

Aus der medizinischen Klinik mit dem Schwerpunkt für Nephrologie und Endokrinologie

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Isolierung und Identifizierung vasomodulierender Biomoleküle
aus bovinen Nebennieren“

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Silvia Salem

Berlin

- Gutachter:
1. Prof. Dr. rer. nat. J. Jankowski
 2. Prof. Dr. med. K. Kisters
 3. Priv.-Doz. Dr. med. S. Herget-Rosenthal

Datum der Promotion: 30. 11. 2012

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. <i>Einleitung</i> | 1 |
| 1.1. Arteriosklerose..... | 1 |
| 1.2. Pathogenese der Arteriosklerose | 1 |
| 1.3. Lokalisation der Arteriosklerose..... | 3 |
| 1.4. Risikofaktoren der Arteriosklerose | 4 |
| 1.4.1. Adipositas, Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie | 4 |
| 1.4.2. Männliches Geschlecht, Alter, Lebensweise | 5 |
| 1.4.3. Genetische Faktoren..... | 5 |
| 1.4.4. Arterielle Hypertonie..... | 6 |
| 1.4.4.1. Renin-Angiotensin-System..... | 6 |
| 1.4.5. Diabetes mellitus..... | 7 |
| 1.4.6. Chronische Niereninsuffizienz..... | 8 |
| 1.4.7. Nebenniere als endokrines Organ..... | 9 |
| 2. <i>Zielsetzung der Arbeit</i> | 12 |
| 3. <i>Material und Methoden</i> | 13 |
| 3.1. Geräte..... | 13 |
| 3.2. Puffer und Chemikalien | 14 |
| 3.3. Versuchstiere..... | 15 |
| 3.4. Methodik, allgemeiner Teil..... | 16 |
| 3.4.1. Chromatographische Methoden..... | 16 |
| 3.4.1.1. Ionenaustausch-Chromatographie..... | 17 |
| 3.4.1.1.a. Anionenaustausch-Chromatographie | 17 |
| 3.4.1.1.b. Kationenaustausch-Chromatographie | 17 |
| 3.4.1.2. Reversed-Phase-Chromatographie | 18 |
| 3.4.2. Molekulare Massenbestimmung mittels MALDI-Massenspektrometrie | 18 |
| 3.4.2.1. MALDI-LIFT-TOF/TOF-Tandem-Massenspektrometrie | 19 |
| 3.4.2.2. Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie | 20 |
| 3.4.2.3. Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie | 20 |
| 3.5. Spezieller Teil 1 | 21 |
| 3.5.1. Übersicht..... | 21 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.5.2. | Mechanische Desintegration | 23 |
| 3.5.3. | Extraktion | 24 |
| 3.5.4. | Präparative Reversed-Phase-Chromatographie | 24 |
| 3.5.5. | Anionenaustausch-Chromatographie | 25 |
| 3.5.6. | Kationenaustausch-Chromatographie | 25 |
| 3.5.7. | Reversed-Phase-Chromatographie | 26 |
| 3.5.8. | Reversed-Phase-Chromatographie, Lineargradient | 27 |
| 3.5.9. | Kalzifizierungsbioassay an den Aortensegmenten | 28 |
| 3.5.10. | Kalziumquantifizierung | 28 |
| 3.5.11. | MALDI-Massenspektrometrie | 29 |
| 3.5.12. | MALDI-LIFT-TOF/TOF-Tandem-Massenspektrometrie | 29 |
| 3.5.13. | Peptidsynthese | 29 |
| 3.5.14. | Histochemische und immunohistochemische Analyse | 30 |
| 3.5.15. | Plasma-Aufbereitung | 30 |
| 3.5.16. | Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie | 31 |
| 3.6. | Spezieller Teil 2 | 32 |
| 3.6.1. | Übersicht | 32 |
| 3.6.2. | Mechanische Desintegration und Extraktion | 34 |
| 3.6.3. | Chromatographische Aufarbeitung | 34 |
| 3.6.4. | Bioassay der isoliert-perfundierten Rattenniere | 35 |
| 3.6.5. | Isolierung der Rattenniere | 35 |
| 3.6.6. | Bioassay der isoliert- perfundierten Rattenniere | 35 |
| 3.6.7. | Massenspektrometrische Analyse | 37 |
| 3.6.8. | Peptidsynthese | 37 |
| 3.6.9. | Plasma-Aufbereitung | 37 |
| 3.6.10. | Bioassay der isoliert- perfundierten Rattenniere | 37 |
| 3.6.11. | Untersuchungen des zugrunde liegenden Pathways | 37 |
| 3.7. | Spezieller Teil 3 | 38 |
| 4. | <i>Ergebnisse</i> | 39 |
| 4.1. | Ergebnisse, Teil 1 | 39 |
| 4.1.1. | Probenaufbereitung aus der bovinen Nebenniere | 39 |

| | | |
|----------|---|----|
| 4.1.2. | Reversed-Phase-Chromatographie..... | 39 |
| 4.1.3. | Kalzifizierungsbioassay an den Aortensegmenten..... | 40 |
| 4.1.4. | Kalzifizierungsbestimmung | 40 |
| 4.1.5. | Anionenaustausch-Chromatographie..... | 40 |
| 4.1.6. | Reversed-Phase-Chromatographie, Lineargradient..... | 41 |
| 4.1.7. | MALDI-Massenspektrometrie..... | 42 |
| 4.1.8. | Peptidsynthese..... | 44 |
| 4.1.9. | Kalzifizierungsbioassay an den Aortensegmenten..... | 44 |
| 4.1.10. | Kalzifizierungsbestimmung | 44 |
| 4.1.11. | Histochemische und immunohistochemische Analyses | 45 |
| 4.2. | Extraktion aus dem humanen Plasma | 47 |
| 4.2.1. | Reversed-Phase-Chromatographie..... | 47 |
| 4.2.2. | Elektrospray-Ionisations-Massenpektrometrie | 48 |
| 4.2.3. | Peptidsynthese..... | 50 |
| 4.2.4. | Plasmakonzentrationsuntersuchungen des CBF | 50 |
| 4.3. | Ergebnisse, Teil 2..... | 51 |
| 4.3.1. | Nebenniere..... | 51 |
| 4.3.2. | Reversed-Phase-Chromatographie..... | 51 |
| 4.3.3. | Bioassay an der isoliert-perfundierten Rattenniere | 52 |
| 4.3.4. | Anionenaustausch-Chromatographie | 52 |
| 4.3.5. | Reversed-Phase-Chromatographie, Lineargradient..... | 53 |
| 4.3.6. | Massenspektrometrie | 54 |
| 4.3.6.1. | MALDI - Massenspektrometrie..... | 54 |
| 4.3.6.2. | Elektrospray-Ionisations-Massenpektrometrie | 58 |
| 4.3.7. | Peptidsynthese..... | 58 |
| 4.3.8. | Bioassay an der isoliert- perfundierten Rattenniere | 59 |
| 4.3.9. | Extraktion aus dem humanen Plasma..... | 60 |
| 4.3.10. | Reversed-Phase-Chromatographie | 60 |
| 4.3.11. | Elektrospray-Ionisations-Massenpektrometrie..... | 61 |
| 4.3.12. | Peptidsynthese | 64 |
| 4.3.13. | Bioassay an der isoliert-perfundierten Rattenniere | 64 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 4.3.14. | Einfluss des L-NAME auf die Wirkung des VIF..... | 65 |
| 4.3.15. | Plasmakonzentrationsuntersuchungen des VIF | 67 |
| 4.4. | Ergebnisse Teil 3..... | 68 |
| 4.4.1. | Bioassay an der isoliert-perfundierten Rattenniere | 68 |
| 4.4.2. | Kalzifizierungsbioassay an den Aortensegmenten..... | 68 |
| 4.4.3. | Kalzifizierungsbioassay..... | 68 |
| 4.4.4. | Histochemische und immunohistochemische Analyse..... | 69 |
| 5. | <i>Diskussion</i> | 71 |
| 5.1. | Vaskuläre Kalzifizierung und kardiovaskuläre Mortalität..... | 71 |
| 5.2. | Diskussion der Methodik..... | 72 |
| 5.3. | Chromogranin Peptide..... | 73 |
| 5.4. | Kalzifizierungsparameter | 74 |
| 5.5. | Cbfa1 | 76 |
| 5.6. | Bedeutung des Angiotensins | 77 |
| 5.7. | Klinische Bedeutung | 79 |
| 6. | <i>Zusammenfassung</i> | 80 |
| 6.1. | Ausblick | 81 |
| 7. | <i>Anhang</i> | 83 |
| 7.1. | Literatur- und Quellenverzeichnis | 83 |
| 7.2. | Tabellen- und Abbildungsverzeichnis | 92 |
| 7.2.1. | Tabellenverzeichnis | 92 |
| 7.2.2. | Abbildungsverzeichnis | 92 |
| 7.3. | Abkürzungen | 94 |
| 7.4. | Lebenslauf..... | 96 |
| 7.5. | Publikationsliste..... | 97 |
| 7.6. | Abstracts..... | 97 |
| 7.7. | Vorträge..... | 97 |
| 7.8. | Poster | 98 |
| 7.9. | Danksagung | 99 |
| 7.10. | Erklärung | 100 |

1. Einleitung

1.1. Arteriosklerose

Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen in Industrieländern zu den häufigsten Todesursachen. Es sind jedoch nur einige wenige Risikofaktoren bekannt, die zur Genese und Progression der kardiovaskulären Erkrankungen beitragen. Ein bekannter Risikofaktor ist die Arteriosklerose¹. Die Arteriosklerose beginnt in Form einer vaskulären Kalzifizierung und kommt häufig bei Hypertonie-, chronisch nierenkrankten und arteriosklerotischen Patienten vor². Die arteriosklerotischen Gefäße dieser Patientengruppen zeigen charakteristische Kalzifizierungsmerkmale wie Gefäßsteifigkeit, verminderte Dehnbarkeitsfähigkeit und verminderte Elastizität auf, verursacht durch die Gefäßverkalkung. Die Erkrankung entwickelt sich in der Regel schleichend und verläuft häufig jahrelang unbemerkt, bis sie durch einen Herzinfarkt, Schlaganfall, Nierenschäden, *Angina pectoris*, Thrombose und Ischämie manifest wird. Die Hyperphosphatämie und Hyperkalzämie fördern und beschleunigen den Kalzifizierungsprozess der Gefäße und damit das Voranschreiten der Arteriosklerose.

1.2. Pathogenese der Arteriosklerose

Es existieren zwei Theorien zur Entwicklung der Arteriosklerose:

- 1) die „*response to injury hypothesis*“, die sich aus der Lipidhypothese von Virchow und der Hypothese des chronischen Endothelschadens zusammensetzt
- 2) die „*lipoprotein induced arteriosclerosis hypothesis*“

Russel Ross entwickelte die *response to injury hypothesis*, die die Verletzung und den Entzündungsprozess des Endothels in den Gefäßen voraussetzt. Die Schädigung des Endothels kann durch verschiedene Faktoren wie erhöhte LDL Werte, freie Radikale (bei Rauchern), *Diabetes mellitus* und virale Infektionen verursacht werden. Unabhängig von der Schädigungsursache ist die Antwort auf die endotheliale Dysfunktion Gefäßverkalkung und Arteriosklerose^{3; 4}. Im Gegensatz zur antikoagulantischen Eigenschaft des gesunden Endothels, führt die Endotheldysfunktion zu Kompensationsmechanismen, die zur erhöhten Haftung der Leukozyten und Thrombozyten und zur Erhöhung der prokoagulantischen Eigenschaften des Endothels führen. Wenn der Entzündungsprozess nicht gestoppt werden

kann, wird die Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen in das Inflammationsgebiet stimuliert, sodass eine Teilläsion des Gefäßes entsteht. Im Weiteren kommt es zur Verdickung der Gefäßwand. Diese kann anfangs durch abgestufte Gefäßdilatation kompensiert werden, so dass die Gefäßverengung sich nicht klinisch bemerkbar macht⁵. Dieses Phänomen, vermittelt durch von Monozyten abgeleitete Makrophagen und spezielle T-Lymphozyten⁶, wird als „Remodulierung“ bezeichnet. Bei fortbestehender Inflammation wandern diese Makrophagen und Lymphozyten vermehrt aus dem Blut ein und vermehren sich in der Läsion⁷. Dort aktiviert, setzen sie hydrolytische Enzyme, Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren frei⁸. Dieser sich wiederholende Zyklus führt letztlich zur Vergrößerung und Umbau der Läsion bis hin zur Plaquebildung, welche in das Lumen hineinreicht und den Blutfluss stört³. Zeitlich begrenzte Verletzungen des Endothels sind reversibel.

Die *lipoprotein induced arteriosclerosis hypothesis* stammt von Joseph Leonard Goldstein⁹. Nach Goldstein ist die Schädigung des Endothels nur ein Teilschritt in der Entstehung der Arteriosklerose. Das Hauptaugenmerk liegt auf der Modifizierung der Lipoproteine niedriger Dichte, der „*low Density Lipoproteins*“, (LDL-Lipide). Es sind verschiedene Modifikationen des LDL bekannt, z.B. durch Oxidation oder Glykosilierung bei Diabetes⁹⁻¹²; ¹¹. Das LDL-Lipid ist eine wesentliche Ursache für die Verletzung des Endothels und die darunterliegende glatte Muskelschicht; dabei wird das oxidierte LDL-Lipid als schädlicher angesehen als das unmodifizierte LDL-Lipid. Das oxidierte LDL wird mittels sogenannter Scavengerrezeptoren internalisiert, die sich auf der Oberfläche der Makrophagen befinden^{10; 11; 13}. Das führt zur Bildung von Lipidperoxid und erleichtert die Ablagerung von Cholesterolester in den Läsionen¹⁴. Dieser Prozess bedingt die Bildung von Schaumzellen, die Erhöhung der Genexpression, die für die Bildung der Makrophagenkolonien^{15; 16; 17} und das Monozyten chemotaktische Protein¹⁸ verantwortlich sind. Die zunehmende Entzündungsreaktion äußert sich in Stimulation der Makrophagenreplikation und dem Einwandern dieser in die Läsionen. Durch den Inflammationsprozess wird die Bindung des LDL-Lipids an das Endothel und die glatten Muskelzellen erhöht und die Transkription des LDL-Rezeptor Gens gesteigert^{19; 20; 21}. Nach Bindung an Makrophagen durch die Scavengerrezeptoren induziert das modifizierte LDL seinerseits die Freisetzung der Entzündungsmediatoren. Der *circulus viciosus* zwischen diesen Mechanismen entsteht und treibt das Auftreten der Läsion voran.

Das oxidierte LDL konnte direkt in humanen Plaque-Läsionen nachgewiesen werden²². Antioxidanzien wirken diesem Prozess vornehmlich durch Inhibieren der LDL Oxidation oder Adhäsion der Monozyten entgegen²³.

1.3. Lokalisation der Arteriosklerose

Die Gefäßkalzifizierung wird in zwei Arten unterteilt. Die Intimakalzifizierung, häufig verursacht durch Entzündungsreaktionen und Endothelverletzungen²⁴ und die Mediakalzifizierung, die dem Ossifikationsprozess in den Knochen sehr ähnelt^{25; 26; 27}. Für das bessere Verständnis der Lokalisation der Gefäßschichten wird im Folgenden der Gefäßaufbau erklärt. Die arteriellen Gefäße bestehen aus drei Schichten; der *Tunica intima*, die das Gefäß von innen auskleidet und aus Endothelzellen besteht mit der *membrana elastica interna*, der *Tunica media*, die sich aus glatten Muskelzellen und elastischen Kollagenfasern zusammensetzt mit der *membrana elastica externa* und der *Adventitia*, die aus Bindegewebe besteht und in die kleine Blutgefäße und Gefäßnerven zur Blutversorgung und Innervation der großen Gefäße eingebettet sind.



- *Tunica intima*
- *Membrana elastica interna*
- *Tunica media*
- *Membrana elastica externa*
- *Blutgefäße in der Adventitia*
- *Adventitia*

Abbildung 1: Schichtenaufzeichnung der Blutgefäße

Bei der Arteriosklerose entwickeln sich Veränderungen vornehmlich in den ersten beiden Schichten: der *Intima* und der *Media*. Beiden Prozessen liegt eine unterschiedliche Pathophysiologie zugrunde²⁸.

Die klassische Atherosklerose ist definiert als Lipideinlagerung in der *Intima* oder *Subintima*. Dies führt zur Plaquebildung und folglich zur Einengung des Lumens und Ausdünnung der darunterliegenden *Media*^{29; 30}.

Die Kalzifizierung der *Media* findet primär in den *elastischen Lamina* und den glatten Muskelzellen der Mediaschicht statt^{31; 32; 33}. Bezeichnend für die Mediakalzifizierung ist, dass sie sich entweder im späteren Stadium der Intimakalzifizierung als Folgeerscheinung durch den Übergriff des Kalzifizierungsprozesses auf die glatte Muskulatur manifestiert oder aber unabhängig von der Anwesenheit der inflammatorischer Zellen und Lipidzellen, die für die Entwicklung der Intimakalzifizierung unentbehrlich sind, für sich alleine auftritt²⁸.

1.4. Risikofaktoren der Arteriosklerose

Obwohl die Pathogenese der Arteriosklerose bislang nicht gänzlich bekannt ist, sind jedoch Risikofaktoren, die zur Entstehung der Arteriosklerose wesentlich beitragen, bekannt. Diese werden im Folgenden näher beschrieben.

1.4.1. Adipositas, Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie

Adipositas ist ein Risikofaktor für die Entwicklung vieler Krankheiten wie *Diabetes mellitus* und kardiovaskuläre Erkrankungen³⁴. Vor allem zwischen der abdominellen Fettleibigkeit und der Arteriosklerose besteht ein starker Zusammenhang³⁵. Dies ist zurückzuführen auf den hohen Triglycerid-, erhöhte Apolipoprotein B- und *low-density lipoproteins* (LDL)-, erniedrigte *high-density lipoproteins* (HDL)- und Adeponektin-Spiegel^{35; 36}. Aktuelle Studien zeigen, dass erniedrigte HDL-Cholesterin-Spiegel das Fortschreiten der Arteriosklerose durch das Fördern des Entzündungsprozesses begünstigen³⁷. Erhöhte Triglyceridwerte weisen einen signifikanten Zusammenhang mit der Entwicklung von Arteriosklerose auf³⁸. Ein niedriger HDL-Cholesterin Spiegel ist der wichtigste Risikofaktor für Schlaganfall; auch bei gut eingestelltem LDL-Cholesterinspiegel³⁷. LDL-Cholesterin ist notwendig für die allgemeine Zellfunktion, zu hohe LDL-Cholesterin Spiegel jedoch führen zur Atheromenbildung³⁹. Der erste Schritt der Initiierung der Atheromenbildung durch endothelialer Dysfunktion wird durch das oxidierte LDL-Cholesterin verursacht³⁹. Apolipoprotein B (Apo B) ist ein valider Biomarker der Arteriosklerose, da jedes atherogene Partikel ein apoB-Molekül beinhaltet⁴⁰. Hohe Apolipoprotein-B-Spiegel zeigen folglich ein fortgeschrittenes Stadium der

Arteriosklerose an. Eine erhöhte abdominale Fettmenge erhöht die Synthese des Angiotensinogens und Angiotensin II, reduziert die Adiponektinkonzentration und aktiviert Entzündungsprozesse, die zur Entwicklung von Hypertonie und infolge zu Arteriosklerose führen³⁵. Adiponectin steht als Gegenspieler den proinflammatorischen Adipokinen gegenüber und ist bekannt für seine protektiven Eigenschaften in der Inhibition der Entwicklung der Arteriosklerose^{41; 42}. Erniedrigte Adiponectinspiegel scheinen für die erhöhte Arterioskleroseentwicklung bei den adipösen Patienten verantwortlich zu sein^{36,35}. Eine erhöhte Konzentration von Angiotensin II stimuliert die Expression proinflammatorischer Gene und erhöht dadurch die Entzündungsreaktion und den oxidativen Stress in den Gefäßwänden^{36; 43; 44} was zur Entwicklung der Arteriosklerose beiträgt.

1.4.2. Männliches Geschlecht, Alter, Lebensweise

Das männliche Geschlecht⁴⁵, hohes Alter⁴⁶ verbunden mit erhöhtem Stress, wenig Bewegung und Nikotinkonsum, zählen zu den klassischen Risikofaktoren zur Entwicklung der Arteriosklerose⁴⁷. Zu diesem Zweck wurde der mittlere Wert der Wanddicke der Aorta in verschiedenen Personengruppen mit den oben genannten Risikofaktoren mittels MRT gemessen. Die Wanddicke der Aorta korreliert mit dem Stadium der Arteriosklerose und ist ein heute übliches klinisches Verfahren zur Detektion der Arteriosklerose⁴⁸. Das Ergebnis dieser Studie zeigt, dass eine lineare Korrelation zwischen der mittleren Wanddicke der Aorta und dem Alter vorliegt^{48; 49; 50; 51}. Bei Männern ist die Wanddicke der Aorta gegenüber den Frauen erhöht^{48; 49; 50; 51}. Nikotinkonsum führt durch Beeinflussung diverser Faktoren, wie die Erniedrigung der HDL-Cholesterinwerte und Erhöhung der Fibrinogenkonzentration⁵², zum schnelleren und aggressiveren Progression der Arteriosklerose. Zusätzlich ist der Nikotinkonsum, verbunden mit viel Stress und mangelnder Bewegung, stark assoziiert mit der Entwicklung der Arteriosklerose⁵³.

1.4.3. Genetische Faktoren

Die Familienanamnese hat einen großen Einfluss in der Vorhersage vaskulärer Erkrankungen wie der Arteriosklerose. Neue Studien zeigen, dass dies an der Genexpression liegen könnte, die folgende Systeme kontrollieren: das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und die Endothelin- und NO-Synthase⁵⁴. Weitere Studien belegen, dass die Patienten mit famili-

ärer Prädisposition zur Entwicklung von Hypertonie, einem höheren Risiko Arteriosklerose zu entwickeln unterliegen⁵⁵, als Patienten mit negativer Anamnese betreffend die Hypertonie.

1.4.4. Arterielle Hypertonie

Als Hypertonie wird ein chronisch erhöhter Blutdruck im arteriellen System bezeichnet⁵⁶. Nach der Definition der *World Health Organisation* (WHO)⁵⁷ liegt Hypertonie vor, wenn der systolische Blutdruck höher als 139 mmHg und der diastolische Druck höher als 89 mmHg ist und wenn diese Werte bei mehr als zwei Messungen in Ruhe bestimmt werden. Stadium I liegt vor bei Werten für den systolischen Druck 139-179 mmHg und bei diastolischen Werten von 89-109 mmHg, Stadium II liegt vor bei systolischem Druck ≥ 180 mmHg und diastolischem Druck ≥ 110 mmHg. Wenn der systolische und diastolische Druck in verschiedene Stadien fallen, ist der Druck, der in das höhere Stadium fällt, ausschlaggebend⁵⁷. Die Hypertonie wird in zwei Formen unterteilt: in die primäre und sekundäre Hypertonie. An der sekundären Form der Hypertonie leiden 2% bis 5% der Hypertoniker. Als Ursache liegen hier Grundkrankheiten vor wie Nieren- oder Nebennierenerkrankungen⁵⁸, welche den prozentuell größten Anteil der Erkrankung bedingen, oder endokrine und kardiovaskuläre Erkrankungen⁵⁹. Primäre Hypertonie liegt vor, wenn sekundäre Hypertonie ausgeschlossen werden konnte, hierfür müssen als Ursache obengenannte vorliegende Grundleiden ausgeschlossen werden.

1.4.4.1. Renin-Angiotensin-System

Der Tonus der Gefäße wird vorwiegend durch die Balance zwischen Herzauswurfvolumen und peripherem Widerstand bestimmt. Bei Patienten mit essentieller Hypertonie ist überwiegend das Herzauswurfvolumen regulär, jedoch ist der periphere Widerstand erhöht⁵⁶. Der periphere Widerstand wird durch Arteriolen, die in ihren Wänden glatte Muskulatur enthalten, bestimmt⁵⁶. Die Konstriktion der glatten Muskulatur steht mit der intrazellulären Kalziumkonzentration Zusammenhang. Chronische Konstriktion jedoch scheint die Struktur der Gefäßwände zu verändern, was zu irreversibler Steigerung des peripheren Widerstandes führt und dadurch die Entwicklung der Hypertonie⁵⁶ begünstigt. Die Folge ist Gefäßwandumbau und Arteriosklerose.

Jüngste Studien zeigen, dass Hypertonie der potenteste Faktor in der Entwicklung der vaskulären Kalzifizierung ist. Hierbei haben zwei Faktoren eine Funktion: zum einen die mechanische Stimulation durch die Vasokonstriktion, zum anderen die humorale Stimulation⁶⁰. Dabei spielt vor allem Angiotensin II als einer der potentesten Vasokonstriktoren eine große Bedeutung. Der mechanische Stress, der auf die Gefäßwände ausgeübt wird, scheint die Expression der Entzündungsmediatoren zu induzieren^{61; 62; 63} und somit zur Umwandlung der Gefäßstruktur beizutragen; der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch nicht bekannt⁶⁰. Dieser Effekt, verursacht durch den mechanischen Stress, kommt durch alle Vasokonstriktoren zustande. Die humorale Stimulation des Angiotensin II ist hingegen speziell und in dieser Hinsicht viel wichtiger; es kommt zur vermehrten Produktion der reaktiven Sauerstoffradikale sowie zu erhöhten Expression der Entzündungsmediatoren^{64; 65}.

So wichtig das Renin-Angiotensin-System für die Hypertonie und die Gefäßmodulierung ist, da Patienten mit hohem Renin-Spiegel ein erhöhtes Risiko tragen, an kardiovaskulären Erkrankungen zu versterben^{66; 67; 68; 69; 70; 71}, haben Hypertoniker auch niedrige Renin-Blutspiegel⁵⁶. Somit kommt dem lokalen Renin-Angiotensin-System, das parakrin wirkt und in der Niere, dem Herzen und dem arteriellen Gefäßsystem aktiv ist, wichtige Bedeutung in der Regulation des Blutdruckes^{56; 67; 68; 69; 70; 71} und der Arteriosklerose zu. Da Patienten ohne erhöhten Reninspiegel verstärkt vaskuläre Kalzifizierung entwickeln, scheint auch hier einer der zugrundeliegenden Mechanismen der von Angiotensin II zu sein⁷². Dabei muss das systemische Angiotensin II gar nicht erhöht sein; lokal vermehrt exprimiertes Angiotensin II reicht, um einen pathologischen Effekt auf die Entwicklung der vaskulären Kalzifizierung zu haben⁶⁰.

1.4.5. Diabetes mellitus

Diabetiker haben ein erhöhtes Risiko kardiovaskuläre Erkrankungen zu entwickeln; dazu gehört auch die vaskuläre Kalzifizierung⁷³. Vor allem die Mediakalzifizierung gilt als charakteristisch für Diabetis. Diabetes ist mit mikro- und makro-vaskulären Veränderungen verbunden⁷⁴. Einer der Gründe für diese Veränderungen könnte die dem manifesten Diabetes vorangehende Phase der Hyperinsulinämie sein. Erhöhte Plasmainsulinspiegel erhöhen das Risiko der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen sowohl durch die direkte

Einwirkung auf die Gefäßwände⁷⁵, als auch durch den Beitrag zur Entwicklung der Hypertonie⁷⁶ und Hyperlipidämie⁷⁷, welche zu den wesentlichen Risikofaktoren der Arteriosklerose gehören⁷⁸.

1.4.6. Chronische Niereninsuffizienz

Chronisch niereninsuffiziente Patienten haben ein erhöhtes Risiko kardiovaskuläre Erkrankungen, verursacht durch voranschreitende Arteriosklerose, zu entwickeln⁷⁹. Von Niereninsuffizienz wird gesprochen, wenn eine Nierenschädigung mehr als drei Monate bestehen bleibt und wenn die GFR $< 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ vorliegt oder Anomalien, wie Proteinurie, Veränderung der Nierenstruktur bzw. veränderte Blutwerte nachgewiesen werden können^{80; 81}. In **Tabelle 1** werden die unterschiedlichen Stadien aufgezeigt und näher erklärt. Bei den chronisch niereninsuffizienten Patienten ist die vaskuläre Kalzifizierung eine sehr häufige Begleiterscheinung, die in dieser Patientengruppe vermehrt zu kardiovaskulären Erkrankungen und erhöhter Sterblichkeit führt. Die Ablagerung von Kalzium und Phosphat findet in Form von Hydroxyapatite statt und wird in Form von Mikrokalzifizierungen sichtbar⁸². Die Intimakalzifizierung ist bei den CKD-Patienten im frühen Stadium zu detektieren, wogegen die Mediakalzifizierung eher in dem fortgeschrittenen Stadium prävalent ist²⁴

Tabelle 1: Einteilung der Stadien der Niereninsuffizienz nach „Kidney Disease Outcomes Quality Initiative“⁸³

| Stadium | GFR (ml/min/1,73m ²) | Erklärung |
|---------|-------------------------------------|---|
| 1 | > 89 | Nierenkrankheit mit normaler oder erhöhter GFR |
| 2 | 60-89 | leichte Nierenfunktionseinschränkung mit milder Abnahme der GFR |
| 3 | 30-59 | mittlere Nierenfunktionseinschränkung mit moderater Abnahme der GFR |
| 4 | 15-29 | schwere Nierenfunktionseinschränkung mit massiver Abnahme der GFR |
| 5 | <15 | dialysepflichtiges Nierenversagen |

1.4.7. Nebenniere als endokrines Organ

Der Nebenniere, als Hormondrüse, kommt eine besondere Bedeutung für die Entwicklung und Regulierung der Arteriosklerose zu. Im Folgenden wird der Aufbau der Nebenniere beschrieben. Die Nebenniere ist eine paarige Hormondrüse, die sich auf dem oberen Pol beider Nieren befindet. Sie besteht aus zwei Teilen, dem Nebennierenmark und der Nebennierenrinde. Die Rinde besteht aus drei Schichten (**Abbildung 2**).

In der *Zona arcuata/glomerulosa* wird Aldosteron als Reaktion auf erhöhte Kalium- oder erniedrigte Natriumspiegel im Blut oder eine Minderdurchblutung der Niere gebildet. Aldosteron ist Teil des Renin-Angiotensin-Systems und reguliert die Kalium- und Natriumkonzentration. Störungen in diesem Bereich der Nebenniere führen zu Krankheitsbildern wie Hyperaldosteronismus^{84; 85}.

