

4. Ergebnisse

4.1 Isolierung humaner Lymphozyten

Gesunden, normotonen Spendern wurde aus einer peripheren, oberflächlichen Vene 400 ml Blut entnommen. Nach Zentrifugation des Vollblutes wurde das überstehende Plasma von den festen Blutbestandteilen getrennt. Mittels HistopaqueTM-1077-Lösung und weiteren Zentrifugationsschritten wurden die Lymphozyten isoliert. Nach 1 h Selbstinkubation wurde aus dem Überstand der so stimulierten Lymphozyten eine vasokonstriktiv-wirkende Substanz isoliert.

4.2 Kationenaustausch-Chromatographie

Der Überstand der Lymphozyten wurde zunächst durch ein Kationenaustausch-Chromatographie-Schritt konzentriert und fraktioniert. Ein charakteristisches Kationenaustausch-Chromatogramm zeigt Abbildung 2.

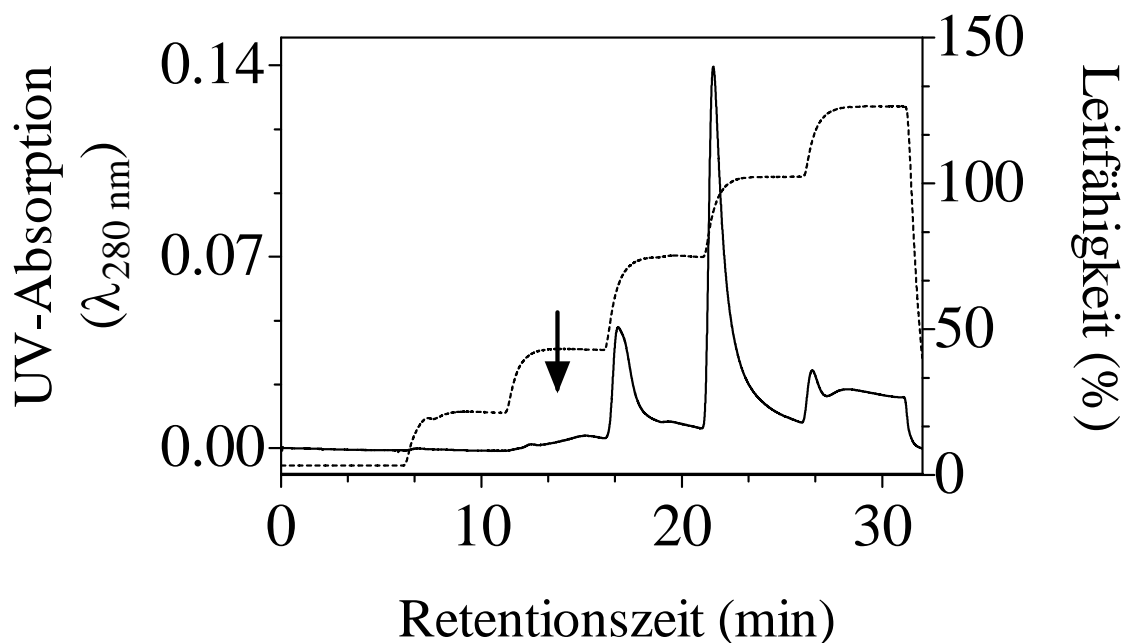


Abbildung 2: Charakteristisches Chromatogramm der Kationenaustausch-Chromatographie

Probe:	Lymphozytenübersand nach 1 h Inkubation
Säule:	HiTrap TM SP 1ml; Amersham Pharmacia, Schweden
Eluent A:	20 mmol/l K ₂ HPO ₄ in Wasser, pH 3,5
Eluent B:	20 mmol/l K ₂ HPO ₄ und 2 mol/l NaCl in Wasser, pH 3,5
Gradient:	0-5 Min: 0 % B, 5-10 Min: 5 % B, 15-20 Min: 25 % B, 25-30 Min: 50 % B, 30-35 Min: 75 % B, 35-40 Min: 100 % B
Fluss:	1 ml/min
UV-Detektion:	280 nm
Fraktionsgröße:	1 ml

4.3 Reversed-Phase-Chromatographie

Das Eluat der Gradientenstufen der Kationenaustausch-Chromatographie wurde mittels einer Reversed-Phase-Chromatographie konzentriert und entsalzt. Abbildung 3 zeigt ein charakteristisches Reversed-Phase-Chromatogramm. Es ist bei 280 nm ein UV-Maximum zu erkennen, das mit einem Pfeil gekennzeichnet ist. Im folgenden wird auf die Isolierung der vasokonstriktiv-wirkenden Substanz eingegangen, die dieses UV-Maximum bedingt.

