

## **2. Methodik**

### **2.1 Allgemeiner Teil**

#### **2.1.1 Kationenaustausch-Chromatographie**

Die Ionenaustausch-Chromatographie ist eine Trennmethode, die aus einer Flüssigkeitschromatographie hervorgegangen ist. Zur Trennung werden ebenso eine mobile und eine stationäre Phase verwendet, wobei das Trägermaterial der stationären Phase aus einem sehr porösen, beschichteten Feststoff besteht und die mobile Phase aus einer Flüssigkeit. Zur Vergrößerung der Oberfläche und Verbesserung der Trennleistung der Säule werden Feststoffteilchen mit kleinem Korndurchmesser verwendet. Der Korndurchmesser liegt zwischen 1  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$ . Aufgrund des geringen Teilchendurchmessers des Packungsmaterials muss ein hoher Druck aufgewendet werden, damit die mobile Phase durch die Trennsäule fließen kann. Auch die Flussrate, mit der die mobile Phase durch die Trennsäule geführt wird, ist begrenzt, weil es sonst zu einem zu hohen Druckgefälle innerhalb der Säule kommen kann. Theoretisch kann man allerdings mit einer niedrigen Flussrate und einem Korndurchmesser von 1  $\mu\text{m}$  pro Meter bis zu 15.000 Trennstufen erreichen. Bei der Ionenaustausch-Chromatographie trägt die stationäre Phase elektrische Ladung an der Oberfläche.

Im Falle der Kationenaustausch-Chromatographie sind an einer polymeren Matrix kovalent anionische Gruppen gebunden. Kationische Substanzen der mobilen Phase lagern sich zunächst an die anionischen Gruppen an und neutralisieren somit die Ladung. Beim Auftragen des Probengemisches werden diese kationischen Substanzen von den kationischen Probenmolekülen verdrängt. Durch Erhöhung der Kationenstärke in der mobilen Phase werden bei der Elution die Probenmoleküle durch den Kationenüberschuß von der stationären Phase verdrängt, wobei anfangs Substanzen geringer Ladungsdichte bzw. Affinität zu den anionischen Gruppen der stationären Phase eluieren. Moleküle höherer Ladungsdichte bzw. Affinität binden stärker an die Matrix und eluieren entsprechend erst bei höherer Kationenstärke.

### **2.1.2 Reversed-Phase-Chromatographie**

Das Verfahren der Reversed-Phase-Chromatographie beruht auf der Wechselwirkung zwischen der Einheit Probenmoleküle/Ionenpaarreagenz und der stationären Phase. Die geladenen Probenmoleküle bilden mit den organischen Ionen des Ionenpaarreagenz ein Ionenpaar, das sich auf einer Umkehrphase ähnlich einer neutralen Substanz verzögern lässt. Die in der Probe enthaltenen Moleküle werden aufgrund der unterschiedlich starken Verzögerung der einzelnen Stoffe in der stationären Phase getrennt. Im Durchbruch eluieren bereits stark polare Substanzen, wie zum Beispiel Salze. Je stärker der hydrophobe Charakter der Substanz ist, umso länger wird sie in der stationären Phase zurückgehalten.

### **2.1.3 Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (Maldi-Massenspektrometrie)**

Mit einem MALDI-Massenspektrometer werden, unter Verwendung von massenspektrometrischen Techniken, komplexe hochmolekulare Verbindungen wie Enzyme, Kohlenhydrate und Oligonukleotide in ihrem Molekulargewicht bestimmt. Mit dem Maldi-Ionisierungsverfahren erschließt sich der Einsatzbereich der organischen Massenspektrometrie auf bis zu 350.000 Dalton. Das Verfahren ist durch eine hohe Nachweisempfindlichkeit gekennzeichnet. Es ermöglicht auch geringe Probenmengen zu analysieren, die eine Konzentration von  $10^{-15}$  M aufweisen [Karas und Giesmann, 1992]. Das Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, in der aus einer Substanzprobe ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt wird, einem Massenanalysator, der die Ionen hinsichtlich des Masse/Ladungs-Quotienten ( $m/z$ ) auftrennt und schließlich einem Detektor, der ein Massenspektrum liefert, aus dem abgelesen werden kann, welche Ionen in welchen relativen Massen gebildet werden [Lottspeich, 1998]. Die Auflösung des Massenspektrums der positiv geladenen Ionen wird durch einen zusätzlichen Reflektor erhöht. Der Reflektor befindet sich am Ende des Flugrohrs und besteht aus mehreren Metallringen oder Gittern, an denen mehrstufige Reflektorpotentiale angelegt sind. Ionen gleicher  $m/z$ -

