

5. Diskussion

Trotz intensiver Bemühungen ist es bisher nicht gelungen, eine einheitliche Ursache für die essentielle Hypertonie zu finden. Als Ursache wird ein multifaktorielles Geschehen angenommen, das zu einer Regulationsstörung des Herz-Kreislauf-Systems führt. Sowohl die Erhöhung des Herzzeitvolumens, als auch die Erhöhung des totalen peripheren Widerstands tragen zur Entstehung einer Hypertonie bei. Unter den verschiedenen Faktoren haben die Aktivierung des sympathischen Nervensystems (Rahn et al., 1999) sowie die Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) (Dinh et al., 2001) eine besondere Bedeutung

Bei Patienten mit essentieller Hypertonie besteht eine erhöhte Aktivität des sympathischen Nervensystems mit erhöhten Katecholamin-Konzentrationen im Vergleich zu normotensiven Patienten (Rahn et al., 1999). Ein erhöhter Sympathikotonus führt zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems (Saxena, 1992, DiBona, 2004). Angiotensin II ist das bedeutsamste Produkt des Renin-Angiotensin-Systems und einer der stärksten blutdrucksteigernden Substanzen des Organismus.

Es sind auch weitere Substanzen im Blut beschrieben, die einen vasokonstringierenden Effekt ausüben und für die Regulation des Blutdrucks von Bedeutung sein könnten. Die ersten Hinweise auf vasokonstriktive Substanzen im Blut gaben die Parabioseversuche von Dahl et al. mit hypertensiven und normotensiven Ratten (Dahl et al., 1969). Weinstock et al. gelang der Nachweis von Angiotensinen in Makrophagen (Weinstock, Blum, 1984).

In nicht publizierten Vorversuchen zu der hier vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass isolierte Lymphozyten vasokonstringierende Substanzen bei Selbstinkubation in den Überstand abgeben. Ziel dieser Dissertation war es, eine vasokonstriktiv-wirkende Substanz in humanen Lymphozyten aufzuspüren, zu isolieren und zu identifizieren.

Die Ergebnisse der Dissertation zeigen, dass Lymphozyten eine vasokonstriktiv-wirkende Substanz produzieren und sezernieren. Im Verlauf dieser Arbeit konnte die betreffende Substanz als ein modifiziertes Angiotensin II-Peptid identifiziert werden, bei der die erste Aminosäure des Angiotensin II, die Asparaginsäure, durch Alanin substituiert worden ist. Dem entsprechend wird das betreffende Peptid als „des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II“ bezeichnet.

Zur Isolierung des vasokonstriktiv-wirkenden Peptids aus Lymphozyten, wurden zunächst Lymphozyten aus Vollblut isoliert. Hierfür wurde zunächst gesunden, normotensiven Spendern Vollblut entnommen. Durch Zentrifugation wurde aus dem Vollblut das Plasma von Blutzellen getrennt. Der Rückstand wurde mit einer Histopaque-1077-Lösung überschichtet. Die Histopaque-1077-Lösung führte während der Zentrifugation des Blutes zur Ausbildung eines Dichtegradienten und diente dadurch zur Trennung humaner Lymphozyten von übrigen Blutzellen (Sigma-Aldrich Co, 2003). Nach der Zentrifugation wurden drei Schichten erhalten, in denen sich unterschiedliche Blutzellen anreicherten. Erythrozyten und Granulozyten aggregierten und sedimentierten in die untere Schicht. In der mittleren Schicht reichern sich Lymphozyten an. Die obere Schicht enthielt das Restplasma, das sich nach der ersten Zentrifugation noch in der Probe befand. Mittels mehrmaliger Waschvorgänge mit isotonischer NaCl-Lösung und Zentrifugations-Schritten konnten Thrombozyten entfernt werden, so dass nun Lymphozyten isoliert vorlagen. Während der Selbst-Inkubation sezernierten Lymphozyten Substanzen, die sich im Überstand konzentrierten.