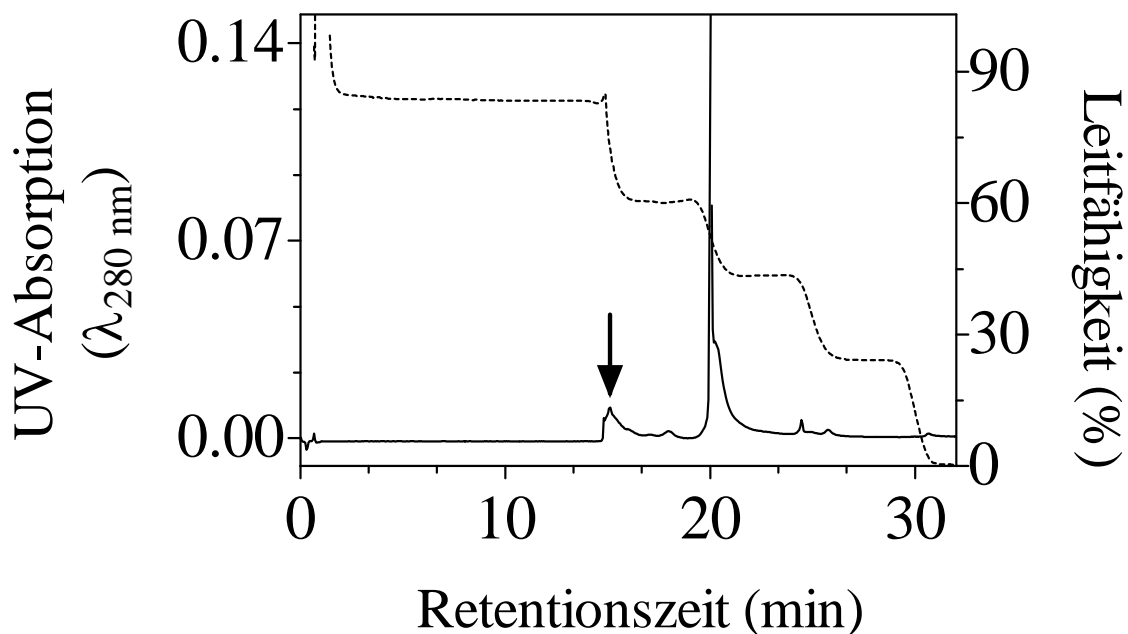


Abbildung 3: Charakteristisches Chromatogramm der Reversed-Phase-Chromatographie

Probe:	Eluat der Kationenaustausch-Chromatographie
Säule:	Poros R2/H; 100 x 2.1 mm I.D., Perseptive Biosystems, Deutschland
Eluent A:	40 mmol/l wässriges Triethylammoniumacetat
Eluent B:	80 % wässriges Acetonitril
Gradient:	0-10 Min: 0 % B, 10-15 Min: 25 % B, 15-20 Min: 50 % B, 20-25 Min: 75 % B, 25-30 Min: 100 % B
Fluss:	0,5 ml/min
UV-Detektion:	280 nm
Fraktionsgröße:	1 ml

Die vasokonstringierende Wirkung der lyophilisierten Fraktionen sämtlicher Elutionsstufen der Reversed-Phase-Chromatographie wurde mittels eines Nierenperfusionstests an einer isolierten Rattenniere bestimmt. Abbildung 4 zeigt die Wirkung einer charakteristischen vasokonstriktiv-wirkenden und einer nicht vasokonstriktiv-wirkenden Fraktion auf den Druck des Nierenperfusionstests. Zum Vergleich ist die Wirkung des Angiotensin II auf den Perfusionsdruck dargestellt.