Verhältnisse mit unterschiedlichen Endgeschwindigkeiten, wie sie aus z.B. verschiedenen Anfangsgeschwindigkeiten und Ionisationsorten herrühren können, dringen unterschiedlich tief in das elektrische Bremsfeld des Reflektors ein. Geladene Teilchen mit hoher Anfangsenergie werden später reflektiert als Ionen mit niedriger Energie. Herkömmliche MALDI-Massenspektrometer arbeiten hauptsächlich mit einem Flugzeitmassenspektrometer, auch TOF-(time-of-flight)-Analysator genannt, bei denen die Massenbestimmung im Hochvakuum über eine sehr genaue elektronische Messung der Zeit erfolgt, die zwischen dem Start der Ionen in der Quelle bis zum Eintreffen am Detektor vergeht [Lottspeich, 1998].

Für die MALDI-MS-TOF-Analyse wird die Probe auf einen metallischen Probenhalter mit einer niedermolekularen Matrix kokristallisiert und in das Hochvakuum des Massenspektrometers überführt. In dem Vakuum ( $10^{-7}$  hPa) des Massenspektrometers ionisiert die polykristalline Schicht mit dem  $N_2$ -Laser (Pulsdauer 5 ns). Durch die Verdampfung der festen Phase werden die Probenmoleküle freigesetzt und beschleunigt. Mit Hilfe eines elektostatischen Feldes von einigen keV/mm werden je nach Polarität positive oder negative Probenmoleküle in Richtung des Analysators beschleunigt. Die Bestimmung der Molekularmasse erfolgt über eine genaue elektronische Messung der Zeit, die vom Start bis zum Erreichen des Detektors vergeht. Bei gleicher kinetischer Energie haben Ionen unterschiedlicher Masse verschiedene Flugzeiten. Der Detektor registriert das Auftreffen der Molekülionen am Ende des Flugrohrs. In erster Näherung ist die Flugzeit proportional zur Wurzel des m/z-Verhältnisses. Die Messgenauigkeit beträgt 0.01%. Mit Hilfe der MALDI-MS Technik konnte ein Molekül mit dem Molekulargewicht von 1046,54 Dalton nachgewiesen werden.

Das MALDI-time-of-flight/time-of-flight (TOF/TOF)-Verfahren ist ein neueres, massenspektrometrisches Verfahren, das sich ideal zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Einzelsubstanzen eignet. Das TOF/TOF-Instrument kombiniert die hohe Sensitivität hinsichtlich der Proteinanalyse des MALDI-Gerätes

mit der umfassenden Fragmentinformation, die aus der Dissoziation der Probenionen bei der Kollision gewonnen wird [Medzihradsky, 2000]. Der Vorteil gegenüber dem herkömmlichen MALDI-TOF-Gerät besteht darin, dass es innerhalb einer Messung ein komplettes Massenspektrum erzeugen kann. Das MALDI-TOF-Gerät hingegen muss die gewonnenen Fragmentspektren einzeln segmentieren und ist damit sehr zeitraubend. Der entscheidende Unterschied zwischen dem herkömmlichen MALDI-TOF-Gerät und dem MALDI-TOF/TOF-Gerät ist, dass letzteres einen hochauflösenden Reflektor verwendet, der eine bessere Darstellung der großen Energiebandbreite der Ionen ermöglicht.

#### **2.1.4 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mit der durch enzymatische Amplifizierung einer Zielsequenz, viele Kopien eines DNA-Moleküls erzeugt werden [Brown, 1993].

Bei der Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion wird zunächst durch das Enzym Reverse Transkriptase aus einer RNA-Matrize ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Ursprünglich verwenden Retroviren dieses Enzym, um bei der Replikation ihres RNA-Genoms ein DNA-RNA-Hybrid zu bilden [Stryer, 1996]. Die Reverse Transkriptase ist in der Lage, aus der mRNA eines Organismus eine komplementäre DNA (cDNA) herzustellen [Brown, 1993]. Voraussetzung ist, dass ein Primer zur Verfügung steht, der durch Basenpaarung mit der RNA verbunden ist und eine freie 3'-OH-Gruppe besitzt. Der neue synthetisierte cDNA-Einzelstrang kann anschließend mit Hilfe einer DNA-Polymerase in einen cDNA-Doppelstrang umgewandelt werden.

