A zur Ang-III-Synthese nicht mehr zur Verfügung, wodurch vermutlich der Ang-II/Ang-III-Synergismus abgeschwächt wird [42].

Tabelle 1: Aminosäuresequenzen der Angiotensin-Peptide

Ang-I	Asp – Arg – Val – Tyr – Ile – His – Pro – Phe – His – Leu
Ang-II	Asp – Arg – Val – Tyr – Ile – His – Pro – Phe
Ang-III	Arg – Val – Tyr – Ile – His – Pro – Phe
Ang-IV	Val – Tyr – Ile – His – Pro – Phe
Ang-(1-7)	Asp – Arg – Val – Tyr – Ile – His – Pro
Ang-A	Ala – Arg – Val – Tyr – Ile – His – Pro – Phe
Angioprotektin	Pro – Glu – Val – Tyr – Ile – His – Pro – Phe

1.2.6 AT-Rezeptoren

Die Signalübertragung des AT₁-Rezeptors vollzieht sich über G-Proteine, die zum einen die Phospholipase C aktivieren mit nachfolgendem intrazellulären Kalziumanstieg, der seinerseits die Proteinkinase C aktiviert. Weiterhin werden über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor die Adenylatzyklase inhibiert und Tyrosinkinase aktiviert. Mit Entdeckung des AT₂-Rezeptors, der durch denselben Liganden wie der AT₁-Rezeptor aktiviert wird, in seiner Auswirkung jedoch den klassischen AT₁-vermittelten Effekten des Ang-II vielfach entgegenwirkt [72], wurde zunehmend deutlich, dass es sich bei dem RAS um ein sehr komplexes System handelt, dessen Effekte weit über Vasokonstriktion und Blutdruckanstieg hinausgehen. Auch bei diesem Rezeptor handelt es sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der weitere Systeme aktiviert wie beispielsweise das NO-cGMP-System, die Tyrosinphosphatase sowie die Phospholipase A₂, die Arachidonsäure aus membranösen Phospholipiden freisetzt [73] [74]. Über den AT₃-Rezeptor ist bislang wenig bekannt. Zu den beteiligten Signalwegen zählen der intrazelluläre Kalziumanstieg, die Induktion der c-fos-Genexpression sowie die Aktivierung einiger Transkriptionsfaktoren [50]. Bei dem AT₄-Rezeptor handelt es sich um das Enzym „*Insulin Regulated Aminopeptidase*“ (IRAP), eine Aminopeptidase, die durch das Ang-IV gehemmt wird [61] [62]. Der Mas-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der neben den bereits beschriebenen Effekten auch modulierend auf den AT₁-Rezeptor einwirkt. Beide Rezeptoren können miteinander Heterooligomere bilden, wodurch die

Affinität von Ang-II zum AT₁-Rezeptor erhöht wird, dessen Signaltransduktion dabei jedoch verringert wird [75].

Tabelle 2: Funktion der Ang-II-Rezeptoren AT₁ und AT₂ (Burnier M, Brunner HR. Die Ang-II-Antagonisten in der heutigen Praxis. Cardiovasc. 2002; No. 2)

AT ₁ -Rezeptor	AT ₂ -Rezeptor
<ul style="list-style-type: none">• Vasokonstriktion• Aldosteronsynthese und -sekretion• Tubuläre Natriumresorption• Steigerung der Vasopressinsekretion• Verminderung der renalen Durchblutung• Renale Renin-Inhibition• Kardiale Hypertrophie• Steigerung der kardialen Kontraktilität• Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen• Verstärkung der peripheren Noradrenalinaktivität• Zentrale Sympathikusaktivierung• Synthese extrazellulärer Matrixproteine	<ul style="list-style-type: none">• Fetale Gewebsdifferenzierung• Inhibition von Zellwachstum• Vasodilatation• Modulation extrazellulärer Matrix• Neuronale Regeneration• Zelldifferenzierung• Apoptose• Prostaglandinsynthese

2 Zielsetzung der Arbeit

Wie im Parabioseversuch von Dahl et al. demonstriert werden konnte, spielen humorale Faktoren bei der Blutdruckregulation eine entscheidende Rolle [76]. Dahl wies durch Kreuztransfusion hypertoner und normotoner Ratten nach, dass der Blutdruck der normotonen Ratten durch die Kreuztransfusion anstieg, der Blutdruck der hypertonen Ratten hingegen abfiel. Eine genaue Kenntnis der beteiligten humoralen Faktoren ist notwendig, um das Verständnis über die molekularen Mechanismen der Blutdruckregulation wie auch der Pathogenese der essentiellen Hypertonie weiter zu vervollständigen.

Das RAS repräsentiert einen bedeutenden Bestandteil der humoralen Blutdruckregulatoren. Erst kürzlich konnte mit dem Ang-A eine weitere Variante aus der Gruppe der Angiotensin-Peptide im menschlichen Plasma nachgewiesen werden, welches eine geringere Affinität zum AT₁-Rezeptor als Ang-II aufzeigte, jedoch eine stärkere zum AT₂-Rezeptor [42]. Im Laufe dieser Studie zeigte sich bei massenspektrometrischen Untersuchungen ein weiteres Massensignal bei 1001,5 Dalton. Dabei konnten strukturelle Analogien zum Ang-II gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte dieses Peptid, das Angioprotektin, aus dem menschlichen Plasma isoliert und vollständig identifiziert und charakterisiert werden, um dadurch zum Verständnis der komplexen Interaktionen des RAS innerhalb der Pathogenese der essentiellen Hypertonie beizutragen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Analysewaage, AS120, *Ohaus, USA*

Blockthermostat, Thermostat 5320, *Eppendorf, Deutschland*

HPLC-Pumpe, BioLogic DuoFlow, *Biorad, USA*

Kraftaufnehmer, Fort25, *World Precision Instruments, USA*

Laser-Scanning-Mikroskop, LSM 510 META, *Zeiss, USA*

Leitfähigkeitsmessgerät, LF 39, *WTW, Deutschland*

MALDI-Probenenträger, MTP AnchorChip 400/384, *Bruker Daltonics, Deutschland*

Massenspektrometer, Bruker Ultraflex TOF/TOF, *Bruker Daltonics, Deutschland*

Nierenperfusionssystem, *Hugo Sachs Elektronik (HSE) – Havard Apparatus, Deutschland*

- Bad-/Umwälzthermostat, E 103, *Lauda, Deutschland*
- Schlauchpumpe, REGLO Digital ISM 834/230 V, *Ismatec, Deutschland*
- Beheizte Feuchtkammer, Typ 834/8 mit Luftblasenfalle, *HSE, Deutschland*
- Druckabnehmer, ATP 300, *HSE, Deutschland*
- Brückenverstärker, TAM-D Typ 705/2, *HSE, Deutschland*
- Registrierungseinheit, HSE-USB Data Acquisition Hardware, *HSE, Deutschland*

pH-Meter, inoLab pH720, *WTW, Deutschland*

Photometer, Multiskan Ascent, *Thermo Electron, Deutschland*

Präzisionswaage, Delta Range PC 440, *Mettler-Toledo, Deutschland*

Präparierbesteck, Rat Surgical Kit, *Havard Apparatus, USA*

Reinstwasseranalge, Seralpur DELTA UF, *ELGA LabWater, Deutschland*

RPC-Säule, Chromolith Performance, RP-18e 100-4.6, *Merck, Deutschland*

RPC-Säule, PolyEncap-A300, 10 µm, 250-20, *Bischoff Analysetechnik, Deutschland*

SEC-Säule, Sephacryl S-100 High Resolution 1000 x 16 mm, *Pharmacia BioTech, Schweden*

UV-Detektor, Econo UV-Monitor, *Biorad, USA*

Umwandler für Kraftaufnehmer, AD16JR, *World Precision Instruments, USA*

Vakuumentrifuge, SVC 100 H, *Savant, USA*

Verstärker für Kraftaufnehmer, TBM-4, *World Precision Instruments, USA*

Zentrifuge, 3-E, *Sigma-Aldrich, USA*

Zentrifuge, 3200, *Eppendorf, Deutschland*

3.1.2 Puffer und Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen, sofern nicht anders angegeben.

Acetylcholin (Sigma), ACTH-Fragment 18-39 (Sigma), Angiotensin II (Sigma), „Angiotensin II Enzyme Immunoassay Kit“ (Spi-Bio, Frankreich), Azetonitril (Merck), CaCl₂ (Merck), Carbogen (Charité, Deutschland), fetalbovines Serum (Gibco Invitrogen, USA), Glucose (Merck), Heparin-Natrium 5.000 U/ml (Biochrom, Deutschland), KCl (Roth), KOH (Merck), Krebs-Henseleit-Lösung (137 mmol/l NaCl, 1,1 mmol/l MgCl₃, 12 mmol/l NaHCO₃, 2,7 mmol/l KCl, 5,6 mmol/l Glucose, 0,4 mmol/l NaH₂PO₄, 2,4 mmol/l CaCl₂), L-Glutamin (Sigma), MCDB 131-Medium (Gibco Invitrogen, USA), MgCl₂ (Merck), NaCl (Sigma), NaHCO₃ (Sigma) NaH₂PO₄ (Sigma), PBS-Puffer (Sigma), Penicillin (Ratiopharm, Deutschland), Perchlorsäure (Sigma), Phenylephrin (Sigma), Saralasin (Sigma), Streptomycin (Ratiopharm, Deutschland), synthetisches Angioprotektin (WITA, Deutschland), Trifluoressigsäure (Sigma), Urethan (Sigma), α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (Sigma).

3.1.3 Versuchstiere

Zur Organentnahme wurden männliche, normotensive, vier bis sechs Monate alte Wistar-Kyoto Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 300 bis 500 Gramm verwendet. Die Tierversuchsgenehmigungsnummer des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin lautet: O 0075/08 (Datum der behördlichen Genehmigung: 26.01.2006).

3.2 Methoden – Allgemeiner Teil

3.2.1 Chromatographische Methoden

Bei der Chromatographie handelt es sich um eine Methode zur Auftrennung eines Substanzgemischs. Allen chromatographischen Methoden ist die Verwendung einer stationären und einer mobilen Phase gemeinsam. Die stationäre Phase kann fest oder flüssig sein, die mobile Phase flüssig oder gasförmig. Das Substanzgemisch wird durch unterschiedliche Wechselwirkungen aus der mobilen Phase an die stationäre gebunden und nachfolgend auf unterschiedlichen Wegen wieder sukzessive an die mobile Phase abgegeben, womit die Substanzen im Prinzip getrennt wären.

Bei der *Größenausschluss-Chromatographie* werden die Substanzen eines Substanzgemischs aufgrund ihrer Größe voneinander getrennt. Dazu werden sie durch eine Säule mit einem porösen Trägermaterial (Polymer oder Silikat) geleitet. Kleine Moleküle diffundieren in die Poren des Gels und müssen dadurch auf dem Weg durch die Säule eine längere Wegstrecke zurücklegen. Große Moleküle können aufgrund ihrer Größe nicht in die Poren diffundieren und eluieren dadurch vor den kleineren. Neben diesem Trennmechanismus beeinflussen noch andere Faktoren die Elution der Moleküle. Dabei handelt es sich im Wesentlichen um hydrophobe Wechselwirkungen, Ionenaustausch, Ionenausschluss und p - π -Wechselwirkungen. Ionenausschlussmechanismen sind beteiligt durch die negativ geladene Oberfläche des Gels. Positiv geladene Probenmoleküle werden durch Ionenaustauschkraft verstärkt an die Oberfläche des Gels gebunden, wodurch eine verlängerte Passage durch die Säule und somit eine verlängerte Retentionszeit entsteht. Negativ geladene Probenmoleküle werden hingegen von der Oberfläche des Gels abgestoßen, dringen dadurch nicht in die Poren ein und eluieren früher. Diesen beiden Mechanismen wird durch Zugabe von 0,3-0,5 M Puffer entgegengewirkt. Die Änderung des pH-Werts in der mobilen Phase neutralisiert die Ladungen der Probenmoleküle und der Säule und verhindert dadurch den Ionenausschluss und -austausch [77].

Die *Reversed-Phase-Chromatographie* basiert auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Substanzgemisch und dem Trägermaterial der Chromatographie-Säule. Die stationäre Phase besteht aus Kieselgelen, die mit Kohlenwasserstoff-Resten unterschiedlicher Länge besetzt sind. Die Moleküle adsorbieren in Abhängigkeit ihrer Polarität an die unterschiedlich langen Seitenketten der stationären Phase. Zuvor müssen die Substanzen mit einem

Äquilibrierungspuffer versetzt werden. Dieser bindet zwischen Ladungen der zu trennenden Substanzen und dem Trägermaterial der Säule. Kleine geladene Moleküle binden nicht an das Trägermaterial. Insofern wird das Substanzgemisch bei dieser Chromatographie gleichzeitig entsalzt und ist dadurch eine wichtige Voraussetzung sowohl für die nachfolgenden massenspektrometrischen Untersuchungen als auch für den Nierenperfusionstest. Die retendierten Substanzen werden dann nach Hydrophobizität und Größe gelöst. Durch eine Gradienteneluierung eluieren mit der polaren mobilen Phase hydrophile Substanzen, die Elution hydrophoberer Substanzen erfolgt mit einer zweiten apolaren mobilen Phase [78]

3.2.2 MALDI - Massenspektrometrie

Bei der Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation (MALDI) handelt es sich um eine Ionisationsmethode, die einem Massenspektrometer vorgeschaltet ist. Dabei werden die zu analysierenden Proben zusammen mit einer speziellen Matrix auf die Spots eines MALDI-Probenträgers pipettiert. Als Matrix dienen Lösungen niedermolekularer organischer Substanzen in Abhängigkeit der verwendeten Laserwellenlänge und des verwendeten Analyten. Im Falle von Oligopeptiden eignet sich im Besonderen die α -Cyano-Zimtsäure. Als Energiequelle dienen Impulse eines Stickstofflasers der Wellenlänge von 337 nm. Die Matrix hat die Aufgabe, möglichst viel der Laserenergie zu absorbieren und auf den Analyten, der zuvor mit der Matrix auf dem Probensteller kokristallisiert wurde, zu übertragen. Die Analytionen werden zusammen mit den Matrixionen in einfach-positivgeladenem Zustand im Vakuum des Massenspektrometers durch ein Spannungsfeld beschleunigt. Auf diese Weise wird den Molekülen, nachdem das Gerät zuvor mit einer bekannten Referenzsubstanz kalibriert wurde, anhand ihrer benötigten Flugzeit bis zum Aufprall auf einen Detektor ein Massengewicht zugeordnet. Entsprechend wird die Methode der Messung als „*Time-Of-Flight*“-Massenspektrometrie (TOF-MS) bezeichnet. Zur weiteren Identifizierung können die Substanzen durch erneuten Laserbeschuss sequenziert werden, wobei die Massenbestimmung der Fragmente erneut durch die TOF-Methode erfolgt. Die MALDI als Ionisationsquelle zeichnet sich aus durch eine hohe Empfindlichkeit und gute Anwendbarkeit auf große und komplexe Moleküle und Biopolymere.

3.2.3 Bioassay der isolierten perfundierten Rattenniere

Die Experimente bedienen sich des bereits 1973 von Hofbauer et al. beschriebenen Modells der isoliert perfundierten Rattenniere [79]. Bei einer anästhesierten Ratte wird eine der beiden

Nieren *in situ* dargestellt und aus der Kapsel freipräpariert. Anschließend wird die Aorta punktiert, die Nierenarterie sondiert und mit einem Venenverweilkatheter konnektiert. Die ordnungsgemäße Konnektion wird durch ein gleichmäßiges Ablassen der Niere nach Injektion einer Krebs-Henseleit-Lösung, die später auch als Perfusionslösung dient, gesichert. Zur Antikoagulation wird dem Bolus Heparin beigemischt. Die Niere kann nun entnommen werden und nach Anschluss an das Perfusionssystem in der beheizten Feuchtkammer gelagert werden. Dabei wird sie mit einer peristaltischen Pumpe und der erwärmten physiologischen Perfusionslösung mit konstantem Flussvolumen perfundiert. Die Perfusionslösung wird mit Carbogen, einem Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid, unter regelmäßiger Kontrolle des pH-Werts gesättigt. Der Perfusionsdruck wird kontinuierlich mit einer Druckaufnehmer-Einheit kurz vor Eintritt in den Nierenhilus detektiert und aufgezeichnet. Der mittlere Druck sollte sich bei etwa 80 mmHg bewegen. Die Vitalität des Gewebes wird nun mit vasokonstriktischen Testsubstanzen, die über eine unterschiedliche Signalübermittlung wirken, überprüft. Nachfolgend können die betreffenden Proben getestet werden. Die Niere kann in der Regel bis zu 8 Stunden nach Explantation verwendet werden. Es empfiehlt sich eine regelmäßige Vitalitätskontrolle mit den vasokonstriktischen Testsubstanzen.