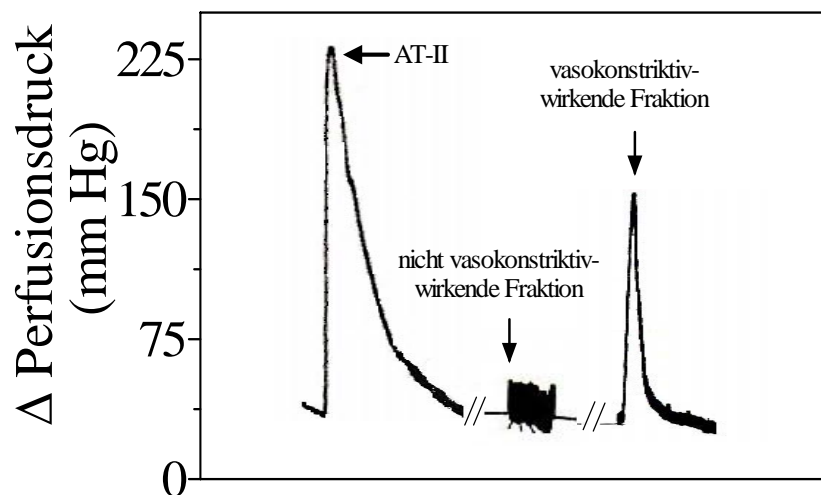


Abbildung 4: Original-Nierenperfu-sions-Druckkurve einer charakteristischen vaso-konstriktiv-wirkenden und einer nicht vasokonstriktiv-wirkenden Fraktion, die mit einem Pfeil gekennzeichnet ist. Zum Vergleich ist die Wirkung des Angiotensin II auf den Perfusionsdruck gezeigt.

4.4 MALDI-Massenspektrometrie

Die entsalzte und lyophilisierte Fraktion der Reversed-Phase-Chromatographie die in Abbildung 3 mit einem Pfeil gekennzeichnet wurde und im Nierenperfusionstest eine vasokonstriktorische Wirkung hatte, wurde mittels MALDI-Massenspektrometrie analysiert. Abbildung 5 zeigt das MALDI-Massenspektrum der isolierten Substanz.

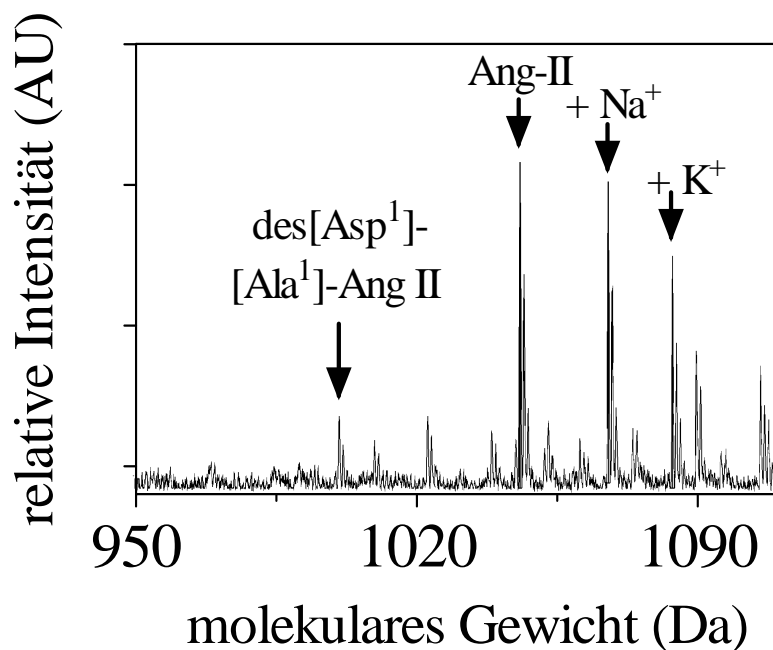


Abbildung 5: MALDI-Massenspektrum
Massenspektren der Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie (Abbildung 3) sind mit einem Pfeil markiert. Matrix: Zimtsäure, Abszisse: Massenzahl pro Ladung, Ordinate: relative Intensität

Mit der MALDI-Massenspektrometrie wurde in einer der Fraktionen eine Masse von 1003 Da bestimmt. Mittels Datenbanken wurde die isolierte Substanz als ein Peptid mit der folgenden Aminosäuresequenz identifiziert: Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe. Hierbei handelt es sich um das vasokonstriktiv-wirkende Peptid des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II. Die Aminosäuresequenz des Angiotensin II und des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8: Aminosäuresequenz des Angiotensin II und des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II

Substanz	Aminosäuresequenz
Angiotensin II	Asp -Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe
des[Asp ¹]-[Ala ¹]-Ang II	Ala - Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe

4.5 Elektrospray Ionisation

Die entsalzte und lyophilisierte Fraktion der Reversed-Phase-Chromatographie wurde auch mittels ESI-Massenspektrometrie analysiert. Das resultierende ESI-Massenspektrum ist in Abbildung 6 gezeigt, in der die einzelnen Fragmente der isolierten Substanz dargestellt sind.