Anschließend wurde eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion wurde die ACE-, Renin und Angiotensinogen-cDNA vervielfältigt. Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Vervielfältigung

spezifischer DNA-Sequenzen [Stryer, 1996]. Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten:

1. Strangtrennung: Die beiden DNA-Stränge werden durch kurzfristiges Erhitzen der Lösung auf 95°C für 15 Sekunden voneinander getrennt.
2. Hybridisierung des Primers: Die Lösung wird auf 54°C abgekühlt, damit die Primer mit jeweils einem Strang hybridisieren können.
3. DNA-Synthese: Anschließend wird die Lösung auf 72°C erhitzt, um die optimale Temperatur für die Taq-DNA-Polymerase zu erreichen.

Die Reaktion wurde 30-40 Zyklen lang fortgesetzt. Dabei nimmt die DNA-Menge exponentiell zu. Somit kann man aus einer sehr geringen Menge Startmaterial eine große Menge identischen DNA-Materials gewinnen, die dann weiter untersucht werden kann.

Mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese werden die Amplifikate aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Elektrophorese ist die wichtigste Methode zur Analyse von Nucleinsäuren [Lottspeich, 1998]. Im Gegensatz zu Proteinen haben alle Nucleinsäuren innerhalb eines sehr großen pH-Bereiches stets eine negative Ladung. Ladungsträger sind dabei die negativ geladenen Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Gerüsts der Nucleinsäuren. Die Wanderung der Nucleinsäuren in Richtung Anode ist deshalb relativ unabhängig vom pH-Wert. Die Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit der Nucleinsäuren werden ausschließlich durch die unterschiedlichen Molekülgrößen verursacht. Die Wahl des Trägermaterials wird vor allem durch Art und Größe der zu analysierenden Nucleinsäure bestimmt. Agarose ist das wichtigste Trägermaterial für die Elektrophorese von Nucleinsäuren [Lottspeich, 1998]. In Agarosegelen lassen sich, je nach Konzentration der Agarose, die DNA-Fragmente über einen weiten Größenbereich auftrennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente ist in Agarosegel in der Regel proportional zur Spannung. Eine gute Auftrennung der DNA-Fragmente ergibt sich, wenn die angelegte Spannung von 5 V/cm nicht überschritten wird. Auch die hier verwendete Zugabe von interkalierenden Farbstoffen, wie Ethidiumbromid, verringert die Laufgeschwindigkeit eines Fragmentes um ca. 15 % [Lottspeich, 1998].

## 2.2 Spezieller Teil

Die folgende Abbildung zeigt eine Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendeten Arbeitsschritte zur Isolierung und Identifizierung des Angiotensin II aus mononukleären Leukozyten.