3.3 Methoden – Spezieller Teil

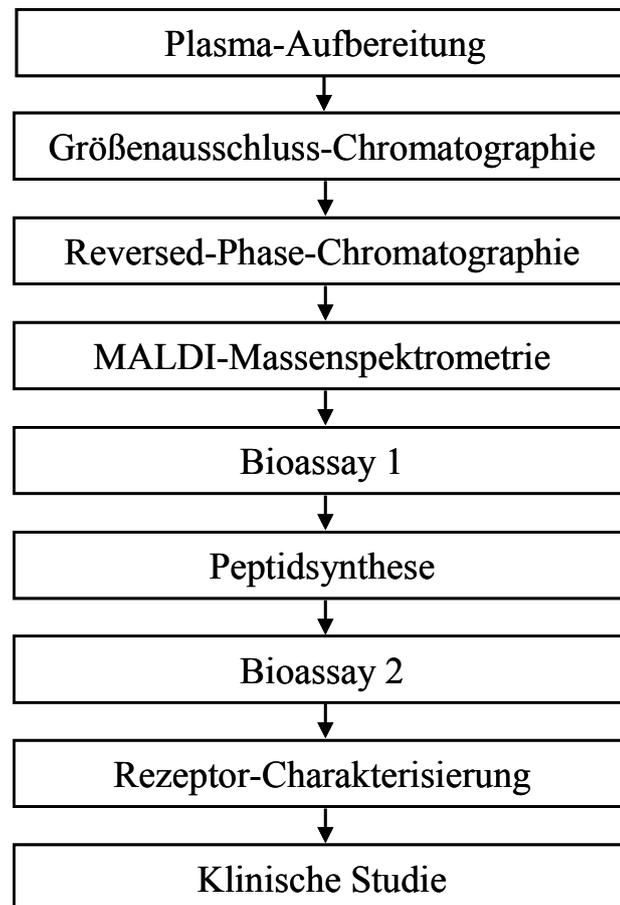


Abbildung 1: Übersicht über die Arbeitsschritte zur Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung des Angiotensins aus dem menschlichen Plasma.

3.3.1 Plasma-Aufbereitung

Von 10 gesunden Spendern wurden jeweils 50 ml peripher-venöses Blut über einen peripheren Venenkatheter in 5 konventionelle Blutentnahme-Röhrchen mit jeweils 18 mg K₂-EDTA abgenommen. Zur Isolation des Plasmas wurden die Blutproben mit 300 g bei 20°C für 30 Minuten zentrifugiert. Die korpuskulären Bestandteile der Spenderproben wurden verworfen und das Plasma vereinigt. Zur Deproteinierung des Probenmaterials wurde unter Kühlung in einem Eisbad Perchlorsäure hinzugegeben (65 µl Perchlorsäure pro ml Plasma, 0,6 mol/l), wodurch die Proteine der Probe denaturieren und ausflocken. Die Proben wurden bei 4°C mit 3.500 U/min für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der pH-Wert des Überstands wurde mit Kaliumhydroxidlösung auf 9,0 titriert, wobei kristallines Kaliumperchlorat ausfällt. Die Substanzen wurden bei -20°C eingefroren, wodurch die

Salzausfällung maximiert wurde. Nach dem Auftauen und der erneuten Zentrifugation bei 4°C mit 3.500 U/min für 5 Minuten konnte der Überstand dem nächsten Arbeitsschritt unterzogen werden.

3.3.2 Größenausschluss-Chromatographie

Das Plasma wurde nun mittels Größenausschluss-Chromatographie fraktioniert. Dazu wurde das Gel der Chromatographie-Säule (Sephacryl S-100 High Resolution; 1000 x 16 mm, Pharmacia BioTech, Schweden) mit 0,9% NaCl in Wasser äquilibriert, die Säule mit dem Plasma beladen und anschließend mit der 0,9%igen NaCl-Lösung bei einer Flussgeschwindigkeit von 2,5 ml/min unter kontinuierlicher UV-Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm eluiert. Da sich in den Vorversuchen das Angioprotektin aufgrund der ähnlichen Beschaffenheit und Elutionseigenschaften wie der des Ang-A in derselben Fraktion der Größenausschluss-Chromatographie befand, bedienten wir uns nachfolgend der Reversed-Phase-Chromatographie, um das Substanzgemisch weiter aufzutrennen.

3.3.3 Analytische Reversed-Phase-Chromatographie

Das Eluat der Größenausschluss-Chromatographie wurde auf eine monolithische Reversed-Phase-Chromatographiesäule aufgetragen (Chromolith, Performance RP-18e; 100 x 4.6 mm I.D., Merck, Deutschland), um das Substanzgemisch weiter zu fraktionieren. Dabei erfolgt simultan die Entsalzung der Probe. Als Äquilibrierungspuffer wurde 0,1% Trifluoressigsäure (TFA, Lösung A) in Wasser verwendet. Die Flussgeschwindigkeit betrug 2 ml/min. Die gebundenen Substanzen wurden mit einer linear ansteigenden Konzentration von 80% Acetonitril in Wasser (ACN, Lösung B) unter kontinuierlicher UV-Absorptionsmessung bei 280 nm nach folgendem Schema in Fraktionen eluiert: 0-2 min: 0 % Lösung B; 2-32 min: 0-75 % Lösung B; 32-32.5 min: 75- 100 % Lösung B; 32.5-33.5 min: 100 % Lösung B.

3.3.4 MALDI – Massenspektrometrie

Die lyophilisierten Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie wurden mittels MALDI-MS und MALDI-MS/MS-Fragmentierungsanalyse ausgewertet. Dazu wurden die Proben in 10 µl Wasser resuspendiert und jeweils 1 µl von jeder Fraktion auf einen prästrukturierten MALDI-Probenträger (MTP AnchorChip 400/384, Bruker Daltonics, Deutschland) unter

Anwendung der α -Cyano-Zimtsäure-Affinitätsmethode aufgetragen [80]. Alle massenspektrometrischen Messungen wurden mit einem „Bruker Ultraflex-III TOF/TOF“ der Firma Bruker-Daltonics (Bremen, Deutschland) durchgeführt. Dabei kam ein Smart Beam-Laser mit einer Repetitionsrate von 100-200 Hz zum Einsatz. Es wurde die Summe aus durchschnittlich 200 Single-Shot-Spektren im MS-Modus und durchschnittlich 600 Single-Shot-Spektren im MS/MS-Modus analysiert. Die Massenspektren der positiv geladenen Ionen wurden im Reflektormodus mithilfe der “Delayed Ion Extraction”-Methode analysiert. Die Fragmentierung der Ionen wurde im dafür vorgesehenen LIFT-Modus durchgeführt. Die Kalibrierungskonstanten wurden unter Verwendung von Standardpeptiden ermittelt, die in unmittelbarer Nähe zu den Proben auf den Messteller aufgetragen wurden.

3.3.5 Bioassay 1 - Isolierte perfundierte Rattenniere

Für den Versuch an der isolierten perfundierten Rattenniere wurde eine Ratte durch intraperitoneale Urethan-Injektion anästhesiert (1,5 g/kg Körpergewicht) und daraufhin eine Niere explantiert. Die isolierte Rattenniere wurde mit konstanter Flussrate von 6-10 ml/min über eine peristaltische Pumpe mit 37°C warmer, Carbogen-gesättigter Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Die Funktionstüchtigkeit der Niere wurde durch Bolusinjektionen von Ang-II (10^{-6} mol/l) und α,β -meATP (10^{-5} mol/l) vor Beginn und am Ende des Versuchs überprüft. Vor Beginn der Versuchsphase wurde die Niere für 30 Minuten bei einem Basaldruck im Perfusionssystem von 70 mmHg äquilibriert. Ein Aliquot der Probe der Reversed-Phase-Chromatographie, in der das Vorliegen des Angiotensins zuvor mittels MALDI-Massenspektrometrie gesichert wurde, wurde zuvor in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert. Dadurch wurden die Lösungsmittel entfernt, die eine toxische Wirkung auf die Niere bedingt hätten. Nachfolgend wurde die entsalzte, getrocknete Probe in 0,5 ml der Perfusionslösung aufgelöst. Zur Bestimmung der Vasoaktivität wurde jeweils ein Bolus mit einem Volumen von 80 μ l injiziert. Nach Ausbleiben der Vasokonstriktion wurde ein Bolus von einem Gemisch aus unserer Probe und 100 pmol Ang-II injiziert und einem Bolus einer alleinigen Ang-II-Lösung derselben Konzentration gegenübergestellt.

3.3.6 Peptidsynthese

Das identifizierte Peptid wurde mit der Festphasen-Methode unter Verwendung von Fluorenylmethoxycarbonyl-Standardchemikalien (Fmoc) im Continuous-Flow-Modus synthetisiert. Dabei wurde ein TentaGel-S-RAM-Harz für Peptidamide (0.21 mmol/g)

verwendet, ein TentaGel-S-PHB-Harz (Rapp Polymere, Deutschland) für das freie Peptid, H-Benzotriazol-Tetramethyl-Uronium-Hexafluorophosphate (HBTU) als Kopplungsreagenz. Die Aktivierung erfolgte mit 2,0 Äquivalenten Diisopropylethylamine (DIEA) als Hilfsbase, die Kopplung für 20 Minuten, die Entkopplung mit 20% Piperidin in Dimethylformamid (DMF) für 15 Minuten. Die Abbruchreaktion erfolgte mit 95% TFA in Wasser für 3 Stunden. Die Aufreinigung des Peptids wurde mittels präparativer HPLC und einer RP-Chromatographie-Säule (PolyEncap-A300, 10 µm Partikelgröße, 250 mm x 20 mm, Bischoff Analysetechnik GmbH, Deutschland) in Wasser mit ansteigender ACN-Konzentration als mobile Phase durchgeführt. Dabei wurde über eine Zeitspanne von 70 Minuten ein Eluationsgradient von 5-70% Lösung A (80% ACN in Wasser) in Lösung B (0,1% TFA in Wasser) mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 ml/min eingegeben. Das gereinigte Peptid wurde lyophilisiert. Das Peptid wurde mithilfe der MALDI-Massenspektroskopie auf einem MALDI-TOF-Massenspektrometer "Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstation" (PerSeptive Biosystems, USA) unter Verwendung von α -Cyano-Zimtsäure und Sinapinsäure als Matrix gemessen und zeigte die entsprechend $[M + H]^+$ Massen-Peaks [81].

3.3.7 Bioassay 2 - Isolierte Aortenringe der Ratte

Die physiologischen vasoaktiven Effekte des Angiotensin II (Ang-II) wurden am Modell der isolierten Aortenringe der Ratte getestet. Männliche Wistar-Ratten (14-16 Wochen) wurden durch Kohlendioxid-Begasung getötet. Ein Aortensegment distal des linken Subklavia-Abgangs wurde entnommen und daraus mehrere Ringe von 3 mm Länge präpariert. Das Endothel wurde durch vorsichtiges Reiben zerstört und die Aortenringe im Gewebsbad bestehend aus 10 ml Krebs-Henseleit-Lösung suspendiert. Das Gewebsbad wurde auf 37°C temperiert und mit Carbogen auf einen pH-Wert von 7,4 begast. Nachfolgend wurden 100 nmol/l Ang-II hinzugegeben. Die Änderung der Kraftentwicklung wurde mit einem speziellen System aufgezeichnet (Emka Technologies, Frankreich). Die Vitalität der einzelnen Aortenringe wurde zuvor durch Kontraktionsbestimmung mittels Kaliumchlorid (60 mmol/l) überprüft. Nach 30-minütiger Äquilibration wurden die Präparate für 20 Minuten mit Angiotensin II inkubiert. Nachfolgend wurde für das Angiotensin II eine Dosiswirkungskurve erstellt (1 nmol/l - 1 µmol/l). Die Tierexperimente wurden vor Studienbeginn vom Landesamt für Gesundheit, Ernährung und technische Sicherheit genehmigt.

3.3.8 Rezeptor-Charakterisierung

Zur vergleichenden Untersuchung der Bindungsaffinitäten von Angioprotektin und Ang-II an der Zelloberfläche wurden Endothelzellen der MyEnd-Zelllinie der Maus (Murine Myocardial Microvascular Endothelial Cells) in 175 cm² Zellkulturflaschen (Nunc, Deutschland) in MCDB131-Medium unter Zugabe von 100 U/ml Penizillin/Streptomycin, 1% (v/v) L-Glutamin und 7,5% (v/v) fetalbovinem Serum kultiviert. Am Tag 2 wurden die Zellen bei etwa 70%iger Konfluenz gespült und für 3-4 Stunden mit CY3-konjugiertem Angioprotektin beziehungsweise Ang-II inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit Phosphatpuffer (PBS) erneut gespült und mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop (Leitz Dialux, Deutschland) sowie mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Molecular Dynamics, USA) untersucht. Die Bilder wurden mit der ImageSpace-Software (Molecular Dynamics, USA) als Projektionen mit maximaler Intensität aus ungefilterten optischen Sektionen erstellt.

Für den Nachweis der Mas-vermittelten Relaxation erfolgten Versuche an vorkontrahierten Aortenringen der Maus. Dazu wurden 12 bis 14 Wochen alte homozygote Mas-defiziente Mäuse des C57BL/6-Stammes sowie altersentsprechende C57BL/6-Wildtypmäuse (n=34; 28,0 g ± 2,6 g) als Kontrolle verwendet [82] [83] [84]. Die Tiere entstammen dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin (Arbeitsgruppe Dr. Michael Bader) und wurden in der Einrichtung für Versuchstiere im „Department of Physiology and Biophysics“ der Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Belo Horizonte, Brasilien) weitergezüchtet. Die Tiere wurden in Sammelkäfigen in eigens dafür vorgesehenen klimatisierten Räumlichkeiten mit einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Fütterungs- und Haltungsprotokolle wurden vom „Animal Care Committee of the Institute of Biological Sciences“ des UFMG überwacht. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation und anschließende Ausblutung getötet. Ein Aortensegment der Aorta descendens wurde umgehend entnommen und daraus nach Entfernung des Fett- und Bindegewebes mehrere 2-3 mm dicke Ringe präpariert. Die Präparate wurden in Carbogen-gesättigte Krebs-Henseleit-Lösung gegeben und unter einer Vorspannung von 0,5 g für eine Stunde äquilibriert. Die Unversehrtheit des Endothels wurde durch Applikation von Acetylcholin (10 mmol/l) mit nachfolgend mindestens 50%iger Relaxation der durch Phenylephrin (0,1 mmol/l) vorkontrahierten Ringe sichergestellt. Das Phenylephrin wurde 20 Minuten vor der Angioprotektin- beziehungsweise Ang-II-Applikation in das Gewebsbad gegeben. Die mechanischen Aktivitäten wurden isometrisch über einen Kraftaufnehmer (Fort25, World

Precision Instruments, USA), einen Verstärker (Model TBM-4; World Precision Instruments, USA) und einen Umwandler (AD16JR; World Precision Instruments, USA) mittels der CVMS-Data-Acquisition-Recording-Software (World Precision Instruments, USA) aufgezeichnet.

Zur Erueierung einer möglichen NO-Beteiligung an den vasodilatativen Effekten des Angioprotektins wurden kommerziell erhältliche Zelllinien von Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (CHO) und COS-Zellen (CV-1 Origin SV40, American Type Culture Collection, USA) eingesetzt. Dazu wurden die Zellen für mindestens 3 Tage als Monoschicht in 94/16 mm Petrischalen in zellspezifischen Medien kultiviert. Die Zellen wurden mithilfe eines Cytomegalievirus-Promoters mit der Mas-cDNA stabil transfiziert [85] und mit Neomycin selektiert. Die CHO wurden für 30 Minuten mit dem NO-Indikator DAF-FM (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluoreszin-Diazetat) inkubiert (2,5 µmol/l). Nachfolgend wurde Angioprotektin beziehungsweise Ang-(1-7) hinzugegeben (jeweils 1 µmol/l). Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 META, Zeiss, US) mit einer Argon-Laser-Belichtung von 488 nm und einem 63er-Ölimmersionsobjektiv dargestellt.

3.3.9 Komerzielle Ang-II-Assay-Kits

Zur Untersuchung der Kreuzreaktivität zwischen Ang-II und Angioprotektin bei der Verwendung konventioneller enzymatischer Immunoassays zur Ang-II-Bestimmung wurde das "Angiotensin II Enzyme Immunoassay Kit" der Firma Spi-Bio (Frankreich) eingesetzt. Dabei wird ein spezifischer monoklonaler Ang-II-Antikörper auf einer 96-Loch-Mikrotiter-Platte immobilisiert. Im Rahmen einer immunologischen Reaktion entsteht zwischen den Antikörpern und dem zu bestimmenden Ang-II ein Immunkomplex, der anschließend mittels Glutaraldehyd über Aminogruppen kovalent an die Platte gebunden wird. Nach einem Wasch- und Denaturierungsdurchgang reagiert das Ang-II nun mit einem Acetylcholinesterase-markierten Tracer. Die Platte wird erneut gewaschen und nachfolgend Ellman's Reagens, ein enzymatisches Substrat für die Acetylcholinesterase und Chromogen, den Wells hinzugefügt. Der Tracer bildet mit dem Ellman's Reagens einen gelben Farbkomplex, der mittels Spektrophotometrie gemessen wird und sich proportional zur Ang-II-Menge verhält. Die photometrischen Messungen erfolgten mit einem „Multiskan Ascent“-Photometer (Thermo Electron Corporation, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 414 nm.