In der *Zona fasciculata* werden überwiegend Glukokortikoide (Kortisol) gebildet. Das adrenokortikotrope Hormon (ACTH), das in der Hypophyse gebildet wird, steuert die Bildung der Kortikoide; somit unterliegt die Hormonproduktion einem Regelkreislauf. Störungen in diesem Bereich der Nebenniere führen zu Krankheitsbildern wie *Morbus Cushing*⁸⁶.

Die *Zona reticularis* bildet vorwiegend Androgene. Die Androgene werden im Körper in das Geschlechtshormon Testosteron umgewandelt. Störungen in diesem Bereich der Nebenniere führen zu den Krankheitsbildern wie dem Adreno-Genitales-Syndrom⁸⁷.

Das Nebennierenmark besteht zum Teil aus modifizierten Nervenzellen und ist der Bildungsort für Adrenalin und Noradrenalin aus den Vorstufen L-Tyrosin und Dopamin. Diese Katecholamine werden bei Bedarf in das Blut sezerniert⁸⁸.

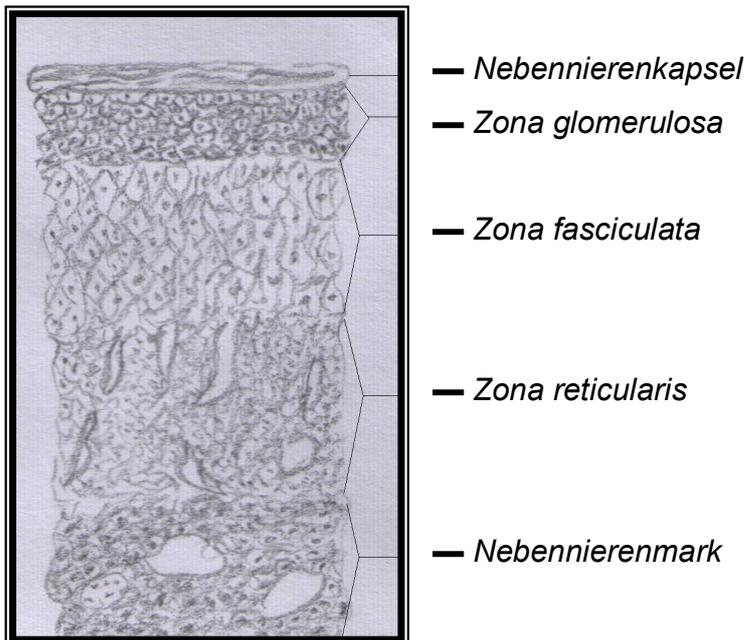


Abbildung 2: Schichtenaufzeichnung der Nebennierenrinde ⁸⁹

Zu den Grundleiden zählen einige Erkrankungen, die im Folgenden erläutert werden.

„Hyperaldosteronismus“ (*Conn-Syndrom*) ist durch vermehrte Ausschüttung des Aldosterons unabhängig vom Renin-Angiotensin-System definiert. Die dadurch resultierende vermehrte Salz- und Wasserretention ist für die Erhöhung des Blutdrucks ursächlich⁹⁰. Hyperaldosteronismus ist charakterisiert durch Hypokaliämie und Hybernatriämie. Die häufigste Ursache des primären Hyperaldosteronismus ist ein einseitiges Adenom der Niere⁹¹, in selteneren Fällen ist eine Nebennierenrindenhypertrophie die Ursache⁹². In einigen Fällen ist das Conn-Syndrom auf ein Nebennierenrindenzellkarzinom zurückzuführen^{93 85}. Erhöhte Aldosteronwerte aktivieren die Mineralokortikoidrezeptoren^{94; 95}. Dieser Prozess aktiviert die Initiierung der Expression von Osteopontin, Osteocalcin und Cbfa1-RUNX2⁹⁶, was zur Mineralisierung und Kalzifizierung der Gefäßwand führt. Somit begünstigen erhöhte Aldosteronwerte die Entwicklung der Arteriosklerose.

Bei renovaskulärer Hypertonie wird eine erhöhte Reninausschüttung der ischämischen Niere ausgelöst. Da die renalen Gefäße in 65% der Fälle durch Arteriosklerose beschädigt sind und die Niere in Folge nicht mehr ausreichend mit Blut perfundiert wird, kommt es zur erhöhten Reninausschüttung⁹⁷. Es kommt zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems,

das zur Blutdrucksteigerung und verbesserten Durchblutung der Niere führt^{97 98}. Die Folge ist die Entstehung der vaskulären Kalzifizierung, wie unter **Abschnitt 1.4.5.1** beschrieben.

Beim „*Morbus Cushing*“ spielt die Disbalance der Kortikoide eine wesentliche Rolle für den Blutdruckanstieg. Die Hypophyse produziert vermehrt Adenocorticotropes Hormon (ACTH), dadurch wird die Nebennierenrinde angeregt vermehrt Kortison zu produzieren. Die Symptome dieser Erkrankung sind unter anderem Gewichtszunahme, Osteoporose und Hypertonie⁹⁹. Osteoporose ist mit Gefäßkalzifizierung vergesellschaftet¹⁰⁰. Aktuelle Daten belegen, dass in den Kalzifizierungsprozess inhibierende und induzierende Biomoleküle involviert sind¹⁰¹. Störungen der Balance zwischen kalzifizierungsinduzierenden und –inhibierenden Biomolekülen können durch Verletzungen oder Erkrankungen verursacht werden und führen als Folge zur Kalzifizierungseinlagerungen in der Gefäßwand¹⁰¹. Synthetische Glukokortikoide wirken als induzierende Biomoleküle für die osteogenetische Differenzierung, und erhöhen die vaskuläre Kalzifizierung¹⁰².

2. Zielsetzung der Arbeit

Die Über- oder Unterfunktion der Nebenniere haben eine wesentliche Bedeutung für die Entwicklung der Arteriosklerose. Daher liegt die Vermutung nahe, dass bis jetzt nicht identifizierte Ursachen und Faktoren der Arteriosklerose ihren Ursprung in der Nebenniere haben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese entwickelt, dass noch nicht bekannte Faktoren in der Nebenniere gebildet werden, welche für die Entwicklung der Arteriosklerose, entweder durch fördernde oder inhibierende Eigenschaften, von essentieller Bedeutung sind.

Im ersten Schritt wurden unbekannte Biomoleküle aus der bovinen Nebenniere, die vasomodulierend oder –regulierend wirken, mittels HPLC-Methoden isoliert. Dafür notwendige Bioassays, wie die Inkubation der Aortenringe und die isolierte perfundierte Niere zum Nachweis der gesuchten Wirkung, wurden in Pilotversuchen etabliert.

Die vasoregulierend oder –modulierend wirkenden Biomoleküle wurden unter Anwendung der unterschiedlichen massenspektrometrischen Methoden identifiziert. Im Weiteren wurden diese Biomoleküle synthetisch hergestellt und weiter immunhistologisch untersucht. Als Abschluss wurden im Rahmen einer klinischen Studie Patienten rekrutiert und die neuen Biomoleküle im humanen Plasma mittels HPLC-Methoden und Massenspektrometrie nachgewiesen und quantifiziert. Als letztes wurden *in vivo* Versuche am Tiermodell durchgeführt.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist es, einen wissenschaftlichen Beitrag zu leisten, der zu neuen Erkenntnissen in der Pathogenese der Arteriosklerose führen kann.

3. *Material und Methoden*

3.1. *Geräte*

Analysewaage, AS120, Ohaus, USA

Aufarbeitungsanlage für HPLC-H₂O, Milli-Q, Water purification system, Millipore, Deutschland

Bad-/Umwälzthermostat, E 103, Lauda, Deutschland

Brückenverstärker TAM-D Typ 705/2 TM, Hugo Sachs, Deutschland

Beheizte Feuchtkammer, Typ 834/8 mit Luftblasenfalle, Hugo Sachs, Deutschland

Chromolith RP-18e, 100 mm x 4,6 mm, Firma Merck, Deutschland

Druckabnehmer ATP 300 TM, Hugo Sachs, Deutschland

Handgetridemühle

HPLC-Pumpe, BioLogic DuoFlow, Biorad, USA

Kraftaufnehmer, Fort25, World Precision Instruments, USA

Leitfähigkeitsmessgerät, LF 39, WTW, Deutschland

LiChroprep RP C18, 310 mm x 25 mm, Korngrösse 40-63 µm, Firma Merck

MALDI-Probenträger, MTP AnchorChip 400/384, Bruker Daltonics, Deutschland

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

Mikroskop

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

Registrierungseinheit, HSE-USB Data Acquisition Hardware, Hugo Sachs, Deutschland

Schlauchpumpe, REGLO Digital ISM 834/230 V, Ismatec, Deutschland

Superformance 16 Säule von 150 ml der Firma Merck, Innendurchmesser 30 cm x 1,6 cm, gestopft mit Fractogel EMP TMAE (M)

Superformance 16 Säule von 150 ml der Firma Merck, Innendurchmesser 30 cm x 1,6 cm, gestopft mit Fractogel EMP SO₃(M)

(Superdex™ Peptide, 10 mm x 300mm, Firma GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden

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

Ultra-Turrax 25 Rührstab

Vakuumentrifuge, SVC 100 H, Savant, USA

Zentrifuge, 3-E, Sigma-Aldrich, USA

Zentrifuge, 3200, Eppendorf, Deutschland

3.2. Puffer und Chemikalien

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

Alkalische Phosphatase (Promega)

Angiotensin II

α,β -Methyleneadenosin 5'-triphosphat

Acetonitril (Merck),

Beta Glycerolphosphat

Dihydroxybenzoesäure (DHB)

DMEM-Medium mit 1,8 mM Ca²⁺ und 0,9 mM PO₄³⁻

Glucose (Merck),

Heparin-Natrium 5.000 U/ml (Biochrom, Deutschland),

H₃PO₄

HCL

KCl (Roth),

KOH

K₂HPO₄

KH₂PO₄

Krebs-Henseleit-Lösung (137 mM NaCl, 1,1 mM, MgCl₃, 12 mM NaHCO₃, 2,7 mM KCl, 5,6 mM Glucose, 0,4 mM NaH₂PO₄, 2,4 mM CaCl₂),

Isofluran (FORENE[®], Abbott GmbH & Co. KG)

L-ascorbic acid

L-NAME

MgCl₂

NaOH

NaCl

NaHCO₃

NaH₂PO₄

Nuclear fast red solution

Perchlorsäure, 70%

Phentolamin

Reagent A für den Kalzium Kit: (aus O-Phthalic Acid, Polyvinyl Pyrrolidone, Methylthymol Blue, Hydroxyquinoline)

Reagent B den Kalzium Kit: (aus Sodium Sulfite, Monoethanolamine)

Saralasin

Sodium Thiosulfat

Suramin

Trifluoressigsäure

Urethan

3.3. Versuchstiere

In dem Bioassays wurden zur Organentnahme 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.

3.4. Methodik, allgemeiner Teil

3.4.1. Chromatographische Methoden

Chromatographische Methoden stellen physikalisch-chemische Trennmethode dar, bei denen Substanzgemische durch Gleichgewichtsstellungen zwischen zwei Phasen getrennt werden¹⁰³. Dabei wird zwischen der stationären (fest oder flüssig) und der mobilen (flüssig oder gasförmig) Phase unterschieden. Die mobile Phase enthält das zu trennende Substanzgemisch. Die Trennung des Substanzgemisches basiert auf physikalisch-chemischen Wechselwirkungen zwischen den beiden Phasen. Unterschiedliche Substanzen werden unterschiedlich stark an die stationäre Phase gebunden. Es resultiert eine unterschiedliche Verweildauer auf der stationären Phase, wodurch die zeitlich unterschiedliche Elution stattfindet. Bei der stationären Phase wird zwischen der Normal- und Umkehrphase (Reversed-Phase) unterschieden.

Bei der Normalphase ist die stationäre Phase polarer als die mobile Phase, bei der Umkehrphase hingegen ist die mobile Phase polarer als die stationäre. Unterschiedliche Methoden können zur Elution der retendierten Substanzen verwendet werden. Eine dieser Methoden ist die Gradientenelution, mit der eine hohe Auflösung/Trennleistung erzielt werden kann. Hierbei wird die Zusammensetzung der mobilen Phase während der chromatographischen Trennung stetig verändert. Die Auftrennung beginnt mit Substanzen geringer Bindungskraft zur stationären Phase und endet mit Substanzen mit starker Bindungskraft zur stationären Phase, d. h. dass im Verlauf der Chromatographie die Elutionskraft der mobilen Phase kontinuierlich gesteigert wird. Dadurch ist es möglich, Substanzen nach dem Grad ihrer Affinität zur stationären Phase differenziert zu trennen.

Im Gegensatz zur Gradientenelution bleibt die Zusammensetzung der mobilen Phase bei isokratischer Elution unverändert. Da nur eine geringe Auflösung des Substanzgemisches bei einer breiten und flachen Elution erfolgt, ist die Trennung komplexer Substanzgemische nicht möglich.

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Formen der chromatographischen Methoden beschrieben.

3.4.1.1. Ionenaustausch-Chromatographie

Die Grundlage der Ionenaustausch-Chromatographie ist die kompetitive Wechselwirkung geladener Ionen: die Probemoleküle konkurrieren mit Salzionen um die geladene Adsorptionsstelle der jeweiligen Matrix. Es wird zwischen der (a) Anionenaustausch-Chromatographie und (b) Kationenaustausch-Chromatographie unterschieden.

3.4.1.1.a. Anionenaustausch-Chromatographie

Bei der Anionenaustausch-Chromatographie sind kationische funktionelle Gruppen an polymeren Matrices einer stationären Phase gebunden. Diese binden anionische Substanzen der mobilen Phase an das Gelmaterial der Matrix. Die Probemoleküle werden auf die Matrix aufgetragen, die anionischen Probemoleküle verdrängen dabei die anionischen Substanzen von der Matrix. Bei der Elution werden gebundene Probemoleküle durch die Erhöhung der Anionenstärke in der mobilen Phase und durch den dadurch entstehenden Anionenüberschuss von der stationären Phase verdrängt. Dabei eluieren zuerst Substanzen mit geringerer Affinität zu den kationischen Gruppen der stationären Phase und anschließend die mit der stärksten Affinität zur Matrix.

3.4.1.1.b. Kationenaustausch-Chromatographie

Bei der Kationenaustausch-Chromatographie sind anionische Gruppen an die polymere Matrix der stationären Phase immobilisiert. Die kationischen Substanzen der mobilen Phase binden an den ionischen Gruppen des Gelmaterials. Die Probemoleküle werden auf die Matrix aufgetragen, kationische Probemoleküle verdrängen dabei kationische Substanzen von der Matrix.

Bei der Elution der Probemoleküle werden diese durch die Erhöhung der Kationenstärke in der mobilen Phase und durch den dadurch entstehenden Kationenüberschuss von der stationären Phase verdrängt. Dabei eluieren zunächst Substanzen mit geringerer Affinität zu den anionischen Gruppen der stationären Phase, zuletzt die mit der höchsten Affinität, da sie am stärksten an die Matrix binden.

3.4.1.2. *Reversed-Phase-Chromatographie*

Die Reversed-Phase-Chromatographie beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen des Analyten mit der unpolaren stationären Phase im polaren wässrigen Lösungsmittel¹⁰⁴. Dabei retendieren apolare und damit hydrophobe Substanzen an der stationären Phase, während hydrophile, stark polare Substanzen im Durchbruch eluieren. Ionische Probemoleküle können mit dem gegensätzlich geladenen organischen Ionen eines Ionenpaar-Reagens, ein nach außen neutral geladenes Ionenpaar bilden, das an der stationären Phase retendiert. Als Ionenpaarreagenz kann bei der Peptid-Analytik Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt werden. Je hydrophober die Substanz ist, desto länger wird sie von der stationären Phase retendiert. Dadurch entsteht je nach der Verweildauer auf der stationären Phase eine Abtrennung des Probenmaterials. Zur Elution hydrophober Substanzen wird häufig das organische Lösungsmittel Acetonitril eingesetzt.

3.4.2. *Molekulare Massenbestimmung mittels MALDI-Massenspektrometrie*

Die Methode der matrixunterstützten Laser Desorptions/Ionisations-Massen-Spektrometrie (MALDI-TOF-MS) ermöglicht die molekulare Massenbestimmung von Biomolekülen in einem Massenbereich von 500–4500 Da mit hoher Selektivität und hoher Sensitivität¹⁰⁵. Der Analyt wird mit einer UV-absorbierenden Matrix (beispielsweise Benzoessäurederivate wie Dihydroxybenzoessäure oder Zimtsäurederivate) auf einen Metalltarget aufgetragen und bis zum Trocknen eingedampft. Mittels Laserlicht wird die Matrix und die Analytionen in die Gasphase überführt. Hierbei werden die Analyten gleichzeitig durch die Säurefunktion der Matrix ionisiert. Die Ionen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und fliegen in Abhängigkeit zur Masse und Ladungszahl in die Richtung des Ionendetektors. Der Detektor wandelt die auftreffenden Ionen in elektrische Signale um, die registriert werden. Über die Flugzeit wird die molekulare Masse des Analyten über Kalibrierfunktionen identifiziert¹⁰⁶ (**Abbildung 3**).

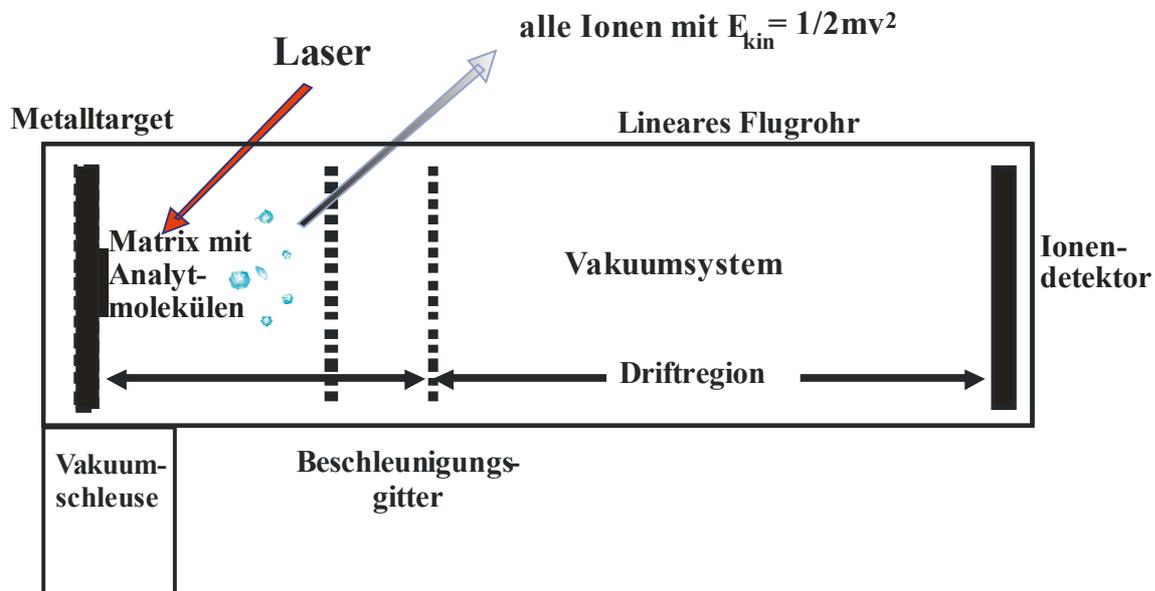


Abbildung 3: Schema des MALDI-TOF

3.4.2.1. MALDI-LIFT-TOF/TOF-Tandem-Massenspektrometrie

Die MALDI-Time-of-Flight/-Time-of-Flight Tandem-Massenspektrometrie (MALDI-LIFT-TOF/TOF-MS/MS) stellt die Weiterentwicklung der Matrix-assoziierten Laser Desorption/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) da. Diese Methode ist durch hohe Sensitivität gekennzeichnet¹⁰⁷. Bei den MALDI-TOF/TOF-Instrumenten sind zwei TOF-Massenanalysatoren kollinear angeordnet. Um die Beschleunigung und Fokussierung der Ionen zu ermöglichen, sind die TOF-Massenanalysatoren mit einer Ionen-Quelle ausgestattet. Im ersten TOF erfolgt die Beschleunigung der zur analysierenden Ionen und die Auswahl und Fragmentierung der Vorläuferionen. Im zweiten TOF werden die Fragmentionen dann beschleunigt und ihre Masse analysiert. Bei der Lift-Methode wird die Stromspannung zwischen den Gittern angehoben. Dieser Teil des Gerätes setzt sich aus drei Zellen zusammen, die zwischen vier Gittern platziert sind. Die Spannung zwischen den beiden ersten Gittern, die die erste Zelle begrenzen, wird auf 19 kV verstärkt, sobald die Ionen diese erreichen. Die zweite Zelle besteht aus Fokussierungselementen, die die Geschwindigkeit der Ionen gestalten. Am dritten Gitter wird die Spannung um 2-3 kV redu-

ziert, wodurch die Ionen gegen die dritte Zelle beschleunigt werden. In der dritten Zelle kommt es zur vollen Beschleunigung der Ionen und zur deren Einstellung auf den Detektor¹⁰⁷.

3.4.2.2. *Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie*

Elektrospray-Ionisationstechnik ist ein Ionisationsverfahren zur Analyse von Biomolekülen, die im flüssigen Zustand vorliegen. Das Verfahren ist schonend, so dass es kaum zur spontanen Fragmentation des Analyten kommt, da die Ionisation unter Atmosphärendruck stattfindet. Der Elektrospray-Ionisation Massenspektrometer eignet sich zur exakten Bestimmung der Molekülmasse und/oder, zur Analyse und Fragmentierung des Analyten¹⁰⁸. Die Analytlösung wird bei der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-Massenspektrometrie) durch eine Metallkapillare geleitet. An der Spitze der Metallkapillare liegt eine Spannung an, die ein elektrisches Feld zwischen der Kapillare und der Gegenelektrode induziert. Das elektrische Feld bedingt eine Bewegung der Ionen aus der Analytlösung in die Richtung der Gegenelektrode. Da die Ionen gleiche Ladung haben, stoßen sie einander ab, so dass sie als feines Aerosol aus der Kapillare raussprühen. Zur Vernebelung des Lösungsmittelflusses und zur Verdampfung des Lösungsmittels wird als neutrales Trägergas Stickstoff gewählt. Durch die Verdampfung verkleinert sich der Radius der Tröpfchen und die Dichte des elektrischen Feldes nimmt zu. Aufgrund der Abstoßung gleichartiger Ladung der Ionen in kleinere Tröpfchen (Coulomb-Explosion) zerfallen die Tröpfchen, so dass sich freie Ionen in der Gasphase bilden. Die Spannung der Kapillare bedingt die Ladung der Ionen. Die Ionen werden in die Ionenfalle geleitet. Mit der Änderung des elektrischen Feldes kann reguliert werden, welche Ionen, entsprechend ihrem Masse zu Ladungsverhältnisses sequentiell aus der Falle katapultiert werden und am Detektor ankommend in elektrische Signale umgewandelt und computergesteuert zur einem Massenspektrum zusammengefügt werden¹⁰⁹.

3.4.2.3. *Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie*

Im Vergleich zu anderen Massenspektrometriemethoden liefert die Hochauflösungs-Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) eine bis zu 100-fach höhere Massenauflösung der Proteine als die obengenannten mas-

senspektrometischen Methoden. Bei FT-ICR-MS befindet sich die Ionenfalle in einem Magnetfeld. Aufgrund der Kombination des Magnetfeldes und eines elektrischen Feldes werden die Ionen auf eine Kreisbahn gebracht, wobei die Umlauffrequenz einzelner Ionen massenabhängig ist. Mit Hilfe eines elektrischen Wechselfeldes, das senkrecht zum Magnetfeld angelegt wird, vergrößert sich der Umlaufradius des betreffenden Ions durch Aufnahme der Energie aus dem Wechselfeld. Die Änderung des Cyclotronradius führt zu messbaren Signalen an den Detektoren. Durch Variationen des Wechselfeldes können Ionen unterschiedlicher Masse erfasst werden. Die Signale werden durch die Fourier-Transformation in Messwerte umgewandelt. Durch diesen Prozess werden die Ionen nicht zerstört, sodass die Messung beliebig wiederholt werden kann um die Messergebnisse zu verbessern. Je höher die Kraft und Homogenität des Magnetfeldes, desto höhere Auflösungskapazität der Massen wird mit dem FT-ICR-MS Gerät erreicht. Die gebrauchte Feldstärke von ca. fünfzehn Tesla wird durch Einsatz supraleitender Magnete erreicht.

3.5. Spezieller Teil 1

3.5.1. Übersicht

Die **Abbildung 4** zeigt die Übersicht über die angewandten Arbeitsschritte und Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit zur Isolierung und Identifizierung des vasoaktiven Peptides aus der bovinen Nebenniere (**Abbildung.4a**) und aus humanem Plasma (**Abbildung 4b**) angewandt wurden.

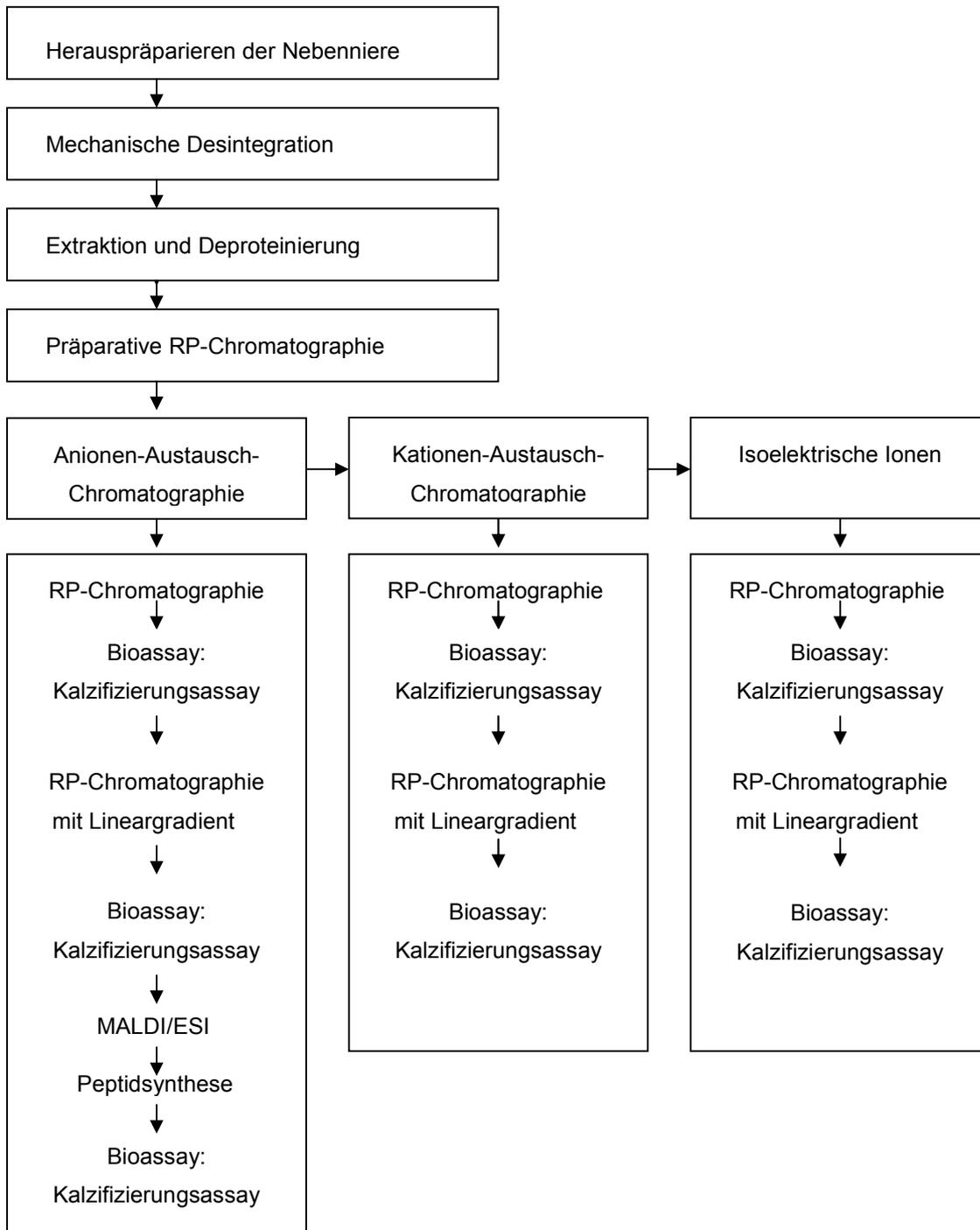


Abbildung 4a: Arbeitsschritte zur Isolierung und Identifizierung der Peptide mit einem Effekt auf die vaskuläre Kalzifizierung aus bovinen Nebennieren.

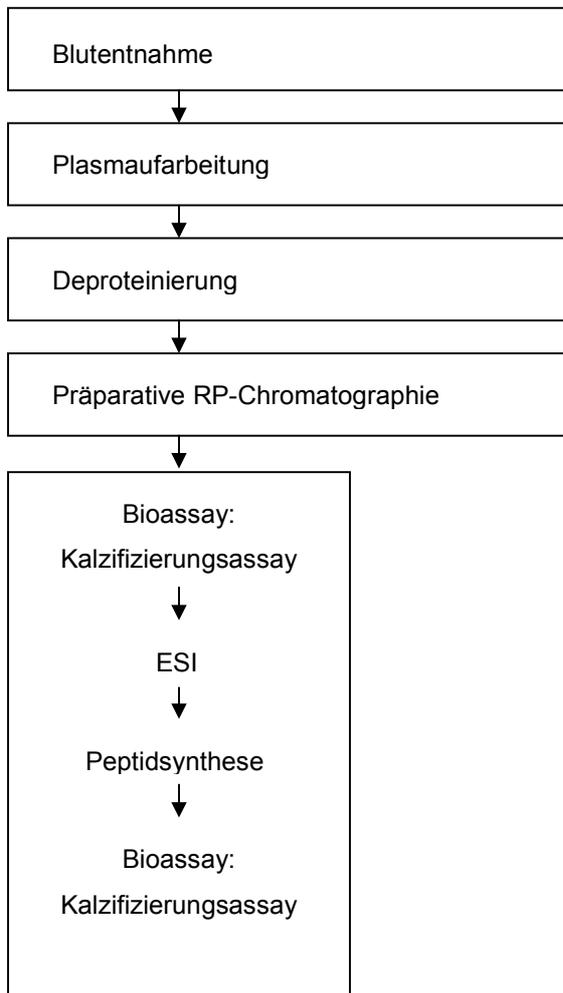


Abbildung 4b: Arbeitsschritte zur Isolierung und Identifizierung des Peptids mit einem Effekt auf die vaskuläre Kalzifizierung aus humanem Plasma.