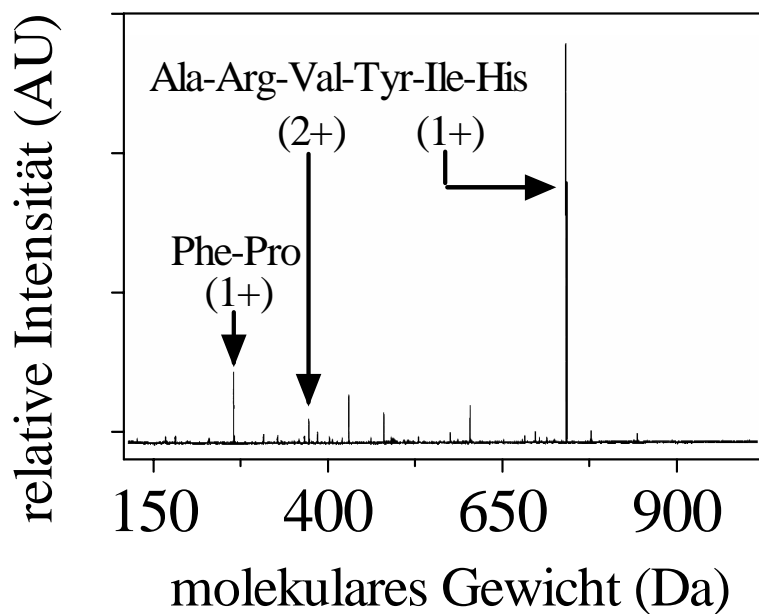


Abbildung 6: ESI-Massenspektrum
 Massenspektren der Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie (Abbildung 3) sind mit einem Pfeil markiert. Matrix: Zimtsäure, Abszisse: Massenzahl pro Ladung, Ordinate: relative Intensität

4.6 Inkubation von Lymphozyten mit Angiotensin II

Nach Isolierung von Lymphozyten wurde der Lymphozytenüberstand in Gegenwart beziehungsweise Abwesenheit des Angiotensin II inkubiert. In definierten Zeitabständen wurden Aliquots von dem Überstand abgenommen. Nach chromatographischer Aufarbeitung mittels Kationenaustausch- und Reversed-Phase-Chromatographie wurden Aliquots der resultierenden Fraktionen massenspektrometrisch analysiert. Abbildung 7 zeigt das MALDI-Massenspektrum des Lymphozytenüberstandes vor Inkubation mit Angiotensin II. In Abbildung 8 ist das MALDI-Massenspektrum des Lymphozytenüberstandes nach einer Inkubationszeit von 2 h mit Angiotensin II gezeigt.

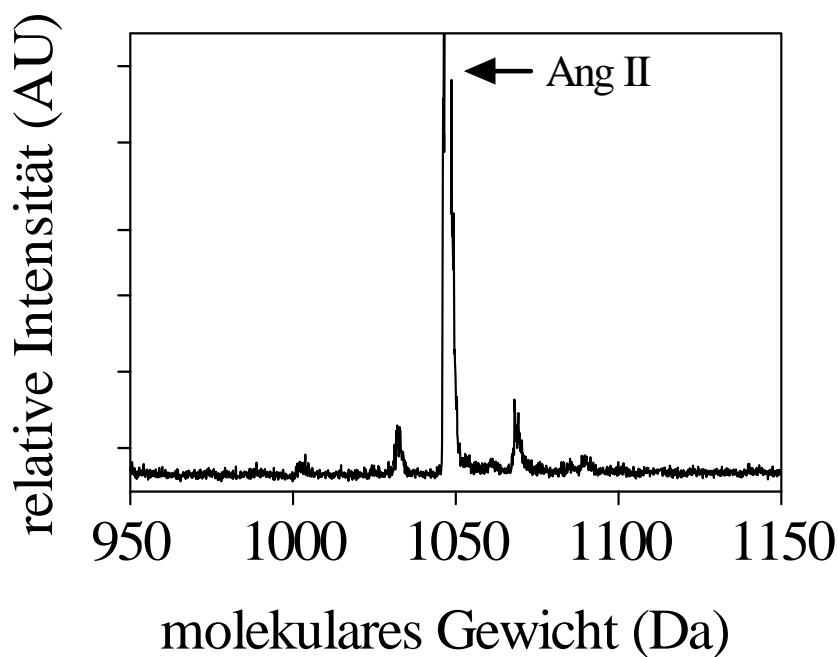


Abbildung 7: MALDI-Massenspektrum des Lymphozytenüberstandes vor Inkubation mit Angiotensin II. Matrix: Zimtsäure, Abszisse: Massenzahl pro Ladung, Ordinate: relative Intensität