4 Ergebnisse

4.1 Plasma-Aufbereitung

Peripher-venöses Blut wurde von insgesamt 10 gesunden Spendern über einen peripheren Venenkatheter in EDTA-Röhrchen abgenommen. Durch Zentrifugation wurde das Plasma von den zellulären Blutbestandteilen abgetrennt und konnte nach der Deproteinierung den weiteren Auftrennungsmethoden unterzogen werden.

4.2 Größenausschluss-Chromatographie

Die Fraktionierung des deproteinisierten Plasmas erfolgte in einem ersten Auftrennungsschritt durch eine Größenausschluss-Chromatographie mit einer Sephacryl-S100-Trennsäule (16 x 1000, Pharmacia Bio Tech, Schweden). Im Chromatogramm (**Abbildung 2**) ist ein deutlicher UV-Absorptionspeak mit einem Maximum bei einer Retentionszeit von 180 Minuten mit einem Pfeil markiert, der von einem weiteren UV-Absorptionspeak im Bereich von 195 bis 210 Minuten gefolgt wird. Durch einen Vergleich der Retentionszeiten mit bekannten Angiotensin-Peptiden konnte das Intervall bestimmt werden, in dem ein Angiotensin-Peptid eluiert. Die Fraktionen im Retentionszeitbereich von 165-195 Minuten wurden zusammengefasst und das zugrunde liegende Substanzgemisch durch die nachfolgende chromatographische Methode weiter aufgetrennt. Aus den Fraktionen des markierten UV-Absorptionspeaks konnte im weiteren Verlauf das Angiotensin isoliert werden.

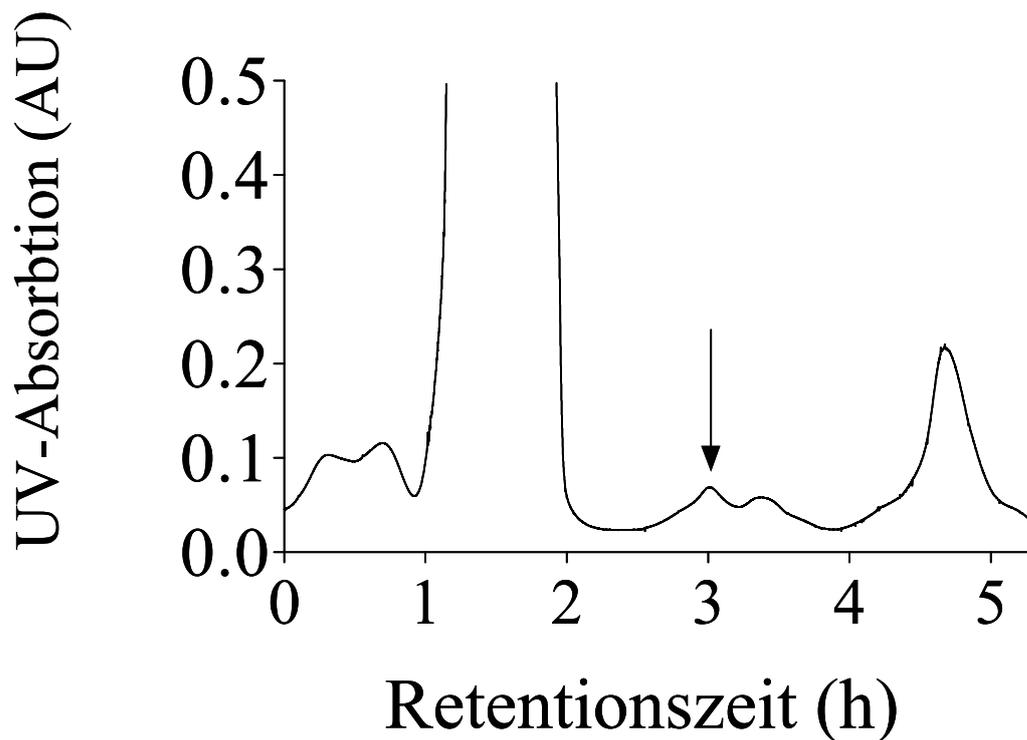


Abbildung 2: Größenausschluss-Chromatogramm von menschlichem Plasma (Säule: Sephacryl S-100 high-resolution, Pharmacia BioTech, Schweden; Säulengröße: 1000 x 16 mm; Eluent: 0,9 % NaCl in Wasser; Flussgeschwindigkeit: 2,5 ml/min; X-Achse: Retentionszeit (h); Y-Achse: UV-Absorption bei 280 nm (relative Einheiten)). Der Pfeil deutet auf einen Peak, aus dem das Angiotensinogen (molekulare Masse: 1001,5 Da) isoliert wurde.

4.3 Analytische Reversed-Phase-Chromatographie

Die zuvor beschriebenen Fraktionen der Größenausschluss-Chromatographie wurden auf eine monolithische Reversed-Phase-Chromatographiesäule aufgetragen (Chromolith Performance RP-18e; 100 x 4.6 mm I.D., Merck, Deutschland). Das zugrundeliegende Substanzgemisch wurde dadurch aufgrund hydrophober Wechselwirkungen weiter fraktioniert. Die massenspektrometrische Messung ergab, dass das Angiotensinogen in der Fraktion der 14. Minute bei einer ACN-Konzentration von etwa 5% eluierte. Der entsprechende Peak ist im Übersichtsspektrum (**Abbildung 3**) mit einem Pfeil markiert.

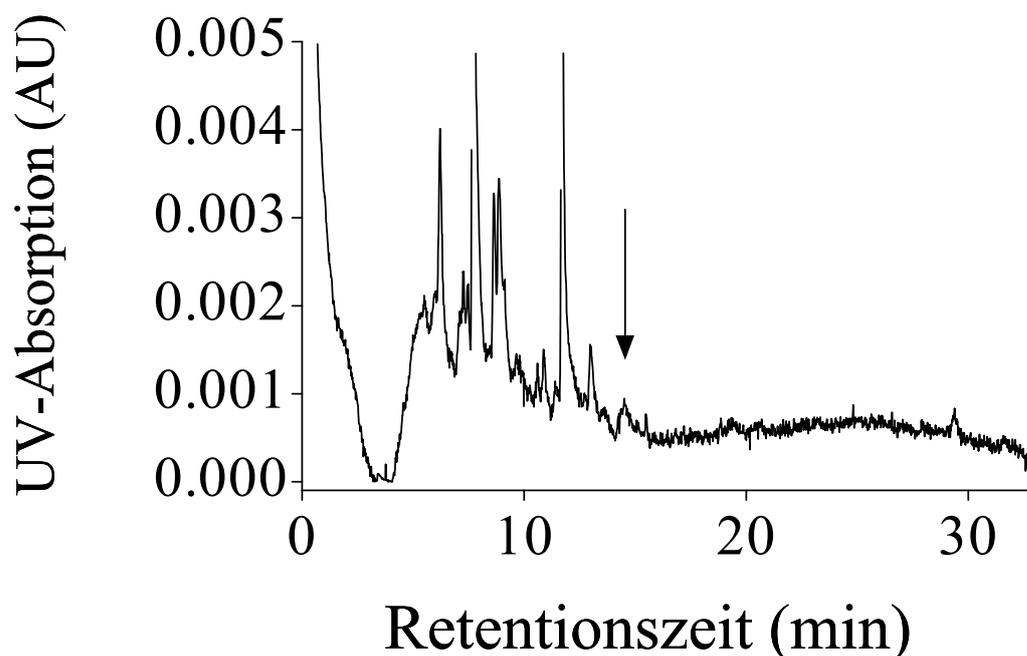


Abbildung 3: Reversed-Phase-Chromatogramm der pfeilmarkierten Fraktion der Größenausschluss-Chromatographie aus Abbildung 2 unter Verwendung einer analytischen Reversed-Phase-HPLC-Säule (Chromolith Performance, 100 x 4.6 mm I.D., Merck, Deutschland; Eluent A: 0,1 % TFA in Wasser; Eluent B: 0,1 % TFA in Wasser und 80% ACN in Wasser; Gradient: 0-2 min: 0 % B, 2-32 min: 0-75 % B, 32-32,5 min: 75-100 % B; 32,5-33,5 min: 100 % B; Flussgeschwindigkeit: 2,0 ml min⁻¹; X-Achse: Retentionszeit (min); Y-Achse: UV-Absorption bei 280 nm (relative Einheiten)).

4.4 MALDI – Massenspektrometrie

Zur massenspektrometrischen Analyse mittels MALDI-MS wurde ein Aliquot der zuvor beschriebenen Fraktion der Reversed-Phase-Chromatographie entnommen. Im Übersichtsspektrum (**Abbildung 4**) ist die Heterogenität des Substanzgemischs zu erkennen. Hier fand sich ein deutliches Signal im Massenbereich von 1001,5 Dalton. Die zugrundeliegende Substanz konnte mithilfe eines Fragmentspektrums (**Abbildung 5**) als Angiotensin-Peptid identifiziert werden. Relevante Peaks wurden entsprechend der üblichen Nomenklatur markiert. Zur vollständigen Identifizierung wurden die Daten der entsprechenden Fragmentmassen einem Datenabgleich der Mascot-Datenbank (Matrix Science, UK), der „Human Genome Database“ (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) des „National Centre for Biotechnology Information“ (National Library of Medicine, USA) sowie einer Sequenzierung unter Verwendung der RapiDeNovo-3.0.1-Sequenzierungseinheit

(Bruker Daltonics, Deutschland) unterzogen. Nachdem sich durch den Datenabgleich unseres Fragmentspektrums mit den beiden Genom-Datenbanken keine vollständigen Aussagen über die gesuchte Aminosäuresequenz des Peptids erzielen ließ, ergaben sowohl die b-Fragmente als auch die y-Fragmente bei Anwendung der RapiDeNovo-3.0.1-Sequenzierungseinheit die Aminosäuresequenz „Pro-Glu-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe“, das Angiotensinogen, das sich vom Ang-II durch die beiden n-terminalen Aminosäuren unterscheidet. Nachfolgend konnte das restliche Probenmaterial für die physiologischen Versuche verwendet werden.

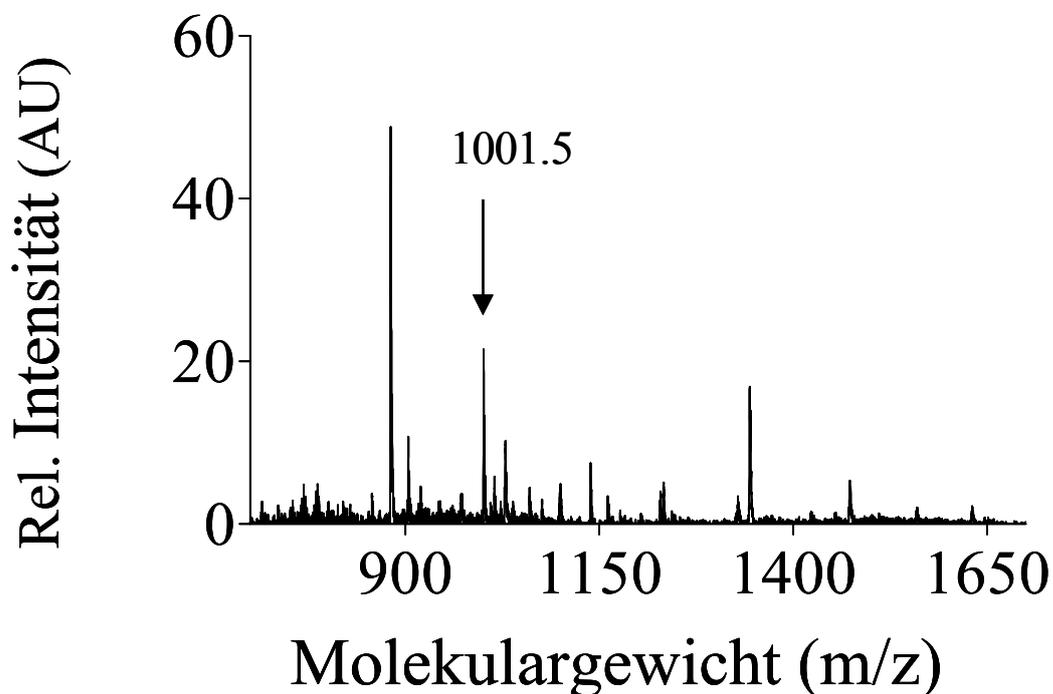


Abbildung 4: MALDI-TOF-Massenspektrum der Fraktion der 14. Minute der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie. Die zugrundeliegende Substanz mit einer molekularen Masse von 1001,5 Da entspricht der Aminosäuresequenz Pro-Glu-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe, dem Angiotensinogen.

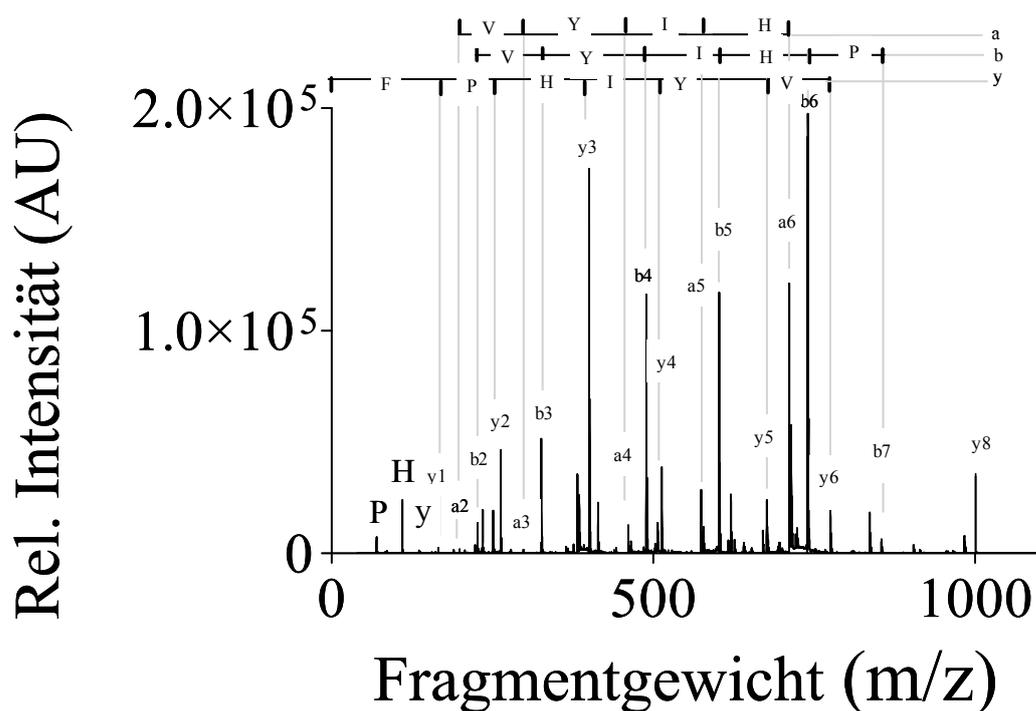


Abbildung 5: MALDI-TOF/TOF-Fragmentspektrum der Substanz mit der molekularen Masse von 1001,5 Da (Angioprotektin) aus Abbildung 4.

4.5 Bioassay 1

Bei dem Versuch an der isolierten perfundierten Rattenniere testeten wir das Substanzgemisch aus der zuvor beschriebenen Fraktion der analytischen Reversed-Phase-Chromatographie auf seine Vasoaktivität. Nachdem sich die ursprünglich erwartete Vasokonstriktion nicht nachweisen ließ und sich nachfolgend ebenfalls keine Vasodilatation nachweisen ließ, untersuchten wir die Interaktionen des Angioprotektins gegenüber dem Ang-II. Dabei zeigte sich eine deutliche Abnahme der vasokonstriktorischen Potenz des Ang-II in Gegenwart des Angioprotektins (ohne Abbildung).

4.6 Peptidsynthese

Das identifizierte Peptid konnte mit der Festphasen-Methode unter Verwendung von Fluorenylmethoxycarbonyl-Standardchemikalien (Fmoc) im Continuous-Flow-Modus synthetisiert werden. Das Fragmentspektrum des synthetisch hergestellten Peptids wurde mit dem Fragmentspektrum des Peptids aus dem Spendermaterial verglichen und stimmte mit diesem überein.