3.5.2. Mechanische Desintegration

Im Schlachthof Perleberg (Brandenburg) wurden die Nebennieren den Rindern rauspräpariert, in 1 cm³ große Stücke geschnitten und unter Eiskühlung transportiert. Im nächsten Schritt wurden die Nebennierenwürfel in flüssigem Stickstoff tief gefroren und bei -80°C für mindestens 12 h gelagert. Im Anschluss wurden die Nebennieren in der Lyophilisationsanlage gefriergetrocknet. Nach der Lyophilisation wurde das Gewebe unter Kühlung mit Hilfe einer Handgetreidemühle bei +4°C Temperatur pulverisiert.

3.5.3. Extraktion

700 g Nebennierenpulver wurden zu 7.000 ml 0,6 mM kalter Perchlorsäure (PCA) gegeben. Das Gemisch wurde mit einem Ultra-Turrax für 30 s bei maximaler Geschwindigkeit von 24.000 Umdrehungen/min gerührt und 1 min mit Eis gekühlt. Dieser Vorgang wurde zehnmal wiederholt. Nach dieser Aufarbeitung wurden die Proben bei 4°C und bei 4.000 U/min für 1 h zentrifugiert. Der Überstand der Probe wurde abgenommen. Der pH-Wert des Überstandes wurde mit konzentrierter KOH auf den Wert 9 eingestellt und zur vollständigen Ausfällung des KClO_4 bei -80°C eingefroren. Nach Auftauen der Proben bei Raumtemperatur, wurden diese in Zentrifugenröhrchen gefüllt und 30 min bei 4.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen.

3.5.4. Präparative Reversed-Phase-Chromatographie

Zur Entsalzung und Konzentrierung der Proben wurde eine präparative Reversed-Phase-Chromatographie durchgeführt. Es wurde die Reversed-Phase-Säule (LiChroprep RP C18, 310 mm x 25 mm, Korngrösse 40-63 μm , der Firma Merck) verwendet. Die Säule wurde mit 200 ml 80% Acetonitril (ACN) in H_2O konditioniert und mit 200 ml wässriger 0,01% Trifluoressigsäure (TFA) äquilibriert.

Nach Auftauen wurde der Probe 1% Trifluoressigsäure (TFA) zugegeben. Anschließend folgte die pH-Wert Einstellung der Proben mit 25% HCl und NaOH auf einen Wert von 6,5. Das Auftragen der Proben auf die Chromatographiesäule erfolgte bei 4°C. Im Anschluss wurde die Säule mit 70ml wässriger 0,1% Trifluoressigsäurelösung (TFA) entsalzt. Im nächsten Schritt wurden die aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen an die stationäre Phase gebundenen Substanzen in einem fünfstufigen Gradienten von 20% ACN-, 40% ACN-, 60% ACN-, 80% ACN- H_2O und 100% ACN- Lösung, bei einer Flussrate von 3 ml/min eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden gesammelt.

Die Chromatographie wurde mit einer Bio-Rad BioLogic DuoFlow HPLC-Anlage unter UV-Detektion bei 280 nm durchgeführt. Die Eluate wurden bei -80°C gelagert und lyophilisiert. Die jeweils entsprechenden eluierten Fraktionen aus den Chromatographieläufen wurden vereinigt. Die 80% ACN-Stufen- und 100% ACN-Stufen-Eluate wurden vereinigt. Die lyophilisierten Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.5.5. Anionenaustausch-Chromatographie

Für die Anionenaustausch-Chromatographie wurde eine Superformance 16 Säule von 150 ml der Firma Merck, Innendurchmesser 30 cm x 1,6 cm, mit Fractogel EMP TMAE (M) befüllt, verwendet. Puffer A (20 mM K_2HPO_4 -Lösung) und Puffer B (20 mM K_2HPO_4 in 1 M NaCl-Lösung) wurden mit NaOH auf einen pH-Wert von 8 eingestellt. Nach der Äquilibrierung der Säule mit Puffer A wurden die zuvor mit NaOH auf einen pH-Wert von 8 eingestellten Proben bei einem Fluss von 1ml/min auf die Säule aufgetragen und in einem fünf-stufigen Gradienten von 20% Puffer B, 40% Puffer B, 60% Puffer B, 100% Puffer B bei einem Fluss von 3 ml/min eluiert und nach Stufen getrennt gesammelt. Der Durchbruch wurde separat gesammelt und für die Kationenaustausch-Chromatographie bereitgestellt. Die Chromatographie wurde mit einer Bio-Rad BioLogic DuoFlow HPLC-Anlage durchgeführt, die UV-Absorption wurde bei 280 nm von einem UV-Detektor bestimmt.

Tabelle 2: Darstellung des angewendeten Stufengradienten

| Stufendauer in min | Konzentration von Puffer B in % |
|--------------------|---------------------------------|
| 40 | 0 |
| 40 | 20 |
| 40 | 40 |
| 25 | 60 |
| 25 | 100 |

3.5.6. Kationenaustausch-Chromatographie

Zur Chromatographie wurde eine Superformance 16 Säule mit dem Volumen 150 ml der Firma Merck, Innendurchmesser 30 cm x 1,6 cm, mit Fractogel EMP $SO_3(M)$ gefüllt, verwendet. Puffer A (20 mM KH_2PO_4 -Lösung) und Puffer B (20 mM KH_2PO_4 in 1 M NaCl-Lösung) wurden mit H_3PO_4 und NaOH auf den pH-Wert von 3,5 eingestellt. Die Säule wurde mit 20 mM KH_2PO_4 -Lösung äquilibriert. Die jeweils nicht retendierten Substanzen aus der Anionenaustausch-Chromatographie wurden mit NaOH und H_3PO_4 auf einen pH-Wert von 3,5 eingestellt und bei einem Fluss von 1ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Proben wurden mit einem Stufengradienten (**Tabelle 3**) mit einer wässrigen 20 mM KH_2PO_4 in 1 M

NaCl-Lösung bei einem Fluss von 3 ml/min eluiert und nach Stufen getrennt gesammelt. Die nicht retendierten Substanzen wurden getrennt gesammelt. Entsprechend wurde mit allen anderen nicht retendierten Substanzen der Anionenaustauschchromatographie verfahren.

Die Chromatographie wurde mit einer Bio-Rad BioLogic DuoFlow HPLC-Anlage unter UV-Detektion bei 280 nm durchgeführt. Die Eluate wurden bei -80°C gelagert und lyophilisiert. Die jeweils entsprechenden eluierten Fraktionen aus den entsprechenden Läufen wurden vereinigt. Die lyophilisierten Proben wurden bei -20°C gelagert.

Tabelle 3: Darstellung des angewendeten Stufengradienten

| Stufendauer in min | Konzentration von Puffer B in % |
|--------------------|---------------------------------|
| 40 | 0 |
| 40 | 20 |
| 40 | 40 |
| 25 | 60 |
| 25 | 100 |

3.5.7. Reversed-Phase-Chromatographie

Zur Entsalzung der Ionen-Austauscher-Fractionen wurde eine Reversed-Phase-Chromatographie durchgeführt. Es wurde eine Reversed-Phase-Säule (LiChroprep RP C18, 310 mm x 25 mm, Korngrösse 40-63µm, der Firma Merck) verwendet. Die Säule wurde mit 200 ml 80%-igem ACN in H₂O konditioniert und mit 200 ml wässriger 40 mM Trifluoressigsäurelösung äquilibriert.

Nach dem Auftauen wurde zu den Fraktionen der Anionen- und Kationen-Austausch-Chromatographie 1/10 des Probenvolumens 1% TFA-Lösung zugegeben; die Proben wurden mit 25% HCl und NaOH auf den pH-Wert von 6,5 eingestellt. Die Proben wurden bei einem Fluss von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Anschliessend wurden die Proben mit 70 ml wässriger 0,1% TFA-Lösung entsalzt. Im nächsten Schritt wurden die aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen an die stationäre Phase gebundenen Substanzen in einem einstufigen Gradienten von unverdünntem ACN, bei einer Flussrate von 3 ml/min eluiert und gesammelt. Die Entsalzung wurde getrennt für jeweils unterschiedliche Fraktio-

nen durchgeführt. Die Proben wurden auf -80°C gekühlt und anschließend lyophilisiert. Die Lagerung der Proben erfolgte dann bei -20°C . Die Chromatographie wurde an die Bio-Rad BioLogic DuoFlow HPLC-Anlage mit einem UV-Detektor bei 280 nm durchgeführt.

3.5.8. *Reversed-Phase-Chromatographie, Lineargradient*

Zur weiteren Auftrennung der Ionenaustauscher-Fractionen wurde eine Reversed-Phase-Chromatographie durchgeführt. Es wurde die Reversed-Phase-Säule (Chromolith RP-18e, 100 mm x 4,6 mm, der Firma Merck) verwendet. Die Säule wurde mit 50 ml 80%-igem Acetonitril (ACN) konditioniert und mit 100 ml wässriger 40 mM Trifluoressigsäure-Lösung (TFA) äquilibriert, bei einem Fluss von 1 ml/min.

Nach dem Auftauen der jeweils in 15 ml H_2O aufgelöst Proben der Anionen- und Kationen-Austausch-Chromatographie, wurde den Proben 1/10 des Probenvolumens 1 M Trifluoressigsäure-Lösung (TFA) zugegeben und die Proben wurden mit 25% HCL und NaOH auf den pH-Wert zwischen 2 und 6,5 eingestellt. Die Proben wurden auf die Säule bei einem Fluss von 1 ml/min aufgetragen und anschließend mit 10 ml wässriger 0,1% TFA-Lösung entsalzt. Es wurden die aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen an die stationäre Phase gebundenen Substanzen in einem Lineargradienten von 1% ACN auf 100% ACN in 90 min, bei einer Flussrate von 3 ml/min eluiert. Der Entsalzungsschritt wurde jeweils getrennt für die unterschiedlichen vorhergehenden Fractionen durchgeführt.

Die Chromatographie wurde an der BioLogic DuoFlow HPLC-Anlage (Bio-Rad, Laboratories, Inc.München) mit einem UV-Detektor bei 280 nm durchgeführt. Die gesammelten Proben wurden bei -80°C eingefroren und später zur Verdampfung der TFA und des Acetonitrils lyophilisiert und bei -20°C auf bewahrt.

Tabelle 4: Darstellung des angewandten Lineargradienten

| Zeit in min | Konzentration von Puffer B in % |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 1 | 1 |
| 2 | 2 |
| weiter in 1 min. Schritten bis | weiter in 1% Schritten bis |
| 90 | 90 |

3.5.9. Kalzifizierungsbioassay an den Aortensegmenten

Den männlichen Wistar-Kyoto Ratten (300 g - 450 g Körpergewicht) wurde die Brustaorta entnommen. Die Adventitia wurde unter sterilen Bedingungen entfernt, ohne das Gefäß zu verletzen. Das Gefäß wurde in Segmente geschnitten (Länge: 3-4 mm) und in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) überführt (5 Vol.-% CO₂ / 95 Vol.-% O₂ bei 37°C). Die Aortasegmente wurden in DMEM mit 1,8 mM Ca²⁺ und 0,9 mM PO₄³⁻ inkubiert. Der Versuch wurde in Gegenwart von Penicillin und Streptomycin (1%) und bei 5 Vol.-% CO₂ / 95 Vol.-% O₂ bei 37°C durchgeführt. Der Phosphat Spiegel im Medium wurde von 0,9 auf 3,8 mM erhöht zum einen durch (A) Zugabe von 100 mM NaH₂PO₄, nach Equilibrierung des DMEM Mediums bei 5% CO₂ oder zum anderen durch (B) Zugabe von 234 mg Betaglycerolphosphat (BGP) zu 100 ml DMEM Medium (Endkonzentration 10 mM) und 100 µl Ascorbinsäure (Endkonzentration 0,1%). Ascorbinsäure wirkt als Kofaktor für alkalische Phosphatase, die das Betaglycerolphosphat (BGP) zum anorganischen Phosphat umwandelt. Die Aortensegmente wurden in Abwesenheit und Anwesenheit der einzelnen Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie inkubiert, die aktiven Fraktionen wurden massenspektrometrisch bestimmt. Im zweiten Schritt wurde dieselbe Prozedur jeweils in Anwesenheit und Abwesenheit der identifizierten und synthetisierten Peptide (1 mM) durchgeführt. Das Medium wurde nach jeweils 3 Tagen gewechselt. Anschließend wurden die Segmente in HEPES (Puffer aus physiologischer Salzlösung, bestehend aus 1,8 mM Ca²⁺ und 0,9 mM PO₄³⁻ (pH-Wert 7,4) gewaschen. Die gewaschenen Segmente wurden über Nacht bei 4°C in 1 ml 4% Formaldehydlösung fixiert. Der Kalziumgehalt der Aortasegmente wurde wie in folgendem beschrieben bestimmt.

3.5.10. Kalziumquantifizierung

Die Aortensegmente wurden an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet, gewogen und in 0,6 M HCl gelöst. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von benötigter Menge NaOH auf den pH-Wert 7 eingestellt. Der Kalziumgehalt wurde mittels eines DICA-500-QuantiChrom™ Calcium Assay Kit quantifiziert. 200 µl des Reagents A aus O-phthalicsäure, Polyvinylpyrrolidon, Methylthymolblau, Hydroxyquinolin und 200 µl aus dem Reagent B aus Natriumsulfit, Monoethanolamin wurden in eine 96-Wellplate gegeben. 5 µl der zu untersuchenden

Proben wurden in die Wells dazugegeben und gerührt. Die Konzentration des Kalziums wurde photometrisch bei 612 nm quantifiziert.

3.5.11. MALDI-Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse der isolierten Peptide wurde mit der Matrix unterstützenden Laserdesorptions-Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) durchgeführt. 1 µl Dihydroxybenzoesäure (DHB) diente als Matrix. Die Proben wurden nach der Reversed-Phase-Chromatographie zu der Matrix zugegeben. Daraufhin wurden die Proben an der Luft liegengelassen bis die Lösungsmittel verdampft sind. Anschließend erfolgte die massenspektrometrische Analyse der Proben. Die Probenionen desorbierten durch den Beschuss mittels des Stickstofflasers mit einer Wellenlänge von 337 nm und der Energie von 10^6 - 10^7 W/cm².

3.5.12. MALDI-LIFT-TOF/TOF-Tandem-Massenspektrometrie

Mit Hilfe der Technik der MALDI-Lift-TOF/TOF-MS/MS erfolgte die Fragmentierung der isolierten Peptide. Die Probenvorbereitung entsprach der im **Abschnitt 3.5.11**. Mittels eines Lasers wurden die Proben mit der Wellenlänge von 337nm ionisiert. Die Fragmentenspektren wurden unter Aufsummierung von ca. 200 Spektren mit der Lift-Option des Gerätes akkumuliert.

3.5.13. Peptidsynthese

Die identifizierten Peptide wurden automatisch durch die Festphasemethode mittels Fluorenylmethoxycarbonyl-Standardchemikalien (Fmoc) im durchgehenden Flussmodus synthetisiert. TentaGel S Random-Access Memory (RAM) Resin 0,21 mmol g⁻¹ wurde für Peptidamide und TentaGel S p-hydroxybenzoesäure (PHB) Resin (Rapp Polymere, Tuebingen, Deutschland) für freie Säuren von Urokortin verwendet. O-benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphat (HBTU) diente als Kopplungsreagenz und dauert 20 min. Entblockt wurde mit 20% Piperidin in N,N-dimethyl formamide (DMF) für 15 min, die Endspaltung erfolgte mit 95% TFA/5% Wasser für 3 h. Die Reinigung des Peptids wurde mittels präparativer HPLC an PolyEncap A300 (10 µm Partikelgröße, 250 mm x 20 mm, Bischoff Analysetechnik, Leonberg, Deutschland) durchgeführt. Ein Eluentengradient von 5-70% ACN-Lösung in Wasser (0,1% TFA) über 70 min mit einer Flussrate von 10

ml/min wurde verwendet. Die chromatographisierten Peptide wurden im Anschluss lyophilisiert. Die Peptide wurden mittels MALDI-Massenspektrometrie an der Voyager-DE STR BioSpectrometrie charakterisiert. Als Matrix wurden R-cyano-4-hydroxycinnamic Säure und Sinapinic Säure verwendet¹¹⁰. Die Spektren zeigen die erwarteten Massen (M + H)⁺.

3.5.14. Histochemische und immunohistochemische Analyse

Der Bioassay an den Aortensegmenten und die Kalziumquantifizierung mit dem synthetischen Peptid wurde wie im **Abschnitt 3.5.9** und **3.5.10** beschrieben, durchgeführt. Für die histochemische und immunohistochemische Analyse wurden die Segmente gewaschen und in 1ml 4% Formaldehyd bei 4°C über Nacht aufbewahrt, danach erfolgte die Paraffin-einbettung. Die 3 µm Schnitte wurden nach Standardprotokollen auf die Objektträger aufgebracht und mit Hematoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Zur Darstellung der Kalziumkristalle wurde die *von Kossa* Färbung angewandt. Die Histoschnitte wurden für 90 min. in 5% (w/v.) AgNO₃ inkubiert, während sie mit intensivem Licht bestrahlt wurden. Danach wurden sie sorgfältig mit Wasser gewaschen und in 2,5% (w/v) Na₂S₂O₃ inkubiert. Nach der Färbung mit "Nuclear fast red" wurden die Schnitte dehydriert and in Entelan-Medium gelagert. Die immunohistochemische Analyse wurde an Paraffinschnitten für das polyklonale „rabbit anti-rat“ Osteocalcin (1:1000, Acris Antikörper, Herford, Deutschland), für das polyklonale „goat anti-rat“ Osteopontin (1:50 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) und für das polyklonale „goat anti-rat“ FGF-23 (1:50, Sant Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) durchgeführt. Nach der Deparaffinierung wurden die Schnitte mit Zitrat 20 min bei 90°C vorbehandelt (Zitratpuffer pH 7.2, 20 Minuten bei 90°C im Wasserbad), danach wurde endogene Peroxidase mit 1% H₂O₂ und das endogene Biotin mit TNB Blocking Kit (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) geblockt. An dem nachfolgenden Tag wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem biotinmarkierten sekundärem „goat anti-rabbit“ Antikörper / „donkey anti-goat“ Antikörper (1:200, 30 Minuten, 37°C, Santa Cruz, USA).

3.5.15. Plasma-Aufbereitung

Es wurde einer Patientengruppe und Nierengesunden jeweils venöses Blut entnommen. Den Blutproben wurde K₂-EDTA und der Proteaseinhibitormix (CompleteMini; Roche) zu-

gesetzt. Die Proben wurden bei 2100 rpm und bei Raumtemperatur für 15 min zentrifugiert, um das Plasma von den zellulären Bestandteilen des Blutes abzutrennen. Das Pellet wurde verworfen. Die Deproteinierung des Überstandes erfolgte unter Kühlung mittels Perchlorsäure, indem auf 1ml Plasma 65 µl 70% Perchlorsäure zugegeben wurde. Anschließend wurde die Probe ohne Verzögerung gevortext bis die Proteine denaturiert und ausgeflockt waren. Danach wurde die Probe bei 3000 U/min für 15 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen, das Pellet verworfen. Zur Ausfällung des Perchlorats wurde der pH-Wert der Probe auf einen Wert über 9 eingestellt, das auskristallisierte Kaliumperchlorat fiel unter Kühlung auf -20°C aus, die Proben wurden über Nacht bei -20°C eingefroren. Die Proben wurden langsam aufgetaut und bei 3000 U/min für 15 min, bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen, das Pellet verworfen und der pH-Wert der Probe auf einen Wert zwischen 2,5 und 6 eingestellt. Im Anschluss wurde die Reversed-Phase-Chromatographie wie im **Abschnitt 3.5.4** unter Verwendung einer Chromolith RP-18e, 100 mm x 4,6 mm, der Firma Merck mit einem Fluss von 1 ml/min durchgeführt. Der Kalzifizierungsassay erfolgte wie im **Abschnitt 3.5.9** und **3.5.10** beschrieben.

3.5.16. Elektropray-Ionisations-Massenspektrometrie

Die MS und MS/MS Ionenanalyse wurden mittels Flüssig-Chromatographie/Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI) Technik durchgeführt. Zwei Kapillaren HPLC-Pumpe (G1376A, Agilent, Böblingen, Germany) mit einem Mikrovakuum Degaser (G1379B, Agilent, Böblingen, Germany), ein automatischer Mikrowell-Plattenautosampler (G1377A, Agilent, Böblingen, Germany) und ein diodenarray multiwellenlängen Detektor (G1365D Agilent, Böblingen, Germany) wurden für die Chromatographie verwendet. Die Chromatographie wurde mit einer Agilent Zorbax SB-C18 Säule (5 µm, 150 x 0,5mm, Agilent, Böblingen, Germany) durchgeführt, die Säulentemperatur wurde auf 25° C fixiert. 0,1% Ameisensäure (FA) in Wasser wurde als Eluent A; 98 % Acetonitril in Wasser als Eluent B verwendet. Das injizierte Volumen betrug 5 µl. Die Flussrate von 10 µl/min und ein Lineargradient (0 min: 1% Eluent B; 30 min: 60% Eluent B) wurde für die Elution der Retentionssubstanz von der Säule verwendet. Die ESI-Massenspektrometrie wurde im positiven Modus und im Enhanced Modus durchgeführt. Der Massenbereich betrug von 80 bis 2800 m/z. Die Scangeschwindigkeit von den gemessenen Massenspektren betrug 26000 m/z pro Sekunde.

Es wurde eine Akkumulationszeit von 200 ms gewählt. Die Flussrate des Nitrogengases betrug 5 l/min. Die Temperatur der Transferkapillare wurde auf 300 °C eingestellt. Die Kapillarspannung betrug 1,5 bis 4,5 kV. Die massenspektrometrische Daten wurden mittels der Software HyStar 3.2 (Bruker-Daltonics, Bremen, Deutschland) akkumuliert und mittels Data Analysis 4.0 (Bruker-Daltonics, Bremen, Deutschland) analysiert. Glutathion wurde als interner Standard verwendet.

Die Peptidsynthese der identifizierten Peptide erfolgte wie im **Abschnitt 3.5.13** beschrieben.

3.6. *Spezieller Teil 2*

3.6.1. *Übersicht*

Die **Abbildung 5** zeigt die Übersicht über die angewandten Arbeitsschritte und Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit zur Isolierung und Identifizierung des vasoregulierenden Peptides aus der Nebenniere (**Abbildung 5a**) und aus humanem Plasma (**Abbildung 5b**) angewandt wurden.

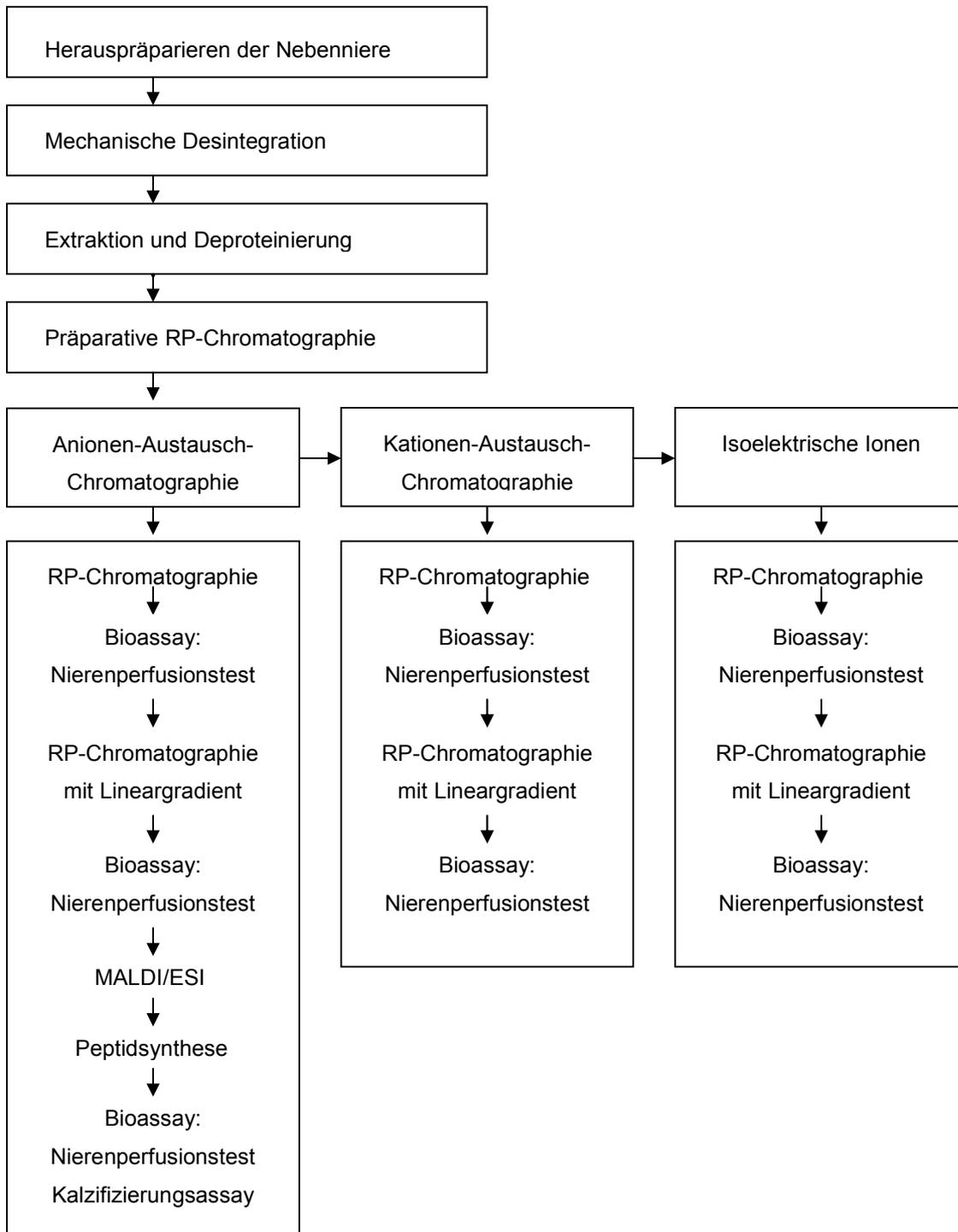


Abbildung 5a: Arbeitsschritte zur Isolierung und Identifizierung vasoregulierender Peptide aus bovinen Nebennieren.

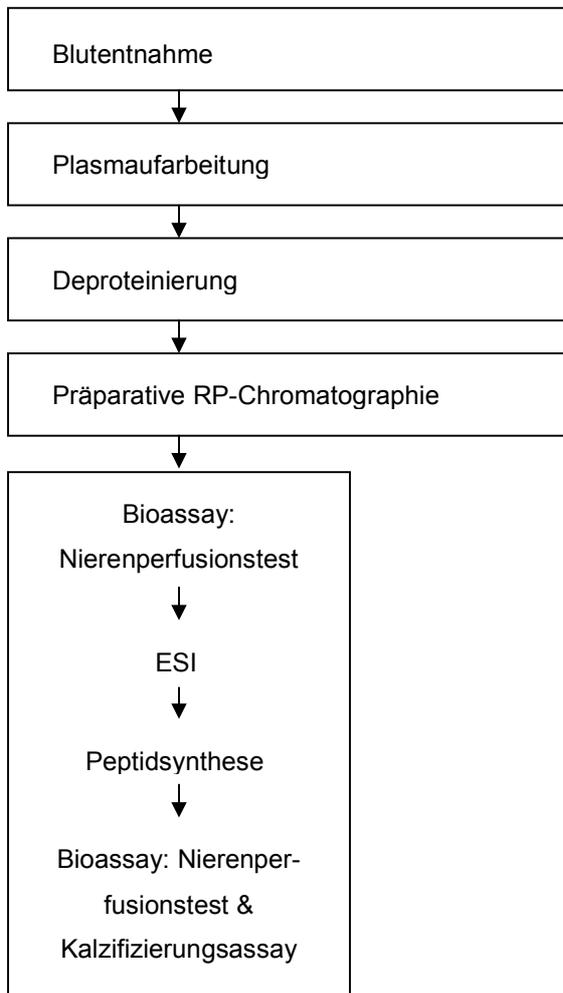


Abbildung 5b: Arbeitsschritte zur Isolierung und Identifizierung vasoregulierender Peptide aus humanem Plasma.

3.6.2. Mechanische Desintegration und Extraktion

Die Probenvorbereitung erfolgte identisch zu der in den **Abschnitten 3.5.2** und **3.5.3** beschriebenen Art und Weise.

3.6.3. Chromatographische Aufarbeitung

Die chromatographische Auftrennung erfolgte analog zu den in den **Abschnitten 3.5.4**, **3.5.5**, **3.5.6**, **3.5.7** und **3.5.8** genannten chromatographischen Aufbereitungsschritten.

3.6.4. Bioassay der isoliert-perfundierten Rattenniere

Die Organentnahme erfolgte an männlichen normotensiven Wistar-Kyoto Ratten, deren Körpergewicht durchschnittlich 300 bis 500 Gramm betrug. Die Tierversuchsgenehmigung des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin läuft unter der Nummer: O 0075/08. Die entnommene Nieren wurden bereitgestellt.

3.6.5. Isolierung der Rattenniere

Es wurde eine 3 Minuten andauernde Inhalationsnarkose mit Isofluran (FORENE[®], Abbott GmbH & Co. KG) durchgeführt. Nach dem Einschlafen des Tieres wurde dieses mit intra-peritonealer Urethan-Injektion (1,5 g pro kg Körpergewicht) anästhesiert. Nach negativ ausgefallenem Testen der Schmerzreflexe wurde das Peritoneum vom Unterbauch bis zum Zwerchfellansatz durch einen Y-Schnitt geöffnet. Im Folgenden wurde eine der beiden Nieren, bevorzugt die linke, mit der jeweiligen *Arteria renalis* und die *infrarenalen Aorta* stumpf freigelegt. An der *infrarenalen Aorta abdominales* und an der *Arteria renalis* wurden nun Ligaturen angelegt. Nach Abklemmen der Aorta proximal der *infrarenalen* Ligatur wurde die *infrarenale Aorta* inzidiert. Ein Polyethylen-Katheter wurde in die Aorta eingeführt und in die jeweilige Nierenarterie nach der Entfernung der Aortenklemme eingeschoben. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Unterbrechung der Zirkulation stattfand. 250 Insulin Einheiten Heparin-Natrium-Lösung (Biochrom AG, Berlin) wurden in die Nierenarterie injiziert. Die Ligaturen wurden verschlossen und die isolierte Niere wurde aus dem Retro-peritonealraum rausgeholt und an das Perfusionssystem angeschlossen.