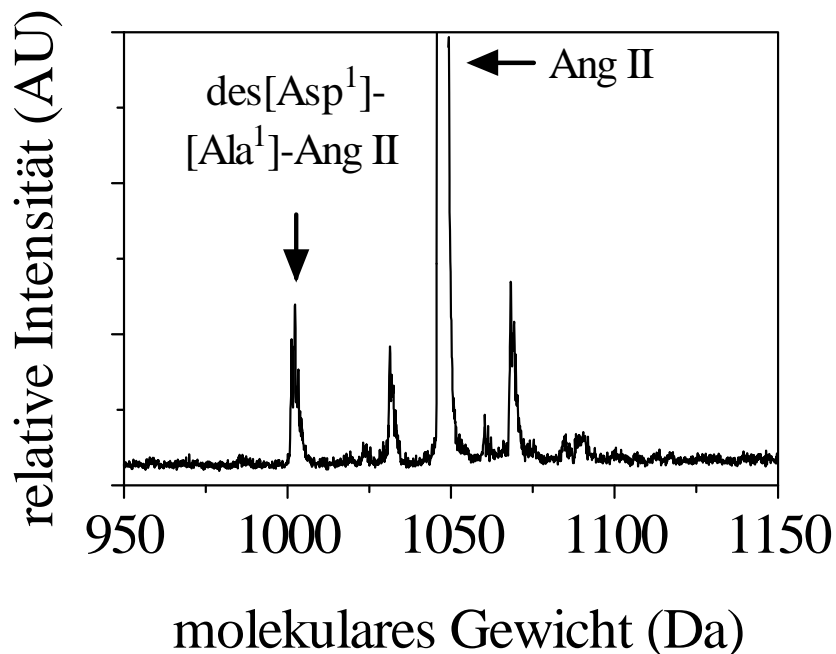


Abbildung 8: MALDI-Massenspektrum des Lymphozytenüberstandes nach 2 h Inkubation mit Angiotensin II. Matrix: Zimtsäure, Abszisse: Massenzahl pro Ladung, Ordinate: relative Intensität

In Abbildung 7 ist das Massensignal bei 1046 Da mit einem Pfeil gekennzeichnet. Dieses Massensignal entspricht dem des Angiotensin II. Nach 2 h Inkubation ist ein weiteres Massensignal (entspricht des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II) in Abbildung 8 mit einem Pfeil markiert. Dieses Massensignal ist nach 2 h Inkubation im Vergleich zum entsprechenden Signal in Abbildung 7 deutlich größer.

Abbildung 9 zeigt das Ergebnis der Quantifizierung des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II. Die Inkubation der Lymphozyten in Gegenwart von Angiotensin II, führt zu einem signifikanten Anstieg des Massensignals bei 1003 Da, der molekularen Masse des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II im Überstand.

