

**Untersuchung der proteolytischen
Prozessierung von humanen
Angiotensin-Peptiden**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
eingereicht am
Department Chemie
Universität Hamburg

von
Diana Hildebrand
aus Bojnice

Hamburg, November 2012

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christian Betzel
Prof. Dr. Hartmut Schlüter

Tag der Disputation: 25. Januar 2013

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2009 bis November 2012 am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Institut für Klinische Chemie im Arbeitskreis Massenspektrometrische Proteomanalytik unter Anleitung von Prof. Dr. Hartmut Schlüter angefertigt. Die Arbeit wurde zudem von Prof. Dr. Dr. Christian Betzel vom Department Chemie der Universität Hamburg betreut.

1	Einleitung	9
1.1	Das Renin-Angiotensin-System.....	9
1.2	Biologische Wirkung der Angiotensin-Peptide	15
1.2.1	Angiotensin 1-8	15
1.2.2	Angiotensin 1-9	15
1.2.3	Angiotensin 1-7	16
1.2.4	Angiotensin 2-8	17
1.2.5	Angiotensin 3-8	17
1.3	Angiotensin-Rezeptoren.....	18
1.3.1	Der AT ₁ - und AT ₂ -Rezeptor	18
1.3.2	Der Mas-Rezeptor	20
1.3.3	Der AT ₄ -Rezeptor (IRAP)	20
1.4	Generierung von Angiotensin-Peptiden.....	21
1.5	Problemstellung	23
2	Material und Methoden.....	24
2.1	Entwicklung eines Massenspektrometrie-basierten Enzym-Assays zur Detektion Angiotensin-generierender Aktivität	24
2.2	Quantifizierung von Angiotensin-Peptiden mit LC-MS-SRM	25
2.2.1	Bestimmung der massenspektrometrischen Parameter zur SRM-basierten relativen Quantifizierung von Angiotensin-Peptiden	25
2.2.2	Bestimmung der Chromatographieparameter für die relative Quantifizierung von Angiotensin-Peptiden	28
2.3	Massenspektrometrische Identifizierung von Angiotensin-Peptiden.....	29
2.3.1	Identifizierung von Angiotensin-Peptiden über MALDI-TOF-MS.....	29
2.3.2	Identifizierung von Angiotensin-Peptiden mit LC-ESI-IT-MS	30
2.4	Gewinnung von Blutplasma.....	32
2.4.1	Gewinnung von humanem Blutplasma.....	32
2.4.2	Gewinnung von murinem Blutplasma.....	32

2.5 Immobilisierung von Proteinen.....	32
2.5.1 Immobilisierung von Proteinen aus humanem und murinem Plasma	33
2.6 Bestimmung von Enzymaktivitäten immobilisierter Proteine	33
2.6.1 Bestimmung der Enzymaktivitäten immobilisierter Proteine mit ESI-QQQ-SRM und MALDI-TOF-MS	33
2.7 Bestimmung von Enzymaktivitäten nicht immobilisierter Proteine.....	34
2.7.1 Bestimmung der Enzymaktivitäten nicht immobilisierter Proteine mit ESI- QQQ-SRM	34
2.8 Versuche zur Charakterisierung der Angiotensin-generierenden Proteasen	35
2.8.1 Inkubation immobilisierter Plasmaproteine mit unterschiedlichen Angiotensin-Substraten	35
2.8.2 Inkubation rekombinanter Aminopeptidase N mit unterschiedlichen Angiotensin-Substraten	35
2.8.3 Inkubation rekombinanter humaner Chymase mit A1-10.....	36
2.8.4 Inkubation immobilisierter Plasmaproteine mit A1-10 in Anwesenheit und Abwesenheit verschiedener Inhibitoren.....	36
2.9 Fraktionierung von humanem Blutplasma.....	36
2.9.1 Abreicherung von Plasmaproteinen aus Blutplasma	36
2.9.2 Fraktionierung einer Plasmapeptidfraktion durch Festphasen-extraktion ..	37
2.9.3 Fraktionierung einer Plasmapeptidfraktion über reversed phase- Chromatographie	37
2.10 Nachweis von Angiotensin-Peptiden in humanem Plasma	39
2.10.1 Bestimmung der Konzentration von Angiotensin-Peptiden in humanem Plasma durch einen Fluoreszenz-Immunoassay	39
2.10.2 Bestimmung der Fluoreszenzintensität.....	39
2.11 Versuche zur physiologischen Wirkung von Angiotensin-Peptiden	39
2.11.1 <i>In vitro</i> -Untersuchung der physiologischen Wirkung von Angiotensin- Peptiden auf murine BlutgefäÙe mittels Druck-Myographie.....	39
2.11.2 <i>In vivo</i> -Untersuchung der physiologischen Wirkung von Angiotensin- Peptiden in Mäusen	41

2.12 Material	49
2.12.1 Geräte	49
2.12.2 Chemikalien	50
2.12.3 Verbrauchsmaterialien	51
2.12.4 Biomaterialien.....	52
2.12.5 Software	53
3 Ergebnisse	54
3.1 Untersuchung der Angiotensin 1-10-metabolisierenden Aktivitäten in humanem Plasma	54
3.1.1 Massenspektrometrischer Nachweis der Angiotensin 1-10-metabolisierenden Aktivitäten in humanem Plasma	54
3.1.2 Untersuchung des Desorptions- und Ionisationsverhaltens von Angiotensin-Peptiden mittels MALDI-MS	61
3.1.3 Validierung der Angiotensin1-10-metabolisierenden Aktivitäten in humanem Plasma mit LC-ESI-IT-MS	62
3.1.4 Untersuchung des Einflusses der Immobilisierung humaner Plasmaproteine auf die Angiotensin-generierenden Aktivitäten in humanem Plasma.....	66
3.2 Untersuchungen der Generierung humaner Angiotensin-Peptide	69
3.2.1 Untersuchung der zeitabhängigen Generierung der Angiotensin-Peptide .	69
3.2.2 Nachweis der Angiotensin-metabolisierenden Aktivitäten von Angiotensin 2-10, Angiotensin 3-10, Angiotensin 4-10 und Angiotensin 5-10 in humanem Plasma.....	71
3.2.3 Untersuchungen der Angiotensin-generierenden Aktivität in humanem Plasma in An- und Abwesenheit von Protease-Inhibitoren	75
3.3 Untersuchung der Angiotensin-prozessierenden Aktivität der Aminopeptidase N	79
3.4 Nachweis von Angiotensin-Peptiden in humanem Plasma	85
3.4.1 Chromatographische Trennung von Angiotensin-Peptiden in humanem Plasma.....	85
3.4.2 Nachweis von Angiotensin-Peptiden in humanen Plasmapeptid-fraktionen mit Hilfe eines fluoreszenzbasierten Immuno-Assays	88