4.7 Bioassay 2

Zur Bestätigung der Interaktionen von Angiotensin II und Angiotensin II wurde am Modell der isolierten Aortenringe der Ratte die Änderung der Kraftentwicklung bei den Gewebeproben nach Exposition mit Angiotensin II in Gegenwart und Abwesenheit des synthetisierten Angiotensin II mit einem speziellen System aufgezeichnet (Emka Technologies, Frankreich). Die jeweiligen vasokonstriktorischen Effekte wurden zu der Referenzsubstanz Phenylephrin in Relation gesetzt (**Abbildung 6**). Die Konzentrationsangaben von Angiotensin II und Angiotensin II beziehen sich auf die Konzentrationen im Gewebsbad. Sehr deutlich erkennt man eine Abschwächung der Angiotensin II-vermittelten Vasokonstriktion in nahezu linearer Abhängigkeit der Angiotensin II-Konzentration.

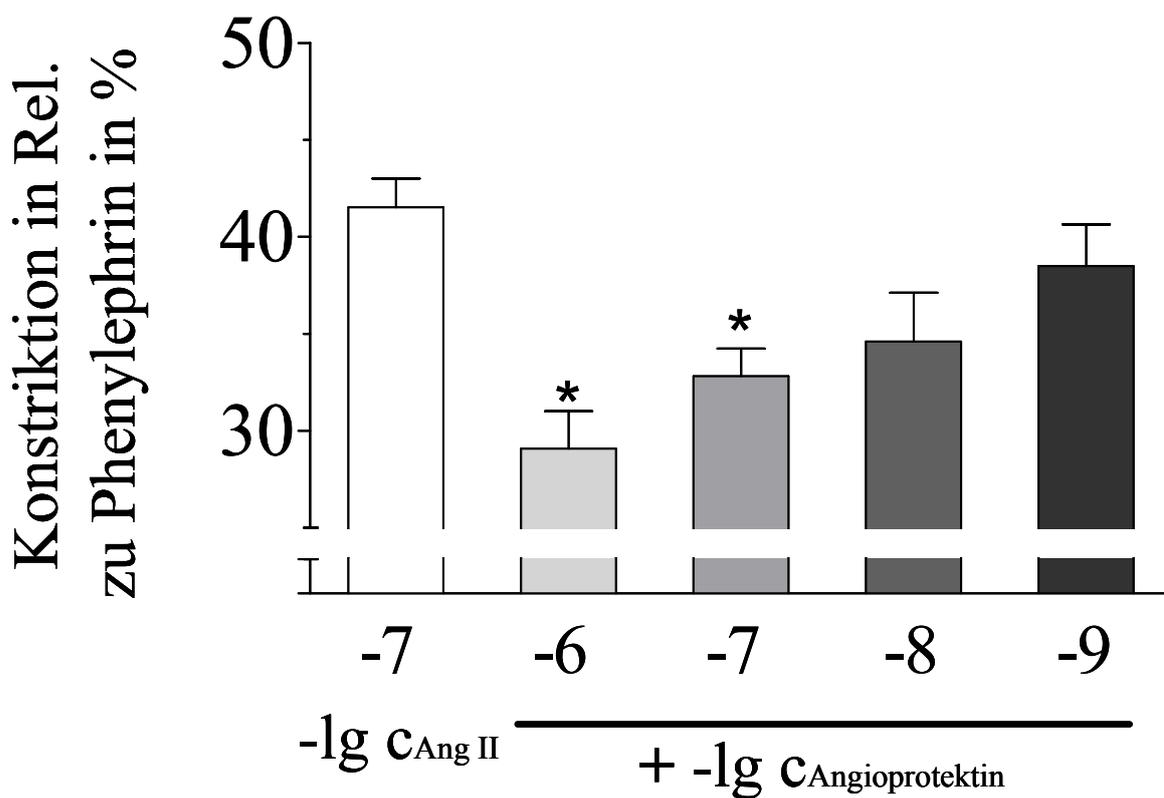
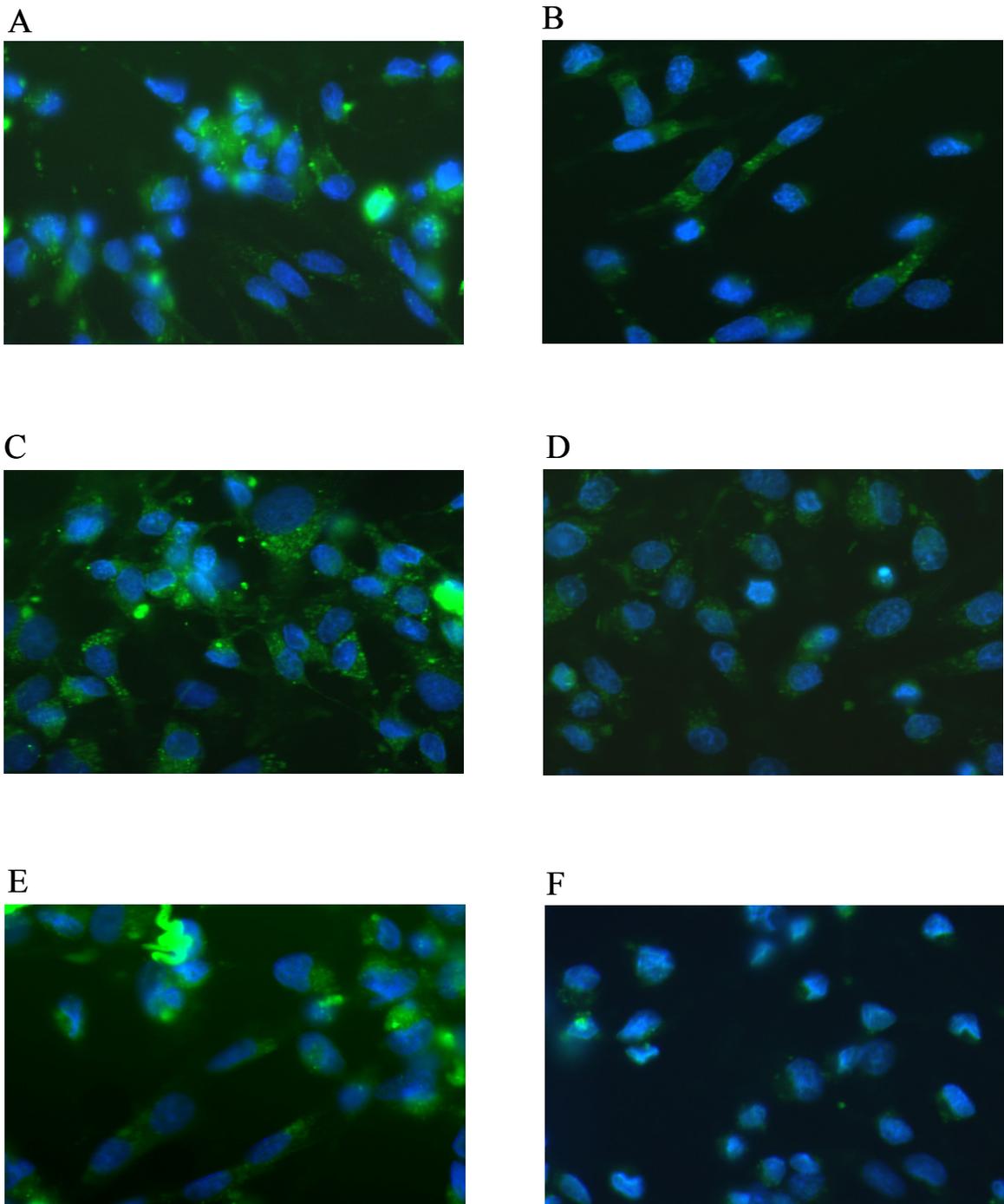


Abbildung 6: Angiotensin II-induzierte Vasokonstriktion an isolierten Aortenringen der Ratte in Abwesenheit (linker Balken) und in Gegenwart ansteigender Konzentrationen des Angiotensin II. Y-Achse: Konstriktion relativ zur Konstriktion mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Phenylephrin (%); Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts, $n=10$, $*p<0,01$).

4.8 Rezeptor-Charakterisierung

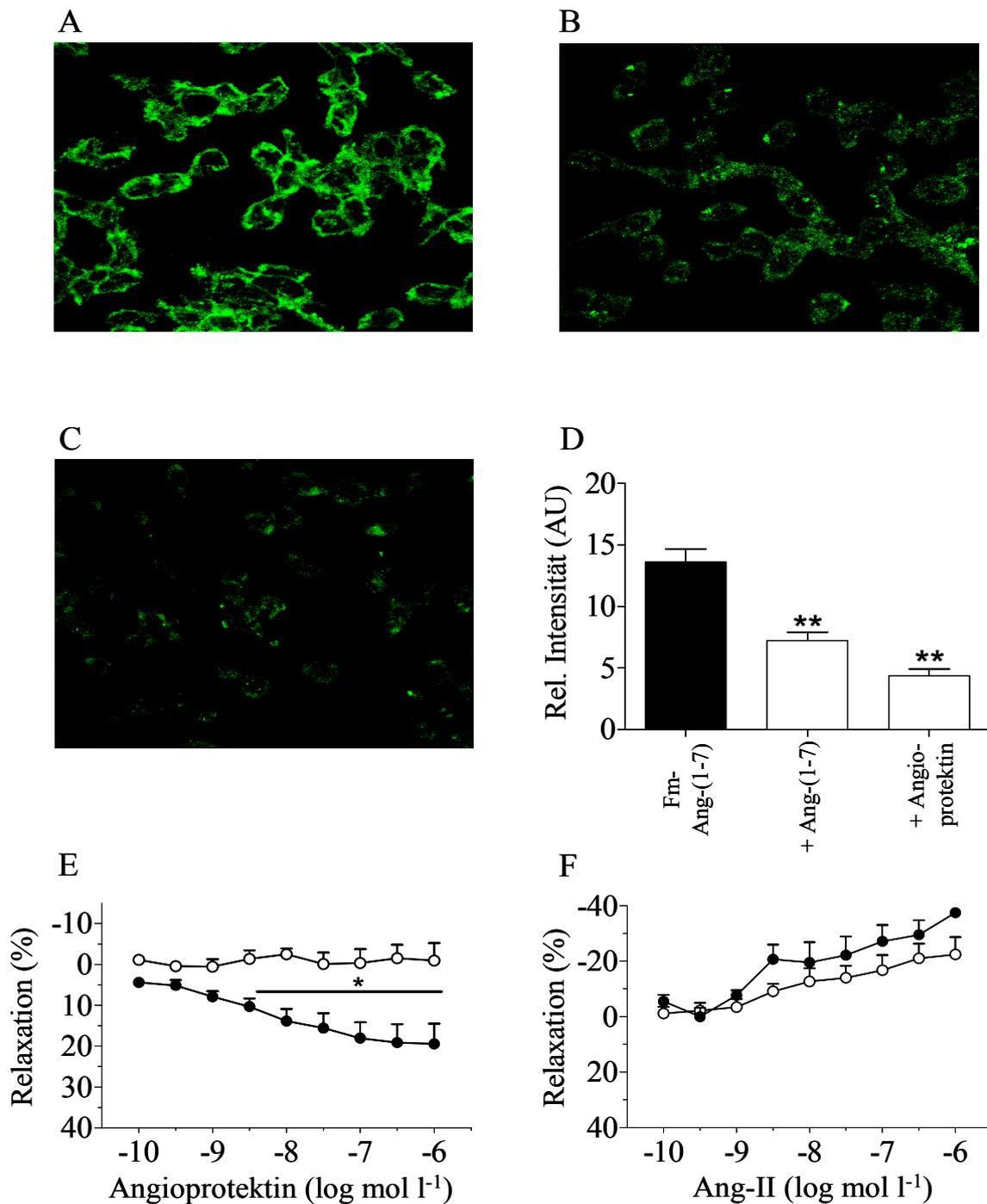
Die immunhistochemischen Fluoreszenzbilder von Endothelzellen der Maus demonstrieren Bindungs- und Verdrängungsinteraktionen von Ang-II und Angiotensin II an der Oberfläche der Endothelzellen. Während unmarkiertes Ang-II an der Oberfläche von Endothelzellen markiertes Ang-II verdrängte (**Abbildung 7B**) und unmarkiertes Angiotensin II ebenso markiertes Angiotensin II verdrängte (**Abbildung 7D**), konnten Verdrängungseffekte von unmarkiertem Ang-II gegenüber markiertem Angiotensin II nicht bestimmt werden (**Abbildung 7E**). Obwohl sich Ang-II und Angiotensin II lediglich durch zwei Aminosäuren voneinander unterscheiden, werden ihre jeweiligen physiologischen Effekte offensichtlich über unterschiedliche Rezeptoren vermittelt.



Abbildungen 7 A-F: Repräsentative immunhistochemische Fluoreszenzbilder von Endothelzellen der Maus nach Inkubation mit (A) Cy3-Ang-II, (B) Cy3-Ang-II in Gegenwart von Ang-II, (C) Cy3-Angioprotektin, (D) Cy3-Angioprotektin in Gegenwart von Angioprotektin, (E) Cy3-Angioprotektin in Gegenwart von Ang-II und (F) Negativkontrolle.

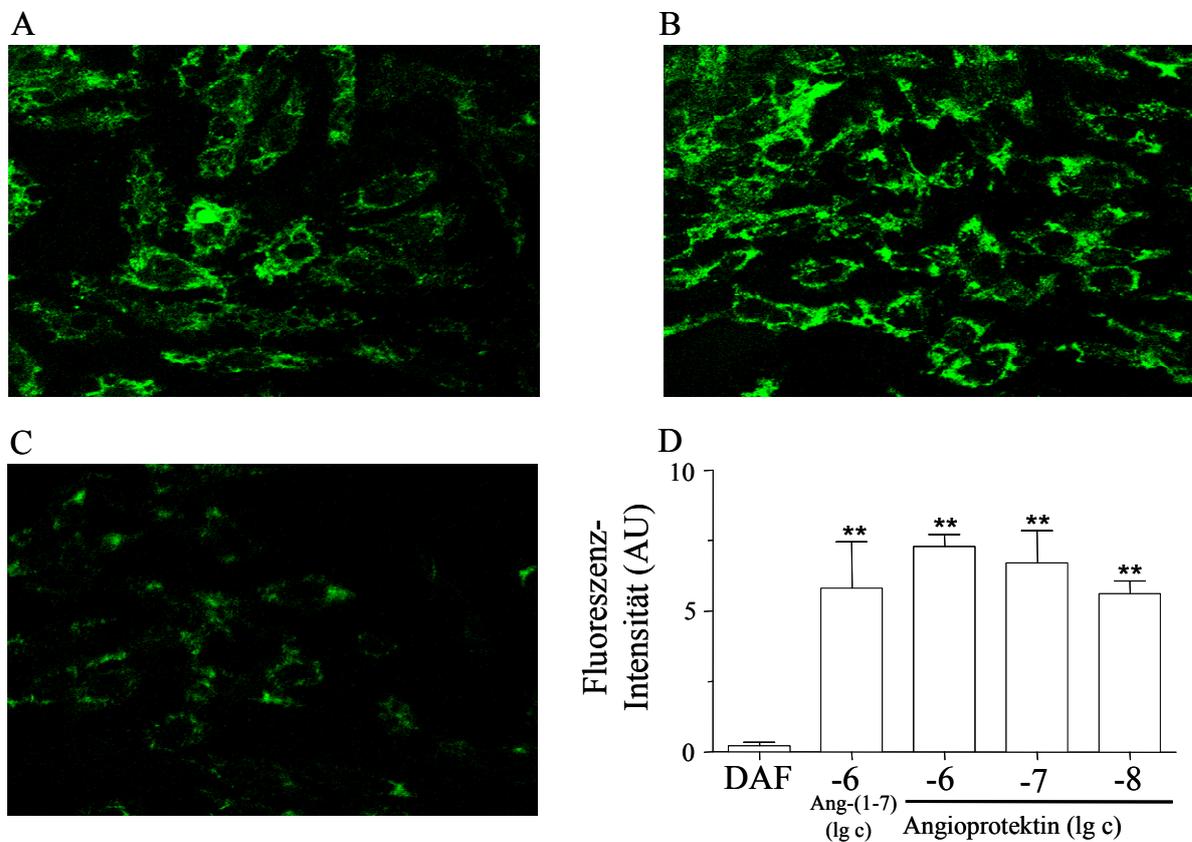
Da der modulierende Effekt des Angioprotektins an den des Mas-Liganden Ang-(1-7) erinnert, wurde das Verdrängungspotential des Angioprotektins gegenüber fluoreszenzmarkiertem Ang-(1-7) aus Bindungen an der Oberfläche von Ovarialzellen beim Chinesischen Hamster (CHO) untersucht, die mit Ratten-Mas-cDNA stabil transfiziert wurden (CHO-Mas). Sowohl das unmarkierte Ang-(1-7) konnte diese Bindungen lösen (**Abbildung 8B**) als auch das Angioprotektin (**Abbildung 8C**). Der Verdrängungseffekt des Angioprotektins war stärker als der des unmarkierten Ang-(1-7) (**Abbildung 8D**).