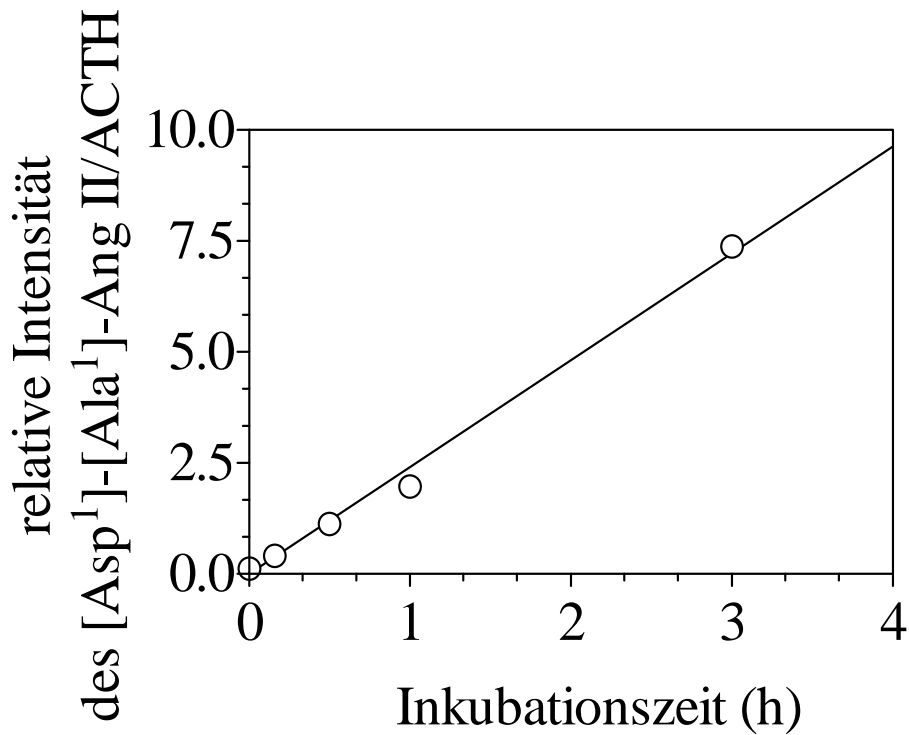


Abbildung 9: Quantifizierung des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II: Anstieg der Menge an des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II mit zunehmender Inkubationszeit.
Abszisse: Inkubationszeit in h, Ordinate: relative Intensität von des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II

Abbildung 10 gibt ein Überblick über die Massenspektren des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II, Angiotensin II und des internen Standards ACTH.

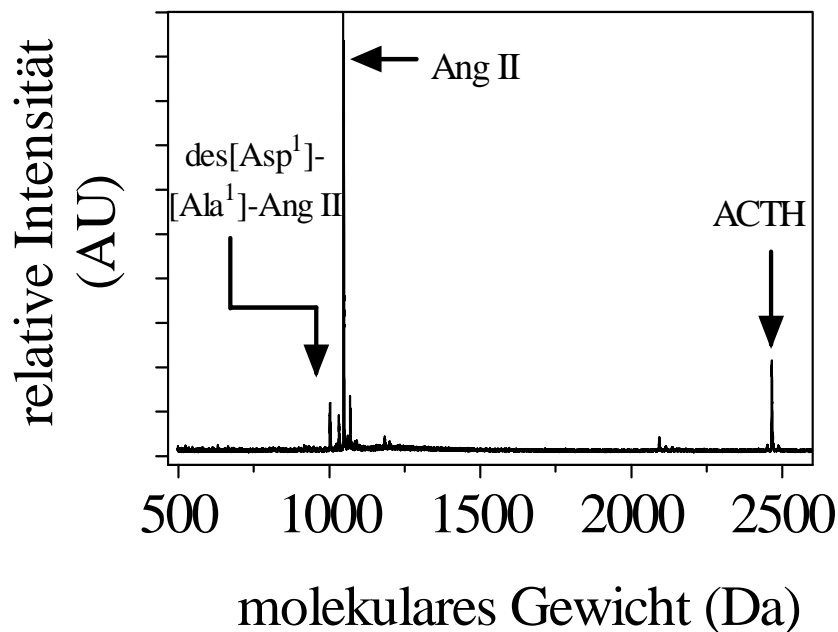


Abbildung 10: Massenspektren des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II, Angiotensin II und des internen Standards ACTH, Matrix: Zimtsäure, Abszisse: Massenzahl pro Ladung, Ordinate: relative Intensität

In einem weiteren Versuch wurden isolierte Lymphozyten denaturiert. Dafür wurden die Lymphozyten zum einen thermisch, zum anderen mit 0,6 Mol Perchlorsäure versetzt, denaturiert. Anschließend erfolgte erneut eine Inkubationsreihe mit Angiotensin II im Überstand der Lymphozyten. In definierten Zeitabständen wurden Aliquots vom Überstand abgenommen. Nach chromatographischer Aufarbeitung mittels Kationenaustausch- und Reversed-Phase-Chromatographie wurden die Aliquots mittels MALDI-Massenspektrum analysiert. Es wurden die in Kapitel 3.2.5 beschriebenen Bedingungen zur massenspektrometischen Analyse verwendet. Nach Inkubation von nativen Lymphozyten in Abwesenheit von Angiotensin II und von denaturierten Lymphozyten mit Angiotensin II, zeigte die massenspektrometrische Analyse keine Bildung von des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II.

4.7 Wirkung des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II auf den Perfusionsdruck einer isolierten, perfundierten Niere

Die vasokonstringierende Wirkung des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II auf den Perfusionsdruck einer isolierten, perfundierten Niere wurde mittels eines Nierenperfusionstests bestimmt.

Abbildung 11 gibt die Dosis-Wirkungs-Beziehung von Angiotensin II und des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II in Gegenwart und Abwesenheit vom Angiotensin-Rezeptor Antagonist AT (1) EXP 3174 im Nierenperfusionstest wieder.

Im Nierenperfusionstest führte des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II zu einer dosisabhängigen Vasokonstriktion. Bei gleichen Konzentrationen von Angiotensin II und des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II, zeigte des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II eine deutlich geringere Änderung des Perfusionsdruckes als Angiotensin II.