3.5 Nachweis physiologischer Effekte von Angiotensin-Peptiden	92
3.5.1 Untersuchung der physiologischen Effekte von Angiotensin-Peptiden auf die Blutdruckmodulation an isolierten Mauseaortenringen	92
3.5.2 In vivo-Untersuchung der physiologischen Effekte von Angiotensin- Peptiden auf die Blutdruckmodulation bei Mäusen.....	96
4 Diskussion	102
5 Literatur	124
6 Anhang	149
6.1 Ergänzende Abbildungen.....	149
6.2 Gefahrenstoffinformationen.....	151
6.3 Abkürzungsverzeichnis.....	152
7 Zusammenfassung	154
8 Summary	155
Curriculum Vitae.....	156
Publikationen.....	158
Selbstständigkeitserklärung	161
Danksagung.....	162

1 Einleitung

1.1 Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist eines der wichtigsten biologischen Hormonsysteme zur Regulation des Blutdrucks und des Wasserhaushalts im Menschen. Es ist an der Modulation des vaskulären Tonus^{1, 2} des sympathischen Nervensystems³ sowie des Natrium- und Kalium-Haushaltes^{4, 5} beteiligt, beeinflusst die Morphogenese des renalen Systems⁶ und wird mit inflammatorischen Vorgängen in Verbindung gebracht.^{7, 8} Es kann grundsätzlich zwischen dem systemischen RAS und verschiedenen lokalen RAS unterschieden werden.

Lokale RAS wurden beispielsweise in der Niere⁹ und dem Gehirn¹⁰ beschrieben. Die Besonderheit des lokalen RAS ist, dass die Komponenten dieses Systems nicht in der Zirkulation gebildet werden, sondern unabhängig vom zirkulären System gewebespezifisch entstehen. Dies ermöglicht eine gezielte parakrine oder autokrine Regulation physiologischer Prozesse, weshalb auch die Zusammensetzung der einzelnen RAS-Komponenten im Vergleich zum systemischen RAS stark abweichen kann. Über das lokale RAS wird beispielsweise in der Niere durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems Einfluss auf den Salzappetit und das Durstgefühl ausgeübt.¹¹ Es kann jedoch auch an der Regulation systemischer Prozesse beteiligt sein.

Die physiologischen Wirkungen des RAS werden über eine Serie von Enzym-Substrat-Interaktionen vermittelt, infolge derer eine Vielzahl biologisch aktiver Angiotensin-Peptide generiert werden, welche ihre Wirkung zielgenau über die Aktivierung von gewebsständigen Angiotensin-Rezeptoren ausüben.

Auf die Wirkungsweise und das Zusammenspiel einzelner RAS-Komponenten soll im Folgenden kurz am Beispiel der Blutdruckregulation eingegangen werden. Eine Veranschaulichung der folgenden Erläuterungen ist in Abbildung 1 dargestellt.

Fällt der renale Blutdruck unter einen Wert von ca. 90 mmHg erfolgt eine Aktivierung der sogenannten Baroflex-Rezeptoren in der Niere, woraufhin die Protease Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat in die Zirkulation freigesetzt wird (Harrison-Bernard¹²). Auch eine Verringerung der glomerulären Filtrationsrate infolge einer Abnahme des Plasmavolumens führt zur Freisetzung von Renin in die Zirkulation. Diesen Effekt

erzielen auch erniedrigte Konzentrationen an Natriumionen in der Niere (*Macula densa*)¹³ und die Aktivierung des sympathischen Nervensystems durch körperliche Aktivität oder Stress.¹⁴ Die Synthese und Sekretion des Renins wird außerdem durch direkte^{15, 16} als auch indirekte^{17, 18} Stimulation renaler Nerven angeregt.

Die Freisetzung von Renin bildet die Grundlage für eine proteolytische Renin-vermittelte Generierung des biologisch inaktiven Prohormons Angiotensin 1-10 (A1-10; meist als AI bezeichnet) aus dem Preprohormon Angiotensinogen, welches in der Leber gebildet und von dort aus ins Plasma sezerniert wird.¹² A1-10 kann wiederum proteolytisch durch das *Angiotensin converting enzyme-1* (ACE-1), welches hauptsächlich in der Lunge lokalisiert ist, zum biologisch aktiven Angiotensin 1-8 (A1-8, meist als AII bezeichnet) gespalten werden¹⁹.

In Abhängigkeit des Zell- und Gewebetyps kann A1-8 über Bindung des weitläufig exprimierten AT₁-Rezeptors verschiedene Aktivitäten auslösen. Zum einen bewirkt A1-8 durch Bindung des AT₁-Rezeptors²⁰, welcher u.a. an Blutgefäßen bzw. den glatten Gefäßmuskelzellen der Arteriolen²¹ vorkommt, eine Vasokonstriktion.

Zum anderen aktiviert A1-8 das sympathische Nervensystem durch Bindung von Rezeptoren im Hypothalamus, wodurch eine vermehrte Sekretion des Antidiuretischen Hormons (ADH) ausgelöst wird, welche mit einer Erweckung des Durstgefühls, des Salzappetits und der Freisetzung von Vasopressin einhergeht (Fitzsimons¹¹). In den Nieren bewirkt A1-8 über den AT₁-Rezeptor im proximalen Tubulus direkt die Retention von Natrium-Ionen. Die Sezernierung von Aldosteron über Interaktion von A1-8 mit den Nebennieren vermittelt ebenfalls eine verminderte Salz- und Wasserausscheidung. Zudem führt A1-8 auch zur Ausschüttung des Hormons Adrenalin, welches seinerseits das sympathische Nervensystem aktiviert (Fitzsimons¹¹).