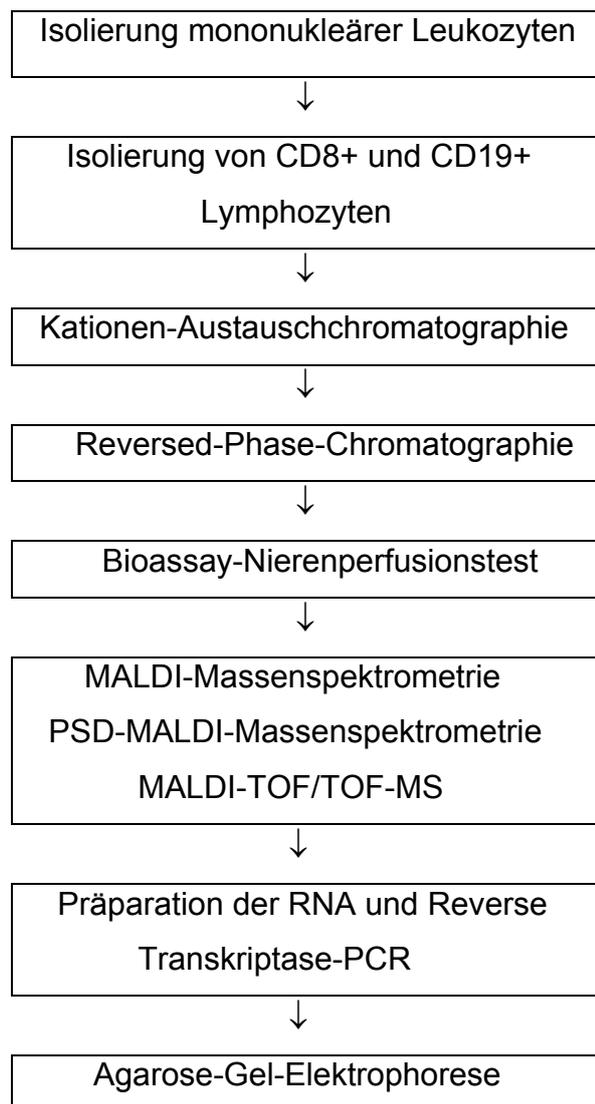


Abbildung 1: Arbeitsschritte zur Isolierung und Identifizierung von Angiotensin II aus mononukleären Leukozyten

### 2.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen

Mononukleäre Zellen wurden aus Vollblut gesunder Probanden isoliert. Hierzu wurde aus der Vena cubitalis 400 ml heparinisieretes Vollblut abgenommen. Pro 100 ml Vollblut wurden 0,2 ml Heparin, entsprechend 1.000 I.E Heparin zur Gerinnungshemmung verwendet. Die 400 ml Vollblut wurden 15 min bei Raumtemperatur (RT) und 240 g zentrifugiert (Zentrifuge 3K-1, Firma Sigma-Aldrich, Deutschland). Das überstehende Plasma wurde verworfen, der Rückstand wurde 1:1 mit 0,9%-igem NaCl-Lösung verdünnt.

In 15 ml-Zentrifugenröhrchen wurden 3 ml Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Deutschland; Dichte 1.077 g/ml) vorgelegt und mit 5 ml des verdünnten Blutes überschichtet. Anschließend wurde bei Raumtemperatur für 20 Minuten und 240 g zentrifugiert. Beim Zentrifugieren werden Erythrozyten und Granulozyten durch Polysaccharose aggregiert und rasch sedimentiert. Die mononukleären Zellen verbleiben als milchiger Ring in der Plasma-Histopaque-1077-Interphase. Die Erythrozytenkontamination ist vernachlässigbar.

Die milchige Interphase mit den mononukleären Zellen wurde mit einer Transferpipette abgesaugt, die verbleibenden Schichten verworfen. Die Interphase mit mononukleären Zellen wurde mit 10 ml wässriger 0,9% NaCl-Lösung versetzt, und bei Raumtemperatur für 5 Minuten und 400 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Die Zellen wurden in einer Lösung mit folgender Zusammensetzung bei einem pH-Wert von 7.4 resuspendiert: 136 mmol/l NaCl, 5,4 mmol/l KCl, 0,44 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,34 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ , 5,6 mmol/l D-Glucose, 10 mmol/l N-2-Hydroxyethylpiperatin-N`-2-Ethansulfonsäure.

Die gewonnenen Leukozyten wurden mit 10  $\mu\text{g}$  Lipopolysaccharid (LPS Serotyp 0111:B4 von E. coli; Sigma-Aldrich, Deutschland) versetzt, um eine Stimulation der Zellen zu bewirken. Die mononukleären Zellen wurden anschließend für 60 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde bei Raumtemperatur für 2 Minuten und 5.600g mit der Tischzentrifuge zentrifugiert.

## **2.2.2. Isolierung der CD8+ (T-Lymphozyten) und CD19+ ( B-Lymphozyten) Lymphozyten**

Die CD8+ (T-Lymphozyten) und CD19+ (B-Lymphozyten) Lymphozyten wurden anhand der Anleitung des Zellen-Isolierungs-Kits von Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland) isoliert. Zunächst wurden die CD 8+ Lymphozyten durch CD 8-Micro Beads und die CD 19+ Lymphozyten durch CD 19-Micro Beads magnetisch gekennzeichnet. Danach wurde die Zellsuspension auf eine Säule aufgetragen, die sich innerhalb eines magnetischen Feldes befand. Die magnetisch gekennzeichneten Zellen retenierten an der Säule, während die unmarkierten Zellen passierten. Im Anschluss wurde die Säule aus dem magnetischen Feld genommen, so dass die bis dahin magnetisch zurückgehaltenen Zellen eluierten und gesammelt werden konnten.