Der vasokonstriktorische EC₅₀-Wert des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II lag mit $4,43 \pm 1,95 \times 10^{-7}$ mol/l über dem des Angiotensin II ($(5,20 \pm 2,52) \times 10^{-8}$ mol/l). Die minimale effektive Konzentration von des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II betrug weniger als 10^{-8} mol/l.

Im Gegenwart des Angiotensin-Rezeptor Antagonisten AT (1) EXP 3174 führten Angiotensin II und des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II zu keiner Änderung des Perfusionsdruckes.

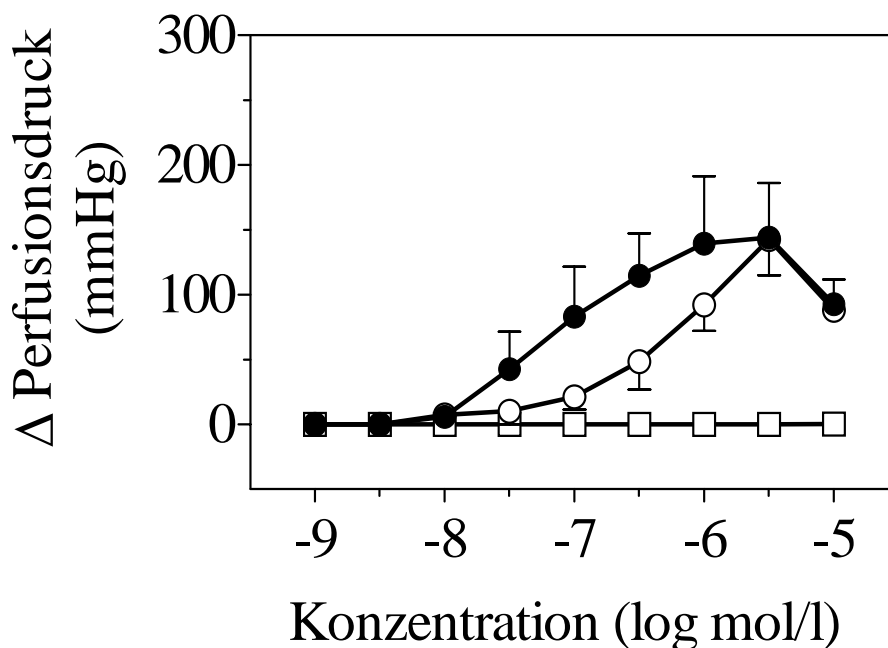


Abbildung 11: Änderung des Perfusionsdruckes der isolierten, perfundierten Niere, die durch des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II (O), Angiotensin II (●) und des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II in Gegenwart vom Angiotensin-Rezeptor Antagonist AT₁ (1) EXP 3174 (□) induziert ist.

Abszisse: Konzentration der Agonisten (log mol/l)

Ordinate: Änderung des Perfusionsdruckes (in mmHg)

Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert von 6 Bestimmungen (n = 6),

die vertikalen Linien den Mittelwerten ± S.E.M. **, p < 0,01.

4.8 Affinität des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II zum Angiotensin-Rezeptor

Nach dem Nierenperfusionstest wurde die Affinität des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II zum Angiotensin-Rezeptor untersucht. Dazu wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK 293 Zellen) mit humanen AT₁- und AT₂-Rezeptoren transfiziert.

Die Bindung von des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II und Angiotensin II am AT₁- und AT₂- Rezeptor wurde durch die Verdrängung des mit einem Radioisotop markierten ¹²⁵I-Sar¹,Ile⁸-Ang II mit nicht-markiertem Sar¹,Ile⁸-Ang II charakterisiert. Die Verdrängungskurven sind in Abbildung 12 und 13 wiedergegeben. In Abbildung 12 ist die Affinität zum AT₁-Rezeptor dargestellt. Dabei ist der sigmoider Kurvenverlauf von des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II vergleichbar mit dem Kurvenverlauf von Angiotensin II. In Abbildung 13 ist die Affinität zum AT₂- Rezeptor

dargestellt. Hierbei ist die sigmoide Kurve des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II im Vergleich zur Angiotensin II-Kurve nach links verschoben.