In nicht-transfizierten CHO konnte hingegen keine messbare Rezeptorenbindung nachgewiesen werden. Zur Bestätigung der Hypothese der maßgeblichen Beteiligung von Mas-Rezeptoren wurden die vasodilatatorischen Effekte des Angioprotektins auf Aortenringe von Wildtyp- und Mas-Knockout-Mäusen untersucht, die unmittelbar zuvor mit Phenylephrin vorkontrahiert wurden. Während bei den Wildtyp-Mäusen ein signifikanter vasorelaxierender Effekt durch Angioprotektin erzielt werden konnte, ließ sich am Gefäßtonus der Mas-Knockout-Mäuse keine Wirkung beobachten (**Abbildung 8E**). Ang-II verursachte an beiden Tiermodellen erwartungsgemäß einen Anstieg des Gefäßtonus (**Abbildung 8F**).



Abbildungen 8 A-F: Affinitätsvergleich von Ang-(1-7) und Angiotensin bei Mas-transfizierten Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (CHO): Repräsentative konfokale mikrofotografische Bilder in Gegenwart von (A) Fluoreszenz-markiertem Ang-(1-7), (B) Fluoreszenz-markiertem Ang-(1-7) nach Zugabe von unmarkiertem Ang-(1-7), (C) Fluoreszenz-markiertem Ang-(1-7) nach Zugabe von unmarkiertem Angiotensin. (D) Graphische Darstellung der Mas-Affinität durch relativen Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten (jeweilige Konzentrationen: 1 $\mu\text{mol/l}$; $n=12$; $**p < 0.01$: ANOVA, Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts). Vasoaktivität beim Phenylephrin-vorcontractierten Aortenring der Maus in Abhängigkeit steigender Konzentrationen von (E) Angiotensin bei Mas-Knockout-Mäusen (O, $n=6$) und Wildtyp-Mäusen (●, $n=8$, $*p < 0.01$) beziehungsweise (F) Ang-II bei Mas-Knockout-Mäusen (O, $n=4$) und Wildtyp-Mäusen (●, $n=2$).

Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Mas-Rezeptor-vermittelten Relaxation wurden CHO-Mas in Gegenwart des NO-Indikators 4-Amino-5 Methylamino-2',7'-Difluorfluoresceindiacetat (DAF) mit Ang-(1-7) (**Abbildung 9A**) und Angiotensin II (**Abbildung 9B**) stimuliert. Angiotensin II verursachte im Vergleich zum Versuch unter Kontrollbedingungen (**Abbildung 9C**) eine signifikante NO-Freisetzung, die deutlich stärker war als die des Ang-(1-7) (**Abbildung 9D**). In nicht-transfizierten Zellen ließ sich kein Effekt beobachten (ohne Abbildung).



Abbildungen 9 A-D: NO-Freisetzung aus Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters in Gegenwart des NO-Indikators DAF. Repräsentative konfokale mikrofotografische Bilder nach Stimulation mit (**A**) Ang-(1-7) und (**B**) Angiotensin II gegenüber der Kontrolle (**C**). (**D**) Grafische Darstellung der NO-Freisetzung durch relativen Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten (** $p < 0.01$: ANOVA, Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts, $n=6$).

4.9 Angioprotektin-Plasmakonzentrationen / Ang-II-Assay-Kits

Weiterhin untersuchten wir die Angioprotektin-Plasmakonzentrationen bei gesunden Erwachsenen und bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz mithilfe der massenspektrometrischen Methode, wie zuvor beschrieben (Jankowski v 591). Die klinischen Daten der Patienten sowie der gesunden Kontrollpersonen werden in **Tabelle 3** dargestellt. Bei den Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz war die Plasmakonzentration des Angioprotektins gegenüber den gesunden Kontrollpersonen durchschnittlich auf das 3,12-fache erhöht (**Abbildung 10**). Im Falle der Ang-II-Plasmakonzentration zeigte sich kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der terminal Niereninsuffizienten (**Abbildung 10**). Ein kommerziell erhältlicher Ang-II-Antikörper unterscheidet in seiner Bindungsaffinität nicht zwischen Ang-II und Angioprotektin (**Abbildung 11**). Daraus lässt sich folgern, dass kommerziell erhältliche Ang-II-Assays fälschlicherweise zu hohe Ang-II-Werte anzeigen.

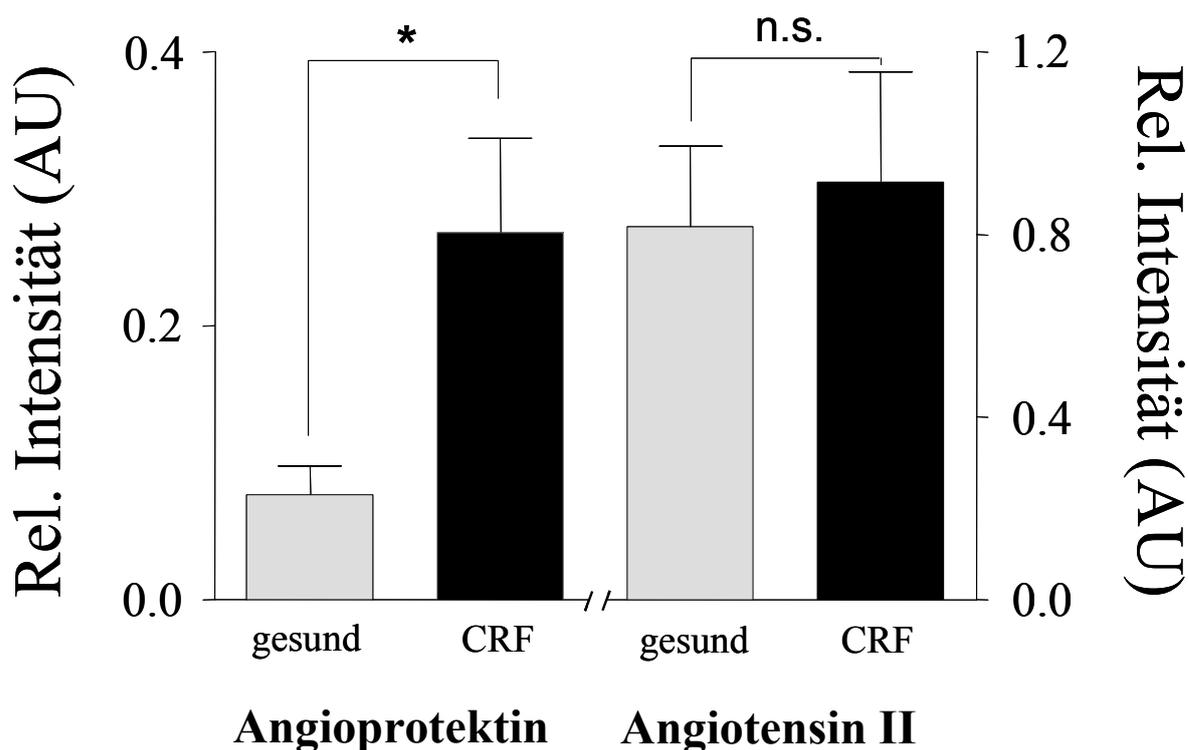


Abbildung 10: Massenspektrometrische Quantifizierung der Angioprotektin- und Ang-II-Konzentrationen im Plasma terminal-niereninsuffizienter Patienten (CRF) sowie gesunder Kontrollpersonen (n=7, Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts, Einzel- und Mittelwerte, $p < 0,05$)

Tabelle 3: Klinische Daten der terminal-niereninsuffizienten Patienten (CRF) und der gesunden Kontrollpersonen bei der Bestimmung der Angiotensin- und Ang-II-Plasmakonzentrationen.

Variable	CRF-Patienten (n=7)	Gesunde Testpersonen (n=7)	Signifikanz
Alter (in Jahren)	63 ± 5	50 ± 5	n.s.
Geschlecht (m/w)	5 / 2	4 / 3	n.s.
Blutdruck (mm Hg) systolisch diastolisch	121 ± 10 68 ± 5	121 ± 2 74 ± 2	n.s.
Body-Mass-Index (kg m ⁻²)	24 ± 1	23 ± 1	n.s.
Leukozyten (10 ³ µl ⁻¹)	9,3 ± 1	5,4 ± 1	p < 0,01
C-reaktives Protein (mg dl ⁻¹)	3,0 ± 1	0,2 ± 0	p < 0,01
Harnstoff (mmol l ⁻¹)	111 ± 22	18 ± 1	p < 0,01

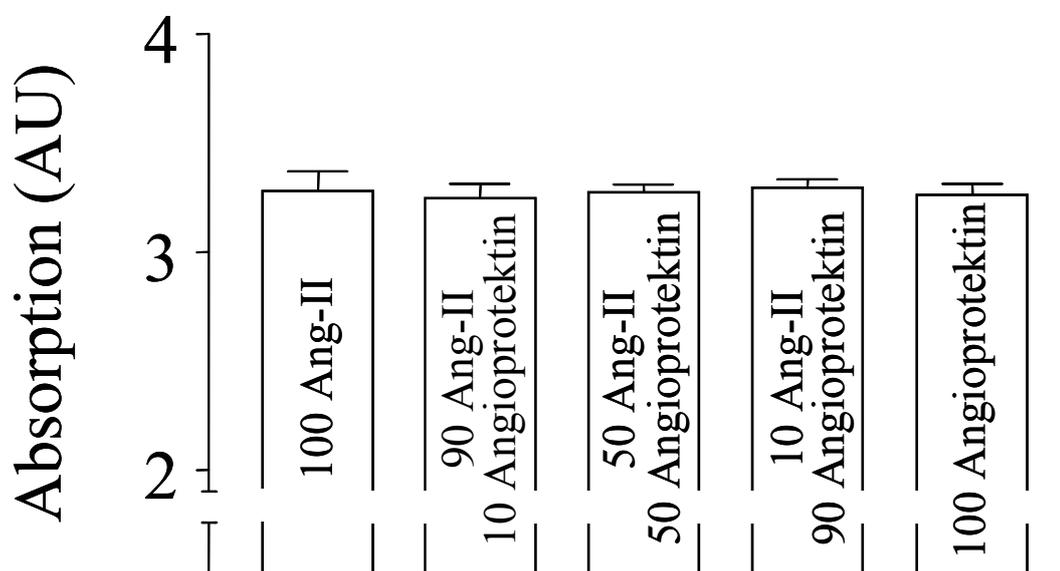


Abbildung 11: Quantifizierung von synthetischem Angiotensin und synthetischem Ang-II mittels eines enzymatischen Immunoassays durch photometrische Messung. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf pg/ml, n=5.

5 Diskussion

Ätiologie und Pathogenese der essentiellen Hypertonie sind nach wie vor Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Vor dem Hintergrund der Tatsache, dass die essentielle Hypertonie die Ausgangsbasis für kardiovaskuläre wie auch andere mikrovaskuläre degenerative Erkrankungen bildet, wird deutlich, welchen enormen Einfluss sie auf die Sterblichkeit der Bevölkerung der Industriestaaten hat. Obwohl in diesem Zusammenhang laufend neue Erkenntnisse gewonnen werden, sind kurative Ansätze in der Behandlung der essentiellen Hypertonie im Grunde nicht vorhanden, nicht zuletzt aufgrund ihrer multifaktoriellen Genese. Die Komplexität des RAS, das maßgeblich an der Entstehung und der Progredienz der Herz-Kreislauf-Erkrankungen beteiligt ist, trägt hierzu noch bei. Ohnehin scheinen humorale vasoaktive Substanzen von großer Bedeutung zu sein. Die Hypothese geht zurück auf einen Parabioseversuch von Dahl et al., der hypertone und normotone Ratten kreuztransfundierte und nachwies, dass der Blutdruck der normotonen Ratten dadurch anstieg, der Blutdruck der hypertonen Ratten hingegen abfiel [76]. Eine bedeutende Rolle spielte in den letzten Jahren die Entdeckung unterschiedlicher Dinukleotid-Polyphosphate, die einen entscheidenden Anteil an der lokalen und systemischen Blutdruckregulation haben [86] [11] [12]. Auch die Gruppe der Angiotensine rückte zunehmend in den Fokus der Aufmerksamkeit. Die Beteiligung der biologisch aktiven Ang-II-Derivate an der lokalen und systemischen Blutdruckregulation wurde dabei deutlich.

Ang-II wird über die Aminopeptidase A in Ang-III abgebaut, welches über die Aminopeptidase B in Ang-IV umgewandelt wird. Endopeptidasen und Carboxypeptidasen bauen das Ang-IV in weitere biologisch inaktive Fragmente ab. Alternativ können aus dem Ang-II das Ang-(1-7), das Ang-A und vermutlich das im Rahmen dieser Arbeit isolierte, identifizierte und charakterisierte Angioprotektin gebildet werden. Die Angiotensin-Peptide Ang-IV, Ang-(1-7) und das Angioprotektin weisen eine biologische Aktivität auf, die sich unabhängig von den ursprünglich bekannten Angiotensin-Rezeptoren AT₁ und AT₂ vollzieht, wodurch im Falle des Ang-IV und des Ang-(1-7) letztlich die Entdeckung der AT₄- und der Mas-Rezeptoren erfolgte. Dabei verfügen sie über eine dem Ang-II entgegengesetzte, vasoprotektive Wirkung. Zunehmend werden neuartige physiologische und pathophysiologische Effekte aus der Gruppe der Angiotensine publiziert. So wurden in

jüngster Zeit einige lokale, gewebsspezifische RAS-Systeme beschrieben [87] bis hin zu intrakrinen RAS-Regelkreisen, deren Wirkungskreis sich innerhalb einzelner Zellen abspielt [88].

Im Jahre 2006 gelang es Jankowski *et al.*, Ang-A aus dem menschlichen Plasma zu isolieren. Dabei wurde bei massenspektrometrischen Untersuchungen ein weiteres Massensignal detektiert, das Analogien zum Ang-A beziehungsweise zum Ang-II aufzeigte. Um die zugrundeliegende Substanz zu untersuchen, wurde sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst in größerer Menge isoliert und anschließend identifiziert. Nachdem bei der Substanz in physiologischen Versuchen eine vasoprotektive, dem Ang-II entgegengesetzte Wirkung nachgewiesen werden konnte, wurde das Peptid synthetisiert. Das Fragmentspektrum des synthetisch hergestellten Peptids wurde mit dem isolierten Peptid aus dem Spendermaterial verglichen und zeigte deutliche Übereinstimmungen. Es handelt sich dabei um ein vasoregulatorisches Angiotensin-Peptid, das sich durch die beiden n-terminalen Aminosäuren vom Ang-II unterscheidet. Das synthetisch hergestellte Peptid konnte nun weiteren eingehenden physiologischen Versuchen unterzogen werden.

