

Aus der Medizinischen Klinik IV  
Der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Nachweis von Angiotensin II im Überstand von stimulierten  
mononukleären Leukozyten**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Anja Dewald  
aus Heidelberg

Gutachter: 1. PD Dr. rer. nat. Joachim Jankowski  
2. PD Dr. R. Vetter  
3. Prof. Dr. Hocher

Datum der Promotion: 23.09.2007

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Problemstellung</b>	<b>1</b>
1.1 Einleitung	1
1.2 Problemstellung	11
<b>2. Methodik</b>	<b>12</b>
2.1 Allgemeiner Teil	12
2.1.1 Kationenaustausch-Chromatographie	12
2.1.2 Reversed-Phase-Chromatographie	13
2.1.3 Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-/Ionisations- Massenspektrometrie (Maldi-Massenspektrometrie)	13
2.1.4 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion	15
2.2 Spezieller Teil	17
2.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen	18
2.2.2 Isolierung der CD8+ (T-Lymphozyten) und CD19+ (B-Lymphozyten) Lymphozyten	19
2.2.3 Kationenaustausch-Chromatographie	19
2.2.4 Präparative Reversed-Phase-Chromatographie	20
2.2.5 Bioassay-Nierenperfusionstest	21
2.2.6 Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations- Massenspektrometrie (MALDI-MS)	22
2.2.7 Präparation der RNA und Reverse Transkriptase- Polymerasekettenreaktion	23
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1 Isolierung mononukleärer Zellen	25
3.2 Kationenaustausch-Chromatographie	25
3.3 Reversed-Phase-Chromatographie	26
3.4 MALDI-Massenspektrometrie	28
3.5 Bioassay-Nierenperfusionstest	29
3.6 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion	30

<b>4. Diskussion</b>	<b>35</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>42</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>44</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>53</b>
7.1 Geräte und Reagentien	53
7.2 Abkürzungsverzeichnis	55
<b>8. Danksagung</b>	<b>57</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>58</b>

## 7. Anhang

### 7.1 Geräte und Reagentien

#### Geräte

Aufbereitungsanlage für HPLC-Wasser:

Milli-Q, Water purification-System, Firma Millipore, Deutschland

Beschleunigungs-time-of-flight-Gerät (qTOF MS Marinor):

PE/Per Septive Biosystems, Framingham, USA

Destillationsanlage zur Herstellung bidestillierten Wassers:

Köttermann 1080, Deutschland

Fraktionssammler:

Frac-100, Firma Deutschland

HPLC-Pumpe:

Gradient Pump 229, Firma Amersham-Pharmacia, Schweden

HPLC-UV-Monitor:

Lambda Max 81

HPLC-System:

SMART System, Amersham Pharmacia, Schweden

HPLC-Zubehör:

Firma Latek, Deutschland

Kationenaustauscher-Chromatographie-Säule:

HiTrap<sup>TM</sup>SP 1 ml; Amersham Pharmacia, Schweden

Leitfähigkeitsmessgeräte:

LF 39, Firma WTW, Deutschland

LF 196, Microprocessor Conductivity Meter, Firma WTW, Deutschland

LF 42, Firma WTW, Deutschland

Massenspektrometer:

Bruker Reflex III, Firma Bruker-Datronix, Deutschland

pH-Meter: Typ 27, Firma Knick, Deutschland

Reversed-Phase-Chromatographie-Säule:

Poros R2/H; 100 x 2.1 mm I.D., Perseptive Biosystems, Deutschland

Transponder:

Typ P23 ID, Gould, Oxnard, California, USA

## UV-Detektoren:

Unicord S II, Amersham-Pharmacia, Schweden  
Econo UV-Monitor, Firma Bio-Rad, USA

## Vakuumzentrifuge:

Speed Vac Concentrator SVC 100 H, Firma Savant

Verstärker: Hugo Sachs, Deutschland

Zentrifugen: 3K-1, Firma Sigma-Aldrich, Deutschland  
Eppendorf 3200, Firma Eppendorf, Deutschland.