Der Überstand der Lymphozyten wurde mittels eines Kationenaustauschers chromatographiert, um kationischen Substanzen aus der Probe zu konzentrieren. Die Trennung der kationischen Probensubstanzen erfolgte hierbei aufgrund unterschiedlicher Affinität zum Kationenaustauscher. Die funktionelle Gruppe der stationären Phase der Kationenaustauscher-Säule bestand hierbei aus anionischen Gruppen, die kovalent an das Gelmaterial der Kationenaustauscher-Säule gebunden sind. Kationische Substanzen der mobilen Phase lagerten sich an die anionischen Gruppen an. Während des Probenauftrags wurden diese Kationen durch die Kationen in der Probe ersetzt. Mittels Kationenaustauscher wurden kationische Substanzen aus der Probe getrennt. Die Elution der Probensubstanzen erfolgte mittels eines Gradienten durch kontinuierliche Steigerung der Kationenstärke der mobilen Phase. Hiermit wurden sämtliche retendierte Substanzen eluiert, unabhängig von der Stärke der Retention.

Die Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie wurden im nächsten Chromatographie-Schritt auf eine Reversed-Phase-Chromatographie-Säule aufgetragen. Die Elution der Probensubstanzen erfolgte wiederum mittels eines Gradienten. Die polare

stationäre Phase der Reversed-Phase-Säule retendierte Substanzen aufgrund hydrophober Wechselwirkungen umso stärker, je unpolarer sie sind. Hierdurch wurden sehr hydrophobe und sehr hydrophile Substanzen getrennt. Entsprechend eluierten unpolare Substanzen erst bei höheren Konzentrationen des hydrophoben Elutionsmittels Acetonitril. Durch die Reversed-Phase-Chromatographie wurden die Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie entsalzt und konzentriert.

In der 2. Stufe der Kationenaustausch-Chromatographie in Abbildung 2 und in der 1. Stufe der Reversed-Phase-Chromatographie in Abbildung 3 ist je ein UV-Maximum bei 280 nm zu erkennen, das jeweils mit einem Pfeil markiert ist. Diese beiden UV-Absorptionen sind besonders herauszustellen, da in den Fraktionen dieser Stufen durch nachfolgende Schritte ein vasokonstriktiv-wirkendes Peptid nachgewiesen wurde.

Den Proben der Reversed-Phase-Chromatographie wurde 1/10 des Volumens als Aliquot abgenommen. Zur Entfernung von Lösungsmitteln aus den Aliquots, die eine toxische Wirkung auf die Niere ausüben könnten, wurden sie in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert. Die Effekte der Aliquots der entsalzten und lyophilisierten Proben auf den Gefäßtonus wurden mittels eines Nierenperfusionstests bestimmt. Der Durchfluss einer vasokonstriktiv-wirkenden Substanz über die Nierenarterie führte zu einer Vasokonstriktion mit nachfolgendem Anstieg des Perfusionsdruckes.

Eine Voraussetzung des Nierenperfusionstests ist eine physiologische Salzkonzentration der zu untersuchenden Proben. Zu hohe Salzkonzentrationen führten aufgrund der höheren Osmolarität zu einer artifiziellen Vasokonstriktion und somit zu einem falsch positiven Ergebnis, das die versuchsvorbereitende Entsalzung mit der Reversed-Phase-Chromatographie notwendig machte.

Die im Nierenperfusionstest vasokonstriktiv-wirkenden Fraktionen wurden mit MALDI-Massenspektrometrie und Elektrospray Ionisation analysiert. Das identifizierte Peptid, des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II, ist wie auch Angiotensin II ein Oktapeptid und hat eine ähnliche Aminosäuresequenz wie das Angiotensin II. Die Aminosäure Asparaginsäure vom Angiotensin II ist jedoch beim des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II durch die Aminosäure Alanin ersetzt.

Die Wirkung des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II auf den Perfusionsdruck der isolierten, perfundierten Niere zeigte im Nierenperfusionstest, dass des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II den vaskulären Tonus beeinflusst. des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II ruft in der isolierten, perfundierten Niere eine vorübergehende dosisabhängige Vasokonstriktion hervor. Der vasokonstriktorische Effekt ist jedoch deutlich kleiner als der des Angiotensin II. Nach der erfolgreichen Identifizierung der vasokonstriktiv-wirkenden Substanz wurde die Wirkung des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II untersucht. Die Datenbank-Recherche des humanem Genoms ergab keine DNA-Sequenz, die des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II kodiert. Es kann daher vermutet werden, dass das des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II durch eine posttranslationale Modifikation des Angiotensin II im Organismus gebildet wird. In wieweit eine Decarboxylase an diesen posttranslationalen Modifikations-Prozess beteiligt sein könnte, wurde daher nach der erfolgreichen Identifizierung untersucht.