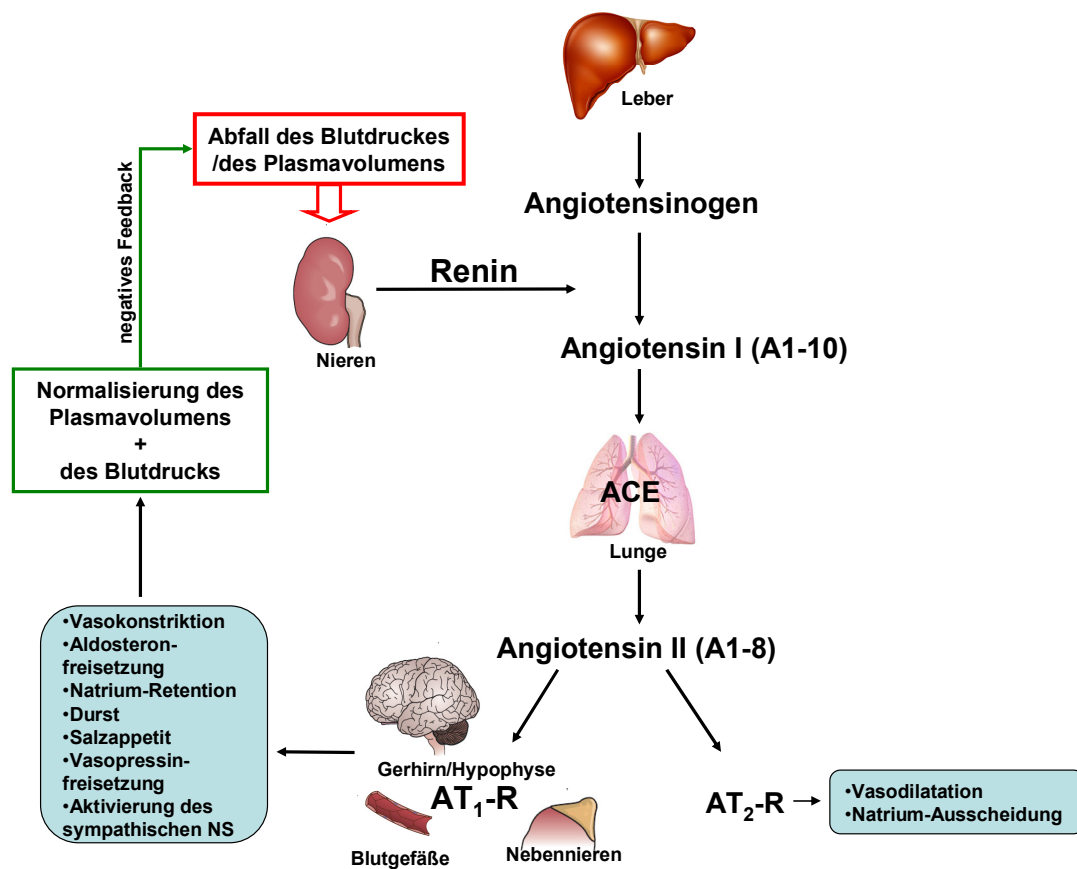


Abbildung 1. Regulation des systemischen Blutdrucks über das RAS. Bei Abfall des Blutdrucks erfolgt die Freisetzung von Renin aus der Niere in die Zirkulation. Renin spaltet das aus der Leber ins Plasma sezernierte Preprohormon Angiotensinogen in Angiotensin I (A1-10). A1-10 wird anschließend proteolytisch, hauptsächlich aber durch ACE-1, in Angiotensin II (A1-8) gespalten. Über Bindung an den AT₁-Rezeptor (AT₁-R), welcher u.a. im Gehirn, den Blutgefäßen und den Nebennieren vorkommt, vermittelt A1-8 gegenregulierende Prozesse (z. B. Vasokonstriktion) welche zu einer Normalisierung des Plasmavolumens bzw. des Blutdrucks führen. Infolgedessen wird durch negatives Feedback die Freisetzung von Renin aus der Niere wieder gedrosselt. Ebenso kann einem erhöhten Blutdruck/Plasmavolumen durch Bindung von A1-8 an den AT₂-Rezeptor (AT₂-R) entgegengewirkt werden (Vasodilatation). NS: Nervensystem. Abbildungen mit Änderungen übernommen.²²⁻²⁴

Die von A1-8 über den AT₁-Rezeptor ausgelösten physiologischen Veränderungen tragen letztlich dazu bei, das zirkulierende Plasmavolumen auf ein normales Maß zu adaptieren. Gleichzeitig wird durch die Vasokonstriktion der Gefäße eine Erhöhung des Blutdrucks erreicht, und somit dem verringerten Plasmavolumen gegengesteuert. Dies wird wiederum von den Baroflex-Rezeptoren der Niere registriert. In Form eines negativen Feedbacks wird nun die Reninfreisetzung aus der Niere und damit auch die Generierung von biologisch aktiven Angiotensin-Peptiden aus A1-10 gedrosselt.²⁵

Lange wurde angenommen, dass A1-8 das einzige biologisch aktive Angiotensin-Peptid ist, welches aus A1-10 entsteht und physiologische Wirkungen vermitteln kann. Das RAS beinhaltet neben A1-8 und Renin jedoch eine große Anzahl weiterer hormoneller und enzymatischer Komponenten, welche im Folgenden detailliert beschrieben werden. Eine Übersicht der im humanen RAS wirkenden Angiotensin-generierenden Proteasen und der Rezeptoren, über welche die proteolytisch generierten Angiotensin-Peptide ihre biologische Wirkung vermitteln, ist in Abbildung 2 dargestellt.