## **2.2.3 Kationenaustausch-Chromatographie**

Der Überstand mit den isolierten CD8+ und CD19+ Lymphozyten wurde nach Inkubation durch einen Kationenaustauscher auf einer High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Anlage (SMART System, Amersham Pharmacia, Schweden; Säule: HiTrap™ SP 1 ml, Amersham Pharmacia, Schweden) konzentriert und fraktioniert. Als Eluent A wurde eine 10 mmol  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung, in Wasser gelöst, verwendet (pH 3,5). Als Eluent B wurde eine 10 mmol  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung und 2 mol/l NaCl in Wasser verwendet. Die Chromatographie wurde auf dem SMART System der Firma Amersham Pharmacia, Schweden, durchgeführt. Als Säule diente eine HiTrap™ SP 1 ml der Firma Amersham Pharmacia. Die Injektionsschleife hatte ein Volumen von 1 ml. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Leitfähigkeit und Absorption bei 280 nm wurden gemessen. Es wurde der in Tabelle 2 aufgeführte Stufengradient verwendet. Das Eluat wurde aufgrund der Absorption bei 280 nm gesammelt. Es wurde eine Peak-Fraktionierung durchgeführt. Die Proben wurden bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Tabelle 2: Gradient der Kationenaustausch-Chromatographie (Säule: HiTrap™ SP 1 ml; Amersham Pharmacia, Schweden; Eluent A: 10 mmol  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Lösung in Wasser, pH 3,5; Eluent B:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung und 2 mol/l NaCl in Wasser, pH 3,5; Fluss: 1 ml/min; Fraktionsgröße 1 ml)

Zeit (Minuten)	% Lösungsmittel B
0-5	0 %
5-10	5 %
10-15	12 %
15-20	25 %
20-25	37 %
25-30	50 %
30-35	75 %

#### 2.2.4 Präparative Reversed-Phase-Chromatographie

Die vasokonstringierenden Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie wurden anschließend mit Hilfe der Reversed-Phase-Chromatographie fraktioniert. Für diesen Trennungsschritt wurde eine mit einer Kieselgelmatrix (C18-Seitenketten, Korngröße 40-63  $\mu\text{m}$ ) gepackte Reversed-Phase-Säule (Poros R2/H, Innendurchmesser 100 x 2.1 mm, Perseptive Biosystems, Deutschland) verwendet. Die Säule wurde mit 200 ml Acetonitril (ACN) (Lösung B) konditioniert und mit 200 ml einer wässrigen 40 mM Triethylammoniumacetat (Triethylamin-Acetatlösung) (TEAA)-Lösung (Lösung A) äquilibriert. Nach Auftauen einer Probe eines 400 ml Blutäquivalentes wurde so viel wässrige 1 M TEAA-Lösung als Ionenpaarreagenz hinzugegeben, bis eine Endkonzentration von 40 mM erreicht wurde. Der pH-Wert des Gemisches wurde mittels 1 M HCl-Lösung auf 6,5 eingestellt. Anschließend erfolgte die Auftragung der Probe auf die Säule. Die an der Säule retenierenden Substanzen wurden mit einer 80 %-igen Acetonitril-Lösung (Lösung B) eluiert. Die Flussrate der mobilen Phase betrug 0,5 ml/min. Das Eluat wurde aufgrund seines Absorptionsverhaltens bei 280 nm gesammelt.

Das Eluat wurde bei  $-30^{\circ}\text{C}$  eingefroren und lyophilisiert.