5.1 Isolierung des Angioprotektins

Die Auswahl der Auftrennungsschritte wie auch die Auswahl menschlichen Plasmas von gesunden normotensiven Spendern als Ausgangssubstanz richtete sich nach den erfolgreichen Methoden der Pilotversuche. Dabei erwies sich die Kombination der Größenausschluss-Chromatographie und der Reversed-Phase-Chromatographie zur Auftrennung von Peptiden als geeignet. In der Größenausschluss-Chromatographie werden die Substanzen eines Substanzgemischs aufgrund ihrer Größe getrennt. Nachfolgend kam die Reversed-Phase-Chromatographie zur weiteren Auftrennung der Substanzen des pfeilmarkierten UV-Absorptionspeaks aus **Abbildung 2** zum Einsatz. In dieser Fraktion akkumulierte das Angioprotektin. Die übrigen Fraktionen wurden zunächst konserviert. Die Reversed-Phase-Chromatographie basiert auf hydrophoben Wechselwirkungen. Um die Probenmoleküle nach ihrer Hydrophobizität aufzutrennen und eine Bindung an die Säule zu ermöglichen, galt es, zu Beginn möglichst viele ihrer Ladungen zu neutralisieren. Dies erfolgte durch Zugabe des Ionenpaarreagenz Trifluoressigsäure. Im Falle der Peptide kommen bevorzugt saure Ionenpaarreagenzien zum Einsatz, da sich diese mit ihren negativen Ladungen an die

überzähligen positiven Ladungen der Peptide lagern. Dabei entstehen jedoch keine kovalenten Bindungen, wodurch sich die verwendeten Lösungsmittel im nachfolgenden Lyophilisationsschritt gut sublimieren ließen. Das Angiotensin eluierte bei einer ACN-Konzentration von 5% im Lineargradienten relativ früh und entspricht dadurch einem eher polaren Molekül. Die simultane Entsalzung des Probenmaterials bei der Reversed-Phase-Chromatographie ist eine wichtige Voraussetzung sowohl für den Nierenperfusionstest als auch für die massenspektrometrischen Untersuchungen. Hohe Salzkonzentrationen führen im Nierenperfusionstest aufgrund der höheren Osmolarität zu einer toxischen Gefäßreaktion und somit zu einem falsch positiven Ergebnis. Bei der MALDI-Ionisation würde ein hoher Salzgehalt in der Probe aufgrund von Wechselwirkungen zu einer Beeinträchtigung der Kokristallisierung von Matrix und Probenmaterial und damit zu einer Beeinträchtigung der Ionisationsfähigkeit des Peptids führen. Durch massenspektrometrische Messungen konnte die Anreicherung der betreffenden Substanz in der 14. Fraktion der Reversed-Phase-Chromatographie detektiert und anschließend mit der Durchführung der physiologischen Versuche begonnen werden. Im physiologischen Versuch an der isolierten perfundierten Rattenniere konnte eine Vasoaktivität des Angiotensins beobachtet werden. Jedoch ist zur Bestätigung des Ergebnisses dessen Reproduzierbarkeit mit der entsprechenden Substanz in Reinform, also mit dem synthetisierten Peptid, unverzichtbar. Wie man am MALDI-Übersichtsspektrum (**Abbildung 4**) erkennen kann, besteht in der betreffenden Fraktion eine deutliche Heterogenität. Außerdem sind der Durchführung der unterschiedlichen physiologischen Versuche aufgrund der begrenzten Menge der isolierten Substanz aus dem Spenderplasma Grenzen gesetzt. Insofern sollte parallel zu den ersten physiologischen Versuchen intensiv an der Identifizierung der Molekularstruktur gearbeitet werden. Selbst nach identifizierter Aminosäuresequenz muss ein synthetisches Peptid nicht automatisch die gleichen physiologischen Effekte seines natürlichen Gegenstücks vorweisen. Die Analogien zum Ang-II waren sowohl bei der Identifizierung als auch bei der Synthese von entscheidendem Vorteil. Die Kalibrierungskonstanten wurden unter Verwendung von Standardpeptiden ermittelt, die in unmittelbarer Nähe zu den Proben auf den Probenträger aufgetragen wurden. Dadurch ist es möglich, eine Messgenauigkeit mit einem Fehler von unter 100 ppm zu erzielen. Weiterhin wurde den Proben jeweils 10 µg ACTH-Fragment 18-39 (Adrenokortikotropes Hormon) sowie 10 µg Saralasin als interner Standard hinzugefügt, um kinetische Ungenauigkeiten der MALDI-Ionisationsmethode zu minimieren. Zur Identifizierung des Peptids wurden die Daten der entsprechenden Fragmentmassen einem

Datenabgleich der Mascot-Datenbank (Matrix Science, UK), der „Human Genome Database“ (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) des „National Centre for Biotechnology Information“ (National Library of Medicine, USA) unter Verwendung des „Basic Local Alignment Search Tool“ (Blast) sowie einer Sequenzierung mithilfe der RapiDeNovo-3.0.1-Sequenzierungseinheit (Bruker Daltonics, Bremen) unterzogen, die schließlich zur Aufklärung der Aminosäuresequenz führte. Bei dieser Methode wird die Aminosäuresequenz ausschließlich anhand des Fragmentspektrums des Moleküls ohne Abgleich mit einer Datenbank errechnet. Wichtige Voraussetzung hierfür ist eine ausreichende Menge des zu identifizierenden Moleküls in der Probe. Die Ergebnisse aus den Kapiteln 4.7 und 4.8 sollen in den folgenden Absätzen nur begleitend diskutiert werden, da sie von kooperierenden Arbeitsgruppen durchgeführt wurden.

5.2 Mechanismus des Angioprotektin-Effekts

Nach Ausbleiben einer Vasokonstriktion oder Vasodilatation im Versuch an der isolierten perfundierten Rattenniere durch ein Aliquot der Probe wurde ein Bolus von einem Gemisch aus der Probe und 100 pmol Ang-II injiziert und einem Bolus einer alleinigen Ang-II-Lösung derselben Konzentration gegenübergestellt. Hierbei fiel eine deutlich abgeschwächte vasokonstriktorische Gefäßreaktion auf, was uns zur Synthese des Peptids zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit dieses Effekts sowie zum Zwecke weiterer physiologischer Untersuchungen veranlasste. Das beobachtete Phänomen aus dem Versuch am Nierenperfusionssystem konnte am Modell der isolierten Aortenringe der Ratte bestätigt werden. Angioprotektin verfügte auch hier in physiologisch relevanten Konzentrationen über keinen direkten vasodilatatorischen Effekt auf den Aortentonus bei der Ratte, jedoch interagierte es mit dem vasokonstriktorischen Ang-II. Eine äquivalente Dosis des Angioprotektins verminderte eine Ang-II-induzierte Vasokonstriktion um etwa 25 % (**Abbildung 6**). Dieser Effekt des Angioprotektins wird -zumindest teilweise- durch eine Modulation des Kalziumeinstroms in die glatten Gefäßmuskelnzellen verursacht. Während Ang-II einen starken Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt, war dieser Effekt in Gegenwart von Angioprotektin signifikant abgeschwächt (ohne Abbildung). An dieser Stelle lässt sich ein Vergleich mit dem Dinukleotid Diadenosin-Triphosphat ziehen. Im Falle dieses Dinukleotids wurde über Stimulation des P2Y1-Rezeptors ein ähnlicher Effekt beschrieben wie der des Angioprotektins, nämlich eine Abschwächung von Ang-II-

induzierten Vasokonstriktionen [89]. Im Falle renaler Widerstandsgefäße der Ratte wurde von Diadenosin-Triphosphat-induzierten Kontraktionen berichtet bei gleichzeitiger dilatativer Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen der mesenterialen Gefäße, was mittels unterschiedlicher Expressionsmuster der einzelnen Rezeptoren erklärt wird [90]. So soll das Diadenosin-Triphosphat seine konstriktorische Wirkung über einen intrazellulären Kalziumanstieg in glatten Gefäßmuskelzellen mit nachfolgender Aktivierung der Myosinkinase und Phosphorylierung von Myosinfilamenten über P2X-Rezeptoren entfalten, seine dilatatorische Wirkung über eine P2Y-vermittelte Aktivierung der eNOS mit nachfolgender intrazellulärer Erhöhung des Second Messengers cGMP [91] und endothelialer NO-Freisetzung. Eine Stimulation der NO-Freisetzung erfolgte auch im physiologischen Versuch mit Mas-cDNA transfizierten CHO nach Inkubation mit Angiotensin. Die Angiotensin-stimulierte NO-Freisetzung überstieg dabei die Ang-(1-7)-stimulierte NO-Freisetzung, womit die Rolle des Angiotensins als Regulator der endothelialen Funktion hervorgehoben wird. Auch überstieg die Affinität des Angiotensins zum Mas-Rezeptor die des Ang-(1-7) zum Mas-Rezeptor. Vergleichende Versuche zwischen dem Angiotensin und dem Ang-(1-7) schienen naheliegend, da der beobachtete vasoprotektive Effekt des Angiotensins an den des Ang-(1-7) erinnert. Neben diesen Beobachtungen und der Angiotensin-stimulierten Abschwächung des Ang-II-induzierten intrazellulären Kalziumanstiegs in glatten Gefäßmuskelzellen gilt es nun, die molekularen Mechanismen der Signalübertragung des Angiotensins weiter zu entschlüsseln sowie dessen Interaktionen mit den Effekten des Ang-II näher zu untersuchen.

5.3 Rezeptor-Charakterisierung

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit Mas-Knockout-Mäusen und CHO-Mas erlauben den Rückschluss, dass die vasodilatatorischen Eigenschaften des Angiotensins mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Mas-Rezeptoren zurückzuführen sind. Das Mas-Proto-Onkogen konnte erstmals aufgrund seiner tumorgenetischen Aktivität mithilfe eines *in-vivo*-Tumorassays nachgewiesen werden [92]. In Säugetieren wird das Gen hauptsächlich im Hodengewebe, im Hippokampus und der Amygdala sowie im Nieren- und Herzgewebe exprimiert [93] [94]. Es kodiert für ein Protein mit sieben transmembranösen Domänen, die Merkmale von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Klasse I aufweisen. Von diesem Protein nahm man in der Vergangenheit an, es handle sich um den Rezeptor für das

Oktapeptid Ang-II, dem bisher bedeutsamsten Peptid des Renin-Angiotensin-Systems [95]. Ambroz [96] und Ardaillou [97] gelang später jedoch der Beweis, dass ein Ang-II-induzierter intrazellulärer Kalziumanstieg in Mas-transfizierten Zellen nur dann erfolgte, wenn die Zellen zudem den AT₁-Rezeptor endogen exprimierten, den Rezeptor, der neben dem AT₂-Rezeptor inzwischen als hauptsächlicher Angriffspunkt für das Ang-II identifiziert wurde. Daraus lässt sich ableiten, dass der Mas-Rezeptor *per se* kein eigenständiger Ang-II-Rezeptor ist. Trotz dieser Erkenntnis ist inzwischen bewiesen, dass der Mas-Rezeptor eine physiologische Rolle im Ang-II-Stoffwechsel spielt. Walther *et al.* wiesen eine veränderte Aktivität neuronaler AT₁-Rezeptoren nach Ang-II-Stimulation bei Mäusen mit inaktiviertem Mas-Protoonkogen nach [82], wobei diese Mäuse zudem geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der Regulation der Herzdynamik und des Blutdrucks aufzeigten [98]. Weiterhin wurde Ang-(1-7) als endogener Agonist des Mas-Rezeptors identifiziert [83] [99] und nachgewiesen, dass es dabei den Ang-II-Funktionen entgegenwirkt [100] [101].

5.4 Syntheseweg

Mit der Entdeckung des Mas-Rezeptors, des ACE-2, des Ang-(1-7) und dem kürzlich entdeckten Ang 1-12 [102] als potentiell Vorläufermolekül im Angiotensin-Metabolismus wurden bezüglich gegenseitiger synergistischer oder antagonistischer Interaktionen der einzelnen Angiotensin-Peptide neue Vorzeichen gesetzt. Auch konnten Ursprung, Biosynthese und Regelkreis des Angiotensins in der vorliegenden Arbeit noch nicht abschließend geklärt werden. Da sich die Aminosäuresequenz von der des Ang-II unterscheidet, wäre es wahrscheinlich, dass es sich bei dem unmittelbaren Vorläufermolekül des Angiotensins nicht um Angiotensinogen handelt. Zudem konnte bei einem Datenabgleich mit einer Datenbank des menschlichen Genoms die exakte Aminosäuresequenz des Angiotensins nicht gefunden werden, was wiederum zu der Hypothese der Generierung durch posttranslationale Modifikation führt. Dabei könnte das Angiotensin aus Ang-II, Ang-A oder anderen Vorläuferpeptiden endogen gebildet werden. In **Abbildung 12** werden die strukturellen Ähnlichkeiten von Ang-II, Ang-A und dem Angiotensin verdeutlicht. Entgegen der Ähnlichkeiten bei den Aminosäuren 1 und 2 des Ang-II und Ang-A bestehen an dieser Stelle zwischen dem Angiotensin und dem Ang-II deutliche Unterschiede. Bezüglich der Synthese des Ang-A wird vermutet, dass es mithilfe der leukozytären Aspartat-Decarboxylase aus dem Ang-II synthetisiert wird. Dabei wird die

erste Aminosäure am n-terminalen Ende, die Asparaginsäure, zu Alanin decarboxyliert. Die Aufklärung des Synthesewegs des Angiotensins macht sehr komplexe Untersuchungen notwendig und ist das Ziel gegenwärtig durchgeführter Studien.

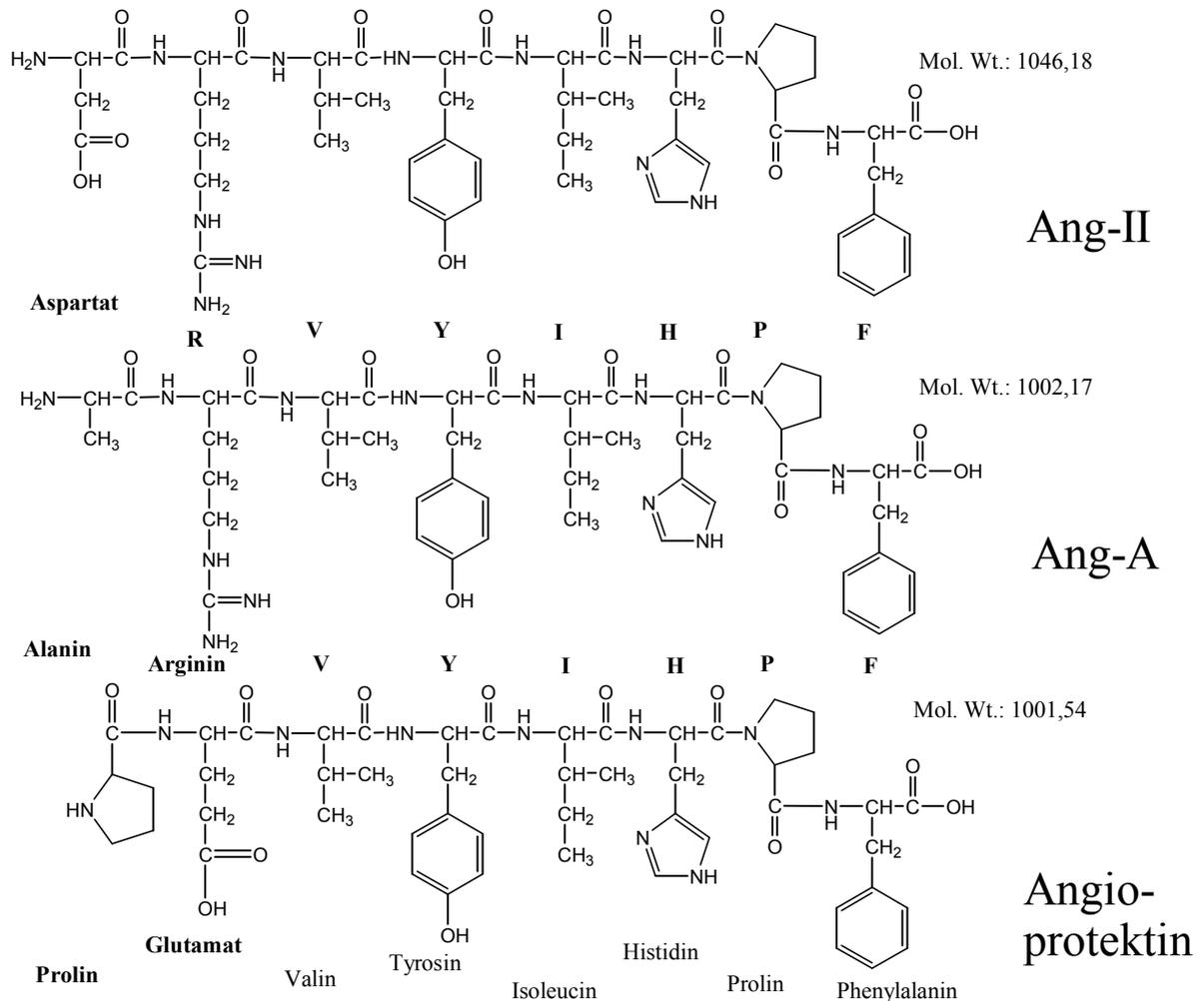


Abbildung 12: Vergleich der Strukturformeln von Ang-II, Ang-A und Angiotensin

5.5 ACE-Hemmer und AT₁-Antagonisten

Der Aufklärung des Angiotensin-Synthesewegs wird einen Beitrag zu der Frage des Stellenwerts von ACE-Hemmern gegenüber AT₁-Antagonisten leisten. Teil dieser Diskussion ist die Rolle des Ang-(1-7), das seine vasoprotektive Wirkung analog dem Angiotensin über den Mas-Rezeptor entfaltet (**Abbildung 8**). Die Synthese des Ang-(1-7) erfolgt zum einen durch das ACE aus Ang 1-9, welches zuvor mithilfe des ACE-2 aus Ang-I synthetisiert wurde. Zum anderen erfolgt die Ang-(1-7)-Synthese durch das ACE-2 aus Ang-II, welches

zuvor mithilfe des ACE aus Ang-I synthetisiert wurde [41] [67]. Für beide Synthesewege werden sowohl ACE als auch ACE-2 benötigt. Das heisst, dass durch ACE-Hemmer die Anreicherung von Ang-(1-7) unterbunden wird, wie auch die Anreicherung des ebenfalls vasoprotektiven Ang-IV. Darin liegt teilweise die kardio- und renoprotektive Wirkung der AT₁-Antagonisten begründet [103]. Durch diese Substanzklasse wird nicht nur der schädliche Einfluss der Ang-II-induzierten Aktivierung des AT₁-Rezeptors reduziert, sondern auch die günstigen Auswirkungen des Ang-IV und des Ang-(1-7) durch verstärktes Substratangebot gefördert. Ebenso bleibt die vasodilatatorische Wirkung der Ang-II-induzierten Aktivierung des AT₂-Rezeptors erhalten. Gleichzeitig wird der protektive Nutzen der AT₁-Antagonisten kontrovers diskutiert [104] [105]. ACE-Hemmer wiederum unterbinden durch Blockierung des ACE den Abbau des Ang-(1-7) [71]. Ebenfalls erfolgt durch die Blockierung des ACE eine Kumulation des vasoprotektiven Bradykinin, das bei vielen Patienten jedoch auch zu verstärktem Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen führt [106]. In der Regel ist die Kumulation der vasoprotektiven Kinine jedoch durchaus erwünscht. Insgesamt handelt es sich bei dem Kallikrein-Kinin-System um ein Gegengewicht zum RAS. Beide Systeme stehen physiologischerweise in einem komplexen Gleichgewicht und interagieren an unterschiedlichen Stellen. Eine davon ist das membrangebundene ACE, das das Ang-I zu Ang-II aktiviert und ebenso das Bradykinin zu inaktiven Abbauprodukten inaktiviert. Eine abschließende Beurteilung der Überlegenheit von AT₁-Antagonisten gegenüber ACE-Hemmern oder umgekehrt liegt noch immer nicht vor. Die günstige Beeinflussung eines weiten Spektrums kardiovaskulärer Erkrankungen sowie die damit verbundene Mortalitätssenkung durch ACE-Hemmer ist seit langem bekannt [107] und ebenso umstritten [108], wie auch die Kombinationstherapie [109] [110] [111]. Eine Bestimmung der Plasmakonzentration des Angioprotektins bei Patienten unter Medikation mit ACE-Hemmern bzw. AT₁-Antagonisten könnte in diesem Zusammenhang weiteren Aufschluss über dessen Metabolismus liefern.