Ausgangspunkt des RAS ist, wie oben bereits erwähnt, das Protein Angiotensinogen, welches als Preprohormon fungiert und als solches durch proteolytische Spaltung entweder direkt in das biologisch aktive Peptidhormon A1-8, oder aber in den biologisch inaktiven Peptidhormonvorläufer Angiotensin 1-10 überführt werden kann. Als wichtigste A1-10-generierende Protease gilt Renin.²⁶ A1-10 selbst kann durch verschiedene Enzyme zu den Angiotensin-Peptiden A1-8, Angiotensin 1-9 (A1-9) und Angiotensin 1-7 (A1-7) abgebaut werden (Fyhrquist *et al.*²⁷), wobei die Generierung von A1-7 zusätzlich aus dem A1-9 und dem A1-8 erfolgen kann. Auf die proteolytische Generierung der Angiotensin-Peptide wird in Abschnitt 1.4 näher eingegangen. Bei A1-8 und A1-7 handelt es sich um biologisch aktive Peptidhormone, welche ihre Wirkung durch Bindung an unterschiedliche Rezeptoren vermitteln. A1-8 kann sowohl an den AT₁- als auch an den AT₂-Rezeptor binden. A1-7 vermittelt dagegen seine biologische Wirkung über den Mas-Rezeptor. Für die biologische Aktivität von A1-9 im Menschen gibt es bisher keine Belege.

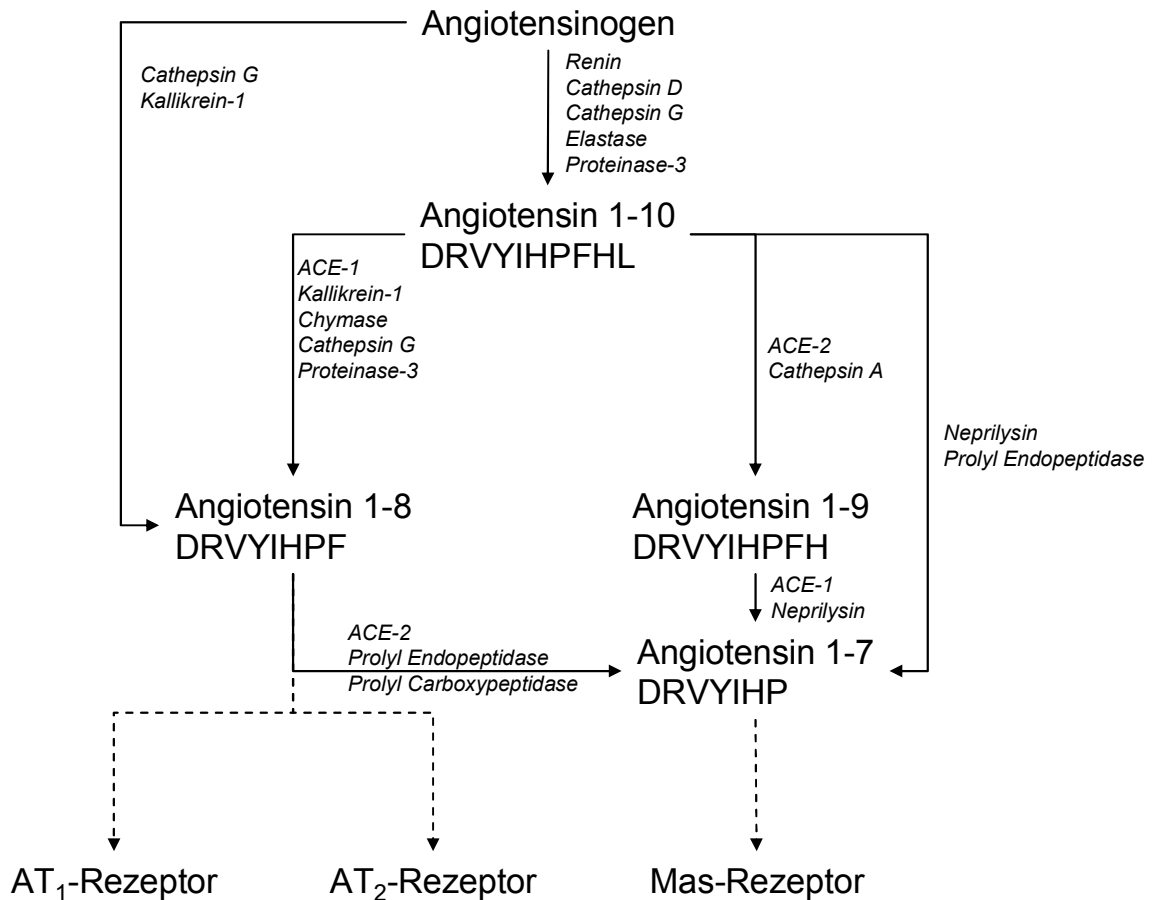


Abbildung 2. Übersicht der im humanen Renin-Angiotensin-Systems (RAS) wirkenden Angiotensin-generierenden Proteasen und Rezeptoren. Die Aktivierung des RAS wird durch die proteolytische Spaltung (Pfeile mit durchgezogener Linie) des Angiotensinogens in Angiotensin 1-10 (A1-10) sowie in das vasoaktive Angiotensin 1-8 (A1-8) vermittelt. A1-10 kann anschließend durch verschiedene Enzyme in die vasoaktiven Peptide A1-8 und Angiotensin 1-7 (A1-7), sowie Angiotensin 1-9 (A1-9) gespalten werden. Das A1-7 kann ebenfalls enzymatisch aus dem A1-9 generiert werden. Seine biologische Aktivität (Pfeile mit unterbrochener Linie) vermittelt A1-8 über die Bindung an den AT₁- bzw. AT₂-Rezeptor, während A1-7 an den Mas-Rezeptor bindet.

Die erstbeschriebene Komponente des RAS war die Aspartylprotease Renin, welche 1898 von Tigerstedt in Extrakten der Kaninchenniere entdeckte wurde und auch als Angiotensinogenase bezeichnet wird.²⁸ Später wurde sie auch im menschlichen Plasma und der Niere nachgewiesen.²⁹ Renin wird aus einem inaktiven Vorläuferprotein, dem aus 383 Aminosäuren bestehenden zirkulierenden Prorenin, gebildet.