Dazu wurde der Überstand isolierter Lymphozyten in Gegenwart beziehungsweise Abwesenheit von Angiotensin II inkubiert. Während der Inkubation wurden in definierten Zeitintervallen Aliquots von dem Überstand abgenommen und chromatographisch mittels Kationenaustausch- und Reversed-Phase-Chromatographie konzentriert und fraktioniert. Im Anschluss an die Chromatographie-Schritte erfolgte eine Analyse mit der MALDI-Massenspektrometrie. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung zeigten nach Inkubation mit Angiotensin II einen Anstieg des Massensignals des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II. In der Inkubationszeitreihe war eine zeitabhängige Freisetzung von des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II zu erkennen, wobei die höchste zeitabhängige Freisetzung von des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II nach 2 h festzustellen war. Nach 2 h Inkubation wurde ein „steady-state“ erreicht, es wurde somit die gleiche Menge des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II gebildet wie metabolisiert. Der „steady-state“ war durch einen konstanten des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II-Gehalt erkennbar. Aufgrund des Zeitverlaufs der Freisetzung kann vermutet werden, dass sich die isolierte Substanz im Überstand von Lymphozyten durch ein Enzym, eine Aspartat-Decarboxylase, aus Angiotensin II bildet.

Durch weitere Versuche wurde überprüft, ob die Synthese von des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II aus Angiotensin II tatsächlich durch ein Enzym erfolgt oder an einen nicht-enzymatischen Prozess gebunden ist. Um eine enzymabhängige Synthese des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II

nachzuweisen beziehungsweise auszuschließen, wurden Lymphozyten isoliert und denaturiert. Nach der Denaturierung wurde der Lymphozytenüberstand mit Angiotensin II versetzt und inkubiert. Nach der Inkubation wurden Aliquots abgenommen und mittels Kationenaustauscher- und Reversed-Phase-Säule chromatographiert. Da in der nachfolgenden Analyse mit der MALDI-Massenspektrometrie weder in nativen Lymphozyten in Abwesenheit von Angiotensin II, noch in denaturierten Lymphozyten mit Angiotensin II eine Synthese des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II festgestellt werden konnte, ist zu vermuten, dass eine enzymatische Decarboxylierung vorliegt.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II durch ein Enzym aus Angiotensin II synthetisiert werden könnte, das Asparaginsäure in Alanin decarboxyliert. Da in denaturierten Lymphozyten die Bildung von des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II nicht nachzuweisen war, wird angenommen, dass dieses Enzym in den Lymphozyten vorliegt und Angiotensin II zu des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II metabolisiert.

Die Synthese des Angiotensin II ist ebenfalls enzymgebunden. Ausgangsstoff des Angiotensin II ist das in der Leber produzierte Angiotensinogen. Das Enzym Renin, das in den Nierenzellen gebildet und in das Blut abgegeben wird, spaltet vom Angiotensinogen in einem ersten Schritt Angiotensin I ab. In einem weiteren Schritt trennt das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) 2 Aminosäuren von Angiotensin I, wodurch Angiotensin II entsteht. Dieses „klassische“ Renin-Angiotensin-System existiert nicht nur im Blut, sondern auch als lokale, gewebspezifische Systeme in verschiedenen Organen wie Gehirn, Herz, Niere und Nebenniere (Küttler, 2002).

Gegenwärtig ist die Substratspezifität des Enzyms, das Angiotensin II zu des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II metabolisiert, und ihre Verteilung im Gewebe unbekannt. Es besteht die Möglichkeit, dass es außer in Lymphozyten auch in anderen Organen zu finden ist. Potentiell könnte neben Lymphozyten auch in anderen Geweben des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II produziert werden. Weitere Untersuchungen könnten Informationen über die Lokalisation, Biosynthese und Metabolismus dieses Peptids liefern.

Angiotensin II zeigt neben der vasokonstriktorischen Wirkung auch andere organspezifische Wirkungen. Ob auch des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II neben vasokonstriktorischer Wirkung auch andere Wirkungen hat, ist zukünftig noch zu klären.