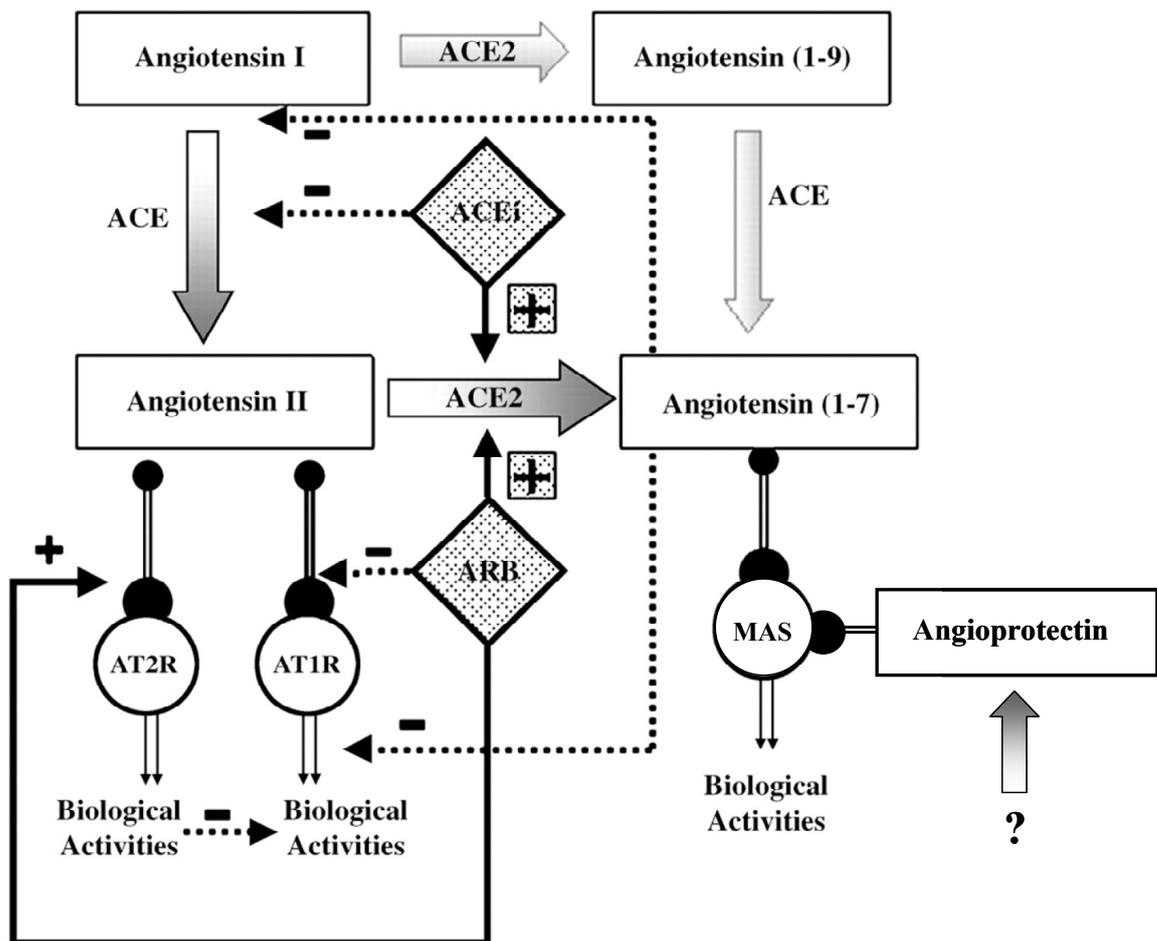


Abbildung 13: Einfluss von ACE-Hemmern und AT₁-Antagonisten am Beispiel des Mas-Agonisten Ang-(1-7) (Keidar, S. et al. Cardiovasc Res 2007 73:463-469)

5.6 Angioprotektin als Biomarker

Der Plasmaspiegel des Angioprotektins bei chronisch niereninsuffizienten Patienten liegt im Bereich des Plasmaspiegels des Ang-II, ist jedoch bedeutend höher als bei gesunden Probanden (**Abbildung 10**). Dies könnte einerseits durch eine verstärkte enzymatische Bildung erfolgen, andererseits durch verminderten enzymatischen Abbau oder verminderte renale Ausscheidung. Vor dem Hintergrund der Annahme, das Ang-II spiele eine Rolle beim Fortschreiten der Niereninsuffizienz und ACE-Hemmer verfügen in diesem Zusammenhang über einen therapeutischen Nutzen, besteht die Möglichkeit, dass es sich bei den erhöhten Angioprotektinspiegeln bei chronisch niereninsuffizienten Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden um einen Schutzmechanismus gegenüber den nachteiligen

Auswirkungen der erhöhten Ang-II-Werte bei diesen Patienten handelt. Auf der anderen Seite stellt eine potentiell synergistische Korrelation der steigenden Angiotensinwerte mit dem Fortschreiten der Niereninsuffizienz einen wichtigen Gesichtspunkt dar, der weiterer intensiver Forschungsbemühungen bedarf. Da die Plasmakonzentration von Angiotensin bei terminal niereninsuffizienten Patienten gegenüber gesunden Kontrollpersonen deutlich erhöht ist, stellt sich die Frage, ob sich das Angiotensin als prädiktiver Biomarker zur Früherkennung der Niereninsuffizienz oder kardiovaskulärer Erkrankungen eignen könnte. Bisher galt die Mikroalbuminurie als verlässlicher prädiktiver Parameter für die Entwicklung oder das Fortschreiten einer Niereninsuffizienz oder kardiovaskulärer Erkrankungen. Die Gründe hierfür sind weitestgehend unbekannt. Es besteht die Möglichkeit, dass die Mikroalbuminurie den generellen Zustand des Endothels beziehungsweise das aktuelle systemische Ausmaß der endothelialen Dysfunktion widerspiegelt, von der die glomeruläre Filtration abhängt. Alternativ zu diesem Erklärungsmodell könnte die Mikroalbuminurie ebenso eine Ursache für weitere korrelierende Pathomechanismen sein. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass zum einen der Ausprägungsgrad der Mikroalbuminurie zum anderen das Fortschreiten von Niereninsuffizienz und kardiovaskulären Erkrankungen aufgrund einer gemeinsamen unabhängigen Ursache miteinander korrelieren. Jedoch wurde die prädiktive Aussagekraft der Mikroalbuminurie jüngst in Frage gestellt. In der im vorigen Kapitel bereits erwähnten Studie über die Überlegenheit von ACE-Hemmern versus AT₁-Antagonisten versus Kombinationstherapie fiel auf, dass im Falle der Kombinationstherapie die Proteinurie abnahm bei gleichzeitiger Verschlechterung der Nierenfunktion [109]. Dies stellt die bisherige Auffassung der HOPE-Studie infrage, die den prädiktiven Wert der Mikroalbuminurie gegenüber der Ausbildung kardiovaskulärer Ereignisse unterstreicht. Doch auch unabhängig von der Aussagekraft der Mikroalbuminurie wäre die Verfügbarkeit weiterer Biomarker zu Früherkennung, Verlaufskontrolle oder Prognostik der chronischen Niereninsuffizienz und der kardiovaskulären Erkrankungen überaus wünschenswert, da die Validität eines einzelnen Biomarkers per se nicht ausreichend ist und dadurch sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse generiert werden können. Durch die Kombination mehrerer sensitiver und selektiver Biomarker kann einerseits die Validität der Diagnosestellung deutlich erhöht werden, andererseits sind hierdurch differentialdiagnostische Aussagen möglich.

6 Zusammenfassung

Mit Entdeckung des Ang-A konnte kürzlich ein vasoaktives Peptid aus der Gruppe der Angiotensin-Peptide im menschlichen Plasma nachgewiesen werden [42]. Im Laufe dieser Studie zeigte sich bei massenspektrometrischen Untersuchungen ein weiteres Massensignal bei 1001,5 Dalton. Dabei konnten strukturelle Analogien zum Ang-II gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte dieses Peptid, das Angioprotektin, aus dem menschlichen Plasma isoliert und vollständig identifiziert und charakterisiert werden, um dadurch zum Verständnis der komplexen Interaktionen des RAS innerhalb der Pathogenese der essentiellen Hypertonie beizutragen.

Zur Isolierung des Peptids kamen dabei die Größenausschluss-Chromatographie und die Reversed-Phase-Chromatographie zum Einsatz. Die Identifizierung gelang durch MALDI-Massenspektrometrie unter Anwendung der RapiDeNovo-3.0.1-Sequenzierungseinheit. Nachfolgend konnte das Peptid, das Angioprotektin, in mehreren Bioassays und Affinitätsassays charakterisiert werden.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass

- das menschliche Plasma über ein vasoaktives Peptid Angioprotektin verfügt, bei dem eine partielle Homologie gegenüber dem Ang-II besteht
- die Plasmakonzentrationen des Angioprotektins bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz gegenüber gesunden Kontrollpersonen um das durchschnittlich 3,12-fache erhöht sind
- diese Plasmakonzentrationen ausreichen, um Ang-II-Effekte zu modulieren
- mit konventionellen, Antikörper-basierten Assays zwischen Angioprotektin und Ang-II nicht unterschieden werden kann und diese mit Vorsicht interpretiert werden sollten
- der endogene AT₁-Gegenspieler Angioprotektin möglicherweise physiologische und pathophysiologische Ang-II-Effekte antagonisiert und dadurch einen potentiellen neuen Modulator des Renin-Angiotensin-Systems repräsentiert.

7 Anhang

7.1 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Alexander LM: Hypertension within the cardiovascular disease risk paradigm. *Jaapa Suppl Hypertension*:3-8, 2007
2. Bricker LA, Greydanus DE: The metabolic syndrome: a gathering challenge in a time of abundance. *Adolesc Med State Art Rev* 19:475-497, ix, 2008
3. Sakihara S: [Current diagnosis of secondary hypertension associated with the endocrinopathies]. *Rinsho Byori* 56:1112-1117, 2008
4. Chiong JR, Aronow WS, Khan IA, Nair CK, Vijayaraghavan K, Dart RA, Behrenbeck TR, Geraci SA: Secondary hypertension: current diagnosis and treatment. *Int J Cardiol* 124:6-21, 2008
5. Herold: Innere Medizin, S. 268, 2007
6. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F: Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14:525-531, 2005
7. Fort J: Chronic renal failure: a cardiovascular risk factor. *Kidney Int Suppl*:S25-29, 2005
8. Nangaku M, Fujita T: Activation of the renin-angiotensin system and chronic hypoxia of the kidney. *Hypertens Res* 31:175-184, 2008
9. Basi S, Lewis JB: Microalbuminuria as a target to improve cardiovascular and renal outcomes. *Am J Kidney Dis* 47:927-946, 2006
10. Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D: Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 6 Suppl 2:S336-343, 1984
11. Jankowski V, Tolle M, Vanholder R, Schonfelder G, van der Giet M, Henning L, Schluter H, Paul M, Zidek W, Jankowski J: Uridine adenosine tetraphosphate: a novel endothelium- derived vasoconstrictive factor. *Nat Med* 11:223-227, 2005
12. Tolle M, Jankowski V, Schuchardt M, Wiedon A, Huang T, Hub F, Kowalska J, Jemielity J, Guranowski A, Loddenkemper C, Zidek W, Jankowski J, van der Giet M:

- Adenosine 5'-tetraphosphate is a highly potent purinergic endothelium-derived vasoconstrictor. *Circ Res* 103:1100-1108, 2008
13. Schmidt: Das Endothel: Zentraler Modulator vaskulärer Funktionen. *Physiologie des Menschen*:S. 651, 2007
 14. Baylis C: Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol* 2:209-220, 2006
 15. Bian K, Doursout MF, Murad F: Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 10:304-310, 2008
 16. Passauer J, Pistrosch F, Bussemaker E, Lassig G, Herbrig K, Gross P: Reduced agonist-induced endothelium-dependent vasodilation in uremia is attributable to an impairment of vascular nitric oxide. *J Am Soc Nephrol* 16:959-965, 2005
 17. Mallamaci F, Tripepi G, Cutrupi S, Malatino LS, Zoccali C: Prognostic value of combined use of biomarkers of inflammation, endothelial dysfunction, and myocardial pathology in patients with ESRD. *Kidney Int* 67:2330-2337, 2005
 18. Konidala S, Gutterman DD: Coronary vasospasm and the regulation of coronary blood flow. *Prog Cardiovasc Dis* 46:349-373, 2004
 19. Cai H, Griendling KK, Harrison DG: The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 24:471-478, 2003
 20. Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM: Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83:952-959, 1998
 21. Rueckschloss U, Duerschmidt N, Morawietz H: NADPH oxidase in endothelial cells: impact on atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 5:171-180, 2003
 22. Kim JA, Berliner JA, Nadler JL: Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 226:862-868, 1996
 23. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97:1916-1923, 1996
 24. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG: Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 95:588-593, 1997

25. Berger NA: Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res* 101:4-15, 1985
26. Watson AJ, Askew JN, Benson RS: Poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase inhibition prevents necrosis induced by H₂O₂ but not apoptosis. *Gastroenterology* 109:472-482, 1995
27. Strawn WB, Chappell MC, Dean RH, Kivlighn S, Ferrario CM: Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation* 101:1586-1593, 2000
28. Ferrario CM: Use of angiotensin II receptor blockers in animal models of atherosclerosis. *Am J Hypertens* 15:9S-13S, 2002
29. Halkin A, Keren G: Potential indications for angiotensin-converting enzyme inhibitors in atherosclerotic vascular disease. *Am J Med* 112:126-134, 2002
30. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G: Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 342:145-153, 2000
31. Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H: Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 359:995-1003, 2002
32. Yamamoto H, Tsuruoka S, Ioka T, Ando H, Ito C, Akimoto T, Fujimura A, Asano Y, Kusano E: Indoxyl sulfate stimulates proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 69:1780-1785, 2006
33. Dou L, Jourde-Chiche N, Faure V, Cerini C, Berland Y, Dignat-George F, Brunet P: The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J Thromb Haemost* 5:1302-1308, 2007
34. Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK: Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 62:749-756, 1988
35. Berk BC: Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* 81:999-1030, 2001
36. Erlinge D: Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol* 31:1-8, 1998