Die proteolytische Spaltung des Prorenins in aktives Renin erfolgt *in vivo* hauptsächlich durch Kallikrein³⁰, aber auch durch andere Proteasen der Serin-Familie, wie z.B. der Elastase.³¹ Nach seiner Prozessierung in seine biologisch aktive Form besteht Renin aus 340 Aminosäuren. Im Menschen wird diese Protease

hauptsächlich von den granulären Nierenzellen des juxtaglomerulären Apparates produziert³². Des Weiteren sind mononukleare Zellen wie Mastzellen³³ zur Synthese von Renin fähig. Seine Lokalisation konnte in steroidogenen Zellen und Leydigzellen in den Hoden^{34, 35} aber auch in der Hypophyse³⁶ und im zentralen Nervensystem (ZNS)³⁷, den Nebennieren³⁸ und den Speicheldrüsen³⁹ der Maus sowie im Uterus des Kaninchens⁴⁰ nachgewiesen werden. Renin-mRNA wird u.a. in den Nieren und Nebennieren¹⁰, der Leber⁴¹ und der Plazenta⁴² exprimiert.

Lange wurde angenommen, dass es sich bei Renin nicht um eine Protease, sondern um ein vasoaktives Protein handelt, da nach intravenöser Injektion von Renin in Hunde ein starker vasokonstriktorischer Effekt messbar war. Diese Annahme konnte 1939 von Kohlstaedt *et al.*⁴³ widerlegt werden, nachdem er beobachtete, dass durch Zugabe reinen Renins zu einem isolierten perfundierten Hundeschwanz keine Vasokonstriktion ausgelöst wurde. Die erwartete Vasokonstriktion erfolgte jedoch nach Zugabe von Plasma. Aus diesen Experimenten leitete sich unter anderem die Entdeckung des Angiotensinogens als Renin-Substrat ab.⁴⁴

Angiotensinogen wurde als ein der Familie der Serpine angehörendes, glykosyliertes α -Globulin^{45, 46} charakterisiert. Es besteht direkt nach seiner Synthese aus 485 Aminosäuren, wobei die 33 N-terminal gelegenen Aminosäuren als Signalpeptid abgespalten werden, wodurch letztlich das reife, 452 Aminosäuren lange Angiotensinogen entsteht.⁴⁷ Das ca. 12 kbp umfassende Gen, welches Angiotensinogen codiert, befindet sich, wie auch das Gen des Renins, im Chromosom 1.⁴⁸ Seine mRNA wurde bisher unter anderem in der Leber^{49, 50}, den Nieren⁵¹, dem Gehirn⁵² sowie in der Plazenta⁴² nachgewiesen. Nach seiner Translation wird Angiotensinogen ins Plasma sezerniert.

In Ratten konnte gezeigt werden, dass der Angiotensinogen- als auch der Renin-mRNA-Spiegel durch die Konzentration an zirkulierendem A1-8 reguliert wird.⁴⁹ Dabei führt eine steigende A1-8-Konzentration zu einem Anstieg der Angiotensinogen-mRNA-Konzentration in der Leber, wohingegen die Konzentration an Renin-mRNA in der Niere abfällt. Die Depletion von Natrium hat ebenfalls eine vermehrte Angiotensinogen-mRNA Synthese zur Folge.³¹

1.2 Biologische Wirkung der Angiotensin-Peptide

1.2.1 Angiotensin 1-8

Hinsichtlich seiner biologischen Wirkung zählt A1-8 bisher zu den am besten charakterisierten Angiotensin-Peptiden.⁵³ Nach Bindung von A1-8 an den AT₁-Rezeptor kann eine Vasokonstriktion⁵⁴, Durstgefühl¹¹, Vasopressin- und Aldosteronfreisetzung⁵³, Zellwachstum⁵⁵ und Zellmigration⁵⁶ ausgelöst werden.

Über Bindung von A1-8 an den AT₂-Rezeptor werden viele der oben genannten Effekte antagonisiert.⁵⁷ So vermittelt A1-8 beispielsweise über den AT₂-Rezeptor Vasodilatation⁵⁸, Apoptose⁵⁹ und antiproliferative Effekte.

Des Weiteren wurde von Jones *et al.* berichtet, dass A1-8 die Lipogenese in humanen adipösen Zellen erhöht.⁶⁰ A1-8 vermittelt durch Stimulation des Norepinephrin-Transporters und der Tyrosin-Hydroxylase auch neuromodulatorische Wirkungen.⁶¹

1.2.2 Angiotensin 1-9

Lange wurde angenommen, dass A1-9 keine autonome biologische Wirkung vermitteln kann. Kürzlich wurde jedoch von Kramkowski *et al.* beschrieben, dass A1-9 in Ratten prothrombisch wirkt.⁶² Nach Injektion von A1-9 in Ratten wurden erhöhte Plasma-Fibrinogen-Level als auch eine erhöhte kollageninduzierte Plättchenaggregation beobachtet. Beide Effekte konnten durch den AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan unterbunden werden, weshalb davon auszugehen ist, dass die durch A1-9 vermittelten Effekte durch Bindung an den AT₁-Rezeptor ausgelöst werden. Es jedoch ist bislang unklar, ob diese Effekte tatsächlich durch A1-9 selbst hervorgerufen werden, oder aber durch Spaltprodukte nach dessen enzymatischer Prozessierung. Denkbar wäre die proteolytische Prozessierung von A1-9 in A1-8. Dieser Weg der Prozessierung von A1-9 wurde bisher zwar nicht im Menschen, jedoch in der Ratte⁶³ beschrieben. Zudem ist bekannt, dass auch A1-8 die von Kramkowski *et al.* beschriebenen Effekte zu erzielen vermag.