3.6.6. Bioassay der isoliert-perfundierten Rattenniere

Das Perfusionsverfahren wurde von Hofbauer *et. al.* beschrieben. Die Niere wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe mit der Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Die Perfusionslösung, setzt sich aus 137 mM NaCl, 1,1 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 2,7 mM KCl, 5,6 mM Glucose, 0,4 mM NaH₂PO₄, 2,4 mM CaCl₂ zusammen. Die Rattenniere wurde mit einer mit 95% O₂ und 5% CO₂ begasten und auf 37°C aufgewärmten Krebs-Henseleit-Lösung, bei einem Fluss von 8 ml/min, äquilibriert. Zunächst erfolgte ca. 30 min die Äquilibration der Niere bei einem Basaldruck von 65 mmHg. Der Druck wurde mit Hilfe eines Druckabnehmers ATP 300 TM (Hugo Sachs) am Zufluss der *Arteria renalis* abgenommen und das Signal mit ei-

nem Brückenverstärker TAM-D Typ 705/2 TM (Hugo Sachs) an die Registriereinheit weitergeleitet und aufgezeichnet (**Abbildung 6**). Mit Bolusinjektion von α,β -Methylenadenosine 5'-triphosphate (α,β -MeATP) (10^{-5} M) und Angiotensin II (10^{-6} M) wird die Vasokonstriktion der Niere getestet.

Das synthetisierte Peptid wurde im Anschluss mittels des Bioassays auf seine vasoaktiven Eigenschaften analysiert. 2 mg des Peptids wurden jeweils in 500 ml Krebs-Henseleit-Lösung aufgelöst, und mittels des Nierenperfusionstestes auf vasoregulatorische Effekte getestet. Über ein Injektionsventil, welches sich zwischen der Pumpe und dem Nierenpräparat befindet, wurden zuerst 100 μ l des Angiotensin II (10^{-6} M) in eine Gefäßschleife am Septum vorgelegt wovon 80 μ l dann in das System injiziert wurden. Im zweiten Schritt wurde 100 μ l des Angiotensin II (10^{-6} M) in eine Gefäßschleife am Septum eingegeben nachdem die Niere mindestens mit 50ml Peptidlösung perfundiert worden ist.

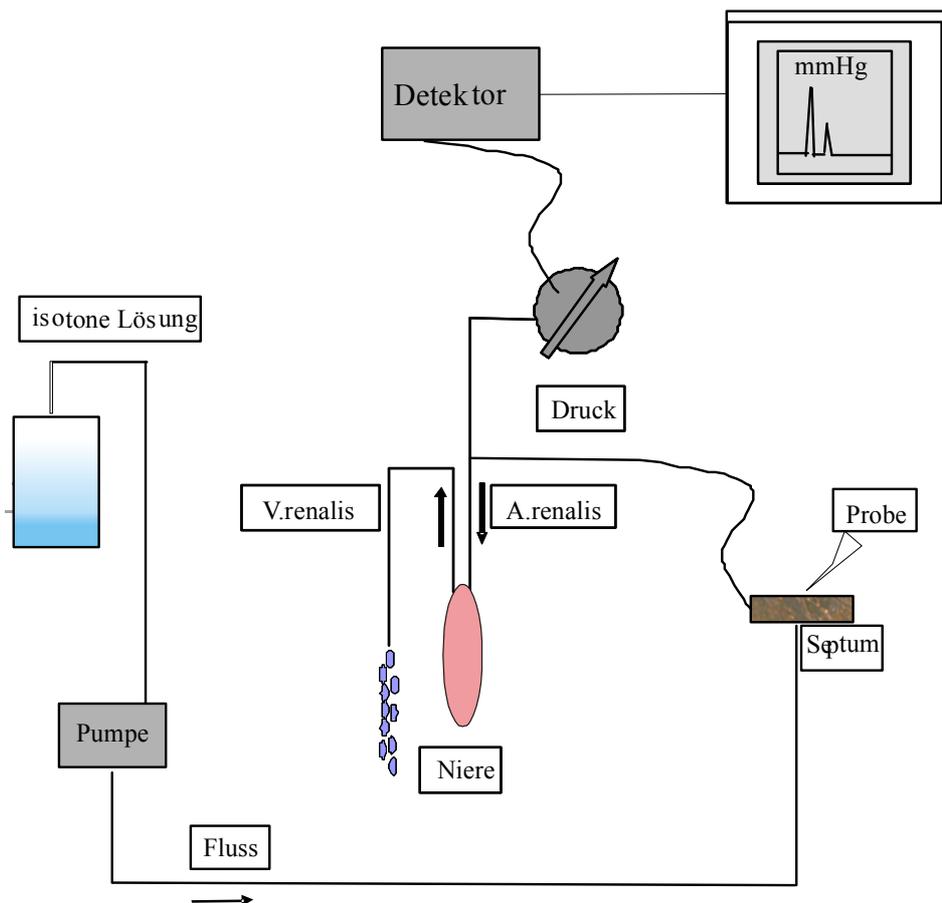


Abbildung 6: Darstellung des Perfusionssystems

3.6.7. Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrische Analyse der Proben erfolgte wie unter den **Abschnitten 3.5.11** und **3.5.12** beschrieben.

3.6.8. Peptidsynthese

Die synthetischen Peptide wurden automatisch durch die Festphasemethode synthetisiert, wie im **Abschnitt 3.5.13** beschrieben.

3.6.9. Plasma-Aufbereitung

Es wurde einer Gruppe von nierengesunden und CKD5 Patienten jeweils venöses Blut entnommen versetzt mit K_2 -EDTA und dem Proteaseinhibitormix (CompleteMini; Roche. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie im **Abschnitt 3.5.15** beschrieben. Im Anschluss wurden die Reversed Phase Chromatographie **wie im Abschnitt 3.5.4**, der Nierenperfusionssassay wie in den **Abschnitt 3.6.5** und **3.6.6**, die massenspektrometrische Identifikation wie im **Abschnitt 3.5.16** und die Peptidsynthese identisch wie im **Abschnitt 3.5.13**. beschrieben ausgeführt.

3.6.10. Bioassay der isoliert- perfundierten Rattenniere

Die Vasoaktivität des Peptides wurde wie unter **Abschnitt 3.6.6** an der isolierten perfundierten Rattennieren getestet.

3.6.11. Untersuchungen des zugrunde liegenden Pathways

Zum Ausschluss der endothelabhängigen Stickstoffmonoxid (NO) Aktivität wurde die Niere mit 10^{-5} M L-NAME für 15 min perfundiert. Acetylcholin 10^{-5} M wurde als Kontrollsubstanz benutzt. Bleibt bei Bolusinjektion von Acetylcholin 10^{-5} M die durch Freisetzung von NO verursachte Vasodilatation aus, sind alle Rezeptoren ausreichend blockiert und der Versuch kann weitergeführt werden. 100 μ l des Angiotensin II (10^{-6} M) wurden in den Kreislauf injiziert und die Druckveränderung beobachtet; identisch wurde vorgegangen unter der Perfusion mit dem identifizierten Peptid. Ist der Druckanstieg in beiden Ansätzen gleich, ist

nachgewiesen, dass der Effekt des Peptides über den endothelabhängigen NO-Pathway hervorgerufen wird.

3.7. *Spezieller Teil 3*

Die identifizierten synthetischen Peptide wurden mittels der angewendeten Bioassays kreuzgetestet. Das zuvor mit dem Kalzifizierungsbioassay getestete Peptid wurde mit dem Nierenperfusionstest auf vasoaktive Eigenschaften wie unter **Abschnitt 3.6.6** beschrieben untersucht. Und das zuvor auf Vasoaktivität getestete Peptid wurde auf kalzifizierende Eigenschaften mittels des Kalzifizierungsbioassays an den Aortensegmenten, wie in den **Abschnitten 3.5.9** und **3.5.10** beschrieben, untersucht. Die anschließende Kalziumquantifizierung und histochemische und immunohistochemische Analyse wurden analog zu dem **Abschnitt 3.5.14** durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse, Teil 1

4.1.1. Probenaufbereitung aus der bovinen Nebenniere

Nach der mechanischen Desintegration und Extraktion der Nebennieren wurde die chromatographische Aufarbeitung durchgeführt.

4.1.2. Reversed-Phase-Chromatographie

Zur Entsalzung und Konzentrierung der Proben wurde eine präparative Reversed-Phase-Chromatographie durchgeführt. Die Proben wurden auf eine LiChroprepSäule aufgetragen. Aufgrund der unterschiedlichen hydrophoben Wechselwirkungen an der stationären Phase eluierten die gebundenen Substanzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Alle Fraktionen wurden mit dem Kalzifizierungsbioassay, wie in dem Methodenteil unter den **Abschnitten 3.5.9** und **3.5.10** beschrieben, auf ihre Kalzifizierungswirkung getestet. Die Fraktion mit deutlichem inhibitorischen Effekt im Kalzifizierungsbioassay ist in **Abbildung 7** mit dem Pfeil markiert.

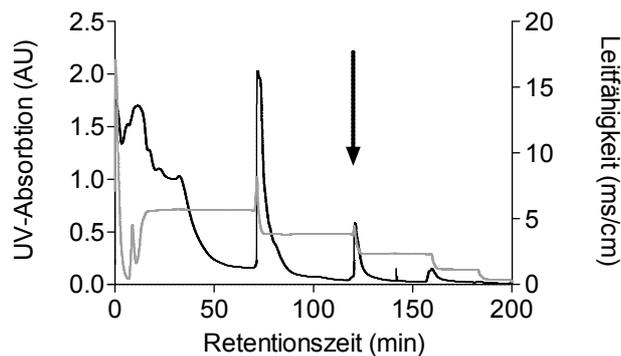


Abbildung 7: Reversed-Phase-Chromatogramm von dem Nebennierenkonzentrat (Säule: LiChroprep RP C18, 310 mm x 25 mm, Korngrösse 40-63 μm , Firma Merck; Eluent: 80% Acetonitril (ACN) in H_2O ; Flussgeschwindigkeit: 3 ml/min; X-Achse: Retentionszeit (min); Y-Achse links: UV-Absorption bei 280 nm (relative Einheiten) Y-Achse rechts Leitfähigkeit (ms/min); Kurvenlegende: UV-Absorption (-), Leitfähigkeit (-)

4.1.3. Kalzifizierungsbioassay an den Aortensegmenten

Die Aortasegmente wurden in DMEM für maximal 7 Tage in Gegenwart von Penicillin und Streptomycin inkubiert. Der Phosphatgehalt wurde auf entweder durch (A) Zugabe von NaH_2PO_4 oder durch (B) Zugabe von BGP und Ascorbinsäure auf 3,8 mM erhöht, als Phosphatlieferanten. Die Aortasegmente wurden in Abwesenheit und Anwesenheit der einzelnen Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie inkubiert. Die gewaschenen Segmente wurden über Nacht in Formaldehyd gelegt. Kalziumgehalt der Aortasegmente wurde wie folgt bestimmt.

4.1.4. Kalzifizierungsbestimmung

Die Aortensegmente wurden an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet, gewogen und in HCl gelöst. Der Kalziumgehalt im Gewebe wurde mittels des QuantiChrom™-Calcium-Assay-Kits entsprechend dem Herstellerprotokoll quantifiziert. Die inkubierten Aortasegmente im Kalzifizierungsmedium unter Zugabe von BGP und NaH_2PO_4 haben eine höhere Ca^{2+} -Konzentration im Gewebe ergeben verglichen mit den Aortasegmenten, die unter Kontrollkonditionen inkubiert worden waren.

Die Ca^{2+} -Konzentration, im Kalzifizierungsmedium (Zugabe von BGP und NaH_2PO_4) inkubierter Aortasegmente, ist signifikant gesunken in Anwesenheit der in **Abbildung 7** markierten Fraktion, im Vergleich zu den im Kalzifizierungsmedium inkubierter Aortasegmente ohne die Zugabe der isolierten Fraktionen.

4.1.5. Anionenaustausch-Chromatographie

Die in **Abbildung 7** markierte Fraktion wurde anschließend einer Anionenaustausch-Chromatographie unterzogen. Die Probe wurde auf eine Superformance 16 Säulengehäuse mit dem Volumen von 150 ml gegeben. Zur Entsalzung der Ionen-Austauscher-Fractionen wurde eine einstufige Reversed-Phase-Chromatographie durchgeführt. Die Entsalzung wurde für jeweils unterschiedliche Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie getrennt durchgeführt. Die Fraktionen wurden auf ihre Effekte auf die Kalzifizierung mit dem Kalzifizierungsbioassay getestet. Die eine Fraktion mit deutlichem inhibitorischen Effekt im Kalzifizierungsbioassay ist in **Abbildung 8** mit dem Pfeil markiert.

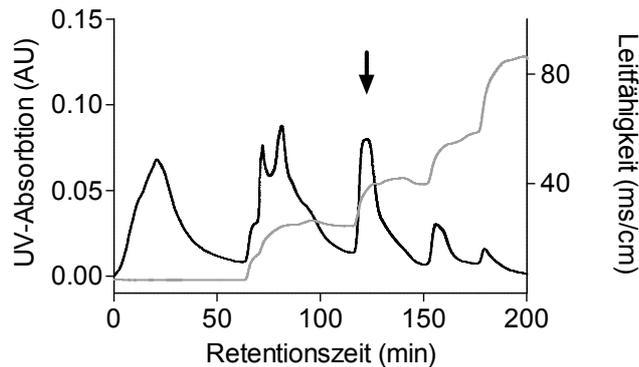


Abbildung 8: Anionenaustausch-Chromatogramm von dem Nebennierenkonzentrat (Säule: Superformance 16 Säule von 150 ml der Firma Merck, Innendurchmesser 30 cm x 1,6 cm, gefüllt mit Fractogel EMP TMAE (M); Puffer A (20 mM K_2HPO_4 -Lösung) und Puffer B (20 mM K_2HPO_4 in 1 M NaCl-Lösung) wurden mit NaOH auf einen pH-Wert von 8 eingestellt; Flussgeschwindigkeit: 3 ml/min; X-Achse: Retentionszeit (min); Y-Achse links: UV-Absorption bei 280 nm (relative Einheiten) Y-Achse rechts: Leitfähigkeit (ms/min); Kurvenlegende: UV-Absorption (-), Leitfähigkeit (-)

4.1.6. Reversed-Phase-Chromatographie, Lineargradient

Zur weiteren Auftrennung der in **Abbildung 8** markierten Ionen-Austauscher-Fractionen wurde eine Reversed-Phase-Chromatographie als Lineargradient durchgeführt. Es wurde die Reversed-Phase-Säule verwendet. Die Fraktionen wurden mittels des Lineargradienten fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihre kalzifizierenden Effekte mit dem Kalzifizierungsbioassay überprüft. Die eine Fraktion mit der deutlichen inhibitorischen Funktion ist in der **Abbildung 9** mit dem Pfeil markiert.

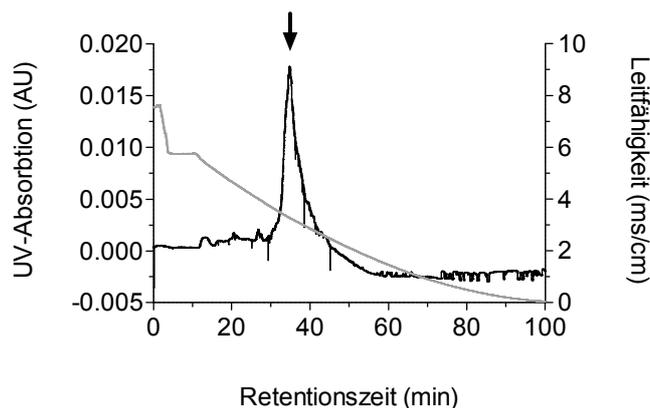


Abbildung 9: Reversed-Phase-Chromatogramm von dem Nebennierenkonzentrat (Säule: Chromolith RP-18e, 100 mm x 4,6 mm, Firma Merck; Eluent: 80% Acetonitril (ACN) in H_2O ; Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min; X-Achse: Retentionszeit (min); Y-Achse links: UV-Absorption bei 280 nm (relative Einheiten); Y-Achse rechts: Leitfähigkeit (ms/min); Kurvenlegende: UV-Absorption (-), Leitfähigkeit (-)

4.1.7. MALDI-Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse der Proben ist durch Matrix unterstützende Laserdesorptions-Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) durchgeführt worden. Ein Aliquot der Probe wurde auf das MALDI-Probentarget aufgetragen und massenspektrometrisch analysiert. Die Analyse ergab ein Signal, das nur in der Fraktion mit der deutlichen inhibitorischen Funktion im Kalzifizierungsbioassay nachweisbar war; dargestellt in **Abbildung 10**.

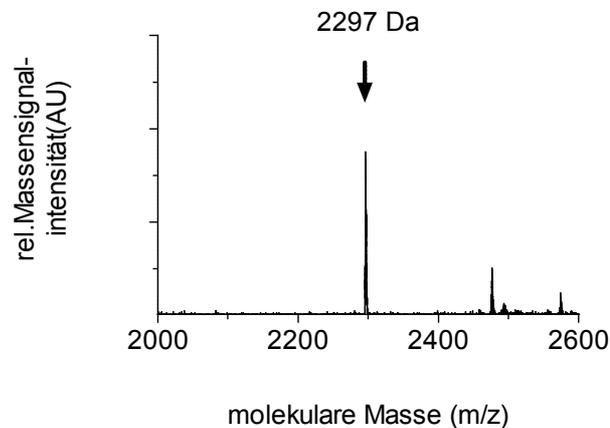


Abbildung 10: MALDI-TOF-Massenspektrum der Fraktion mit der deutlichen inhibitorischen Funktion im Kalzifizierungsbioassay. Es wurde ein Signal detektiert mit der Masse 2297 Da.

Im weiteren Schritt wurde dieses Signal fragmentiert und mittels RapiDeNovo-3.0.1-Sequenzierung (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) identifiziert; dargestellt in **Tabelle 5**.

Tabelle 5: Fragmentdarstellung des identifizierten Peptides aus der bovinen Nebenniere

| b-Fragmente | Masse in Da | y-Fragmente | Masse in Da |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| b1 | 113,87 | y19 | |
| b2 | 143,23 | y18 | 2183,74 |
| b3 | 300,06 | y17 | 2054,67 |
| b4 | 428,96 | y16 | 1997,66 |
| b5 | 558,07 | y15 | |

| | | | |
|-----|---------|-----|---------|
| b6 | | y14 | 1739,90 |
| b7 | | y13 | |
| b8 | 945,39 | y12 | 1481,69 |
| b9 | 1074,19 | y11 | |
| b10 | 1189,24 | y10 | 1223,81 |
| b11 | | y9 | 1108,78 |
| b12 | | y8 | |
| b13 | 1557,67 | y7 | 653,55 |
| b14 | | y6 | 740,15 |
| b15 | 1775,73 | y5 | |
| b16 | 1931,86 | y4 | 522,18 |
| b17 | | y3 | |
| b18 | | y2 | 253,12 |
| b19 | | y1 | |

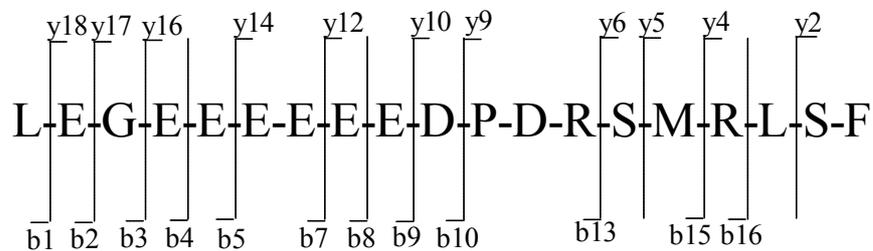


Abbildung 11: Die identifizierte Peptidsequenz der Fraktion mit der inhibitorischen Funktion im Kalzifizierungsbioassay mit der molekularen Massen 2297 mittels RapidDeNovo-Sequenzierung ermittelt, markiert in der **Abbildung 9**

Durch ein Datenabgleich mit der Mascot-Datenbank ergaben sich ein noch unbekanntes Peptid aus dem Mutterprotein Chromogranin A, dargestellt in **Abbildung 12**. Das Peptid mit der Masse 2297 $(M + H)^+$ und der Sequenz: LEGEEEEEEEDPDRSMRLSF wurde **Calcification Blocking Factor (CBF)** genannt.

| | | |
|-------------|-------------|-------------|
| MRSAAVLALL | LCAGQVIALP | VNSPMNKGDT |
| EVMKCIVEVI | SDTLSKPSPM | PVSKECFETL |
| RGDERILSIL | RHQNLLKELQ | DLALQGAKER |
| THQQKKHSSY | EDELSEVLEK | PNDQAEPKEV |
| TEEVSSKDAA | EKRDDFKEVE | KSDEDSGDGR |
| PQASPLGLPG | PKVEEDNQAP | GEEEEAPSNA |
| HPLASLPSPK | YPGPQAKEDS | EGPSQGPASR |
| EKGLSAEQGR | QTEREEEEEEK | WEEAEAREKA |
| VP EEESPPTA | AFKPPPSLGN | KETQRAAPGW |
| PEDGAGKMGA | EEAKPPEGKG | EWAHSRQEEE |
| EMARAPQVLF | RGGKSGEPEQ | EEQLSKEWED |
| AKRWSKMDQL | AKELTAEKRL | EGEEEEEEEDP |
| DRSMRLSFRA | RGYGFRGPGL | QLRRGWRPNS |
| REDSVEAGLP | LQVRGYPEEK | KEEEGSANRR |
| PEDQELESLS | AIEAELEKVA | HQLEELRRG |

Abbildung 12: Die Peptidsequenzen des detektierten Peptides nach dem Datenabgleich mit der Mascot Datenbank aus dem bovinen Protein Chromogranin A.

4.1.8. Peptidsynthese

Das bovine *CBF* wurde durch die Festphasemethode mittels Standard Fmoc Chemie im durchgehenden Flussmodus hergestellt. Die Reinigung des Peptids wurde mittels preparativer HPLC durchgeführt. Das gereinigte Peptid wurde lyophilisiert. Das Peptid wurde mittels MALDI Massenspektrometrie charakterisiert¹⁰. Das Spektrum zeigte die erwartete Masse ($M + H^+$).

4.1.9. Kalzifizierungsbioassay an den Aortensegmenten

Das Bioassay wurde in Anwesenheit und Abwesenheit des identifizierten Peptides *CBF* wie im **Abschnitt 4.2.1** durchgeführt. Die gereinigten Segmente wurden über Nacht in Formaldehyd gelegt. Der Kalziumgehalt der Aortasegmente wurde wie folgt bestimmt.

4.1.10. Kalzifizierungsbestimmung

Die Kalziumbestimmung erfolgte wie in **Abschnitt 4.2.2** beschrieben. Die inkubierten Aortensegmente im Kalzifizierungsmedium (unter Zugabe von BGP und NaH_2PO_4) haben eine höhere Ca^{2+} -Konzentration im Gewebe ergeben verglichen mit den Aortasegmenten, die unter Kontrollkonditionen inkubierten worden waren (BGP: 145 ± 8 vs. 95 ± 10 ; NaH_2PO_4 :

108 ± 11 vs. 95 ± 10; in nmol Ca²⁺/gGewebe; n=3). Die Ca²⁺ Konzentration im Kalzifizierungsmedium (Zugabe von BGP und NaH₂PO₄) inkubierter Aortasegmente ist signifikant gesunken in Anwesenheit des isolierten Peptides im Vergleich zu den im Kalzifizierungsmedium inkubierter Aortasegmente ohne die Zugabe des isolierten Peptides CBF (BGP: 145,7 ± 8,3 vs. 81,73 ± 5,6; NaH₂PO₄: 108 ± 10,6 vs. 74 ± 5; in nmol Ca²⁺/gGewebe; n=6).

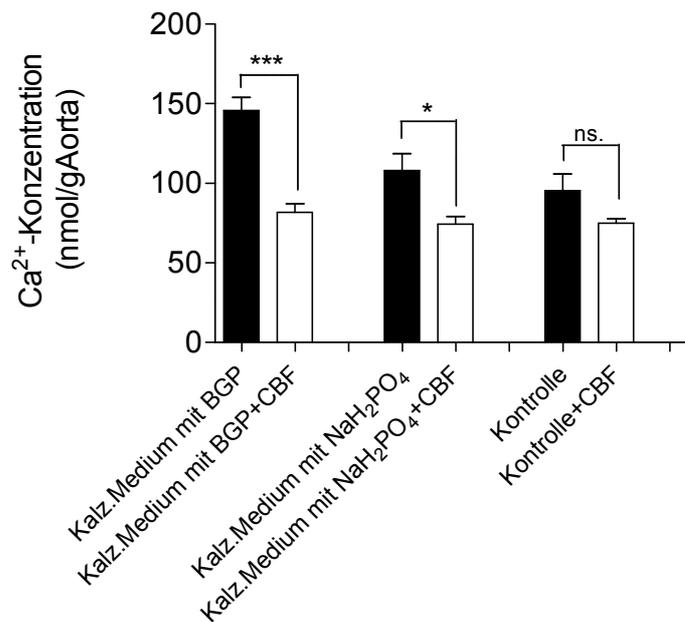


Abbildung 13: Ca²⁺-Konzentration der Aortasegmente (in nmol/g Aorta), inkubiert im Kalzifizierungsmedium mit Betaglycerolphosphat (BGP) oder NaH₂PO₄; in Abwesenheit und Anwesenheit des CBF-Peptides. p* < 0,05; p** < 0,001; p*** < 0,0001

4.1.11. Histochemische und immunohistochemische Analyses

Für die histochemische und immunohistochemische Analyse wurden die Schnitte zum einen mit *von Kossa Staining* gefärbt zum anderen mit Antikörpern behandelt. In **Abbildung 14** sind die Färbungen dargestellt.

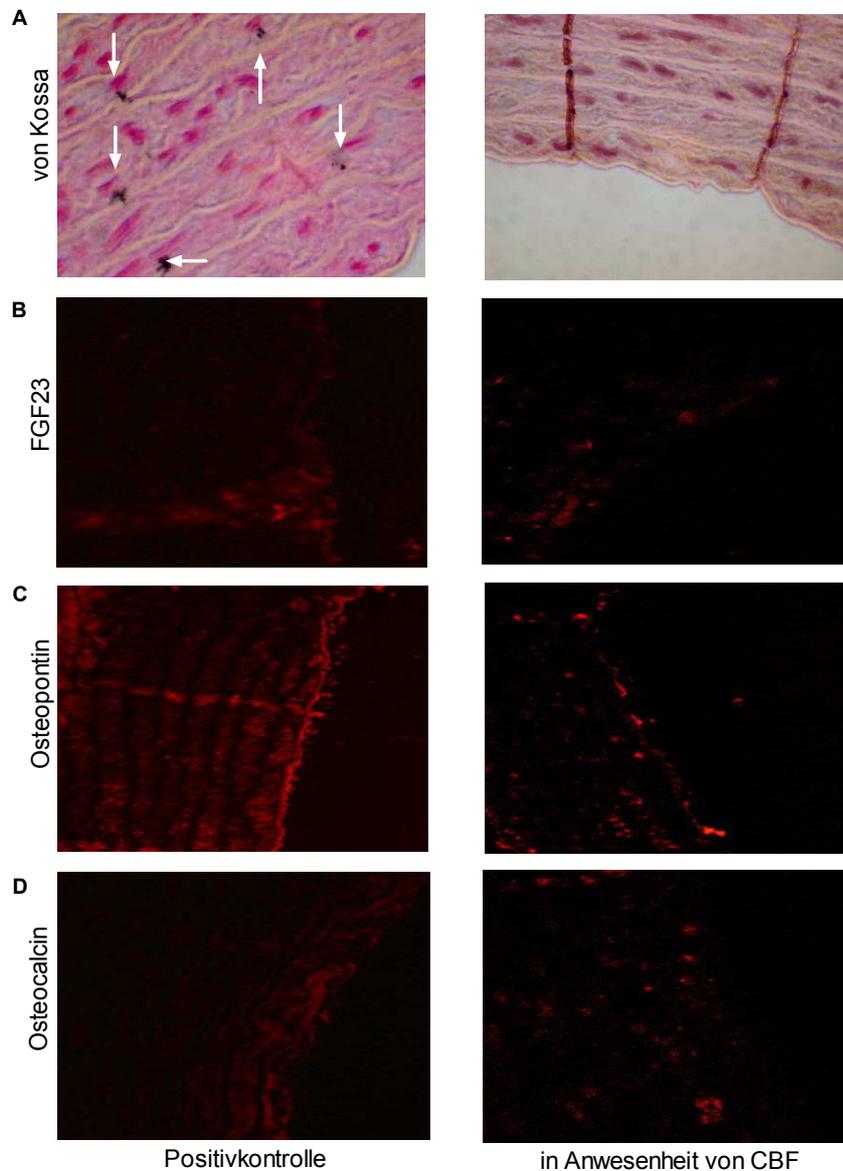


Abbildung 14: Representative immunohistochemische Abbildungen der Aortasegmente, die, A) von Kossa-Färbung B) FGF-23-Anfärbung, C) Osteopontin-Anfärbung, D) Osteocalcin-Anfärbung nach der Inkubation in Abwesenheit des CBF (linkes Bild), und in Anwesenheit von CBF (rechtes Bild).

In dem von Kossa Staining färben sich Kalziumablagerungen schwarz, die Zellkerne rot. Die von Kossa Färbung zeigt in der **Abbildung 14 A** schwarze Kalziumeinlagerungen in den Kalzifizierungskontrollen, markiert mit Pfeilen; daneben zeigen die Schnitte mit dem Zusatz des Peptides CBF keine sichtbaren Kalziumeinlagerungen. Die Antikörper Färbung

zeigt in der **Abbildung 14 B-D**, linkes Bild, deutliche Fluoreszenzsignale für Kalzifizierungsmarker wie FGF23, Osteopontin und Osteocalcin in den Kalzifizierungskontrollen. Die Segmente, denen das Peptid *CBF* zugegeben wurden, weisen eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität auf (**Abbildung 14 B-D**, rechtes Bild).

4.2. Extraktion aus dem humanen Plasma

Vollblut wurde CKD5-Patienten und nierengesunden Probanden entnommen und mit einem Proteinaseinhibitor versetzt. Die Proben wurden deproteiniert und durch Zentrifugation von dem Pellet befreit. Der Überstand der Probe wurde für weitere chromatographische Aufarbeitung bereit gestellt.