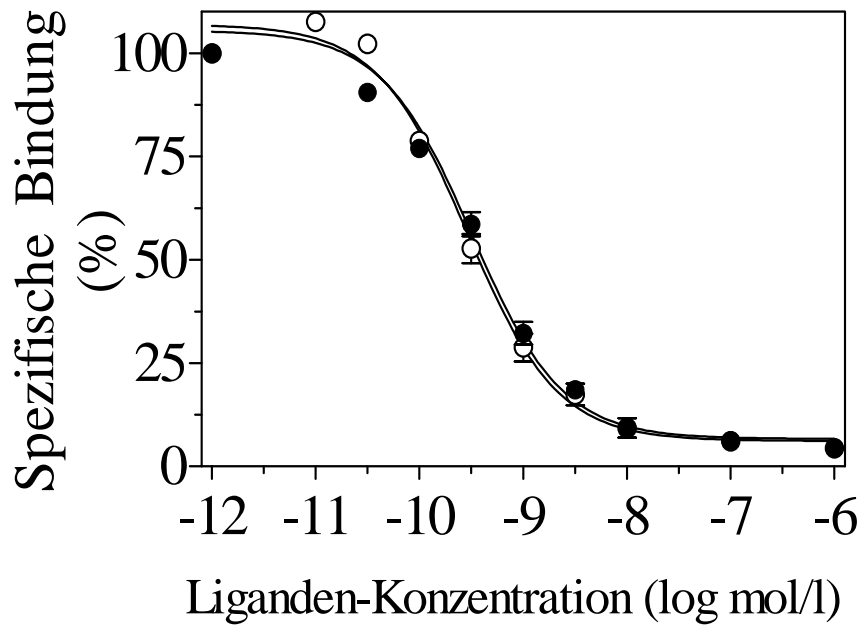


Abbildung 12: Verdrängung des ¹²⁵I-Sar¹,Ile⁸-Ang II durch des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II (O) und Angiotensin II (●) in COS-7 Zellen, die mit AT₁-Rezeptoren transfiziert waren. Mittelwerte ± S.E.M., n = 5 *, p < 0,05; **, p < 0,01.

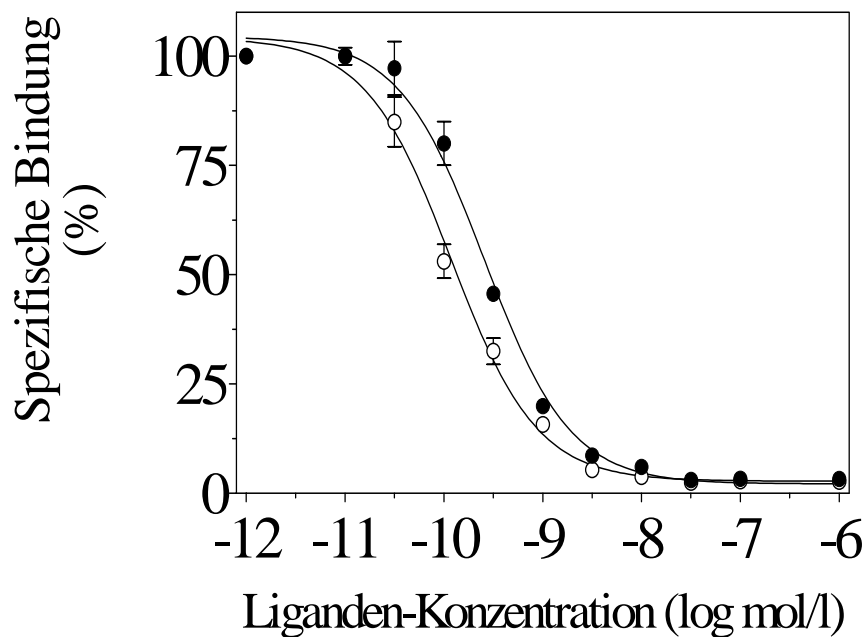


Abbildung 13: Verdrängung des ^{125}I -Sar¹,Ile⁸-Ang II durch des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II (O) und Angiotensin II (●) in COS-7 Zellen, die mit AT₂-Rezeptoren transfiziert waren. Mittelwerte \pm S.E.M., n = 5 *, p < 0,05; **, p < 0,01.

Der EC₅₀-Wert für des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II betrug in mit AT₁-Rezeptor transfizierten Zellen $9,54 \pm 0,04$ [-log EC₅₀]. In mit AT₂-Rezeptor transfizierten Zellen betrug der EC₅₀-Wert $9,92 \pm 0,04$ [-log EC₅₀]. Der EC₅₀-Wert von des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II war im Vergleich zu Angiotensin II, in AT₂-transfizierten Zellen signifikant niedriger (p < 0,05). Ein signifikanter Unterschied der EC₅₀-Werte für des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II und Angiotensin II in AT₁-transfizierten Zellen lag nicht vor.