37. Vanholder R, Van Laecke S, Glorieux G: What is new in uremic toxicity? *Pediatr Nephrol* 23:1211-1221, 2008
38. Mezzano SA, Aros CA, Droguett A, Burgos ME, Ardiles LG, Flores CA, Carpio D, Vio CP, Ruiz-Ortega M, Egido J: Renal angiotensin II up-regulation and myofibroblast activation in human membranous nephropathy. *Kidney Int Suppl*:S39-45, 2003
39. Thomas WG, Brandenburger Y, Autelitano DJ, Pham T, Qian H, Hannan RD: Adenoviral-directed expression of the type 1A angiotensin receptor promotes cardiomyocyte hypertrophy via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Circ Res* 90:135-142, 2002
40. Shah BH, Catt KJ: A central role of EGF receptor transactivation in angiotensin II - induced cardiac hypertrophy. *Trends Pharmacol Sci* 24:239-244, 2003
41. Keidar S, Kaplan M, Gamliel-Lazarovich A: ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1-7). *Cardiovasc Res* 73:463-469, 2007
42. Jankowski V, Vanholder R, van der Giet M, Tolle M, Karadogan S, Gobom J, Furkert J, Oksche A, Krause E, Tran TN, Tepel M, Schuchardt M, Schluter H, Wiedon A, Beyermann M, Bader M, Todiras M, Zidek W, Jankowski J: Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:297-302, 2007
43. Ridker PM, Gaboury CL, Conlin PR, Seely EW, Williams GH, Vaughan DE: Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II. Evidence of a potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function. *Circulation* 87:1969-1973, 1993
44. Chu KY, Leung PS: Angiotensin II in type 2 diabetes mellitus. *Curr Protein Pept Sci* 10:75-84, 2009
45. Yanagitani Y, Rakugi H, Okamura A, Moriguchi K, Takiuchi S, Ohishi M, Suzuki K, Higaki J, Ogihara T: Angiotensin II type 1 receptor-mediated peroxide production in human macrophages. *Hypertension* 33:335-339, 1999
46. Ardaillou R, Chansel D: Synthesis and effects of active fragments of angiotensin II. *Kidney Int* 52:1458-1468, 1997
47. Yamamoto Y, Yamamguchi T, Shimamura M, Hazato T: Angiotensin III is a new chemoattractant for polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 193:1038-1043, 1993

48. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Egido J: Angiotensin III increases MCP-1 and activates NF-kappaB and AP-1 in cultured mesangial and mononuclear cells. *Kidney Int* 57:2285-2298, 2000
49. Ruiz-Ortega M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, Lorenzo O, Plaza JJ, Egido J: Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis. *J Immunol* 161:430-439, 1998
50. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Mezzano S, Egido J: Renin-angiotensin system and renal damage: emerging data on angiotensin II as a proinflammatory mediator. *Contrib Nephrol*:123-137, 2001
51. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Egido J: Angiotensin III up-regulates genes involved in kidney damage in mesangial cells and renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int Suppl* 68:S41-45, 1998
52. Miller-Wing AV, Hanesworth JM, Sardinia MF, Hall KL, Wright JW, Speth RC, Grove KL, Harding JW: Central angiotensin IV binding sites: distribution and specificity in guinea pig brain. *J Pharmacol Exp Ther* 266:1718-1726, 1993
53. Kerins DM, Hao Q, Vaughan DE: Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV. *J Clin Invest* 96:2515-2520, 1995
54. Wright JW, Miller-Wing AV, Shaffer MJ, Higginson C, Wright DE, Hanesworth JM, Harding JW: Angiotensin II(3-8) (ANG IV) hippocampal binding: potential role in the facilitation of memory. *Brain Res Bull* 32:497-502, 1993
55. Haberl RL, Decker PJ, Einhaupl KM: Angiotensin degradation products mediate endothelium-dependent dilation of rabbit brain arterioles. *Circ Res* 68:1621-1627, 1991
56. Gard PR: Cognitive-enhancing effects of angiotensin IV. *BMC Neurosci* 9 Suppl 2:S15, 2008
57. Pawlikowski M, Melen-Mucha G, Mucha S: The involvement of angiotensins in the control of prostatic epithelial cell proliferation in the rat. *Folia Histochem Cytobiol* 39:341-343, 2001
58. Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA, Albiston AL: The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci* 61:2728-2737, 2004

59. Ruiz-Ortega M, Esteban V, Egido J: The regulation of the inflammatory response through nuclear factor-kappaB pathway by angiotensin IV extends the role of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med* 17:19-25, 2007
60. Savoia C, Schiffrin EL: Inflammation in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15:152-158, 2006
61. Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FA, Simpson RJ, Connolly LM, Chai SY: Evidence that the angiotensin IV (AT₄) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* 276:48623-48626, 2001
62. Lew RA, Mustafa T, Ye S, McDowall SG, Chai SY, Albiston AL: Angiotensin AT₄ ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP). *J Neurochem* 86:344-350, 2003
63. Fyhrquist F, Saijonmaa O: Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 264:224-236, 2008
64. Lochard N, Thibault G, Silversides DW, Touyz RM, Reudelhuber TL: Chronic production of angiotensin IV in the brain leads to hypertension that is reversible with an angiotensin II AT₁ receptor antagonist. *Circ Res* 94:1451-1457, 2004
65. Wright JW, Krebs LT, Stobb JW, Harding JW: The angiotensin IV system: functional implications. *Front Neuroendocrinol* 16:23-52, 1995
66. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S: A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 87:E1-9, 2000
67. Li N, Zimpelmann J, Cheng K, Wilkins JA, Burns KD: The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1-7 by rat proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F353-362, 2005
68. Bolli R: Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation* 82:723-738, 1990
69. Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM: Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension* 49:185-192, 2007

70. Andrzejczak D: [Angiotensin (1-7): a new link in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS)]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 63:23-29, 2009
71. Jalil JE, Palomera C, Ocaranza MP, Godoy I, Roman M, Chiong M, Lavandero S: Levels of plasma angiotensin-(1-7) in patients with hypertension who have the angiotensin-I-converting enzyme deletion/deletion genotype. *Am J Cardiol* 92:749-751, 2003
72. Carey RM: Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: the AT2 receptor comes of age. *Hypertension* 45:840-844, 2005
73. Berry C, Touyz R, Dominiczak AF, Webb RC, Johns DG: Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H2337-2365, 2001
74. Haithcock D, Jiao H, Cui XL, Hopfer U, Douglas JG: Renal proximal tubular AT2 receptor: signaling and transport. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11:S69-74, 1999
75. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, Gembardt F, Kellett E, Martini L, Vanderheyden P, Schultheiss HP, Walther T: G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* 111:1806-1813, 2005
76. Dahl LK, Knudsen KD, Iwai J: Humoral transmission of hypertension: evidence from parabiosis. *Circ Res* 24:Suppl:21-33, 1969
77. Dolan JW, Lommen DC, Snyder LR: DryLab computer simulation for high-performance liquid chromatographic method development. II. Gradient elution. *J Chromatogr* 485:91-112, 1989
78. Lottspeich E: Chromatographische Trennmethoden. *Bioanalytik*, S. 215, 2006
79. Hofbauer KG, Zschiedrich H, Rauh W, Gross F: Conversion of angiotensin I into angiotensin II in the isolated perfused rat kidney. *Clin Sci* 44:447-456, 1973
80. Gobom J, Schuerenberg M, Mueller M, Theiss D, Lehrach H, Nordhoff E: Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics. *Anal Chem* 73:434-438, 2001
81. Beyermann M, Fechner K, Furkert J, Krause E, Bienert M: A single-point slight alteration set as a tool for structure-activity relationship studies of ovine corticotropin releasing factor. *J Med Chem* 39:3324-3330, 1996

82. Walther T, Balschun D, Voigt JP, Fink H, Zuschratter W, Birchmeier C, Ganten D, Bader M: Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J Biol Chem* 273:11867-11873, 1998
83. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T: Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8258-8263, 2003
84. Pinheiro SV, Simoes e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, Pesquero JB, Walther T, Alenina N, Bader M, Bleich M, Santos RA: Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension* 44:490-496, 2004
85. Pesquero JB, Lindsey CJ, Zeh K, Paiva AC, Ganten D, Bader M: Molecular structure and expression of rat bradykinin B2 receptor gene. Evidence for alternative splicing. *J Biol Chem* 269:26920-26925, 1994
86. McLennan AG: Dinucleoside polyphosphates-friend or foe? *Pharmacol Ther* 87:73-89, 2000
87. Jin M, Wilhelm MJ, Lang RE, Unger T, Lindpaintner K, Ganten D: Endogenous tissue renin-angiotensin systems. From molecular biology to therapy. *Am J Med* 84:28-36, 1988
88. Kumar R, Singh VP, Baker KM: The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab* 18:208-214, 2007
89. Szczepanska-Konkel M, Jankowski M, Stiepanow-Trzeciak A, Angielski S: Effects of diadenosine polyphosphates on glomerular volume. *Br J Pharmacol* 144:1109-1117, 2005
90. Steinmetz M, Schlatter E, Boudier HA, Rahn KH, De Mey JG: Diadenosine polyphosphates cause contraction and relaxation in isolated rat resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 294:1175-1181, 2000
91. Luo J, Jankowski J, Knobloch M, Van der Giet M, Gardanis K, Russ T, Vahlensieck U, Neumann J, Schmitz W, Tepel M, Deng MC, Zidek W, Schluter H: Identification and characterization of diadenosine 5',5'''-P₁P₂-diphosphate and diadenosine 5',5'''-P₁P₃-triphosphate in human myocardial tissue. *Faseb J* 13:695-705, 1999

92. Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M: Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 45:711-719, 1986
93. Chappell MC, Modrall JG, Diz DI, Ferrario CM: Novel aspects of the renal renin-angiotensin system: angiotensin-(1-7), ACE2 and blood pressure regulation. *Contrib Nephrol* 143:77-89, 2004
94. Chappell MC: Emerging evidence for a functional angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-MAS receptor axis: more than regulation of blood pressure? *Hypertension* 50:596-599, 2007
95. Jackson TR, Blair LA, Marshall J, Goedert M, Hanley MR: The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* 335:437-440, 1988
96. 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* 1133:107-111, 1991
97. Ardaillou R: Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11:S30-39, 1999
98. Walther T, Wessel N, Kang N, Sander A, Tschöpe C, Malberg H, Bader M, Voss A: Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene. *Braz J Med Biol Res* 33:1-9, 2000
99. 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* 289:H1560-1566, 2005
100. Sampaio WO, Henrique de Castro C, Santos RA, Schiffrin EL, Touyz RM: Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension* 50:1093-1098, 2007
101. Santos RA, Ferreira AJ, Simoes ESAC: Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol* 93:519-527, 2008
102. Nagata S, Kato J, Sasaki K, Minamino N, Eto T, Kitamura K: Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system. *Biochem Biophys Res Commun* 350:1026-1031, 2006
103. Parving HH, Lehnert H, Brochner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P: The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 345:870-878, 2001

104. Epstein BJ, Gums JG: Angiotensin receptor blockers versus ACE inhibitors: prevention of death and myocardial infarction in high-risk populations. *Ann Pharmacother* 39:470-480, 2005
105. Verma S, Strauss M: Angiotensin receptor blockers and myocardial infarction. *Bmj* 329:1248-1249, 2004
106. Chao J, Chao L: Kallikrein-kinin in stroke, cardiovascular and renal disease. *Exp Physiol* 90:291-298, 2005
107. Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Kober L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM: Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med* 349:1893-1906, 2003
108. Roig E, Perez-Villa F, Morales M, Jimenez W, Orus J, Heras M, Sanz G: Clinical implications of increased plasma angiotensin II despite ACE inhibitor therapy in patients with congestive heart failure. *Eur Heart J* 21:53-57, 2000
109. Mann JF, Schmieder RE, McQueen M, Dyal L, Schumacher H, Pogue J, Wang X, Maggioni A, Budaj A, Chaithiraphan S, Dickstein K, Keltai M, Metsarinne K, Oto A, Parkhomenko A, Piegas LS, Svendsen TL, Teo KK, Yusuf S: Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet* 372:547-553, 2008
110. Yusuf S, Teo KK, Pogue J, Dyal L, Copland I, Schumacher H, Dagenais G, Sleight P, Anderson C: Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med* 358:1547-1559, 2008
111. Wolf G, Ritz E: Combination therapy with ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers to halt progression of chronic renal disease: pathophysiology and indications. *Kidney Int* 67:799-812, 2005

7.2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Aminosäuresequenzen der Angiotensin-Peptide	12
Tabelle 2:	Funktion der Ang-II-Rezeptoren AT ₁ und AT ₂	13
Tabelle 3:	Klinische Daten der Testpersonen bei der Bestimmung der Angioprotektin- und Ang-II-Plasmakonzentrationen	38

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Übersicht über die Arbeitsschritte	20
Abbildung 2:	Größenausschluss-Chromatogramm	27
Abbildung 3:	Reversed-Phase-Chromatogramm	28
Abbildung 4:	MALDI-TOF-Massenspektrum	29
Abbildung 5:	MALDI-TOF/TOF-Fragmentspektrum	30
Abbildung 6:	Angioprotektin-Effekt an Ang-II-vorkontrahierten, isolierten Aortenringen der Ratte	31
Abbildung 7:	Immunhistochemische Fluoreszenzbilder von Endothelzellen der Maus nach Inkubation mit markiertem Ang-II und Angioprotektin	33
Abbildung 8:	Affinität des Angioprotektins zum Mas-Rezeptor	35
Abbildung 9:	Ang-(1-7)- und Angioprotektin-induzierte NO-Freisetzung aus CHO	36
Abbildung 10:	Vergleich von Ang-II- und Angioprotektin-Plasmakonzentrationen bei CRF-Patienten und gesunden Kontrollpersonen	37
Abbildung 11:	Angioprotektin- und Ang-II-Quantifizierung mittels eines enzymatischen Immunoassays	38
Abbildung 12:	Vergleich der Strukturformeln von Ang-II, Ang-A und Angioprotektin	45
Abbildung 13:	Einfluss von ACE-Hemmern und AT ₁ -Antagonisten am Beispiel des Mas-Agonisten Ang-(1-7)	47

7.3 Abkürzungen

ACE	Angiotensin converting enzyme
ACN	Azetonitril
ADH	Antidiuretisches Hormon
Ang, AT	Angiotensin
ATP	Adenosintriphosphat
AU	relative Intensität
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CaCl	Kalziumchlorid
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
CHO	Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters
Da	Dalton
eNOS	endotheliale NO-Synthetase
g	Erdschwerebeschleunigung
HPLC	High performance liquid chromatography
IRAP	Insulin-regulierte Aminopeptidase
K ₂ -EDTA	Kalium-Ethylendiamintetraessigsäure
LDL	Low Density Lipoprotein
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption / Ionisation
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MS	Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
RAS	Renin-Angiotensin-System
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time of Flight

7.4 Lebenslauf

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

7.5 Publikationsliste

- 03/2008 Jankowski V, Patzak A, Herget-Rosenthal S, Tran TN, Lay EY, Günthner T, Buschmann I, Zidek W, Jankowski J. Uridine adenosine tetra-phosphate acts as an autocrine hormone affecting glomerular filtration rate. *Journal of Molecular Medicine* 2008 Mar;86(3):333-40.
- 08/2008 Yegutkin GG, Jankowski J, Jalkanen S, Günthner T, Zidek W, Jankowski V. Dinucleotide polyphosphates contribute to purinergic signalling via inhibition of adenylate kinase activity. *Bioscience Reports* 2008 Aug;28(4):189-94.
- 08/2008 Jankowski J, Günthner T. Does an apple a day put hypertension in play? *Kidney International* 2008 Aug;74(4):409-10.
- 07/2009 Günthner T, Jankowski V, Kretschmer A, Nierhaus M, van der Giet M, Zidek W, Jankowski J. Endothelium & vascular smooth muscle cells in the context of uremia. *Seminars in Dialysis* 2009 Jul-Aug; 22(4):428-32
- 07/2009 Jankowski V, Günthner T, Zidek W, Jankowski J. Dinucleoside poly-phosphates and uremia. *Seminars in Dialysis* 2009 Jul-Aug;22(4):396-9
- in Revision Jankowski V, Tölle M, Santos R, Günthner T, Krause E, Zidek W, Jankowski J. Angioprotectin: An Ang-II like peptide causing vasodilatory effects. *Nature*
- in Revision Brettschneider F, Günthner T, Salem S, Nierhaus M, Schulz A, Jankowski V, Zidek W, Jankowski J. Replacement of acetonitrile as solvent in reversed phase chromatography. *Journal of Chromatography*

7.6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim Jankowski, der mich bei meiner Arbeit beraten und betreut hat. Seine kompetente Anleitung war für mich von großem Wert.

Ebenso möchte ich Frau Dr. Vera Jankowski aufrichtig danken für ihre ermutigenden Worte und ihre Expertise, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Walter Zidek danke ich, dass es mir ermöglicht wurde, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung an der Charité anzufertigen.

Herrn Prof. Robson Santos und seinem Team danke ich, wie auch Herrn Prof. Markus van der Giet und seinem Team, für die Bereitstellung der Ergebnisse des Bioassays 2 und der Rezeptor-Charakterisierungsversuche (Kap. 4.7 und 4.8).

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Joachim Jankowski für die Unterstützung jeglicher Art und das gute Arbeitsklima.

Mein tiefster Dank gilt meiner Mutter, deren unentwegte Teilnahme, Motivation und Unterstützung essentiell waren, sowohl im Verlauf dieser Arbeit als auch während meiner gesamten beruflichen Ausbildung.

Die Arbeit wurde gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (NGFN/01GR0807), von der Sonnenfeld-Stiftung sowie von der Rahel-Hirsch-Stiftung.

7.7 Erklärung

„Ich, Thomas Günthner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema *„Angioprotektin: Ein vasoprotektives Angiotensin-Peptid“* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Thomas Günthner

Berlin, 11. Juni 2009