4.2.1. Reversed-Phase-Chromatographie

Zur weiteren Auftrennung der Proben wurde eine Reversed-Phase-Chromatographie als Stufengradient durchgeführt. Es wurde eine Reversed-Phase-Säule mit C_{18} Ketten verwendet. Die Fraktionen wurden mittels des Stufengradienten aufgetrennt. Die Fraktion wurde nach der bei der Nebennierenauftrennung bestimmten Retentionszeit bestimmt und gesammelt; analog zur Nebennierenauftrennung eluierte sie in der 40% Fraktion und ist mit dem Pfeil markiert.

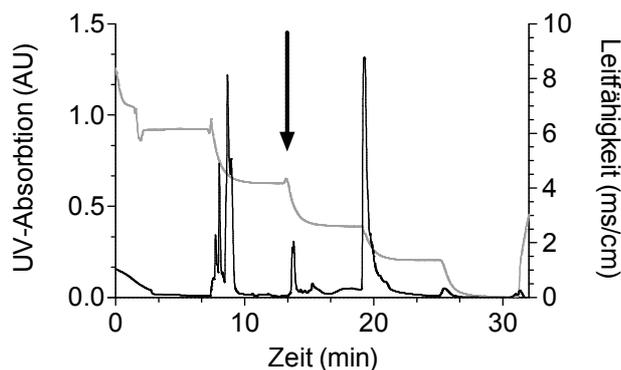


Abbildung 15: Reversed-Phase-Chromatogramm von humanem Plasma (Säule: Chromolith RP-18e, 100 mm x 4,6 mm, Firma Merck; Eluent: 80% Acetonitril (ACN) in H_2O ; Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min; X-Achse: Retentionszeit (min); Y-Achse links: UV-Absorption bei 280 nm (relative Einheiten) Y-Achse rechts: Leitfähigkeit (ms/min); Kurvenlegende: UV-Absorption (-), Leitfähigkeit (-)

4.2.2. Elektrospray-Ionisations-Massenpektrometrie

Das MS-Signal wurde mittels Flüssig-Chromatographie/Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI) Technik aufgenommen. Die Analyse ergab ein Signal mit der Masse 2243 Da ($M + H$)⁺, dargestellt in **Abbildung 16**.

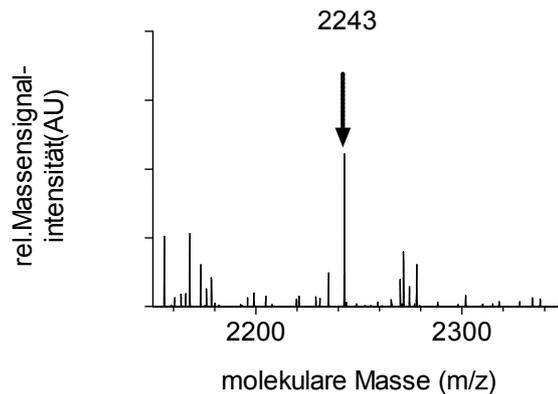


Abbildung 16: ESI-Massenspektrum der relevanten Fraktion nach der Reversed-Phase-Chromatographie mit der Masse 2243 Da.

Im weiteren Schritt wurden dieses Signal fragmentiert und mittels RapiDeNovo-3.0.1-Sequenzierung (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) identifiziert; dargestellt in **Tabelle 6**.

Tabelle 6: Fragmentdarstellung des identifizierten Peptides aus humanem Plasma

| b-Fragmente | Masse in Da | y-Fragmente | Masse in Da |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| b1 | 114,11 | y19 | 2242,9 |
| b2 | 243,00 | y18 | |
| b3 | | y17 | |
| b4 | 427,98 | y16 | 1944,05 |
| b5 | 556,81 | y15 | |
| b6 | | y14 | 1687,17 |
| b7 | 815,03 | y13 | 1557,28 |
| b8 | | y12 | |

| | | | |
|-----|---------|-----|---------|
| b9 | | y11 | |
| b10 | | y10 | 1184,40 |
| b11 | | y9 | 1070,61 |
| b12 | | y8 | 914,65 |
| b13 | 1531,77 | y7 | |
| b14 | | y6 | 712,29 |
| b15 | 1749,44 | y5 | 625,16 |
| b16 | 1877,49 | y4 | |
| b17 | | y3 | |
| b18 | | y2 | |
| b19 | | y1 | 165,79 |

Durch ein Datenabgleich mit der Mascot-Datenbank ergab sich das entsprechende Peptid aus dem Mutterprotein humanes Chromogranin A, dargestellt in **Abbildung 17**. Das Peptid mit der Masse 2243 ($M + H^+$) und der Sequenz: LEGQEEEEEDNRDSMKLSF entspricht dem humanen *Calcification Bloking Factor (CBF)*.

| | | |
|--------------------|-------------------|-------------------|
| MRSAAVLALL | LCAGQVTALP | VNSPMNKGDT |
| RGDERILSIL | RHQNLLKELQ | DLALQGAKER |
| AHQQKKHSGF | EDELSEVLEN | QSSQAELEKEA |
| VEEPSSKDVM | EKREDSKEAE | KSGEATDGAR |
| PQALPEPMQE | SKAEGNNQAP | GEEEEEEEEEA |
| TNTHPPASLP | SQKYPGPQAE | GDSEGLSQGL |
| VDREKGLSAE | PGWQAKREEE | EEEEEEAEAG |
| EEAVPEEEGP | TVVLNPHPSL | GYKEIRKGES |
| RSEALAVDGA | GKPGAEEAQD | PEGKGEQEHS |
| QQKEEEEEEMA | VVPQGLFRGG | KSGELEQEEE |
| RLSKEWEDSK | RWSKMDQLAK | ELTAEKRLEG |
| QEEEEEDNRDS | SMKLSFRARA | YGFRGPGPQL |
| RRGWRPSSRE | DSLEAGLPLQ | VRGYPEEKKE |
| EEGSANRRPE | DQELESLSAI | EAELEKVAHQ |
| LQALRRG | | |

Abbildung 17: Die Peptidsequenz der detektierten Substanz nach dem Datenabgleich mit der Mascot Datenbank aus dem humanem Protein Chromogranin A.

4.2.3. Peptidsynthese

Das humane CBF wurden durch die Festphasemethode mittels Standard Fmoc Chemie im durchgehenden Modus hergestellt. Die Aufreinigung des Peptids wurde mittels preparativer HPLC durchgeführt. Das aufgereinigte Peptid wurde lyophilisiert. Anschließend wurde das Peptid mittels MALDI Masspektroskopie charakterisiert¹¹⁰. Das Massenspektrum zeigte die erwartete Masse ($M + H^+$).

4.2.4. Plasmakonzentrationsuntersuchungen des CBF

Im weiteren Schritt wurde die Plasmakonzentration des neuen identifizierten Peptides CBF mittels der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie Technik bei chronisch niereninsuffizienten im Stadium 5 und nierengesunden Patienten gemessen und quantifiziert. Die Konzentration des Peptides wurde mittels Erstellung der Kalibrierkurven bestimmt und zwischen den CKD5 Patienten und Nierengesunden verglichen. Die klinischen Daten der Patienten sind in der **Tabelle 7** aufgeführt.

Tabelle 7: Klinische Daten der nierengesunden Kontrollpersonen und chronisch niereninsuffizienten CKD5 Probanden, die für die Bestimmung der CBF Plasmakonzentrationen verwendet wurden

| Variablen | CKD-Patienten | nierengesunde | Signifikanz |
|------------------|---------------|---------------|-------------|
| Alter | 69,64 ± 1,88 | 68,80 ± 7,78 | n.s. |
| Gewicht | 73,18 ± 3,5 | 64,4 ± 4,9 | n.s. |
| BMI | 24,77 ± 1,2 | 23,31 ± 1,4 | n.s. |
| Blutdruck (mmHg) | | | |
| systolisch | 155,5 ± 5,1 | 135,0 ± 6,5 | p>0,05 * |
| diastolisch | 85,9 ± 3,91 | 75,0 ± 3,3 | p>0,05 * |
| Kreatinin | 6,72 ± 0,66 | 0,67 ± 0,04 | p>0,001 *** |
| Hämoglobin | 10,67 ± 0,59 | 11,76 ± 0,66 | n.s. |
| Albumin | 3,48 ± 0,14 | 3,17 ± 0,33 | n.s. |
| Hämatokrit | 0,33 ± 0,02 | 0,35 ± 0,02 | n.s. |

Die **Abbildung 18** zeigt, dass chronisch nierenkranke Patienten eine signifikant niedrigere Plasmakonzentration von *CBF* aufweisen als die nierengesunden Patienten.

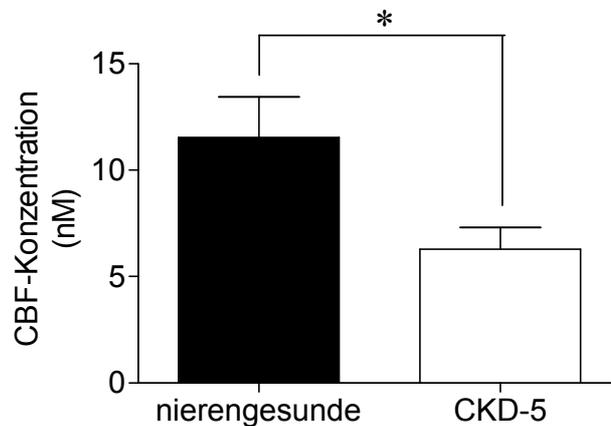


Abbildung 18: Die *CBF*-Konzentration in dem Plasma nierengesunder Kontrollpersonen und CKD-5 Probanden (in nM, $p < 0,05$, Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes, $n=10$); $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,001$; $p^{***} < 0,0001$

4.3. Ergebnisse, Teil 2

4.3.1. Nebenniere

Nach der mechanischen Desintegration und Extraktion der Nebennieren wurde die chromatographische Aufarbeitung analog zum ersten Teil durchgeführt; beschrieben im **Abschnitt 4.3**.

4.3.2. Reversed-Phase-Chromatographie

Zur Entsalzung und Konzentrierung der Proben wurde eine präparative Reversed-Phase-Chromatographie durchgeführt. Die Proben wurden auf eine LiChroprepSäule aufgetragen. Alle Fraktionen wurden mit dem Nierenperfusionstest, wie in dem Methodenteil unter **Abschnitt 3.5.6** beschrieben, auf ihre vasoregulierende Wirkung getestet. Die vasoregulierende Fraktion ist in der **Abbildung 19** mit dem Pfeil markiert.

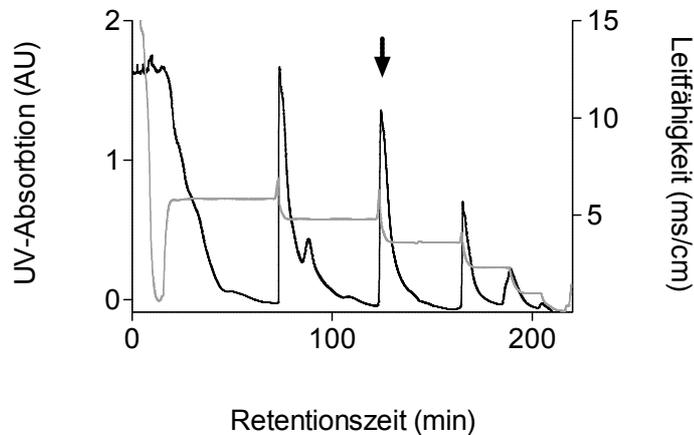


Abbildung 19: Reversed-Phase-Chromatogramm von dem Nebennierenkonzentrat (Säule: LiChroprep RP C18, 310 mm x 25 mm, Korngröße 40-63 µm, Firma Merck; Eluent: 80% Acetonitril (ACN) in H₂O; Flussgeschwindigkeit: 3 ml/min; X-Achse: Retentionszeit (min); Y-Achse links: UV-Absorption bei 280 nm (relative Einheiten) Y-Achse rechts Leitfähigkeit (ms/min); Kurvenlegende: UV-Absorption (-), Leitfähigkeit (-)

4.3.3. Bioassay an der isoliert-perfundierten Rattenniere

Nach der Entnahme der Rattenniere aus dem Retroperitonealraum und dem Anschluss an das Perfusionssystem wurden die Fraktionen an der isolierten perfundierten Rattenniere auf ihre vasoaktiven Eigenschaften analysiert. Die Fraktionen, die eine deutliche Verminderung der Vasokonstriktion des Angiotensin II bewirkten, wurden weiter chromatographisch aufgetrennt.

4.3.4. Anionenaustausch-Chromatographie

Die vasoregulative Fraktion wurde nun einer weiteren Auftrennung durch die Anionenaustausch-Chromatographie unterzogen. Die Probe wurde auf eine Superformance 16 Säule mit dem Volumen von 150 ml gegeben.

Zur Entsalzung der Ionen-Austauscher-Fraktionen wurde eine einstufige Reversed-Phase-Chromatographie durchgeführt. Die Entsalzung wurde für jeweils unterschiedliche Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie getrennt durchgeführt. Die Fraktionen wurden auf ihre Aktivität mit dem Nierenperfusionstest untersucht. Die vasoregulative Substanz in der Anionenaustausch-Chromatographie ist in der **Abbildung 20** gezeigt und mit einem Pfeil markiert.

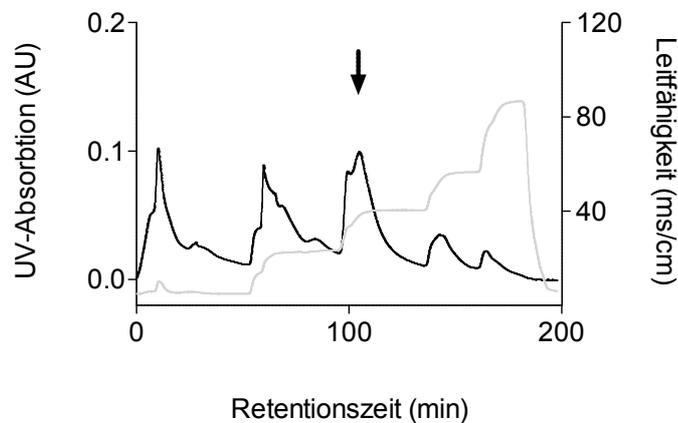


Abbildung 20: Anionenaustausch-Chromatogramm von dem Nebennierenkonzentrat (Säule: Superformance 16 Säule, von 150 ml, der Firma Merck, Innendurchmesser 30 cm x 1,6 cm, gestopft mit Fractogel EMP TMAE (M); Puffer A (20 mM K_2HPO_4 -Lösung) und Puffer B (20 mM K_2HPO_4 in 1 M NaCl-Lösung) wurden mit NaOH auf einen pH-Wert von 8 eingestellt; Flussgeschwindigkeit: 3 ml/min; X-Achse: Retentionszeit (min); Y-Achse links: UV-Absorption bei 280 nm (relative Einheiten) Y-Achse rechts Leitfähigkeit (ms/min); Kurvenlegende: UV-Absorption (-), Leitfähigkeit (-)

4.3.5. Reversed-Phase-Chromatographie, Lineargradient

Zur weiteren Auftrennung der vasoregulativen Fraktionen wurde eine Reversed-Phase-Chromatographie als Lineargradient durchgeführt. Dabei wurde eine Chromatographiesäule mit C_{18} Ketten verwendet. Die Fraktionen wurden mittels des Lineargradienten weiter aufgetrennt. Die aktive Fraktion ist in der **Abbildung 21** gezeigt und mit dem Pfeil markiert.

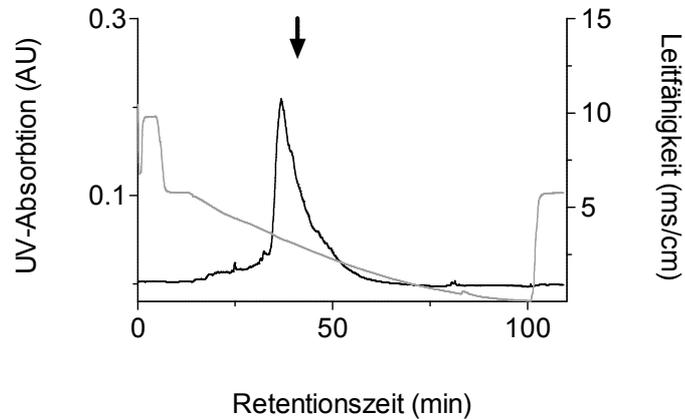


Abbildung 21: Reversed-Phase-Chromatogramm von dem Nebennierenkonzentrat (Säule: Chromolith RP-18e, 100 mm x 4,6 mm, Firma Merck); Eluent: 80% Acetonitril (ACN) in H₂O; Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min; X-Achse: Retentionszeit (min); Y-Achse links: UV-Absorption bei 280 nm (relative Einheiten) Y-Achse rechts: Leitfähigkeit (ms/min); Kurvenlegende: UV-Absorption (-), Leitfähigkeit (-)

4.3.6. Massenspektrometrie

4.3.6.1. MALDI - Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse der Proben ist durch (MALDI-TOF-MS) durchgeführt worden. Ein Aliquot der Probe wurde auf den MALDI-Target aufgetragen und massenspektrometrisch analysiert. Die Analyse ergab ein intensives Signal, welches so intensiv nur in der vasoregulatorisch wirksamen Fraktion detektiert werden konnte; dargestellt in **Abbildung 22**.

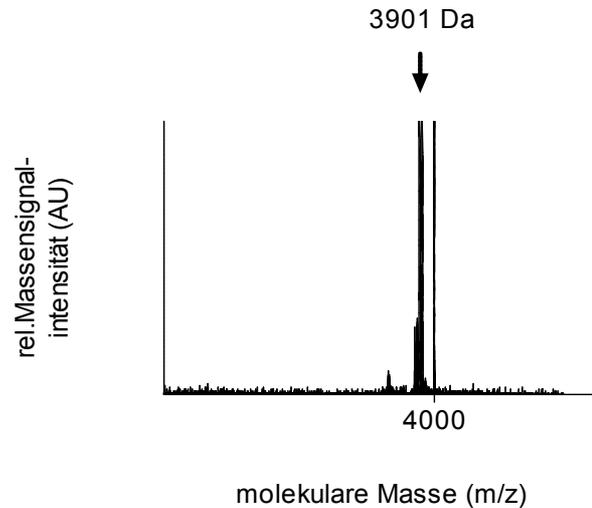


Abbildung 22: MALDI-TOF-Massenspektrum der vasoregulativen Fraktion der Reversed-Phase-Chromatographie als Lineargradient. Es wurde ein intensives Signal detektiert; mit der Masse 3901 Da.

Im weiteren Schritt wurde dieses Signal fragmentiert und mittels RapiDeNovo-3.0.1-Sequenzierung (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) identifiziert, beschrieben in **Tabelle 8** und dargestellt in **Abbildung 23**. Die Aminosäure Serin wurde dehydrolysiert detektiert. Dadurch ergab sich die Masse des gesamten Peptides von 3901 Da, die tatsächliche Masse des identifizierten Peptides beträgt 3919 Da.

Tabelle 8: Fragmentdarstellung des identifizierten Peptides aus dem Nebennierenkonzentrat

| b-Fragmente | Masse in Da | y-Fragmente | Masse in Da |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| b1 | | y35 | 3900,7 |
| b2 | | y34 | 3763,72 |
| b3 | | y33 | |
| b4 | | y32 | |
| b5 | 586,22 | y31 | 3444,60 |
| b6 | 701,25 | y30 | |
| b7 | 830,29 | y29 | 3200,53 |
| b8 | 943,38 | y28 | 3071,49 |

| | | | |
|-----|---------|-----|---------|
| b9 | 1030,41 | y27 | |
| b10 | 1159,45 | y26 | |
| b11 | 1258,55 | y25 | 2742,33 |
| b12 | 1371,61 | y24 | 2643,26 |
| b13 | 1500,65 | y23 | 2637,20 |
| b14 | 1628,74 | y22 | 2401,13 |
| b15 | | y21 | 2273,04 |
| b16 | | y20 | 2175,99 |
| b17 | | y19 | |
| b18 | 2082,90 | y18 | |
| b19 | 2153,96 | y17 | 1818,86 |
| b20 | 2283,00 | y16 | 1747,83 |
| b21 | | y15 | 1618,78 |
| b22 | | y14 | 1521,72 |
| b23 | 2637,20 | y13 | 1393,64 |
| b24 | | y12 | 1264,59 |
| b25 | | y11 | 1165,52 |
| b26 | 2966,35 | y10 | 1064,48 |
| b27 | 3095,40 | y9 | 935,46 |
| b28 | 3194,46 | y8 | 806,39 |
| b29 | 3281,49 | y7 | 707,32 |
| b30 | 3368,53 | y6 | 620,29 |
| b31 | | y5 | 533,25 |
| b32 | 3611,65 | y4 | |
| b33 | 3682,69 | y3 | |
| b34 | 3753,72 | y2 | |
| b35 | 3882,76 | y1 | |

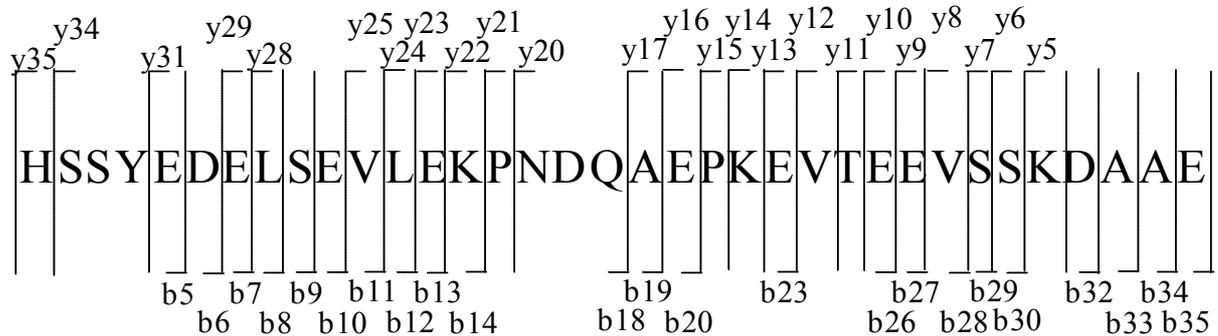


Abbildung 23: Mittels RapiDeNovo-Sequenzierung identifizierte Peptidsequenz der Fraktion mit der vasoaktiven Funktion im Nierenperfusionstest mit der detektierten molekularen Masse 3901 Da, markiert in der **Abbildung 22**, und der tatsächlichen molekularen Masse von 3919 Da.

Durch ein Datenabgleich mit der Mascot-Datenbank ergaben sich ein noch unbekanntes Peptid aus dem Mutterprotein Chromogranin A, dargestellt in **Abbildung 24**. Das Peptid mit der Masse 3919 Da $(M+H)^+$ und der Sequenz HSSYEDELSEVLEKPNDAQEPKEVTEEVSSKDAAE wurde **Vasoconstriction Inhibiting Factor (VIF)** genannt.

| | | |
|-------------|-------------|-------------|
| MRSAAVLALL | LCAGQVIALP | VNSPMNKGDT |
| EVMKCIVEVI | SDTLKSPSPM | PVSKECFETL |
| RGDERILSIL | RHQNLLKELQ | DLALQGAKER |
| THQQKKHSSY | EDELSEVLEK | PNDQAEPKEV |
| TEEVSSKDAA | EKRDDFKEVE | KSDSDSDGDR |
| PQASPLGLPG | PKVEEDNQAP | GEEEEAPSNA |
| HPLASLPSPK | YPGPQAKEDS | EGPSQGPASR |
| EKGLSAEQGR | QTEREEEEEEK | WEEAEAREKA |
| VP EEESPPTA | AFKPPPSLGN | KETQRAAPGW |
| PEDGAGKMG | EEAKPPEGKG | EWASRQEEE |
| EMARAPQVLF | RGGKSGEPEQ | EEQLSKEWED |
| AKRWSKMDQL | AKELTAEKRL | EGEEEEEEEDP |
| DRSMRLSFRA | RGYGFRGPGL | QLRRGWRPNS |
| REDSVEAGLP | LQVRGYPEEK | KEEEGSANRR |
| PEDQELESLS | AIEAELEKVA | HQLEELRRG |

Abbildung 24: Die Peptidsequenzen der detektierten Substanz aus dem bovinen Protein Chromogranin A nach dem Datenabgleich mit der Mascot-Datenbank.

4.3.6.2. *Elektrospray-Ionisations-Massenpektrometrie*

Das MS-Signal wurde mittels Flüssig-Chromatography/Elektrospray-Massenpektrometrie (ESI) Technik aufgenommen. Das Massensignal von 3901 Da ($M+H^+$) (**Abbildung 22**) wies ein dehydrolysiertes Serin auf, ein Phänomen, das wahrscheinlich durch die Probenvorbereitung für die Matrix unterstützende Laserdesorptions-Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) aufgetreten ist. Durch die Messung mit der Elektrospray-Ionisations-Masspektrometrie konnte dieses Problem umgangen werden und die korrekte Masse des Peptides von 3919 Da detektiert werden (**Abbildung 25**).

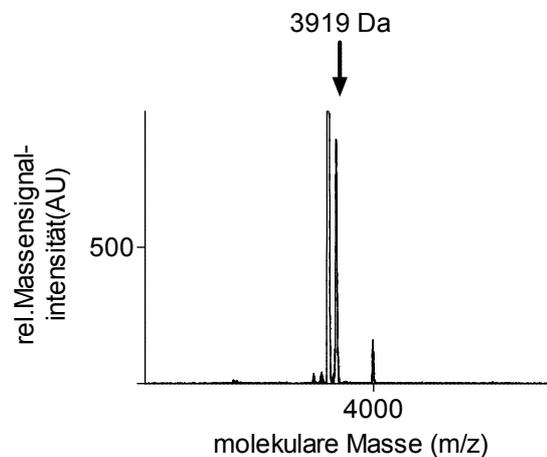


Abbildung 25: MS-ESI-Massenspektrum der vasoaktiven Fraktion mit der Masse 3919 Da, die in dem MALDI-TOF-Massenspektrum mit dem Massensignal von 3901 Da detektiert worden ist.

4.3.7. *Peptidsynthese*

Das bovine VIF wurde automatisch durch die Festphasemethode mittels Standard Fmoc Chemie im durchgehenden Flussmodus hergestellt. Die Reinigung des Peptids wurde mittels preparativer HPLC durchgeführt. Das aufgereinigte Peptid wurde lyophilisiert. Das Peptid wurde mittels MALDI Massenspektrometrie charakterisiert¹¹⁰. Das Spektrum zeigte die erwartete Masse ($M + H^+$).

4.3.8. Bioassay an der isoliert- perfundierten Rattenniere

Die **Abbildung 26** zeigt, dass das humane *VIF*-Peptid die Wirkung des Angiotensin II merklich mindert. Die obere Kurve stellt den Druckanstieg in der *arteria renalis* dar, der durch die steigende Konzentration des eingespritzten Angiotensin II sich verstärkt. Die Kurve zeigt einen sigmoidalen Verlauf. Die untere Kurve zeigt die Dosiswirkungskurve des Angiotensin II in Gegenwart von *VIF* (10^{-6} mol/l), das vorab in die Perfusionslösung gegeben worden war. Die Zugabe des *VIF* bedingt eine deutliche Verminderung der Vasokonstriktion des Angiotensin II bei gleicher Konzentration.

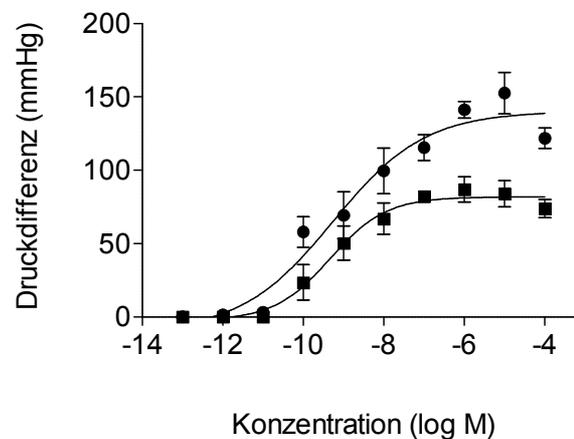


Abbildung 26: Die Vasokonstriktion durch das Angiotensin II Peptid in Abwesenheit (●) und Anwesenheit (■) des isolierte Peptides; Y-Achse: Perfusionsdruckanstieg in mmHg; X-Achse: Ansteigende Konzentration von Angiotensin II in log M; n=3

Im Anschluss wurde die stark vasokonstriktorisch wirkenden Substanz, Epinephrin getestet, in Anwesenheit und Abwesenheit des *VIF* (**Abbildung 27**). Die Perfusion der isolierten perfundierten Niere mit *VIF* bedingte, dass die vasokonstriktorische Eigenschaft des Epinephrin ebenfalls deutlich gemindert wurde.

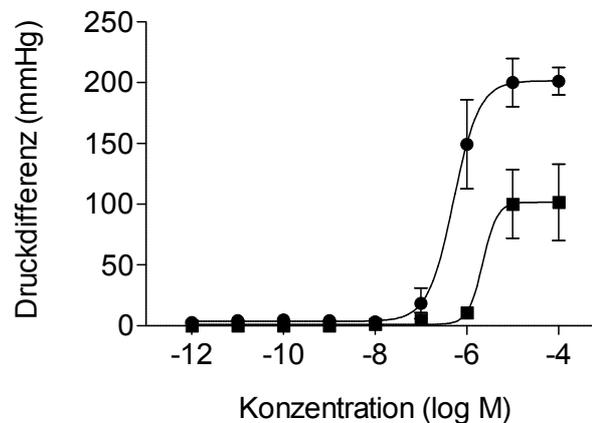


Abbildung 27: Die Vasokonstriktion durch Epinephrin in Abwesenheit (●) und Anwesenheit (■) des VIF-Peptides; Y-Achse: Perfusionsdruckanstieg in mmHg; X-Achse: Ansteigende Konzentration von Epinephrin in log M; n=3

4.3.9. Extraktion aus dem humanen Plasma

Vollblut wurde CKD5-Patienten und gesunden Probanden entnommen und mit einem Proteinaseinhibitor versetzt. Die Proben wurden deproteiniert und durch Zentrifugation von dem Pellet befreit. Die Probenvorbereitung erfolgte wie im **Abschnitt 3.5.15** beschrieben. Der Überstand der Probe wurde für weitere chromatographische Aufarbeitung bereitgestellt.