**Reagentien**

Acetonitril	Firma Merck, Deutschland
ACTH	Firma Sigma-Aldrich, Deutschland
Angiotensin II	Firma Sigma-Aldrich, Deutschland
CD8 MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
CD19 MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
Gelatine	Haemaccel, Behringwerke, Deutschland
Heparin-Natrium-250.000 I.E.	Firma Ratiopharm, Deutschland
Histopaque-1077	Firma Sigma-Aldrich, Deutschland
LiChrosolv Wasser für die Chromatographie	Firma Merck, Deutschland
Lipopolysaccharid LPS	Firma Sigma-Aldrich, Deutschland
Serotyp 0111:B4 von E. coli	
NaCl	Firma Merck, Deutschland
PBS (Phosphatpuffer)	Firma Sigma-Aldrich, Deutschland
Perchlorsäure	Firma Sigma-Aldrich, Deutschland
RNeasy-Mini-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Reverse Transkriptase-Puffer	Life Technology, Deutschland
SuperscriptII Reverse Transkriptase	Invitrogen, Deutschland
Taq polymerase	Life Technology, Deutschland
Triethylammoniumacetat 1 M	Firma Sigma-Aldrich, Deutschland
Zimtsäure	Firma Sigma-Aldrich, Deutschland

Übrige Feinchemikalien

Firma Sigma-Aldrich, Deutschland

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzym
ACN	Acetonitril
AT	Angiotensin
AU	relative Intensität
bp	Basenpaare
°C	Grad Celcius
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CD8+, 19+	Oberflächenantigen
CHCA	Hydroxy- $\alpha$ -cyano-Zimtsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
HCl	Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I.E.	Internationale Einheiten
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
Konz.	Konzentration
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-/ Ionisations- Massenspektrometrie
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
M	Molarität
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometer
NaCl	Natriumchlorid

---

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
nm	Nanometer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PSD	Post source decay
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
TEAA	Triethylammoniumacetat
TOF	Time of flight
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
WHO	World Health Organisation



## 8. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Walter Zidek für die Ermöglichung der Durchführung der Arbeit in der Nephrologie der IV. Medizinischen Klinik der Charité Berlin.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Joachim Jankowski. Seine unendliche Geduld und freundliche Bereitschaft, mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, haben mir über manche Sinneskrise hinweggeholfen. Vor allem in der letzten Zeit der Fertigstellung der Arbeit, in der die große räumliche Distanz und die Geburt meines Sohnes Finn das Arbeiten verkomplizierten, ließ mir mein „Doktorvater“ unermüdlich Unterstützung zukommen. Ganz besonders danke ich ihm für die konstruktive Kritik beim Durcharbeiten meiner Texte, sowie für die große Unterstützung bei der Fertigstellung der Abbildungen. Das ständig sehr freundliche und angenehme Arbeitsklima in unserer Arbeitsgruppe, war eine unermessliche Motivationsquelle beim Fertigstellen dieser Arbeit.

Ebenfalls möchte ich Lars Henning meinen großen Dank aussprechen. Seine Hilfe beim Aufbau und bei der Durchführung der Versuche, sowie seine große Unterstützung bei computertechnischen Problemen, haben in ganz besondere Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke, lieber Lars für die riesige Geduld, die du mit mir hattest, vor allem beim Beantworten meiner unzähligen Fragen, und für das Lösen der technischen Probleme.

Dir, lieber Vera Jankowski, gilt mein ganz spezieller Dank. Durch Deine fachliche Unterstützung, vor allem bei der Fertigstellung der Abbildungen, und durch deine lieben, freundschaftlichen und motivierenden Gespräche warst Du mir eine große Stütze. Durch Deine offene und freundliche Art hast Du in ganz besonderer Weise zu dem sehr guten Arbeitsklima innerhalb der Arbeitsgruppe beigetragen.

Ebenso möchte ich Joachim Thiemann für die computertechnische Unterstützung sowie für die vielen lustigen Bemerkungen am Rande danken. Simone Thomsen und Bertram Seibt danke ich für die vielen guten, aufbauenden Gespräche sowie für ihre Freundschaft.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinen Eltern. Ich möchte ihnen damit für ihr Vertrauen sowie für ihre großzügige Unterstützung während des Studiums und für ihre Aufgeschlossenheit gegenüber meinen Lebens- und Berufsplänen danken.

Mein Freund Alexander Dewald hat durch seine Liebe und sein Verständnis aber auch durch seine fachliche und babysittende Unterstützung ganz besonders zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich liebe Dich.

Abschließend will ich mich herzlich bei Tamara Kramer für das Durchsehen der Arbeit und für ihre unerschütterliche moralische Unterstützung und Freundschaft in allen Lebenslagen bedanken.

## **9. Lebenslauf**

**„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“**

## Erklärung

„Ich, Anja Dewald, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Nachweis von Angiotensin II im Überstand von stimulierten mononukleären Leukozyten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

16.05.2007

Anja Dewald