Folgender Gradient wurde gewählt:

Tabelle 3: Gradient der Reversed-Phase-Chromatographie (Säule: Poros R2/H, 100 x 2.1mm I.D., Perseptive Biosystems, Deutschland; Eluent A: 40 mmol/l TEAA; Eluent B: 80 % Acetonitril; Fluss 0.5 ml/min; Fraktionsgröße 1 ml)

---

Zeit (Minuten)	% Lösungsmittel B
0-10	0 %
10-15	25 %
15-20	50 %
20-25	75 %
25-35	100 %

---

### 2.2.5 Bioassay-Nierenperfusionstest

Die Vasoaktivität der von den CD8+ und CD19+ Lymphozyten sezernierten Substanzen wurde anhand eines Nierenperfusionstests an einer isolierten perfundierten Rattenniere nachgewiesen. Das genaue Prozedere der Nierenpräparation und der Nierenperfusionstests folgt der Anweisung von van der Giet et al. [van der Giet, 1997]. Hierbei wurden bei 4-6 Monate alten männlichen Ratten, durch einen abdominalen Medianschnitt, die Aorta und die linke Niere freipräpariert. Dabei wurden Ligaturen um die linke Nierenarterie und die infrarenale Aorta gesetzt. In der distalen Aorta wurde ein Polyethylenkatheter platziert. Umgehend nach der Anlage des Katheters wurde darüber eine Heparin-Natrium-Lösung injiziert. Nachfolgend wurde der Katheter vorsichtig in die linke Niere vorgeschoben, ohne dass es zu einer Unterbrechung des konstanten Flusses kam. Die Niere wurde entnommen und an das Perfusionssystem angeschlossen, über das die Niere mit konstanter Flussrate perfundiert werden konnte. Dieses System ermöglicht es, den Druck zu messen, der

benötigt wird, um eine Lösung durch das System zu pumpen. Die isolierte Rattenniere wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe in ausschließlich einer Richtung vorsichtig von einer Lösung durchspült. Die Lösung bestand aus 115 mmol/l NaCl, 4.6 mmol KCl, 1 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mmol/l MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 49 mmol/l Glucose und 35 g/l Gelatine (Haemaccel; Behringwerke, Deutschland). Anschließend wurde die Niere mit einem Gemisch aus 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> äquilibriert. Die Temperatur des Perfusionsmediums und der Niere wurden konstant auf 37° C gehalten. Die Flussrate betrug 8 ml/min. Der Perfusionsdruck wurde kontinuierlich von einem Transponder (Typ P23 ID, Gould, Oxnard, Californien, USA) aufgezeichnet und an einen Verstärker (Hugo Sachs, Deutschland) weitergeleitet und aufgezeichnet. Nachdem die Rattenniere zuvor 30 min äquilibriert worden war, wurde die vasokonstringierende Wirkung der lyophilisierten Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie an der isolierten Rattenniere bestimmt. 30 Minuten bevor die zu testenden Substanzen in die Niere gegeben wurden, wurde der Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonist Saralasin (10 µmol/l) durch die Niere perfundiert. Für die Testung des vasokonstringierenden Effekts der isolierten Substanzen mittels der isolierten perfundierten Niere wurde von jeder Fraktion ein Blutäquivalent von 40 ml Vollblut verwendet.

### **2.2.6 Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisation-Massenspektrometrie (MALDI-MS)**

Die lyophilisierten Fraktionen der Reversed-Phase-Chromatographie, die einen vasokonstringierenden Effekt auf die isolierte perfundierte Niere hatten, wurden durch MALDI-MS und MALDI post-source decay (PSD) Ionen-Fragment-Analyse analysiert. Hierzu wurden die lyophilisierten Fraktionen in 10 µl 0.1%-iger wässriger Trifluoressigsäure resuspendiert. 1 µl jeder Fraktion wurden auf einen metallenen MALDI Ankerteller (MTP AnchorChip<sup>TM</sup> 400/384, Bruker-Daltonics, Deutschland) aufgetragen. Anschließend wurde die UV-absorbierende Desorptionsmatrix Hydroxy- $\alpha$ -cyano-Zimtsäure (CHCA) hinzugefügt. Es wurde jeweils 2 µl Hydroxy- $\alpha$ -

cyano-Zimtsäure (1 g/l CHCA, 99% Azeton, 0.005% TFA) aufgetragen [Gobom et al., 2001]. Alle massenspektrometrischen Messungen wurden auf einem Bruker Ultraflex TOF/TOF Instrument durchgeführt (Bruker Daltonics, Deutschland).