4.3.10. Reversed-Phase-Chromatographie

Zur weiteren Auftrennung der Proben wurde eine Reversed-Phase-Chromatographie als Stufengradient durchgeführt. Es wurde eine Chromatographiesäule mit C₁₈ Ketten verwendet. Die Fraktionen wurden mittels eines Stufengradienten aufgetrennt. Die vasoregulative Substanz wurde Anhand der Retentionszeit der Fraktion aus dem bovinen Nebennierenkonzentrat bestimmt und gesammelt; gezeigt in der **Abbildung 28** und mit dem Pfeil markiert.

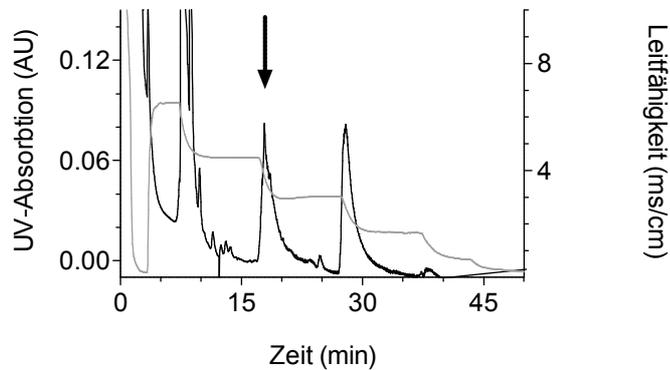


Abbildung 28: Reversed-Phase-Chromatogramm des humanen Plasmas (Säule: Chromolith RP-18e, 100 mm x 4,6 mm, Firma Merck; Eluent: 80% Acetonitril (ACN) in H₂O; Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min; X-Achse: Retentionszeit (min); Y-Achse links: UV-Absorption bei 280 nm (relative Einheiten), Y-Achse rechts: Leitfähigkeit (mS/cm); Kurvenlegende: UV-Absorption (-), Leitfähigkeit (-)

4.3.11. Elektrospray-Ionisations-Massenpektrometrie

Das MS-Signal wurde mittels Flüssig-Chromatographie/Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI) Technik aufgenommen. Die Analyse ergab ein Signal mit der Masse 3907 Da ($M+H$)⁺, dargestellt in **Abbildung 29**.

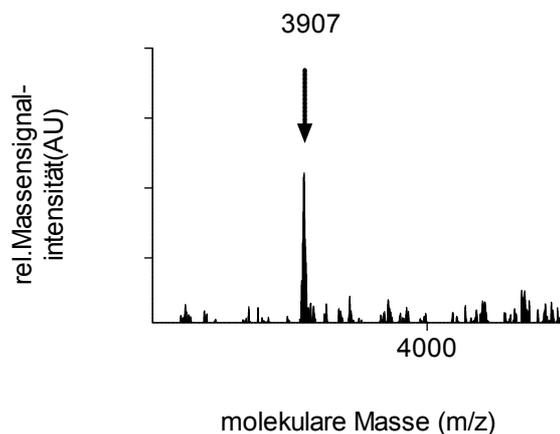


Abbildung 29: ESI-Massenspektrum der Fraktion mit einem Effekt am Nierenperfusionstest nach der Reversed-Phase-Chromatographie. Es wurde ein Signal detektiert; mit der Masse 3907 Da.

In einem weiteren Schritt wurde das isolierte Peptid fragmentiert und mittels RapiDeNovo-3.0.1- Sequenzierung (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) identifiziert, dargestellt in

Tabelle 9.

Tabelle 9: Klinische Daten der nierengesunder Kontrollpersonen und dialysepflichtiger Probanden, die für die Bestimmung der CBF Plasmakonzentrationen verwendet wurden

| b-Fragmente | Masse in Da | y-Fragmente | Masse in Da |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| b1 | | y35 | |
| b2 | | y34 | |
| b3 | | y33 | |
| b4 | | y32 | |
| b5 | | y31 | |
| b6 | 673,15 | y30 | 3350,04 |
| b7 | 802,15 | y29 | |
| b8 | | y28 | |
| b9 | 1002,19 | y27 | |
| b10 | 1131,64 | y26 | 2905,35 |
| b11 | | y25 | |
| b12 | | y24 | 2677,19 |
| b13 | 1472,45 | y23 | 2564,15 |
| b14 | 1586,43 | y22 | |
| b15 | 1714,76 | y21 | |
| b16 | | y20 | 2192,87 |
| b17 | 1888,64 | y19 | 2106,38 |
| b18 | 2017,29 | y18 | 2019,23 |
| b19 | 2087,44 | y17 | 1890,97 |
| b20 | 2216,95 | y16 | |
| b21 | | y15 | |
| b22 | | y14 | |
| b23 | | y13 | 1449,47 |
| b24 | | y12 | 1320,72 |
| b25 | | y11 | |

| | | | |
|-----|---------|-----|---------|
| b26 | | y10 | 1150,06 |
| b27 | | y9 | 1021,19 |
| b28 | | y8 | |
| b29 | | y7 | |
| b30 | | y6 | |
| b31 | | y5 | |
| b32 | | y4 | |
| b33 | 3628,69 | y3 | |
| b34 | | y2 | |
| b35 | | y1 | |

Durch ein Datenabgleich mit der Mascot-Datenbank ergab sich das entsprechende Peptid aus dem Mutterprotein humanes Chromogranin A, dargestellt in **Abbildung 30**. Das Peptid mit der Masse 3907 (M + H)⁺ und der Sequenz HSGFEDELSEVLENQSSQAEELKEA-VEEPSSKDVM entspricht dem humanem *Vasoconstriction Inhibiting Factor (VIF)*.

| | | |
|-------------|------------|-------------|
| MRSAAVLALL | LCAGQVTALP | VNSPMNKGDT |
| RGDERILSIL | RHQNLLKELQ | DLALQAKER |
| AHQQKKHSGF | EDELSEVLEN | QSSQAEELKEA |
| VEEPSSKDVM | EKREDSKEAE | KSGEATD GAR |
| PQALPEPMQE | SKAEGNNQAP | GEEEEEEEEEA |
| TNTHPPASLP | SQKYPGPQAE | GDSEGLSQGL |
| VDREKGLSAE | PGWQAKREEE | EEEEEEAEAG |
| EEAVPEEEGP | TVVLNPHPSL | GYKEIRKGES |
| RSEALAVDGA | GKPGAEEAQD | PEGKGEQEHS |
| QQKEEEEEEMA | VVPQGLFRGG | KSGELEQEEE |
| RLSKEWEDSK | RWSKMDQLAK | ELTAEKRLEG |
| QEEEEEDNRDS | SMKLSFRARA | YGFRGPGPQL |
| RRGWRPSSRE | DSLEAGLPLQ | VRGYPEEKKE |
| EEGSANRRPE | DQELESLSAI | EAELEKVAHQ |
| LQALRRG | | |

Abbildung 30: Die Peptidsequenzen des identifizierten Peptides nach dem Datenabgleich mit der Mascot Datenbank aus dem humanen Protein Chromogranin A.

4.3.12. Peptidsynthese

Das humane VIF wurde automatisch durch die Festphasemethode mittels Standard Fmoc Chemie im durchgehenden hergestellt. Die Reinigung des Peptids wurde mittels preparativer HPLC durchgeführt. Das gereinigte Peptid wurde lyophilisiert. Das Peptid wurde mittels MALDI-Masspektroskopie charakterisiert¹¹⁰. Das Spektrum zeigte die erwartete Masse ($M+H^+$).

4.3.13. Bioassay an der isoliert-perfundierten Rattenniere

Das synthetisierte Peptid wurde nun an der isolierten und perfundierten Niere getestet. **Abbildung 31** zeigt, dass die Wirkung des Angiotensin II merklich durch das humane VIF-Peptid gemindert wurde. Die obere Kurve stellt den Perfusionsdruckanstieg in den Gefäßen und damit den Grad der Vasokonstriktion dar, die durch die steigende Konzentration des eingespritzten Angiotensin II sich verstärkt. Die Kurve zeigt einen sigmoidalen Verlauf. Die untere Kurve zeigt die Dosiswirkungskurve des Angiotensin II in Gegenwart von humanem VIF (10^{-6} mol/l), das vorab in die Perfusionslösung gegeben worden war. Die Zugabe des VIF bedingt eine deutliche Verminderung der Vasokonstriktion des Angiotensin II bei der gleichen Konzentration.

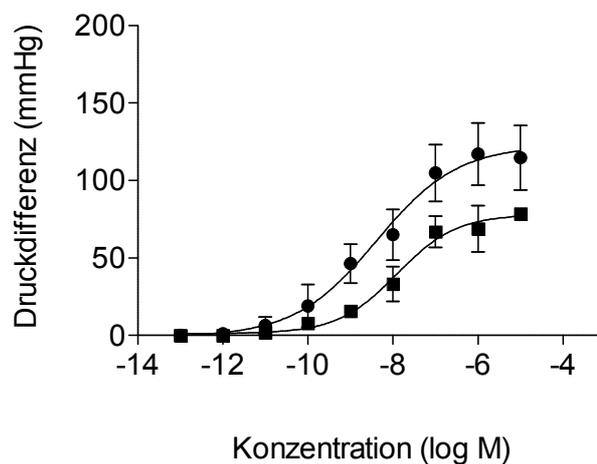


Abbildung 31: Die Vasokonstriktion durch das Angiotensin II Peptid in Abwesenheit (●) und Anwesenheit (■) des VIF-Peptides; Y-Achse: Perfusionsdruckanstieg in mmHg; X-Achse: Ansteigende Konzentration von Angiotensin II in log M; n=3

Im Anschluss wurde die stark vasokonstriktorisch wirkenden Substanz, Epinephrin getestet in Anwesenheit und Abwesenheit des humanen VIFs getestet (**Abbildung 32**). Die Perfusion der isolierten perfundierten Niere mit VIF bedingte kein Unterschied in der vasokonstriktorischen Wirkung des Epinephrins. Alle weitere Versuche wurden aus diesem Grund mit Angiotensin II durchgeführt.

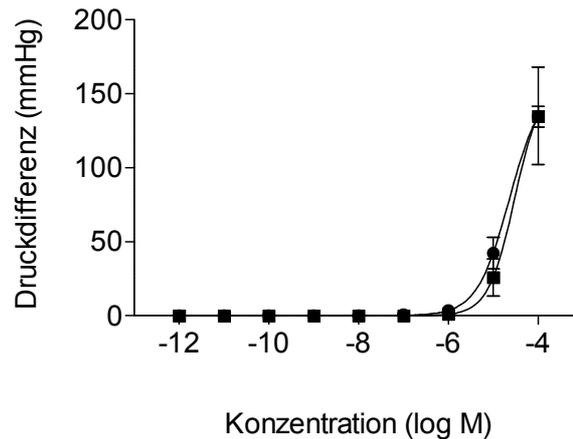


Abbildung 32: Die Vasokonstriktion durch Epinephrin in Abwesenheit (●) und Anwesenheit (■) des VIF-Peptides; Y-Achse: Perfusionsdruckanstieg in mmHg; X-Achse: Ansteigende Konzentration von Epinephrin in log M; n=3

4.3.14. Einfluss des L-NAME auf die Wirkung des VIF

Zum Ausschluss der VIF-Wirkung durch die endothelabhängige NO-Aktivität, wurde die Niere mit 10^{-5} M L-NAME für 15 min perfundiert. L-NAME blockiert die endothelabhängige NO-Freisetzung. **Abbildung 33** zeigt eine stärkere Vasokonstriktion durch Angiotensin II in Anwesenheit des L-NAME, als in seiner Abwesenheit.

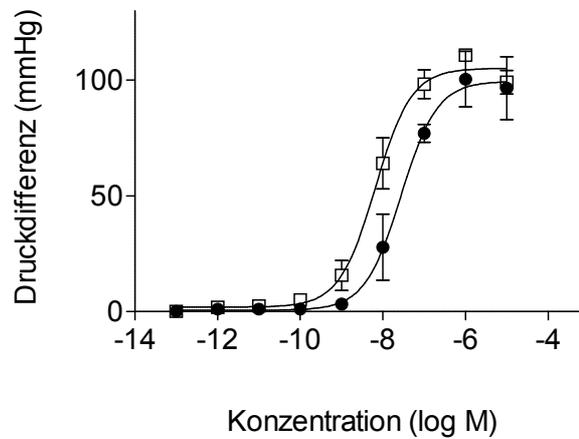


Abbildung 33: Die Vasokonstriktion des Angiotensin II Peptides in Abwesenheit (●) und Anwesenheit (□) von L-NAME; Y-Achse: Druckanstieg in mmHg; X-Achse: Ansteigende Konzentration von Angiotensin in log M; n=3

Der Versuch wurde fortgesetzt, indem Angiotensin II in den Kreislauf unter Perfusion mit L-NAME injiziert wurde und die Druckveränderung beobachtet wurde; dasselbe wurde unter der zusätzlichen Perfusion mit dem Peptid VIF wiederholt. Der Druckanstieg des Angiotensin II mindert sich jedoch in Anwesenheit des VIF-Peptides trotz der Inhibition des NO-Pathways. Die **Abbildung 34** zeigt, dass die Dosiswirkungskurve des Angiotensin II in Anwesenheit des VIF in der Perfusionslösung deutlich unterhalb der Dosiswirkungskurve des Angiotensin II in Abwesenheit von VIF in der Perfusionslösung liegt; auch in Gegenwart von L-NAME.

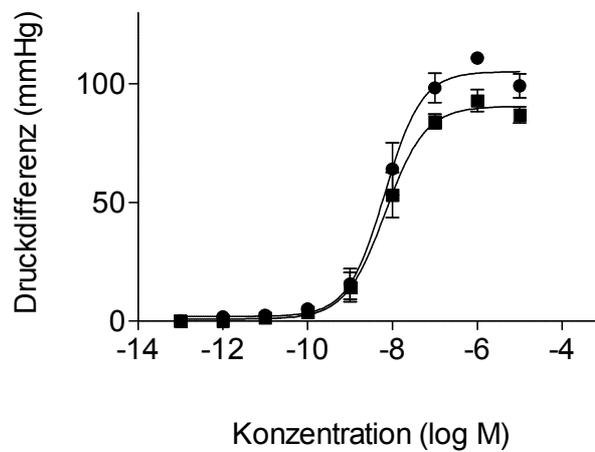


Abbildung 34: Die Vasokonstriktion des Angiotensin II Peptides in Anwesenheit des L-NAME und Abwesenheit (●) und Anwesenheit (■) des VIF-Peptides; Y-Achse: Perfusionsdruckanstieg in mmHg; X-Achse: Ansteigende Konzentration von Angiotensin in log M; n=3

4.3.15. Plasmakonzentrationsuntersuchungen des VIF

In einem weiteren Schritt wurde die Plasmakonzentration des neuen identifizierten Peptides *VIF* mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie Technik bei chronischen niereninsuffizienten Patienten im Stadium 5 und nierengesunden Patienten gemessen und quantifiziert. Die Konzentration der Peptide wurde mittels Erstellung der Kalibrierkurven bestimmt und zwischen den CKD 5 Patienten und Nierengesunden verglichen. Die klinischen Daten der Patienten sind in der **Tabelle 7** aufgeführt. **Abbildung 35** zeigt, dass die Plasmakonzentration von *VIF* bei den chronisch nierenkranken Patienten tendenziell erhöht ist.

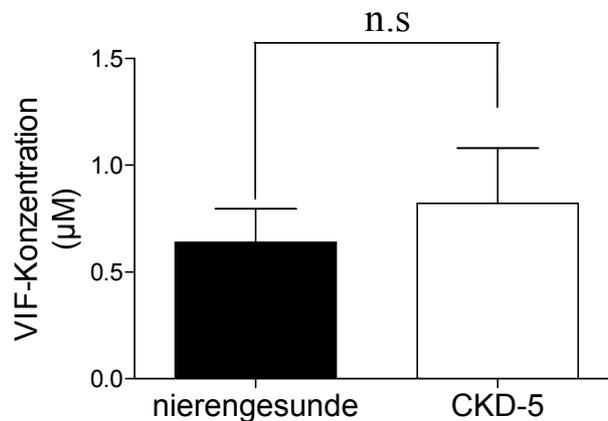


Abbildung 35: Die VIF-Konzentration in dem Plasma nierengesunder Kontrollpersonen und CKD5 Patienten (in μM , $p < 0,05$, Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes, $n=10$); $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,001$; $p^{***} < 0,0001$

4.4. Ergebnisse Teil 3

4.4.1. Bioassay an der isoliert-perfundierten Rattenniere

Die Versuche mit dem CBF-Peptid an der isolierten perfundierten Niere ergaben keine Ergebnisse.

4.4.2. Kalzifizierungsbioassay an den Aortensegmenten

Das Bioassay wurde in Abhängigkeit des identifizierten Peptides VIF wie im **Abschnitt 4.2.1** durchgeführt.

4.4.3. Kalzifizierungsbioassay

Der Kalziumgehalt im Gewebe wurde mittels QuantiChrom™ Calcium Assay Kit entsprechend dem Herstellerprotokoll quantifiziert wie im **Abschnitt 4.2.2** beschrieben. Die Ca^{2+} -Konzentration im Kalzifizierungsmedium (Zugabe von BGP und NaH_2PO_4) inkubierter Aortasegmente, ist signifikant in Anwesenheit der isolierten Peptides VIF gesunken im Vergleich zu den im Kalzifizierungsmedium inkubierter Aortasegmente ohne die Zugabe des isolierten Peptides. (BGP: $145,7 \pm 8,3$ vs. BGP + VIF: $81,95 \pm 10,3$; NaH_2PO_4 : $108 \pm 10,6$ vs. NaH_2PO_4 + VIF: $65,3 \pm 0.006625$; in $\text{nmol Ca}^{2+}/\text{gGewebe}$; $n=6$), (**Abbildung 36**).

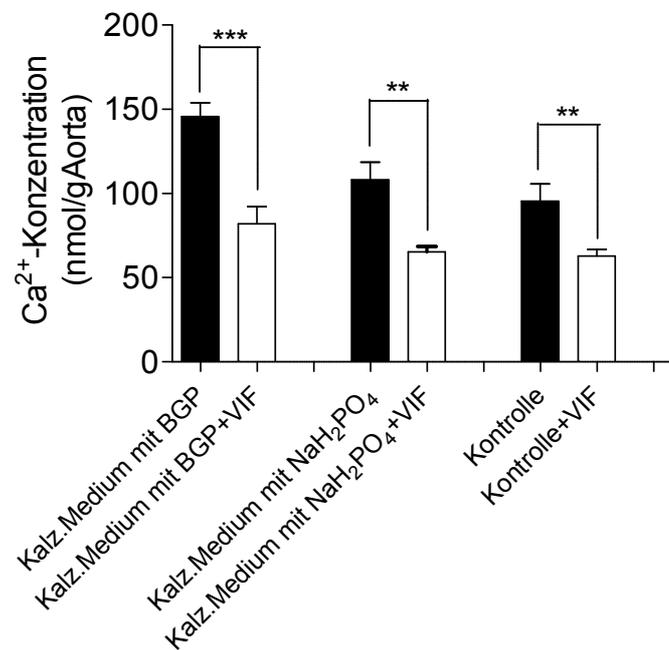


Abbildung 36: Ca²⁺-Konzentration der Aortasegmente (in nmol/g Aorta), inkubiert im Kalzifizierungsmedium mit Betaglycerolphosphat (BGP) oder NaH₂PO₄, in Abwesenheit und Anwesenheit des VIF Peptides. $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,001$; $p^{***} < 0,0001$

4.4.4. Histochemische und immunohistochemische Analyse

Für die histochemische und immunohistochemische Analyse wurden die Schnitte zum einen mit von Kossa gefärbt, zum anderen mit Antikörpern behandelt. In **Abbildung 39** sind die Färbungen dargestellt.

Die von Kossa Färbung zeigt in **Abbildung 39 A** schwarz gefärbte Kalziumeinlagerungen in den Kalzifizierungskontrollen, markiert mit Pfeilen; daneben weisen die Schnitte mit dem Zusatz des Peptides VIF keine sichtbaren Kalziumeinlagerungen auf. Die Antikörper-Anärbung zeigt in **Abbildung 39 B-D**, linkes Bild deutliche Fluoreszenzsignale für Kalzifizierungsmarker wie FGF-23, Osteopontin und Osteocalcin in den Kalzifizierungskontrollen. Die Segmente, denen das Peptid VIF zugegeben wurde, weisen eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität auf (**Abbildung 39 B-D**, rechtes Bild).

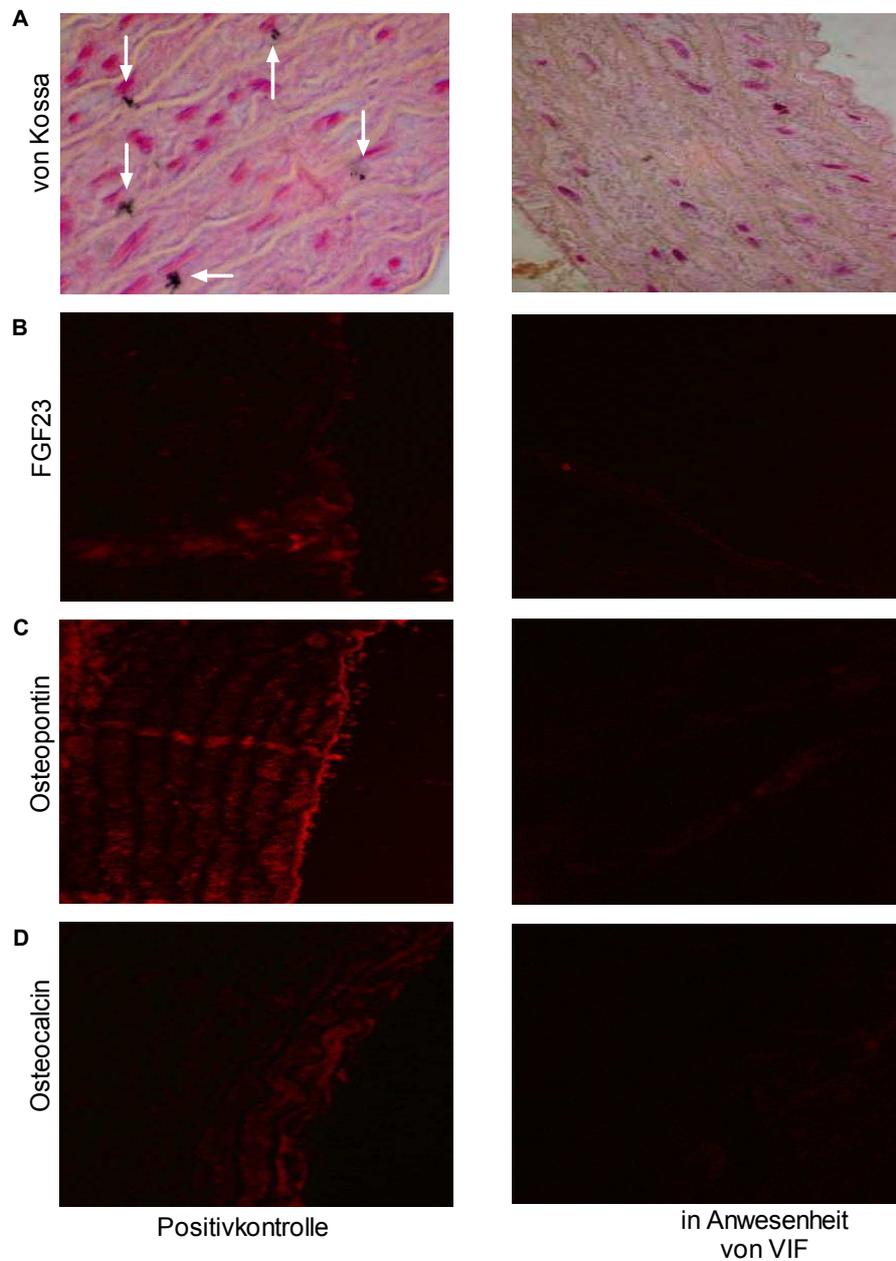


Abbildung 37: Representative immuno- und histochemische Abbildungen der Aortasegmente: A) Von Kossa-Färbung; B) FGF-23-Anfärbung; C) Osteopontin-Anfärbung; D) Osteocalcin-Anfärbung nach der Inkubation in Abwesenheit des VIF (linkes Bild), und in Anwesenheit des VIF (rechtes Bild)

5. Diskussion

5.1. Vaskuläre Kalzifizierung und kardiovaskuläre Mortalität

Vaskuläre Kalzifizierung ist ein essentieller Prozess für das Fortschreiten der kardiovaskulären Erkrankungen mit Folge einer erhöhten Mortalität, sowohl in der Allgemeinbevölkerung als auch in den CKD-Patienten¹¹¹. Studien belegen, dass sowohl inhibierende als auch induzierende Mediatoren in den Prozess der vaskulären Kalzifizierung involviert sind¹⁰¹.

Gleichgewichtstörungen zwischen diesen inhibierenden und induzierenden Mediatoren können durch Verletzungen des Endothels oder diverse Krankheitsbilder verursacht werden, die letztendlich zur Kalziumeinlagerungen in der Gefäßwand führen¹⁰¹. Ein Beispiel hierfür sind Glukokortikoide, welche die osteogenetische Differenzierung der vaskulären glatten Muskelzellen induzieren und dadurch die vaskuläre Kalzifizierung vorantreiben¹⁰². Auch zeigen Studien, dass es einen Zusammenhang zwischen dem *Cushing Syndrom* und den kardiovaskulären Erkrankungen, unter anderem auch vaskulärer Kalzifizierung, gibt¹⁰⁰. Endogene Glukokortikoide werden von der Nebenniere freigesetzt¹⁰².

In Anlehnung an diese Daten und der Tatsache, dass die Nebenniere ein bedeutsames Drüsenorgan ist, lag dieser Arbeit die Hypothese zugrunde, dass noch unbekannte Mediatoren, sowohl mit inhibierenden als auch mit induzierenden Eigenschaften aus der Nebenniere sezerniert werden könnten. Die Kalzifizierung der Media ist unabhängig von den artherosklerotischen Plaques und einer Inflammation des Endothels²⁸. Die genaue Pathophysiologie der Mediakalzifizierung ist noch weitgehend unbekannt. Die Mediakalzifizierung betrifft neben den großen Gefäßen, wie der Brustaorta, auch vorwiegend kleine Gefäße und ist mit verminderter Gefäßelastizität assoziiert^{27; 112}. Die Lokalisation der Kalzifizierung ist vorwiegend in den elastischen Laminae und den glatten Muskelzellen der Mediaschicht³¹⁻³³. Bezeichnend für die Mediakalzifizierung ist, dass sie im späteren Stadium der Intimakalzifizierung, durch den Übergriff des Kalzifizierungsprozesses auf die glatte Muskulatur oder aber auch unabhängig von der Anwesenheit von inflammatorischen Zellen und Lipidzellen, die für die Entwicklung der Intimakalzifizierung unentbehrlich sind, vorkommt.

5.2. *Diskussion der Methodik*

Die Auswahl des bovinen Nebennierengewebes erfolgte aus ethischen Gründen, da es unmöglich und ethisch nicht vertretbar war genügend Aufarbeitungsmaterial aus humanem Gewebe zu bekommen. Des Weiteren konnten die bovinen Nebennieren, für die chromatographische Aufreinigung unter idealen Bedingungen entnommen werden. Außerdem war das bovine Gewebe in ausreichend großen Mengen leicht in den Schlachthöfen zu bekommen, so dass genügend Substanz für die Aufarbeitung vorhanden war. Die chromatographische Auftrennung richtete sich nach vorher stattgefundenen Pilotversuchen in denen die optimale Kombination der unterschiedlichen Chromatographieschritte ermittelt wurde. Im ersten Schritt erfolgte die Reversed-Phase-Chromatographie. Da diese auf hydrophoben Wechselwirkungen basiert, wurde das Substanzgemisch mit einem Ionenpaarreakanz (TFA) neutralisiert. Durch die Bildung der Ionenpaare wurde eine gute Bindung an die Reversed-Phase-Säule gewährleistet. Acetonitril wurde zur Eluation verwendet. Durch die nachfolgende Lyophilisierung wurden die Lösungsmittel verdampft, so dass keine störenden Faktoren die Bioassays beeinflussen konnten, da z.B. Acetonitril auf die isolierte perfundierte Niere toxisch wirkt. Gleichzeitig erfolgt in diesem Chromatographieschritt eine Entsalzung, was ebenso für die physiologischen Bioassays von essentieller Bedeutung ist, da hohe Salzkonzentrationen im Kalzifizierungsbioassay den Kalzifizierungsprozess stark stimulieren. Dies wurde in Pilotversuchen bei Inkubationen der Aortasegmente mit NaCl und MgCl₂ nachgewiesen¹¹³. Auch am Nierenperfusionstest verfälschen hohe Salzkonzentrationen die Ergebnisse. Beide Peptide eluierten in der 40% Fraktion. Zu weiteren Aftrennung wurde die Ionenaustauschchromatographie gewählt, um die anionischen Substanzen von den kationischen zu trennen. Sowohl das *CBF* als auch *VIF* erwiesen sich als anionische Substanzen. Da bei dieser Methode mit hohen Salzkonzentrationen gearbeitet wird wurde im Anschluss eine Reversed-Phase-Chromatographie durchgeführt, um die Proben für den Test an den physiologischen Bioassays vorzubereiten. Da die Probe sich weiterhin nicht als homogen erwiesen haben, wurde eine Reversed-Phase-Chromatographie mit einem langen Lineargradienten gewählt. Da nach diesem Aufarbeitungsschritt die Proben massenspektrometrisch gemessen wurden, war der erneute Entsalzungsschritt sehr nützlich, da sogar geringe Salzmengen die Ionisationsfähigkeit der Substanzen beeinträchtigen

und zu verrauschten Spektren führen, sodass eine Detektion korrekter Signale und deren Identifikation sehr erschwert wird.

Der Bioassay zur Kalzifizierung wurde im Rahmen der Studie zu den kalzifizierungsinhibierenden Eigenschaften des Magnesiums¹¹³ etabliert. Das Model der Aortasegmente wurde dem der glatter Muskelzellen vorgezogen, weil die Gefäßarchitektur so erhalten bleibt und der *in vitro* Versuch so weit wie möglich die physiologischen Gegebenheiten imitieren sollte. Auf die Zugabe des fetalen Serums wurde verzichtet, da es zu einer starken Proliferation der glatten Muskulatur führte¹¹³. Der Assay an der isolierten und perfundierten Niere wurde ebenso in Pilotversuchen etabliert und den physiologischen Gegebenheiten so weit wie möglich angeglichen. Nach dem die Substanzen getestet worden waren, wurden sie Massenspektrometrisch untersucht und identifiziert. Im weiteren Schritt wurden die Bioassays mit den synthetischen Peptiden wiederholt, um sicherzustellen, dass das richtige Peptid identifiziert wurde und es in der synthetischen Variante die gleichen Eigenschaften besitzt.