Aufgrund der Ergebnisse von Ocaranza *et al.* wird vermutet, dass es sich bei A1-9 um einen Faktor handelt, welcher einer kardialen Hypertrophie entgegenwirkt, da eine kontinuierliche Infusion von A1-9 in Ratten nach einem Myokardinfarkt sowohl zu einem erniedrigten A1-8-Plasmalevel, als auch zu einer erniedrigten ACE-Aktivität führte und präventiv gegen kardiäre Myozytenhypertrophie wirkte.⁶⁴

Flores-Munoz *et al.* beschrieben, dass eine dauerhafte Infusion von A1-9 in spontan hypertensive Ratten über eine Modulation der Kollagen I-Expression zu einer Reduktion der kardialen Fibrose führt. Zudem inhibiert A1-9 die Fibroblastenproliferation *in vitro*, wobei diese Inhibition durch Zugabe eines AT₂-Rezeptorantagonisten moduliert werden kann.⁶⁵ Durch Druck-Myographie an Rattenaorten wurde gezeigt, dass A1-9 die durch Phenylephrin vermittelte Vasokonstriktion verstärkte. Dieser Effekt wurde in Gegenwart eines AT₂-Rezeptorantagonisten eliminiert. Des Weiteren zeigten Jackman *et al.*, dass A1-9 durch Stimulation der Arachidonsäure- und Stickstoffmonoxid (*Nitrogen monoxide*; NO)-Freisetzung die über den Bradykininrezeptor B₂-vermittelte Vasodilatation nach Bindung von ACE-resistentem Bradykinin in humanen pulmonalen Endothelzellen potenziert.⁶⁶

1.2.3 Angiotensin 1-7

A1-7 ist vor allem dafür bekannt, als Gegenspieler von A1-8 zu agieren. Die Vermittlung der biologischen Wirkung von A1-7 findet dabei durch Bindung an den Mas-Rezeptor statt.⁶⁷ Von Roks *et al.* wurde gezeigt, dass A1-7 die vasokonstriktorische Wirkung von A1-8 in Menschen aufzuheben vermag.⁶⁸ Eine A1-7-abhängige Vasodilatation konnte sowohl im Menschen^{69, 70} als auch in anderen Spezies wie z.B. in den Koronararterien von Schweinen⁷¹, Kaninchen⁷² und Ratten⁷³ und den mesenterischen Arterien von Katzen⁷⁴ beobachtet werden.

A1-7 bewirkt außerdem eine Inhibition des Zellwachstums²¹, insbesondere des Wachstums glatter Gefäßmuskelzellen. Dies ist wahrscheinlich durch die Mas-Rezeptor-abhängige Inhibition der Transaktivierung des EGF-Rezeptors bedingt.⁷⁵ In humanen Astrozyten⁷⁶, murinen Gliomazellen⁷⁷ und der *vasa afferentia* von Kaninchen⁷⁸ vermag A1-7 die Prostaglandinsynthese zu stimulieren, wobei die Potenz der Stimulation mit der von A1-8 vergleichbar ist.

1.2.4 Angiotensin 2-8

In Bezug auf seine biologische Wirkung ist A2-8 dem A1-8 sehr ähnlich. Kono *et al.* berichteten, dass A2-8 im Vergleich zu A1-8 im Menschen eine gleichwertige Stimulation der Aldosteronfreisetzung bewirkt, jedoch nur 20 % der vasokonstriktorisches Aktivität besitzt.⁷⁹ Eine konzentrationsabhängige Vasokonstriktion durch A2-8 konnte ebenfalls in der endothelfreien humanen Saphenusvene beobachtet werden.⁸⁰ A2-8 wirkt demnach blutdruckregulierend und vermittelt, wie auch A1-8, eine erhöhte Vasopressinfreisetzung. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass A2-8 im Gehirn als Haupteffektor der Vasopressinfreisetzung fungiert.^{81, 82}

Auch die proinflammatorischen und chemotaktischen Eigenschaften von A1-8 wurden für A2-8 nachgewiesen⁸³, wobei die proinflammatorischen Eigenschaften u.a. durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B induziert werden.^{84, 85}

In Nebennieren von Ratten stimuliert A2-8 über den AT₂-Rezeptor die Aldosteronfreisetzung.⁸⁶ Des Weiteren stimuliert A2-8 nach Bindung an den AT₁-Rezeptor in kultivierten murinen Astrozyten die Phosphorylierung der ERK1/2-MAP-Kinase und die Zellproliferation.⁸⁷ In humanen Prostatakrebszellen konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass A2-8 über den AT₁-Rezeptor zu einer erhöhten Zellproliferation führt.⁸⁸ Untersuchungen am *nucleus tractus solitarii* in Ratten zeigten, dass A2-8 die Barorezeptorreflexe dosisabhängig über den AT₁- als auch den AT₂-Rezeptor supprimieren kann.⁸⁹

1.2.5 Angiotensin 3-8

In Studien konnte gezeigt werden, dass A3-8 eine wichtige Funktion bei kognitiven Prozessen ausübt (Gard *et al.*⁹⁰). Nach intrazerebroventrikulärer Injektion von Norleucin1-A3-8 kam es bei Ratten und Mäusen zu einer Verbesserung von Gedächtnis- und Lernfunktionen.^{91, 92} Es gibt Hinweise darauf, dass diese beobachteten kognitiven Effekte die Folge einer über die Interaktion von A3-8 mit dem AT₄-Rezeptor vermittelten Änderung der Oxytocinregulierung sind.^{90, 93} A3-8 bindet nachweislich an den AT₄-Rezeptor, welcher auch als Insulin-regulierte Amino-peptidase (IRAP) bekannt ist.⁹⁴ Es wurde auch von einer Interaktion von A3-8

mit dem Oxytocin-Rezeptor berichtet, wodurch die Ausschüttung von Oxytocin in der Amygdala vermittelt wurde.⁹⁵