Das Renin-Angiotensin-System spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von essentieller Hypertonie. Es kann medikamentös an verschiedenen Stellen gehemmt werden. ACE-Hemmer vermindern die Bildung von Angiotensin II durch Inhibition des Angiotensin-Converting-Enzyms. Durch genaue Kenntnisse über die Angiotensin II-Rezeptoren konnten spezifische Antagonisten am Angiotensin II-Rezeptor entwickelt werden, die selektiv die AT₁-Rezeptoren blockieren, wie EXP 3174. EXP 3174 ist ein aktives Metabolit des Losartan, des ersten entwickelten AT₁-Rezeptor-Blockers. In Gegenwart des Angiotensin-Rezeptor Antagonisten AT (1) EXP 3174 wurde die vasokonstriktorische Wirkung von des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II aufgehoben, so dass davon auszugehen ist, dass des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II wie Angiotensin II an den Angiotensin II-Rezeptor bindet und durch Inhibition des Rezeptors seine Wirkung verliert.

Bindungs- beziehungsweise Verdrängungsuntersuchungen am Angiotensin-Rezeptor zeigten, dass die Affinität des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II zum AT₁-Rezeptor identisch ist mit der des Angiotensin II. Die vasokonstriktorische Wirkung ist jedoch signifikant niedriger. Es handelt sich bei des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II um einen partiellen Agonisten am AT₁-Rezeptor.

AT₁-und AT₂-Rezeptoren sind als funktionelle Gegenspieler zu betrachten. Sie vermitteln teilweise gegensätzliche Wirkungen, wie Vasokonstriktion über AT₁-Rezeptoren und Vasodilatation über AT₂-Rezeptoren. Durch den Feed-back-Mechanismus steigt im Blut der Angiotensin II-Spiegel bei Blockade der spezifischen Angiotensin II-Rezeptoren. Die Folge ist eine vermehrte Stimulation des vasodilatierend und antiproliferativ wirksamen AT₂-Rezeptors. Die Affinität des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II zum AT₂-Rezeptor ist höher als die des Angiotensin II. Möglicherweise kann durch die Bindung von des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II am AT₁-und AT₂-Rezeptor die Wirkung von Angiotensin II antagonisiert und somit gemildert werden.

Der Signalmechanismus des AT₁-Rezeptors erfolgt über G-Proteine, deren Aktivierung eine intrazelluläre Signalkaskade auslöst, die zum Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration führt (Berry et al., 2001). Über welchen Mechanismus der AT₂-Rezeptor ein Mediator für Vasodilatation ist, ist bisher nicht genau geklärt (Csikos et al., 1998). Es wurde über einen indirekten Mechanismus berichtet, wie zum Beispiel die Stimulation des B₂Bradykinin-Rezeptors mit resultierendem Anstieg von Stickstoff und cGMP-Produktion (Tsutsumi et al., 1999, Gohlke et al., 1998). Weiterhin gibt es Publikationen, die über den Anstieg der Aktivität von Phosphotyrosin nach Stimulation von AT₂-Rezeptoren berichten (Tsutzuki et al., 1996, Bedecs et al., 1997, Horiuchi et al., 1999). Die Aufklärung der Signalübertragung am AT₂-Rezeptor wird bei der Untersuchung der Effekte von des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II durch Bindung am AT₂-Rezeptor hilfreich sein.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation, dass humane Lymphozyten ein bisher unbekanntes vasokonstriktiv-wirkendes Peptid, das des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II sezernieren. Der Gehalt des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II nimmt mit zunehmender Inkubationszeit im Überstand von humanen Lymphozyten zu. Es ist somit anzunehmen, dass es ins Plasma sezerniert wird. Es ist davon auszugehen, dass die Plasmakonzentration des des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II nicht nur lokale, sondern auch systemische Effekte hervorrufen könnte. des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II könnte in der Regulation von Gefäßtonus und Wachstum in normalen und atherosklerotisch veränderten beziehungsweise hypertrophierten Gefäßen von Bedeutung sein und als ein weiterer Faktor zur Entstehung der essentiellen Hypertonie beitragen. Mit des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang II ist ein neues aktives Mitglied im Angiotensin-System bekannt, das enzymatisch durch Metabolisierung eines aktiven Peptids entsteht.