Das Gerät ist mit einem Stickstofflaser ausgestattet, der Impulse bei 337 nm entsendet (Laser Science, USA, Wellenlänge 337 nm, Impulsdauer 4 ns, Energie  $10^6$ - $10^7$  W/cm<sup>2</sup>, Durchmesser des Bestrahlungsfeldes 50-100 µm). Durch den Impuls des Stickstoff-Laserstrahls erfolgt die Desorption der Probenionen. Im Durchschnitt sind die präsentierten Spektren die Summe aus 200 Einzel-Spektren, wenn der MS-Modus verwendet wird, bzw. die Summe aus 600 Spektren, wenn der MS/MS-Modus verwendet wird. Die Auflösung des Massenspektrums der positiv geladenen Ionen wurde durch einen zusätzlichen Reflektor erhöht. Die Kalibrierungskurve wurde unter Verwendung von bekannten Peptiden bestimmt. Der Peptid-Standard wurde parallel der zu messenden Probe aufgetragen. Daraus resultierte ein Messfehler kleiner 100 ppm der bestimmten Massen in den gewonnenen Massenspektren. Die Identifizierung der gemessenen Proteine gelang mit Hilfe der Software-Datenbank Mascot (Matrix Science, England).

### **2.2.7 Präparation der RNA und Reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion**

Primer- und Probensequenzen von menschlichem ACE, Renin und Angiotensinogen, sowie als Positivkontrolle des Gens  $\beta$ -Actin, wurden mit Hilfe des Computerprogramms Primer Express 2.0 (Perkin Elmer / Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) erstellt. Mit Ausnahme des Gens  $\beta$ -Actin waren alle Primer auf zwei verschiedenen Exons lokalisiert. Die Gesamt-RNA der CD8+ und der CD19+ Lymphozyten wurde mit Hilfe des Qiagen RNeasy-Mini-Kit gemäß dem Herstellerprotokoll extrahiert (Qiagen, Hilden, Deutschland). An der Ziel-RNA (1-2 µg) wurde eine Reverse Transkription unter Verwendung der 100 U Superscript II Reversen Transkriptase (Invitrogen, Deutschland) durchgeführt. Die Reverse Transkription wurde bei 42°C für 80 Minuten in der Gegenwart von 50 mmol/l Tris-

HCl (pH 8.3), 5,7 mmol/l KCl, 3 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol/l DTT, 0,5 mmol dNTPs, 8 U RNasin (Promega Corp., Madison, WI, USA) und 5 µmol/l Oligo(dT)<sub>16</sub> (Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Bei jeder Reaktionsreihe wurde an einer RNA-Probe keine Superscript II RT-Reverse Transkriptase angewandt.

Parallel wurden Kontroll-PCR-Reihen zur Qualitätssicherung durchgeführt. Es wurden spezifische Primer für menschliches β-Actin verwendet [Raff et. al., 1997], welche die Sequenz 5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3' und die Gegensequenz 5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3' aufweisen (Fragmentlänge: 630 bp). Die Reaktionen mit β-Actin wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt, das folgende Elemente beinhaltet: 5 µl der Reverse Transkriptase-Probe, 5 µl des Reverse Transkriptase-Puffers (Life Technology, Deutschland), 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mmol/l dNTPs, 0.1 µmol/l des jeweiligen Primers, DNase und RNase-freies Wasser und 2.5 U Taq polymerase (Life Technology, Deutschland). Das PCR-Temperatur-Profil befand sich über 26 Zyklen für 30 Sekunden auf 94°C, für 60 Sekunden auf 57°C und für 30 Sekunden auf 72 °C, gefolgt von einer zusätzlichen, 6 Minuten dauernden, Periode bei 72°C.

Tabelle 4: Primer von humanem ACE, Renin, Angiotensinogen (Aogen) und für β-Actin; alle cDNA Sequenzen entnommen aus der Gen-Datenbank genbank database

	Name	Sequenz (5'-3')	Länge (bp)
ACE	ACEhumfor	ATG GCA CTG GAA AAA ATT GC	500
	ACEhumrev	CAG CCC AGG ACC TCG CCG TT	
Renin	Renhumfor	GTG GGT GGA ATC ACG GTG	195
	Renhumrev	TGT TGT AGT AGA AAG AGA AGA CGT CC	
Aogen	Aoghumfor	CTG GTG CTA GTC GCT GCA AA	500
	Aoghumrev	AAC CTG TCA ATC TTC TCA GC	
human	βachumfor	CCT CGC CTT TGC CGA TCC	630
β-actin	βachumrev	GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TC	