Des Weiteren fungiert A3-8 als Agonist für den AT₁-Rezeptor. In Mäusen reguliert A3-8 nach Bindung an den AT_{1B}-Rezeptor den Blutdruck und ist fähig eine Vasokonstriktion auszulösen⁹⁶. Auch in Ratten konnten ähnliche Effekte beobachtet werden. So lösten intrazerebroventrikuläre Injektionen von A3-8 in Ratten eine über den AT₁-Rezeptor vermittelte Vasokonstriktion aus, wobei der Grad der Vasokonstriktion im Vergleich zu A1-8 oder A2-8 geringer ausfiel.⁹⁷ Dies konnte ebenso von Li *et al.*⁹⁸ an Rattenaorten, als auch von van Esch *et al.*⁹⁹ durch Untersuchungen von A3-8 im vaskulären Bett muriner Kononararterien bestätigt werden. Rezeptorbindungsstudien von Le *et al.* zeigten jedoch, dass die Bindungsaffinität von A3-8 zum AT₁-Rezeptor normalerweise gering ausgeprägt ist.¹⁰⁰

1.3 Angiotensin-Rezeptoren

1.3.1 Der AT₁- und AT₂-Rezeptor

Bisher konnten zwei A1-8-bindende Rezeptoren anhand des Vergleiches ihrer Affinität zu den Rezeptorantagonisten Losartan, CGP421112 und PD 123319 charakterisiert werden¹⁰¹. Diese sich stark in ihrer Bindungscharakteristik unterscheidenden Rezeptortypen wurden als AT₁- und AT₂-Rezeptor bezeichnet.

Der humane AT₁-Rezeptor wurde 1992 zum ersten Mal kloniert.¹⁰² Er besteht aus 359 Aminosäuren und hat eine hohe Affinität zu nicht-peptidischen Antagonisten aus der Gruppe der Sartane wie z. B. Losartan, jedoch eine schwache Affinität für den peptidischen Antagonisten CGP421112 und den nicht peptidischen Antagonisten PD 123319.¹⁰³ Der AT₂-Rezeptor hingegen hat eine hohe Affinität für CGP421112 und PD 123319, jedoch eine niedrige Affinität gegenüber Losartan. Die cDNA des humanen AT₂-Rezeptors wurde erstmals 1994 aus Plazentagewebe isoliert und codiert für insgesamt 363 Aminosäuren.¹⁰⁴ Die Bindungsaffinität des AT₂-Rezeptors wird durch Sulfhydrylgruppen tragende und reduzierend wirkende Agenzien wie Dithiothreitol erhöht. Die Bindungsaffinität des AT₁-Rezeptors nimmt hingegen in Anwesenheit solcher Agenzien ab¹⁰⁵.

Die Expression beider Rezeptoren findet in unterschiedlichen Geweben statt. Der AT₁-Rezeptor wird hauptsächlich in der Leber und der Aorta exprimiert.^{106, 107}

Weiterhin wurde seine starke Expression in den die tubulointerstitiellen Regionen umgebenden Arterien der Niere und in Glomeruli nachgewiesen.

Der AT₂-Rezeptor wird vorwiegend in fetalem Gewebe^{106, 108} exprimiert. Seine Expression nimmt während der Entwicklung zu adultem Gewebe stark ab. Außerdem findet seine Expression im Menschen in den interlobularen Arterien sowie den Glomeruli der Niere^{106, 108}, der Lunge¹⁰⁹ und im Uterus¹⁰⁴ statt. Bei der Ratte wurde sie auch in den Nebennieren¹¹⁰, im Gehirn¹¹¹, den Ovarien^{112, 113} nachgewiesen. Die AT₂-Rezeptorexpression kann durch Diabetes¹¹⁴ und kardiovaskuläre Erkrankungen wie Hypertonie¹¹⁵ oder Herzfehler¹¹⁶ beeinflusst werden.

Über den AT₁-Rezeptor kann nach Bindung von A1-8 eine Vielzahl unterschiedlicher biologischer Wirkungen hervorgerufen werden. Zu den wichtigsten gehört die Vermittlung der Vasokonstriktion glatter Gefäßmuskelzellen.²⁰ Außerdem nimmt der AT₁-Rezeptor nach seiner Aktivierung unter anderem Einfluss auf die Hypertrophie¹¹⁷ die kardiale Kontraktivität¹¹⁸, die Zellproliferation und Fibronektinsynthese⁵⁵, die glomeruläre Filtrationsrate, den renalen Blutfluss, die Natriumfreisetzung¹¹⁹ als auch auf die Aldosteron-¹²⁰ und Vasopressinfreisetzung.¹²¹

Der AT₂-Rezeptor, ebenfalls ein 7-transmembranärer G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPGR)¹²², ist weit weniger gut untersucht als der AT₁-Rezeptor. Er weist lediglich eine strukturelle Homologie von ca. 32% zum AT₁-Rezeptor auf.¹²³

Die Stimulation des AT₂-Rezeptors inhibiert die Zellproliferation^{124, 125} und das Zellwachstum, fördert die Apoptose¹²⁶ und vermittelt anti-inflammatorische Prozesse.^{127, 128} Demzufolge antagonisiert der AT₂-Rezeptor viele der durch den AT₁-Rezeptor vermittelten Wirkungen. Über die Bindung von A1-8 an den AT₂-Rezeptor kann die Aktivierung des Kinin-Systems initialisiert werden¹²⁹, was in einer durch Stickstoffmonoxid- (NO)^{130, 131} und cGMP-vermittelten Vasodilatation resultiert. In Neuronen kann der AT₂-Rezeptor über einen G_i-gekoppelten Signalweg eine Calciumfreisetzung über die Aktivierung der Serin/Threonin-Phosphatase stimulieren, was anschließend zu einer Hyperpolarisation führt.¹³² Darüber hinaus wurde berichtet, dass über das G_i-Protein eine Inaktivierung des MAPK-Signalweges ausgelöst werden kann, infolge derer apoptotische Prozesse aktiviert werden.¹³³

AbdAlla *et al.* konnten durch Untersuchungen an humanen fetalen Fibroblasten zeigen, dass dies auf eine Rezeptordimerisierung zwischen AT₁- und AT₂-Rezeptor zurückzuführen ist, welche eine Inhibition der AT₁-Rezeptor-stimulierten Inositolphosphat-Generierung zur Folge hat.¹³⁴

1.3.2 Der Mas-Rezeptor

Der Mas-Rezeptor wurde 1986 von Young *et al.* entdeckt. Er wird vom Mas-Protoonkogen codiert und besteht aus 324 Aminosäuren, die insgesamt 7 Transmembrandomänen ausbilden.¹³⁵ Später wurde von Jackson *et al.* gezeigt, dass es sich bei dem Rezeptor um einen Angiotensin-Rezeptor handelt¹³⁶ der A1-7 bindet⁶⁷ und anschließend eine Vasodilatation vermittelt. Des Weiteren vermittelt der Mas-Rezeptor antifibrotische und -thrombotische Effekte^{137, 138} und vermindert das Wachstum von vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten.