Um bei der massenspektrometrischen Untersuchung die Abweichungen zu detektieren und den Substanzverlust berechnen zu können, wurden den Proben ein interner Standard, Gluthation zugesetzt. Die Identifizierung erfolgte mittels RapiDeNovo-3.0.1- Sequenzierung (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland). Hierbei wird die Aminosäuresequenz rein rechnerisch anhand der vorhandenen Fragmente ermittelt, ohne eine Datenbankabfrage durchzuführen. Um das Ergebnis zu bestätigen wurde daraufhin ein Datenabgleich mit der Mascot-Datenbank (Matrix Science, UK) durchgeführt.

5.3. Chromogranin Peptide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Chromogranin A Peptide identifiziert: das *CBF*, welches eine inhibierende Wirkung im Prozess der vaskulären Kalzifizierung aufweist, und das *VIF*, das außer der inhibierenden Wirkung im Prozess der vaskulären Kalzifizierung auch in die Regulation des Vasotonus eingebunden ist und die Konstriktionspotenz des Vasokonstriktors Angiotensin II deutlich mindert. Chromogranin wird aus sekretorischen Zellen aus verschiedenem Gewebe, aus neuronalem, neuroendokrinen oder endokrinen Gewebe¹¹⁴ sezerniert. Dieses Protein ist als Tumormarker-Protein beschrieben¹¹⁵. Der Einfluss auf kardiovaskuläre Erkrankungen wie essentielle Hypertonie und Arteriosklerose ist nur

ansatzweise bekannt¹¹⁶. Chromogranin A ist das Vorläuferprotein für eine Anzahl von biologisch aktiver Peptide, wie z.B. Vasostatin-I (humanes CHGA 1-97)¹¹⁷⁻¹¹⁹, Vasostatin-II (humanes CHGA 1-113)^{119; 120} und Catestatin (humanes CHGA 352-372)^{117; 121}, die eine regulatorische Funktion in kardiovaskulären Erkrankungen haben. Sowohl Vasostatin I als auch Vasostatin II inhibieren die Vasokonstriktion in isolierten humanen Gefäßen¹²². Vasostatin I ist ein Gegenregulator im adrenergvermittelten kardialen Inotropismus¹²³. Während die Chromogranin A Konzentration bei den Patienten mit essentieller Hypertonie hoch ist, ist gleichzeitig die Catestatin Konzentration im Vergleich zu Kontrollgruppe erniedrigt¹²⁴. Da schon in den frühen Stadien der Erkrankung die Patienten erniedrigte Catestatin-Plasmaspiegel aufweisen, ist davon auszugehen, dass Catestatinmangel einen Einfluss auf die Genese der Hypertonie hat¹²⁵. Weiterhin wirkt Catestatin als ein Inhibitor für die Freisetzung der Katecholamine und ist ein potenter Vasodilatator^{126; 127}. Sowohl Vasostatin als auch Catestatin haben antimikrobiotische Eigenschaften gegen spezielle Mikroorganismen¹²⁸. Als Chromogranin A Peptide wurden erstmalig im Rahmen dieser Arbeit das *CBF* und *VIF* Peptid aus der bovinen Nebenniere isoliert und identifiziert und zeigten einen *in-vitro* inhibierenden Effekt auf die vaskuläre Kalzifizierung bzw. das *VIF* auch auf die vaskuläre Konstriktionsregulation. Darüberhinaus haben wir mittels chromatographischer und mass-spektrometrischer Methoden das humane *CBF* und *VIF* aus dem humanen Plasma isoliert und identifiziert werden. Auch das humane *CBF* und *VIF* zeigten *in-vitro* einen inhibierenden Effekt auf die vaskuläre Kalzifizierung und das humane *VIF* auch auf die vaskuläre Konstriktionsregulation. Allerdings war die vasoregulatorische Wirkung des humanen *VIF* nur auf die vasokonstriktive Potenz des Angiotensin II beschränkt, wobei das bovine *VIF* auch Epinephrins vasokonstriktive Potenz deutlich minderte.

5.4. Kalzifizierungsparameter

Der kalzifizierungsinhibierende Effekt der isolierten und identifizierten Chromogranin A Peptide wird durch die erniedrigten Expressionen von FGF23, Osteopontin und Osteocalcin bestätigt. *CBF* und *VIF* vermindern die Transdifferenzierung der vaskulären glatten Muskelzellen in Osteoblasten ähnliche Zellen. Der Transdifferenzierungsprozess ist eine der Ursachen für den Ummodulierungsprozess der vaskulären Gefäßwand, welcher im Phänotyp der Gefäßkalzifizierung sichtbar wird¹²⁹.

Die Funktion des FGF-23 dabei ist stark umstritten. Einerseits wird FGF-23 als eine sekundäre Erscheinung der Störungen im metabolischen Knochen- und Mineralhaushalt, vor allem bei CKD Patienten, diskutiert¹³⁰. Allerdings zeigen andere Studien, dass FGF-23 als zentraler Faktor in der vaskulären Kalzifizierung eine große Rolle spielt: FGF-23 inhibiert die Calcitriolproduktion und erniedrigt die intestinale Phosphatabsorption^{131; 132}. Weiterhin ist FGF-23, durch Induktion von Phosphaturie und Blockade der tubulären Phosphatresorption¹³³, in die physiologische Regulation des Phosphatserum-Levels eingebunden. FGF-23 unterdrückt aktiv die Sekretion von PTH¹³⁴, wodurch der Entwicklung des sekundären Hyperparathyroidismus bei den CKD-Patienten entgegen gewirkt wird. Sekundärer Hyperparathyroidismus ist wesentlich für die Entwicklung der vaskulären Kalzifizierung¹³⁴. FGF-23 kompensiert offenbar durch die Regulierung des Serumphosphatlevel das Nierenversagen, deshalb wird FGF-23 auch als „neues phosphaturische Hormon“ genannt¹³³. Der vaskuläre Kalzifizierungsprozess ist mit dem Ossifikationsprozess des Knochen zu vergleichen, beruhend auf der Umwandlung der vaskulären glatten Muskelzellen in Osteoblasten ähnliche Zellen¹³⁵ und die daraus folgende Ossifizierung der Gefäßwand in Form von Kalzifizierung. Da das FGF-23 auch in den Kalkläsionen der Gefäße detektiert werden konnte, kann vermutet werden, dass die Kalzifizierung der Gefäße dem Ossifikationsprozess im Knochen ähnelt. In der vorliegenden Arbeit war die FGF-23 Detektion in den Aortensegmenten, die in Anwesenheit von *CBF* und *VIF* behandelt wurden deutlich geringer als in den im Kalzifizierungsmedium inkubierten Positivkontrollen. Die FGF 23 Expression ist offenbar in die Regulation des Knochen- und Mineralmetabolismus eingebunden, somit ist eine erniedrigte FGF-23 Expression als Folge des verringerten Kalzifizierungsprozesses zu sehen.

Während der Umwandlung der vaskulären glatten Muskelzellen in Osteochondrozyten- und Osteoblasten-ähnliche Zellen werden Osteopontin und Osteocalcin exprimiert. Während nicht phosphoryliertes Osteopontin einen fördernden Einfluss auf den Kalzifizierungsprozess hat, wird phosphoryliertes Osteopontin als inhibitorisch angesehen¹³⁶. Die erhöhte Osteopontin- und Osteocalcinexpression ist ein Indikator für die fortschreitende Umwandlung der vaskulären glatten Muskelzellen in Osteoblasten ähnliche Zellen und damit für vaskulärer Kalzifizierung^{136; 137}. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression des Osteopontins^{138; 139} in Anwesenheit des *CBF* und *VIF* Peptides erheblich gemindert ist, somit inhibieren offensichtlich diese Peptide die Entstehung der Hydroxyapatit-

Kristalle. Ebenso ist auch Osteocalcin-Expression in Anwesenheit der beiden Peptide gemindert. Diese Erkenntnisse lassen insgesamt die Schlussfolgerung zu, dass *CBF* und *VIF* sowohl die Umwandlung der vaskulären glatten Muskelzellen in Osteoblasten ähnliche Zellen verhindern als auch die Formierung von Hydroxyapatit-Kristalle mindern.

5.5. *Cbfa1*

Core binding factor α 1 (Cbfa1) ist in den Umwandlungsprozess der vaskulären glatten Muskelzellen in Osteoblasten ähnliche Zellen eingebunden^{140; 141}. *Cbfa1* ist vor allem in Anwesenheit von Betaglycerolphosphat (*BGP*)⁹⁵ und in der kalzifizierten *Media* und *Intima* der Gefäße der *CKD* Patienten, die sich einer Nierentransplantation unterzogen haben, hochreguliert anzutreffen¹⁴⁰.

Insgesamt ist *Cbfa1* ein zentraler Faktor im Umwandlungsprozess der *VSMC* in Osteoblasten ähnliche Zellen. *Cbfa1* ist in Erkrankungen wie Diabetes oder Arteriosklerose, die stark mit vaskulärer Kalzifizierung assoziiert sind, hochreguliert¹⁴². Die Bedeutung des *Cbfa1* für den Kalzifizierungsprozess wird ersichtlich aus der betreffenden Tierstudien an Mäusen, die eine homozygote Mutation im *Cbfa1*-Lokus aufwiesen. Diese verstarben nach der Geburt wegen des Fehlens der Ossifizierung des Skellettsystems¹⁴³. In weiteren Studien wurde *Cbfa1* als der Schlüsselregulator für die Osteoblastenreifung in *in vitro* und *in vivo* Studien durch Behandlung der Knochenmarkstammzellen mit *cbfa1/osf2* Genen belegt¹⁴⁴. Andere Studien zeigen eine Hochregulation des *Cbfa1* und Osteocalcins in kalzifizierten Arterien von *CKD* Patienten, jedoch keine Hochregulation in nicht kalzifizierten Gefäßen¹⁴⁵. Zusammenfassend ist *Cbfa1* ein regulatorischer Faktor der vaskulären Kalzifizierung¹⁴⁶.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die neuen Chromograninpeptide *CBF* und *VIF* die dem *Cbfa1* nachgeschalteten Proteine Osteopontin und Osteocalcin herunter regulieren und somit dem Risiko der Entwicklung koronarer Herzerkrankungen entgegen wirken. Es kann vermutet werden, dass die Peptide direkt in die Regulation des *Cbfa1* eingebunden sind und *Core binding factor α 1* runterregulieren, wodurch der Kalzifizierungsprozess gemindert wird.

5.6. **Bedeutung des Angiotensins**

Die Mediakalzifizierung, früher als Mönckebergsclerose bekannt, ist ein aktiver Umwandlungsprozess der glatten Muskelzellen zu Osteoblasten ähnlichen Zellen. Der Pathomechanismus ist jedoch nicht gänzlich bekannt¹⁴⁷. Es gibt jedoch Hinweise, dass vasoaktive Substanzen wichtige Regulatoren in diesem Prozess sind. Physiologisch vorkommende Peptide wie Endothelin-1 und Urotensin II sind beispielsweise Promoter der vaskulären Kalzifizierung, während Adrenomedullin und „C-type natriuretische Peptid“ die Kalzifizierung inhibieren^{148; 149; 150}. Die Bedeutung des potenten vasoaktiven Angiotensin II Peptides wurde bis jetzt in diesem Zusammenhang nicht hinreichend geklärt. Eine neue Studie zeigt, dass Angiotensin II die NAD(P)H-oxidase Aktivität induziert und dadurch zelluläre Sauerstoffradikale, *reactive oxygene species*, (ROS) erhöht¹⁵¹, ROS seinerseits stimuliert den im **Abschnitt 5.4** beschriebene Osteoblasten Transkriptionfaktor *Runx2/Cbfa1*, was zur Vasomodulierung in der glatten Muskulatur führt¹⁵². Durch die Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) durch Pharmaka, konnte die kardiovaskuläre Mortalität in Risikopatienten gesenkt werden, ohne dass der Blutdruck verändert wurde^{153; 154; 155; 156}, was die Vermutung nahe legt, dass das RAAS nicht nur in der Blutdruckregulation von Bedeutung ist, sondern auf anderem Weg zur kardiovaskulären Mortalität Beitrag leistet, z.B. durch vermehrte Kalkablagerungen in der Media durch Hochregulierung des Transkriptionfaktors *Runx2/Cbfa1*. Ebenso konnte gezeigt werden, dass in den Kalkablagerungen der Media vermehrt, nach der Umwandlung der glatten Muskelzellen in Osteoblasten, eine erhöhte AT1-Rezeptoren Expression stattgefunden hat^{147,157}. AT1 Rezeptoren sind für die Signalvermittlung des RAAS essentiell. Durch Angiotensin-Renin Blocker ist es gelungen, die Mediakalzifizierung signifikant zu senken und damit die vaskuläre Modulierung zu beeinflussen¹⁴⁷. Das Renin-Angiotensin-System ist für die Entwicklung der Arteriosklerose relevant. In dieser Hinsicht kann die Wirkung des *VIF* relevant sein, da es ein potenter Kalzifizierungsinhibitor ist und selektiv die Wirkung des Vasokonstriktors Angiotensin II mindert. Die Vermutung, dass *VIF* durch die Inhibierung der AT1 Rezeptoren wirkt wäre in weiteren Studien zu untersuchen. Auch die Rolle der AT2-Rezeptoren in dieser Hinsicht wäre zu untersuchen. Es kann vermutet werden, dass *VIF* durch die partielle Inhibierung der AT1- Rezeptoren und Stimulierung der AT2-Rezeptoren seine gefäßprotektive Wirkung entfaltet. Des Weiteren sollte in diesem Zusammenhang den in die Ent-

wicklung der Hypertonie involvierter Faktoren mehr Beachtung geschenkt werden in Hinsicht auf Gefäßschädigung und daraus entstehende vaskuläre Kalzifizierung. Im Anfangsstadium der Hypertonie wurde bei Patienten ein erhöhtes Herzauswurfvolumen, aber normaler peripherer Widerstand gemessen, d.h. der erhöhte Blutdruck wird vor allem durch sympathische Überaktivität verursacht. Die Erhöhung des peripheren Widerstandes wird dann als Regulationsmechanismus vom Organismus eingesetzt, um dem steigenden Blutdruck entgegen zu wirken. Hält dieser Zustand lange an, kommt es zur Remodulierung der Arteriolenwände⁵⁶. Damit ist der Prozess einer sich entwickelnden vaskulären Kalzifizierung durch Vasokonstriktoren initiiert. Da es bei anhaltendem Stress zur sympathischen Überaktivierung des Organismus kommt, wird Stress als einer der Gründe genannt, der diesen Mechanismus initiiert¹⁵⁸. Bei erhöhtem andauernden Stress kommt es wiederum zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems. Es scheint eines der potentesten endokrinen Systeme zu sein, das vom Organismus zur Kontrolle des Blutdruckes eingesetzt wird¹⁵⁹. Renin wird aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere freigesetzt, wenn die Niere beispielsweise mangelhaft durchblutet wird oder eine Ischämie vorliegt. Renin metabolisiert Angiotensinogen in das nicht-vasoaktive Angiotensin I, das in der Lunge durch das Angiotensin-Konvertierungsenzym (ACE) in vasoaktives Angiotensin II umgewandelt wird. Des Weiteren begünstigt Angiotensin II die Sezernierung von Aldosteron aus der Nebenniere, welches die Salz- und Wasserretention regelt^{160; 161}. Die Studie von Weiss et al. zeigt, dass apoE-defiziente Mäuse unter normaler Diät und Angiotensin II Zufuhr signifikant stärkere Gefäßkalzifizierungen aufwiesen als die Kontrollgruppe oder eine Gruppe mit atherogenen Diät⁶⁰. Mäuse mit atherogener Diät und Angiotensin II entwickelten eine sehr aggressive voranschreitende, starke Form der vaskulärer Kalzifizierung⁶⁰. Parallel wurde eine Norepinephrin induzierte Hypertonie untersucht. Die vaskuläre Kalzifizierung war deutlich schwächer ausgeprägt als in den Angiotensin-II-Induziert hypertonen Ratten. Die Entwicklung der Gefäßkalzifizierung ist somit nicht auf den mechanischen Effekt des Bluthochdruckes zurück zuführen, sondern primär auf spezifische humorale Effekte des Angiotensin II¹⁶². Die Aktivierung der NADPH-Oxidase glatter Muskelzellen spielt diesbezüglich eine besondere Rolle⁶⁵. Da *VIF* vor allem den angiotensininduzierten Bluthochdruck vermindert und die vaskuläre Kalzifizierung mindert, könnte es in der Behandlung der betreffenden Patientengruppen bedeutend sein.

5.7. *Klinische Bedeutung*

Um die *in vitro* Ergebnisse zu validieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Plasma Konzentration des *CBF* und *VIF* in nierengesunden und terminal niereninsuffizienten Patienten bestimmt. Da Antikörper für die zwei Peptide gegenwärtig nicht zu Verfügung stehen wurden die betreffenden Plasmaspiegel mittels chromatographischer Aufreinigung und massenspektrometrischer Messmethoden bestimmt. CKD Patienten hatten signifikant niedrigere Plasmalevel vom *CBF* Peptid als Nierengesunde (**Abbildung 18**). Die terminal Niereninsuffiziente haben jedoch tendentiell höhere *VIF* Plasmaspiegel als die Nierengesunden (**Abbildung 37**). Da vaskuläre Kalzifizierung eine der wichtigsten Ursachen für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen und die spätere Mortalität in den betroffenen Risikogruppen darstellt, könnte die Funktion der zwei Peptide *CBF* und *VIF* zur Verbesserung der Lebenserwartung und -qualität beitragen.

6. Zusammenfassung

Vaskuläre Kalzifizierung kommt bei den terminal niereninsuffizienten Patienten deutlich häufiger als bei der Normalbevölkerung vor. Einer der wichtigsten Risikofaktoren hierbei ist die Hypertonie. Studien zeigen, dass vaskuläre Kalzifizierung von inhibierenden Biomolekülen wie Pyrophosphat und den *Fibroblast Growth Factor 23* (FGF-23) vermindert wird. Auch Senkung des Bluthochdruckes wirkt präventiv in Hinsicht auf die Entwicklung der vaskulären Kalzifizierung. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Isolierung und Identifizierung zweier neuer unbekannter Peptide: des *Calcification Blockung Factor* (CBF) und des *Vasoconstriction Inhibiting Factor* (VIF). Vorwiegend aus der Nebenniere sezerniert und als ein Bestandteil des humanen Plasmas, weisen beide vasoprotektive Eigenschaften im Ummodulierungsprozess der Gefäßwand, typisch für den durch erhöhte Phosphat und Kalziumlevel induzierten Kalzifizierungsprozess, auf. Diese Form der Kalzifizierung ist besonders häufig unter terminalen Niereninsuffizienten anzutreffen.

Die Peptide wurden aus den bovinen Nebennieren isoliert und mittels unterschiedlicher chromatographischer Techniken bis zur Homogenität aufgereinigt. Nach dem Screening der Fraktionen durch den Kalzifizierungsbioassay, bzw. Nierenperfusionstest wurden die relevanten Fraktionen mittels unterschiedlicher massenspektrometrischer Techniken identifiziert. Mittels RapiDeNovo-Sequenzierung und nachfolgendem Mascot-Datenabgleich wurde der „*Calcification Blockung Factor*“ (CBF) mit der bovinen Sequenz: LE-GEEEEEDPDRSMRLSF und der humanen Variante der Sequenz: LEG-QEEEEEDNRDSSMKLSF identifiziert. Der „*Vasokonstriktion Inhibiting Factor*“ (VIF) wurde mittels Mascot Datenabgleich mit der bovinen Sequenz: HSSYEDELSEVLEKPNDQAEP-KEVTEEVSSKDAAE und der humanen Sequenz: HSGFEDELSEVLENQSSQAEELKE-VEEPSSKDVME identifiziert.

Des Weiteren wurde die Wirkung der Peptide CBF und VIF auf den Kalzifizierungsprozess mittels histologischer von Kossa Färbung des Gewebes qualitativ und mittels eines Kalziumkits quantitativ nachgewiesen. Der Kalziumgehalt des Gewebes in Anwesenheit der Peptide CBF und VIF war signifikant geringer als der Kalziumgehalt der Positivkontrollen. Die Wirkung des VIF Peptides auf die Gefäßkonstriktion wurde mittels des Nierenperfusionstests gezeigt. Die Vasokonstriktion des potenten Vasokonstriktors Angiotensin II wurde

deutlich gemindert. Die massenspektrometrisch detektierte Plasmakonzentration des *CBF* Peptides bei den CKD Kranken hat sich signifikant niedriger erwiesen als bei den Nierengesunden: ($0,14 \pm 0,03$ vs. $0,29 \pm 0,04$; in pM ($n = 10$)). Die massenspektrometrisch detektierte Plasmakonzentration des *VIF* Peptides bei den CKD Kranken hat sich tendenziell erhöht als bei den Nierengesunden erwiesen. Da *CBF* und *VIF* aus chromaffinen Granulazellen der Nebennieren sezerniert werden und in effektiven Konzentrationen im humanen Plasma nachweisbar sind, scheint die Regulationsfunktion der Peptide in der vaskulären Kalzifizierung, der Regulation des Vasotonus und damit in der Entwicklung der koronaren Herzkreislauferkrankungen sehr wahrscheinlich zu sein.

6.1. Ausblick

Um die Ergebnisse *in vivo* zu validieren, werden gegenwärtig in Kooperation Versuche am lebenden Tiermodell durchgeführt: Die Ratten wurden mittels Adeninzufuhr niereninsuffizient gemacht. Die Hälfte der Ratten wurde kontinuierlich das *CBF* über implantierte Pumpen zugeführt, der anderen Hälfte wurde physiologische Salzlösung infundiert. Die ersten Pilotversuche zeigen verminderte Kalzifizierung des Gewebes und bessere Überlebensraten bei den mit *CBF* behandelten niereninsuffizienten Ratten.

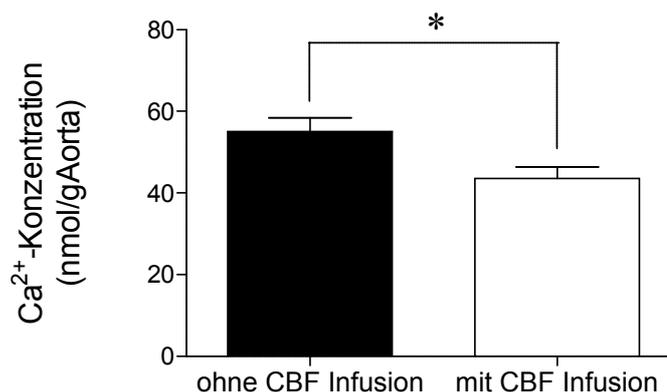


Abbildung 38: Die Ca^{2+} -Konzentration der Aortasegmente (in nmol/mg Aorta) in Abwesenheit und Anwesenheit des *CBF* Peptides. $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,001$; $p^{***} < 0,0001$

Die Versuche mit dem *VIF* Peptid an hypertensiven Ratten stehen noch aus.

In Zukunft sollte der Grund für die Plasmakonzentrationsänderung der *CBF* und *VIF* Peptide bei gefährdeten Patienten untersucht werden. Der physiologische und pathophysiologische Beitrag der Peptide und die zu Grunde liegende Pathways müssen näher untersucht und im Detail dargestellt werden. Insbesondere dem *Cbfa1* und den AT1- und AT2- Rezeptoren sollte in diesem Zusammenhang grosse Beachtung geschenkt werden

Die Herstellung der Pharmakomimetiker der zwei Peptide sollte in Angriff genommen und in der Therapie der Herz-Kreislaufkrankungen untersucht werden.

7. Anhang

7.1. Literatur- und Quellenverzeichnis

- 1 Bazzano, L. A. et al., Dietary fiber intake and reduced risk of coronary heart disease in US men and women: the National Health and Nutrition Examination Survey I Epidemiologic Follow-up Study. *Arch Intern Med* **163** (16), 1897 (2003).
- 2 Alexopoulos, N. and Raggi, P., Calcification in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* **6** (11), 681 (2009).
- 3 Ross, R., Mechanisms of atherosclerosis--a review. *Adv Nephrol Necker Hosp* **19**, 79 (1990).
- 4 Ross, R., George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. *Arteriosclerosis* **1** (5), 293 (1981).
- 5 Glagov, S. et al., Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* **316** (22), 1371 (1987).
- 6 Gravel, R. A., Leung, A., Saunders, M., and Hosli, P., Analysis of genetic complementation by whole-cell microtechniques in fibroblast heterokaryons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76** (12), 6520 (1979).
- 7 van der Wal, A. C. et al., Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab Invest* **61** (2), 166 (1989).
- 8 Kaneko, E. et al., Detection of dissection and remodeling of atherosclerotic lesions in rabbits after balloon angioplasty by magnetic-resonance imaging. *Coron Artery Dis* **11** (8), 599 (2000).
- 9 Brown, M. S. and Goldstein, J. L., Atherosclerosis. Scavenging for receptors. *Nature* **343** (6258), 508 (1990).
- 10 Steinberg, D., Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* **272** (34), 20963 (1997).
- 11 Khoo, J. C., Miller, E., McLoughlin, P., and Steinberg, D., Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. *Arteriosclerosis* **8** (4), 348 (1988).
- 12 Navab, M. et al., The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16** (7), 831 (1996).
- 13 Han, J., Hajjar, D. P., Febbraio, M., and Nicholson, A. C., Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem* **272** (34), 21654 (1997).
- 14 Ullery-Ricewick, J. C., Cox, B. E., Griffin, E. E., and Jerome, W. G., Triglyceride alters lysosomal cholesterol ester metabolism in cholesteryl ester-laden macrophage foam cells. *J Lipid Res* **50** (10), 2014 (2009).
- 15 Rajavashisth, T. B. et al., Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* **344** (6263), 254 (1990).

- 16 Ramsey, S. A., Gold, E. S., and Aderem, A., A systems biology approach to understanding atherosclerosis. *EMBO Mol Med* **2** (3), 79.
- 17 Shaposhnik, Z., Wang, X., and Lusis, A. J., Arterial colony stimulating factor-1 influences atherosclerotic lesions by regulating monocyte migration and apoptosis. *J Lipid Res* **51** (7), 1962.
- 18 Harigai, M. et al., Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflammatory joint diseases and its involvement in the cytokine network of rheumatoid synovium. *Clin Immunol Immunopathol* **69** (1), 83 (1993).
- 19 Hajjar, D. P. and Haberland, M. E., Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan horses and cellular saboteurs. *J Biol Chem* **272** (37), 22975 (1997).
- 20 Negre-Salvayre, A., Coatrieux, C., Ingueneau, C., and Salvayre, R., Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol* **153** (1), 6 (2008).
- 21 Stopeck, A. T., Nicholson, A. C., Mancini, F. P., and Hajjar, D. P., Cytokine regulation of low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 cells. *J Biol Chem* **268** (23), 17489 (1993).
- 22 Yla-Herttuala, S. et al., Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* **84** (4), 1086 (1989).
- 23 Fruebis, J., Gonzalez, V., Silvestre, M., and Palinski, W., Effect of probucol treatment on gene expression of VCAM-1, MCP-1, and M-CSF in the aortic wall of LDL receptor-deficient rabbits during early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17** (7), 1289 (1997).
- 24 Nakamura, S. et al., Coronary calcification in patients with chronic kidney disease and coronary artery disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **4** (12), 1892 (2009).
- 25 Schwarz, U. et al., Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* **15** (2), 218 (2000).
- 26 Chung, A. W. et al., Upregulation of matrix metalloproteinase-2 in the arterial vasculature contributes to stiffening and vasomotor dysfunction in patients with chronic kidney disease. *Circulation* **120** (9), 792 (2009).
- 27 Temmar, M. et al., Pulse wave velocity and vascular calcification at different stages of chronic kidney disease. *J Hypertens* **28** (1), 163.
- 28 Duhn, V. et al., Breast arterial calcification: a marker of medial vascular calcification in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **6** (2), 377.
- 29 Farzaneh-Far, A., Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* **15** (10), 1710 (2000).
- 30 Amann, K., Media calcification and intima calcification are distinct entities in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **3** (6), 1599 (2008).
- 31 Shanahan, C. M. et al., Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* **100** (21), 2168 (1999).
- 32 Proudfoot, D. and Shanahan, C. M., Biology of calcification in vascular cells: intima versus media. *Herz* **26** (4), 245 (2001).
- 33 Proudfoot, D. et al., Acetylated low-density lipoprotein stimulates human vascular smooth muscle cell calcification by promoting osteoblastic differentiation and inhibiting phagocytosis. *Circulation* **106** (24), 3044 (2002).

- 34 Oda, E., Obesity-related risk factors of cardiovascular disease. *Circ J* **73** (12), 2204 (2009).
- 35 Lim, S., Despres, J. P., and Koh, K. K., Prevention of atherosclerosis in overweight/obese patients. - In need of novel multi-targeted approaches. *Circ J* **75** (5), 1019.
- 36 Despres, J. P. and Lemieux, I., Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* **444** (7121), 881 (2006).
- 37 Demarin, V., Lisak, M., Morovic, S., and Cengic, T., Low high-density lipoprotein cholesterol as the possible risk factor for stroke. *Acta Clin Croat* **49** (4), 429.
- 38 Ragino lu, I. et al., [Key laboratory diagnostic biomarkers of coronary atherosclerosis]. *Kardiologija* **51** (3), 42.
- 39 Mitra, S. et al., Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy. *Am J Med Sci* **342** (2), 135.
- 40 Ramjee, V., Sperling, L. S., and Jacobson, T. A., Non-high-density lipoprotein cholesterol versus apolipoprotein B in cardiovascular risk stratification: do the math. *J Am Coll Cardiol* **58** (5), 457.
- 41 Berg, A. H. and Scherer, P. E., Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* **96** (9), 939 (2005).
- 42 Matsuzawa, Y., Therapy Insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **3** (1), 35 (2006).
- 43 Diep, Q. N. et al., PPARalpha activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension* **40** (6), 866 (2002).
- 44 Tham, D. M. et al., Angiotensin II is associated with activation of NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPARs. *Physiol Genomics* **11** (1), 21 (2002).
- 45 Morris-Stiff, G. et al., Variations in the anatomical distribution of peripheral vascular disease according to gender. *Ann R Coll Surg Engl* **93** (4), 306.
- 46 Min, J. K. et al., Age- and sex-related differences in all-cause mortality risk based on coronary computed tomography angiography findings results from the International Multicenter CONFIRM (Coronary CT Angiography Evaluation for Clinical Outcomes: An International Multicenter Registry) of 23,854 patients without known coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* **58** (8), 849.
- 47 Groeneveld, I. F. et al., Short and long term effects of a lifestyle intervention for construction workers at risk for cardiovascular disease: a randomized controlled trial. *BMC Public Health* **11** (1), 836.
- 48 Rosero, E. B. et al., Sex, race, and age distributions of mean aortic wall thickness in a multiethnic population-based sample. *J Vasc Surg* **53** (4), 950.
- 49 Haberl, R. et al., Correlation of coronary calcification and angiographically documented stenoses in patients with suspected coronary artery disease: results of 1,764 patients. *J Am Coll Cardiol* **37** (2), 451 (2001).
- 50 Bots, M. L. et al., Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation* **96** (5), 1432 (1997).
- 51 Joakimsen, O., Bonna, K. H., Stensland-Bugge, E., and Jacobsen, B. K., Age and sex differences in the distribution and ultrasound morphology of carotid atherosclerosis: the Tromso Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19** (12), 3007 (1999).
- 52 McGill, H. C., Jr., The cardiovascular pathology of smoking. *Am Heart J* **115** (1 Pt 2), 250 (1988).

- 53 Mainous, A. G., 3rd et al., Life stress and atherosclerosis: a pathway through un-
54 healthy lifestyle. *Int J Psychiatry Med* **40** (2), 147.
- 55 Gluba, A., Banach, M., Mikhailidis, D. P., and Rysz, J., Genetic determinants of car-
56 diovascular disease: the renin-angiotensin-aldosterone system, paraoxonases, en-
57 dothelin-1, nitric oxide synthase and adrenergic receptors. *In Vivo* **23** (5), 797
(2009).
- 58 Solini, A. et al., Family history of hypertension, anthropometric parameters and
59 markers of early atherosclerosis in young healthy individuals. *J Hum Hypertens* **23**
(12), 801 (2009).
- 60 Beevers, G., Lip, G. Y., and O'Brien, E., ABC of hypertension: The pathophysiology
61 of hypertension. *Bmj* **322** (7291), 912 (2001).
- 62 WHO-ISO Guidelines for the Management of Hypertension, 2008. (2008).
- 63 Stasevic, Z. et al., [Results of kidney function measurement and blood pressure in
64 population from endemic region of Vitina]. *Med Pregl* **61** (7-8), 400 (2008).
- 65 Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H. H., Tang, E. H., and Feletou, M., Endothelial Dys-
66 function and Vascular Disease. *Acta Physiol (Oxf)* (2009).
- 67 Weiss, D., Kools, J. J., and Taylor, W. R., Angiotensin II-induced hypertension ac-
68 celerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation* **103**
(3), 448 (2001).
- 69 Wung, B. S. et al., Cyclic strain-induced monocyte chemotactic protein-1 gene ex-
70 pression in endothelial cells involves reactive oxygen species activation of activator
71 protein 1. *Circ Res* **81** (1), 1 (1997).
- 72 Wang, D. L. et al., Mechanical strain induces monocyte chemotactic protein-1 gene
expression in endothelial cells. Effects of mechanical strain on monocyte adhesion
to endothelial cells. *Circ Res* **77** (2), 294 (1995).
- Capers, Q. th et al., Monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic tissues
of hypertensive rats. *Hypertension* **30** (6), 1397 (1997).
- Griendling, K. K. and Alexander, R. W., Oxidative stress and cardiovascular dis-
ease. *Circulation* **96** (10), 3264 (1997).
- Griendling, K. K., Minieri, C. A., Ollerenshaw, J. D., and Alexander, R. W., Angio-
tensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth
muscle cells. *Circ Res* **74** (6), 1141 (1994).
- Lithell, H., Pathogenesis and prevalence of atherosclerosis in hypertensive patients.
Am J Hypertens **7** (7 Pt 2), 2S (1994).
- Alderman, M. H., Is there a link between the circulating renin-angiotensin system
and coronary disease? A buoyant view. *Heart* **76** (3 Suppl 3), 18 (1996).
- Alderman, M. H. et al., Plasma renin activity: a risk factor for myocardial infarction in
hypertensive patients. *Am J Hypertens* **10** (1), 1 (1997).
- Meade, T. W., Imeson, J. D., Gordon, D., and Peart, W. S., The epidemiology of
plasma renin. *Clin Sci (Lond)* **64** (3), 273 (1983).
- Meade, T. W., Cooper, J. A., and Peart, W. S., Plasma renin activity and ischemic
heart disease. *N Engl J Med* **329** (9), 616 (1993).
- Alderman, M. H. et al., Association of the renin-sodium profile with the risk of myo-
cardial infarction in patients with hypertension. *N Engl J Med* **324** (16), 1098 (1991).
- Yusuf, S. et al., Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on
cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evalua-
tion Study Investigators. *N Engl J Med* **342** (3), 145 (2000).

- 73 Hirata, A. et al., Qualitative score of systemic arteriosclerosis by vascular ultrasono-
74 graphy as a predictor of coronary artery disease in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*.
75 Reiner, Z. et al., [Recommendations of Croatian societies on treatment of
76 macrovascular and microvascular complications in patients with metabolic syndrome
77 and diabetes type 2--treatment of residual risk]. *Lijec Vjesn* **131** (1-2), 1 (2009).
78 Stout, R. W., Insulin and atheroma--an update. *Lancet* **1** (8541), 1077 (1987).
79 Zamami, Y. et al., Hyperinsulinemia induces hypertension associated with neuro-
80 genic vascular dysfunction resulting from abnormal perivascular innervations in rat
81 mesenteric resistance arteries. *Hypertens Res* **34** (11), 1190.
82 Stern, M. P. and Haffner, S. M., Body fat distribution and hyperinsulinemia as risk
83 factors for diabetes and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis* **6** (2), 123 (1986).
84 Warlow, C. et al., Stroke. *Lancet* **362** (9391), 1211 (2003); Lawes, C. M., Vander
85 Hoorn, S., and Rodgers, A., Global burden of blood-pressure-related disease, 2001.
86 *Lancet* **371** (9623), 1513 (2008).
87 Yiu, K. H. et al., Prognostic value of renal dysfunction for the prediction of outcome
88 versus results of computed tomographic coronary angiography. *Am J Cardiol* **108**
89 (7), 968.
90 K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classifica-
91 tion, and stratification. *Am J Kidney Dis* **39** (2 Suppl 1), S1 (2002).
92 Philipneri, M. D. et al., Delivery patterns of recommended chronic kidney disease
care in clinical practice: administrative claims-based analysis and systematic litera-
ture review. *Clin Exp Nephrol* **12** (1), 41 (2008).
Schlieper, G. et al., Ultrastructural analysis of vascular calcifications in uremia. *J Am
Soc Nephrol* **21** (4), 689.
Levey, A. S. et al., Chronic kidney disease as a global public health problem: ap-
proaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving
Global Outcomes. *Kidney Int* **72** (3), 247 (2007).
Omura, M. and Nishikawa, T., [Screening tests and diagnostic examinations of hy-
pertensives for primary aldosteronism]. *Rinsho Byori* **54** (11), 1157 (2006).
Young, W. F., Primary aldosteronism: renaissance of a syndrome. *Clin Endocrinol
(Oxf)* **66** (5), 607 (2007).
Arafah, B. M., Hypothalamic pituitary adrenal function during critical illness: limita-
tions of current assessment methods. *J Clin Endocrinol Metab* **91** (10), 3725 (2006).
Wang, Z. et al., Histopathological and immunophenotypic features of testicular tu-
mour of the adrenogenital syndrome. *Histopathology* **58** (7), 1013.
Cortez, V. et al., Regulation of catecholamine release in human adrenal chromaffin
cells by beta-adrenoceptors. *Neurochem Int*.
Drake, Richard L., Vogl, A. Wayne, W.M., Adam, and MitchellSingh, G., Gray's Ana-
tomie für Studenten mit StudentConsult-Zugang: Übersetzt und herausgegeben von
Friedrich Paulsen. *Anatomieatlas* **1**.
Born-Frontsberg, E. and Quinkler, M., [Conn's syndrome.]. *Internist (Berl)* **50** (1), 17
(2009).
Karashima, S. et al., Clinical characteristics of primary hyperaldosteronism due to
adrenal microadenoma. *Steroids* **76** (12), 1363.
Boulkroun, S. et al., Adrenal cortex remodeling and functional zona glomerulosa
hyperplasia in primary aldosteronism. *Hypertension* **56** (5), 885.

- 93 Beom, S. H. et al., Metastatic adrenocortical carcinoma presenting simultaneously with Cushing's and Conn's syndromes: a case report. *Jpn J Clin Oncol* **41** (11), 1287.
- 94 Yang, H., Curinga, G., and Giachelli, C. M., Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int* **66** (6), 2293 (2004).
- 95 Jono, S. et al., Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* **87** (7), E10 (2000).
- 96 Demer, L. L., Tintut, Y., and Parhami, F., Novel mechanisms in accelerated vascular calcification in renal disease patients. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **11** (4), 437 (2002).
- 97 Peco-Antic, A., Hyponatremic hypertensive syndrome. *Med Pregl* **60 Suppl 2**, 48 (2007).
- 98 Voiculescu, A. and Rump, L. C., [Hypertension in patients with renal artery stenosis.]. *Internist (Berl)* **50** (1), 42 (2009).
- 99 Lodish, M., Patronas, N. J., and Stratakis, C. A., Reversible posterior encephalopathy syndrome associated with micronodular adrenocortical disease and Cushing syndrome. *Eur J Pediatr* (2009).
- 100 Dovio, A. et al., Increased osteoprotegerin levels in Cushing's syndrome are associated with an adverse cardiovascular risk profile. *J Clin Endocrinol Metab* **92** (5), 1803 (2007).
- 101 Kirton, J. P., Wilkinson, F. L., Canfield, A. E., and Alexander, M. Y., Dexamethasone downregulates calcification-inhibitor molecules and accelerates osteogenic differentiation of vascular pericytes: implications for vascular calcification. *Circ Res* **98** (10), 1264 (2006).
- 102 Mori, K. et al., Dexamethasone enhances In vitro vascular calcification by promoting osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19** (9), 2112 (1999).
- 103 Lesellier, E. and West, C., Description and comparison of chromatographic tests and chemometric methods for packed column classification. *J Chromatogr A* **1158** (1-2), 329 (2007).
- 104 Vervoor, R. J. et al., Optimisation and characterisation of silica-based reversed-phase liquid chromatographic systems for the analysis of basic pharmaceuticals. *J Chromatogr A* **897** (1-2), 1 (2000).
- 105 Hortin, G. L., The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clin Chem* **52** (7), 1223 (2006).
- 106 Albrethsen, J., Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Chem* **53** (5), 852 (2007).
- 107 Suckau, D. et al., A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* **376** (7), 952 (2003).
- 108 Di, B. et al., Solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the determination of pitavastatin in human plasma and urine for application to Phase I clinical pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **868** (1-2), 95 (2008).
- 109 Tian, L. et al., Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for pitavastatin and its lactone in human plasma and urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **865** (1-2), 127 (2008).

- 110 Beyermann, M. et al., A single-point slight alteration set as a tool for structure-
activity relationship studies of ovine corticotropin releasing factor. *J Med Chem* **39**
111 (17), 3324 (1996).
- 112 Chen, N. X. et al., Activation of Arterial Matrix Metalloproteinases Leads to Vascular
Calcification in Chronic Kidney Disease. *Am J Nephrol* **34** (3), 211.
- 113 Covic, A., Gusbeth-Tatomir, P., and Goldsmith, D. J., Arterial stiffness in renal pa-
tients: an update. *Am J Kidney Dis* **45** (6), 965 (2005).
- 114 Salem, S. et al., Relationship between Magnesium and Clinical Biomarkers on Inhi-
bition of Vascular Calcification. *Am J Nephrol* **35** (1), 31.
- 115 Helle, K. B., Corti, A., Metz-Boutigue, M. H., and Tota, B., The endocrine role for
chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties. *Cell Mol Life*
116 *Sci* **64** (22), 2863 (2007).
- 117 Ferrero, E. et al., Chromogranin A protects vessels against tumor necrosis factor
alpha-induced vascular leakage. *FASEB J* **18** (3), 554 (2004).
- 118 Vaingankar, S. M. et al., Effects of chromogranin A deficiency and excess in vivo:
biphasic blood pressure and catecholamine responses. *J Hypertens* **28** (4), 817.
- 119 Sahu, B. S., Sonawane, P. J., and Mahapatra, N. R., Chromogranin A: a novel sus-
ceptibility gene for essential hypertension. *Cell Mol Life Sci* **67** (6), 861.
- 120 Roatta, S. et al., The chromogranin A- derived N-terminal peptide vasostatin-I: In
vivo effects on cardiovascular variables in the rabbit. *Regul Pept* **168** (1-3), 10.
- 121 Tota, B., Quintieri, A. M., Di Felice, V., and Cerra, M. C., New biological aspects of
chromogranin A-derived peptides: focus on vasostatins. *Comp Biochem Physiol A*
122 *Mol Integr Physiol* **147** (1), 11 (2007).
- 123 Cerra, M. C. et al., Recombinant N-terminal fragments of chromogranin-A modulate
cardiac function of the Langendorff-perfused rat heart. *Basic Res Cardiol* **101** (1), 43
124 (2006).
- 125 Schillaci, G., De Vuono, S., and Pucci, G., An endogenous brake on the sympathetic
nervous system: the emerging role of catestatin in hypertension. *J Cardiovasc Med*
126 *(Hagerstown)* **12** (9), 609.
- 127 Helle, K. B., Vasostatins. Vascular targets. *Adv Exp Med Biol* **482**, 225 (2000).
- 128 Corti, A., Chromogranin A and the tumor microenvironment. *Cell Mol Neurobiol* **30**
129 (8), 1163.
- 130 Wei, Z. et al., A Common Genetic Variant in the 3'-UTR of Vacuolar H⁺-ATPase
ATP6V0A1 Creates a Micro-RNA Motif to Alter Chromogranin A (CHGA) Processing
and Hypertension Risk. *Circ Cardiovasc Genet*.
- 131 Mahata, S. K., Mahata, M., Fung, M. M., and O'Connor, D. T., Reprint of: Catestatin:
a multifunctional peptide from chromogranin A. *Regul Pept* **165** (1), 52.
- 132 Imbrogno, S. et al., The catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chro-
mogranin A344-363) modulates myocardial function in fish. *J Exp Biol* **213** (Pt 21),
133 3636.
- 134 Fung, M. M. et al., Direct vasoactive effects of the chromogranin A (CHGA) peptide
catestatin in humans in vivo. *Clin Exp Hypertens* **32** (5), 278.
- 135 Metz-Boutigue, M. H. et al., Antibacterial peptides are present in chromaffin cell sec-
retory granules. *Cell Mol Neurobiol* **18** (2), 249 (1998).
- 136 Malecki, R. and Adamiec, R., [The role of calcium ions in the pathomechanism of
the artery calcification accompanying atherosclerosis]. *Postepy Hig Med Dosw*
137 *(Online)* **59**, 42 (2005).

- 130 Mirza, M. A. et al., Relationship between circulating FGF23 and total body atherosclerosis in the community. *Nephrol Dial Transplant* **24** (10), 3125 (2009).
- 131 Hasegawa, H. et al., Direct evidence for a causative role of FGF23 in the abnormal renal phosphate handling and vitamin D metabolism in rats with early-stage chronic kidney disease. *Kidney Int* **78** (10), 975.
- 132 Helvig, C. F. et al., Dysregulation of renal vitamin D metabolism in the uremic rat. *Kidney Int* **78** (5), 463.
- 133 Chen, N. X. and Moe, S. M., Vascular calcification in chronic kidney disease. *Semin Nephrol* **24** (1), 61 (2004).
- 134 Ben-Dov, I. Z. et al., The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest* **117** (12), 4003 (2007).
- 135 Massy, Z. A. et al., The pathophysiology of vascular calcification: are osteoclast-like cells the missing link? *Diabetes Metab* **34 Suppl 1**, S16 (2008).
- 136 Poggio, P. et al., Osteopontin controls endothelial cell migration in vitro and in excised human valvular tissue from patients with calcific aortic stenosis and controls. *J Cell Physiol* **226** (8), 2139.
- 137 Nitschke, Y., Weissen-Plenz, G., Terkeltaub, R., and Rutsch, F., Npp1 promotes atherosclerosis in ApoE knockout mice. *J Cell Mol Med*.
- 138 Li, H. et al., Ras dependent paracrine secretion of osteopontin by Nf1^{+/-} osteoblasts promote osteoclast activation in a neurofibromatosis type I murine model. *Pediatr Res* **65** (6), 613 (2009).
- 139 Sage, A. P., Lu, J., Tintut, Y., and Demer, L. L., Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int* **79** (4), 414.
- 140 Ducy, P. et al., Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89** (5), 747 (1997).
- 141 Harada, H. et al., Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem* **274** (11), 6972 (1999).
- 142 Moe, S. M. et al., Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int* **61** (2), 638 (2002).
- 143 Komori, T. et al., Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89** (5), 755 (1997).
- 144 Zheng, H. et al., Cbfa1/osf2 transduced bone marrow stromal cells facilitate bone formation in vitro and in vivo. *Calcif Tissue Int* **74** (2), 194 (2004).
- 145 Tyson, K. L. et al., Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23** (3), 489 (2003).
- 146 Liu, F. et al., Effect of high glucose levels on the calcification of vascular smooth muscle cells by inducing osteoblastic differentiation and intracellular calcium deposition via BMP-2/Cbfa1 pathway. *J Zhejiang Univ Sci B* **11** (12), 905.
- 147 Armstrong, Z. B., Boughner, D. R., Drangova, M., and Rogers, K. A., Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits arterial calcification in a pre-clinical model. *Cardiovasc Res* **90** (1), 165.
- 148 Wu, S. Y. et al., Endothelin-1 is a potent regulator in vivo in vascular calcification and in vitro in calcification of vascular smooth muscle cells. *Peptides* **24** (8), 1149 (2003).

- 149 Huang, Z. et al., Effects of adrenomedullin, C-type natriuretic peptide, and parathyroid hormone-related peptide on calcification in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* **42** (1), 89 (2003).
- 150 Tintut, Y. and Demer, L. L., Recent advances in multifactorial regulation of vascular calcification. *Curr Opin Lipidol* **12** (5), 555 (2001).
- 151 Bataller, R. et al., NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* **112** (9), 1383 (2003).
- 152 Byon, C. H. et al., Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem* **283** (22), 15319 (2008).
- 153 Schiffrin, E. L., Park, J. B., Intengan, H. D., and Touyz, R. M., Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation* **101** (14), 1653 (2000).
- 154 Henriksen, E. J. et al., Selective angiotensin II receptor antagonist reduces insulin resistance in obese Zucker rats. *Hypertension* **38** (4), 884 (2001).
- 155 Igarashi, M. et al., Candesartan inhibits carotid intimal thickening and ameliorates insulin resistance in balloon-injured diabetic rats. *Hypertension* **38** (6), 1255 (2001).
- 156 Hoogwerf, B. J., Renin-angiotensin system blockade and cardiovascular and renal protection. *Am J Cardiol* **105** (1 Suppl), 30A.
- 157 Bandow, K. et al., Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) induces RANKL, MCP-1, and MIP-1beta expression in osteoblasts through the angiotensin II type 1 receptor. *J Cell Physiol* **211** (2), 392 (2007).
- 158 Plante, G. E., Vascular response to stress in health and disease. *Metabolism* **51** (6 Suppl 1), 25 (2002).
- 159 Crowley, S. D. et al., Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (47), 17985 (2006).
- 160 Otte, M. and Spier, A., The Renin-Angiotensin-Aldosterone System: Approaches to Cardiac and Renal Therapy. *Compend Contin Educ Vet* **31** (1), E1 (2009).
- 161 Qian, C., Schoemaker, R. G., van Gilst, W. H., and Roks, A. J., The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in cardiovascular progenitor cell function. *Clin Sci (Lond)* **116** (4), 301 (2009).
- 162 Simon, G., Abraham, G., and Cserep, G., Pressor and subpressor angiotensin II administration. Two experimental models of hypertension. *Am J Hypertens* **8** (6), 645 (1995).

7.2. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

7.2.1. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-------|
| Tabelle 1: Einteilung der Stadien der Niereninsuffizienz | 8 |
| Tabelle 2: Darstellung des angewendeten Stufengradienten | 25 |
| Tabelle 3: Darstellung des angewendeten Stufengradienten | 26 |
| Tabelle 4: Darstellung des angewandten Lineargradienten | 27 |
| Tabelle 5: Fragmentdarstellung des bovinen <i>CBF</i> | 42-43 |
| Tabelle 6: Fragmentdarstellung des humanen <i>CBF</i> | 48-49 |
| Tabelle 7: Klinische Daten | 50 |
| Tabelle 8: Fragmentdarstellung des bovinen <i>VIF</i> | 55-56 |
| Tabelle 9: Fragmentdarstellung des humanen <i>VIF</i> | 62-63 |

7.2.2. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-------|
| Abbildung 1: Schichtenaufzeichnung der Blutgefäße | 3 |
| Abbildung 2: Schichtenaufzeichnung der Nebennierenrinde | 10 |
| Abbildung 3: MALDI TOF Massenspektrometer | 19 |
| Abbildung 4 a-b: Arbeitsschritte | 22-23 |
| Abbildung 5: Arbeitsschritte | 33-34 |
| Abbildung 6: Darstellung des Perfusionssystems | 36 |
| Abbildung 7: Reversed-Phase-Chromatogramm, Nebennierenkonzentrat | 39 |
| Abbildung 8: Anionenaustausch-Chromatogramm, Nebennierenkonzentrat | 41 |
| Abbildung 9: Reversed-Phase-Chromatogramm, Nebennierenkonzentrat | 41 |
| Abbildung 10: MALDI-TOF-Massenspektrum | 42 |
| Abbildung 11: Die Peptidsequenz des bovinen <i>CBF</i> | 43 |
| Abbildung 12: Die Peptidsequenz im Mutterprotein | 44 |
| Abbildung 13: Ca ²⁺ -Konzentration der Aortasegmente | 45 |
| Abbildung 14: Representative immunohistochemische Abbildungen | 46 |
| Abbildung 15: Reversed-Phase-Chromatogramm von humanes Plasma | 47 |
| Abbildung 16: ESI-Massenspektrum | 48 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 17: Die Peptidsequenz des humanen <i>CBF</i> | 49 |
| Abbildung 18: Die <i>CBF</i> -Konzentration in Patientengruppen | 51 |
| Abbildung 19: Reversed-Phase-Chromatogramm, Nebennierenkonzentrat | 52 |
| Abbildung 20: Anionenaustausch-Chromatogramm, Nebennierenkonzentrat | 53 |
| Abbildung 21: Reversed-Phase-Chromatogramm, Nebennierenkonzentrat | 54 |
| Abbildung 22: MALDI-TOF-Massenspektrum | 55 |
| Abbildung 23: Die Peptidsequenz des bovinen <i>VIF</i> | 57 |
| Abbildung 24: Die Peptidsequenz des bovinen <i>VIF</i> | 57 |
| Abbildung 25: ESI-Massenspektrum | 58 |
| Abbildung 26: Die Vasokonstriktion des Angiotensin II Peptides in Abwesenheit und Anwesenheit des <i>VIF</i> -Peptides | 59 |
| Abbildung 27: Die Vasokonstriktion des Epinephrin in Abwesenheit und Anwesenheit des <i>VIF</i> -Peptides | 60 |
| Abbildung 28: Reversed-Phase-Chromatogramm von humanes Plasma | 61 |
| Abbildung 29: ESI-Massenspektrum | 61 |
| Abbildung 30: Die Peptidsequenz im Mutterprotein | 63 |
| Abbildung 31: Die Vasokonstriktion des Angiotensin II Peptides in Abwesenheit und Anwesenheit des <i>VIF</i> -Peptides | 64 |
| Abbildung 32: Die Vasokonstriktion des Epinephrin in Abwesenheit und Anwesenheit des <i>VIF</i> -Peptides | 65 |
| Abbildung 33: Die Vasokonstriktion des Angiotensin II Peptides in Abwesenheit und Anwesenheit des L-NAME | 66 |
| Abbildung 34: Die Vasokonstriktion des Angiotensin II in Anwesenheit des L-NAME und Abwesenheit und Anwesenheit des <i>VIF</i> -Peptides | 67 |
| Abbildung 35: Die <i>VIF</i> -Konzentration im Patientengruppen | 68 |
| Abbildung 36: Ca ²⁺ -Konzentration der Aortasegmente | 69 |
| Abbildung 37: Representative immunohistochemische Abbildungen | 70 |
| Abbildung 38: Ca ²⁺ -Konzentration der Aortasegmente im lebenden Tiermodel | 81 |

7.3. **Abkürzungen**

| | |
|----------------------|--|
| ACE | Angiotensin converting enzyme |
| ACN | Acetonitril |
| ADH | Antidiuretisches Hormon |
| Ang | Angiotensin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AU | relative Intensität |
| C | Kohlenstoffatom |
| Ca ²⁺ | Kalzium |
| CaCl | Kalziumchlorid |
| Da | Dalton |
| ESI | Elektrospray-Ionisations |
| g | Erdschwerebeschleunigung |
| H | Wasserstoffatom |
| Hg | Quecksilbersäule |
| H ₂ O | Wasser |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| K ₂ -EDTA | Kalium-Ethylendiamintetraessigsäure |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| MALDI | Matrix-unterstützte Laser Desorption / Ionisation |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| M | mol/l |
| m | Masse |
| MALDI | Matrixunterstützte UV-Laser-Desorbptions/Ionisations Massenspektrometrie |
| Mg | Magnesium |
| Mm | mILLIMETER |
| MS | Massenspektrometrie |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |

| | |
|------|-------------------------------------|
| NO | Stickstoffmonoxid |
| P | Phosphat |
| PCA | Perchlorsäure |
| RAAS | Renin-Angiotensin-Aldosteron-System |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TOF | Time of Flight |
| U | Umdrehungen |
| UV | ultraviolet |
| V | Volt |
| WHO | World Health Organisation |
| z | Ladung |

7.4. Lebenslauf

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

7.5. **Publikationsliste**

- Replacement of acetonitrile by ethanol as solvent in reversed phase chromatography of biomolecules.

Brettschneider F, Jankowski V, Günthner T, **Salem S**, Nierhaus M, Schulz A, Zidek W, Jankowski J. J Chromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2010 Mar 15;878(9-10):763-8. Epub 2010 Jan 29.

- Relationship between Magnesium and Clinical Biomarkers on Inhibition of Vascular Calcification

Silvia Salem, Heike Bruck, Ferdinand H. Bahlmann, Mirjam Peter, Jutta Passlick- Deetjen, Axel Kretschmer, Sonja Steppan, Michaela Volsek, Andreas Kribben, Marc Nierhaus, Vera Jankowski, Walter Zidek, Joachim Jankowski J; Am J Nephrol. 2012;35(1):31-9. Epub 2011 Dec 15.

7.6. **Abstracts**

- Inhibitory effect of Mg²⁺ on phosphate induced vascular calcification in CKD patients

Silvia Salem, Heike Bruck, Axel Kretschmer, Michaela Volsek, Andreas Kribben, Vera Jankowski, Joachim Jankowski J
NGFN-Treffen, Berlin 2011

- Relationship between Magnesium and Clinical Biomarkers on Inhibition of Vascular Calcification

Joachim Jankowski J, **Silvia Salem**, Axel Kretschmer, Michaela Volsek, Andreas Kribben, Vera Jankowski, Heike Bruck
NGFN-Treffen, Berlin 2011

7.7. **Vorträge**

- Chromatographische Aufarbeitung der Nebenniere zur Isolierung unbekannter Biomoleküle

Silvia Salem, Joachim Jankowski J
NGFN-Treffen, Berlin 2009

- Vasomodulatorische Rolle der Chromogranin-Peptide

Silvia Salem, Joachim Jankowski J
NGFN-Treffen, Berlin 2010

7.8. *Poster*

- Inhibitory effect of Mg²⁺ on phosphate induced vascular calcification in CKD patients
Silvia Salem, Heike Bruck, Axel Kretschmer, , Michaela Valsek, Andreas Kribben, Vera Jankowski, Joachim Jankowski J
NGFN-Treffen, Berlin 2011
- Relationship between Magnesium and Clinical Biomarkers on Inhibition of Vascular Calcification
Joachim Jankowski J, **Silvia Salem**, Axel Kretschmer, Michaela Valsek, Andreas Kribben, Vera Jankowski, Heike Bruck
NGFN-Treffen, Berlin 2011

7.9. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr.rer.nat Joachim Jankowski, für seine Beratung, Betreuung und Geduld bei der Durchführung meiner Arbeit.

Ich danke ebenso Herrn Prof. Dr. Walter Zidek für die Möglichkeit in seiner Abteilung an der Charité meine Doktorarbeit geschrieben zu haben.

Herrn Prof. Bahlmann und seinem Team danke ich für die Durchführung histochemische und immunohistochemischer Färbungen (Kap. 3.5.24, 4.2.9 und 4.5.4), Herrn Prof. Beyerman für die Durchführung der Peptidsynthesen (Kap. 3.5.13, 4.2.6, 4.3.3, 4.4.12, 4.4.7).

Ebenso danke ich Frau PD Dr. Vera Jankowski für die Einstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin, ohne diese finanzielle Unterstützung wäre das Gelingen dieser Arbeit sehr erschwert gewesen.

Nicht zuletzt danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Joachim Jankowski, die mich in jeglicher Art unterstützt haben und das gute Arbeitsklima geschaffen haben. Mein besonderer Dank gilt hier dem Diplom Biologen Marc Nierhaus und dem Diplom Biochemiker Falko Brettschneider für ihre Hilfsbereitschaft, fachlich kompetente Beratung und grenzenlose Geduld, Brigitte Egbers für ihre Hilfsbereitschaft und ermutigende Worte und Dr. rer. med. Katharina Krüger für ihre liebevolle Unterstützung.

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie, die mir unter Entbehrungen diesen beruflichen Werdegang ermöglicht hat, meinen Eltern, die während der gesamten Zeit mir liebevoll zur Seite gestanden und mich ermutigt haben.

Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (NGFN/01GR0807) gefördert.

7.10. Erklärung

„Ich, Silvia Salem, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

„Isolierung und Identifizierung vasomodulierender Biomoleküle aus bovinen Nebennieren“

selbst ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Silvia Salem

Berlin, 14 Februar 2012