Der Mas-Rezeptor gehört, wie auch der AT₁- und der AT₂-Rezeptor, ebenfalls zu den GPCRs. Die Signaltransduktionskaskaden, die an den vom Mas-Rezeptor vermittelten biologischen Wirkungen beteiligt sind, wurden im Detail bisher nur unzureichend untersucht. Die Inaktivierung des Mas-Rezeptors nach Bindung von A1-7 erfolgt durch dessen Internalisierung.¹³⁹

1.3.3 Der AT₄-Rezeptor (IRAP)

IRAP ist eine membranständige Zink-abhängige Protease mit zwei Zn²⁺-Bindungsstellen, wobei sich lediglich eine davon im katalytischen Zentrum befindet.¹⁴⁰ Im Jahre 2001 wurde von Albiston *et al.* entdeckt, dass es sich bei dieser Protease um den A3-8-Rezeptor handelt.¹⁴¹ Ein Großteil der Studien zur Bindungsaffinität von A3-8 an den AT₄-Rezeptor, in denen nachgewiesen wurde, dass A3-8 mit hoher Affinität an den AT₄-Rezeptor bindet, fanden in Gegenwart von Chelatoren statt.¹⁴² Demaegdt *et al.* zeigten jedoch, dass die Bindungsaffinität von A3-8 stark herabgesetzt ist, wenn sich der Rezeptor im nativen Zustand bzw. in Abwesenheit von Chelatoren befindet.¹⁴³ Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass der AT₄-Rezeptor physiologisch keine bedeutende Rolle bei der Bindung von A3-8 spielt. Die Signaltransduktionswege, welche nach Bindung von A3-8 an der Vermittlung seiner biologischen Wirkung beteiligt sind, sind momentan noch Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Der AT₄-Rezeptor ist für den Abbau von Oxytocin verantwortlich und vermag so den Oxytocinspiegel zu regulieren (Gard *et al.*⁹⁰). Dieser Rezeptor ist vor allem im Gehirn¹⁴⁴, jedoch auch in der Nebenniere, der Niere, dem Thymus, der Blase und der Aorta lokalisiert.

1.4 Generierung von Angiotensin-Peptiden

Im Jahre 1940 gelang es erstmals Braun-Menéndez *et al.* A1-10 aus dem Blut von Hunden zu isolieren.¹⁴⁵ Das biologisch inaktive Dekapeptid A1-10 gilt als Vorläufer mehrerer biologisch aktiver Angiotensin-Peptide. Die Spaltung des reifen Angiotensinogens zu A1-10 durch Renin erfolgt N-terminal zwischen den Aminosäuren Lys10 und Val11.¹⁴⁶

Neben Renin sind weitere Proteasen bekannt (Abbildung 2), welche Angiotensinogen zu A1-10 prozessieren können, jedoch für das zirkuläre RAS eine untergeordnete Rolle spielen. Hierzu gehören Proteasen wie Cathepsin D¹⁴⁷, Cathepsin G^{148, 149} Proteinase-3¹⁵⁰ oder die neutrophile Elastase¹⁵¹, welche hauptsächlich im Gehirn vorkommen¹⁵² und dem lokalen Gehirn-RAS zugeordnet werden.

A1-10 kann weiterhin direkt proteolytisch zu A1-9¹⁵³, A1-8¹⁵⁴, und A1-7¹⁵⁵ umgesetzt werden. Die direkte Generierung von A1-9 aus A1-10 wird durch das ACE-2¹⁵³ sowie Cathepsin A¹⁵⁶, auch lysosomales protektives Protein genannt, katalysiert. Dabei erfolgt der proteolytische Schnitt am A1-10 zwischen dem Phe9 und dem His10.

Des Weiteren kann A1-9 als Substrat von Nephilysin¹⁵⁷ oder dem ACE-1¹⁵⁸ für die Generierung von A1-7 genutzt werden.

Das Oktapeptid A1-8 entsteht durch Abspaltung der beiden C-terminalen Aminosäuren His9-Leu10 von A1-10. Die Generierung von A1-8 aus A1-10 kann von einer Vielzahl an Proteasen katalysiert werden. Hierzu zählt das ACE-1¹⁹, welches neben Cathepsin G^{149, 159} die Hauptrolle für die Generierung des A1-8 im Menschen spielt. Weiterhin sind die Proteasen Kallikrein-1¹⁶⁰, Chymase^{112, 161}, Proteinase-3 sowie die murinen Enzyme Elastase-2¹⁶² und Tonin¹⁶³, zur A1-8-Generierung fähig. Für Tonin konnte gezeigt werden, dass es A1-8 auch direkt aus Angiotensinogen spalten kann.¹⁶⁴

Eine direkte Generierung von A1-7 aus A1-10 wurde im Menschen bisher nicht nachgewiesen. Es ist jedoch bekannt, dass die Prolyl Endopeptidase (PEP) des Hundes¹⁶⁵ und des Schweines¹⁶⁶ A1-7 direkt aus A1-10 durch Abspaltung der Aminosäuren Ile8-His9-Leu10 generieren kann. Die Generierung von A1-7 aus A1-8 kann durch ACE-2¹⁶⁷ und PEP¹⁶⁵ sowie durch die vorwiegend im humanen Lungengewebe vorkommende Prolyl Carboxypeptidase (PCP)¹⁶⁸ stattfinden. Dabei kommt es lediglich zur Abspaltung des C-terminalen Phe8. Die PCP besitzt außerdem

die Fähigkeit, A1-8 durch weitere Degradation zu inaktivieren¹⁶⁹, weshalb sie auch als Angiotensinase C bezeichnet wird.

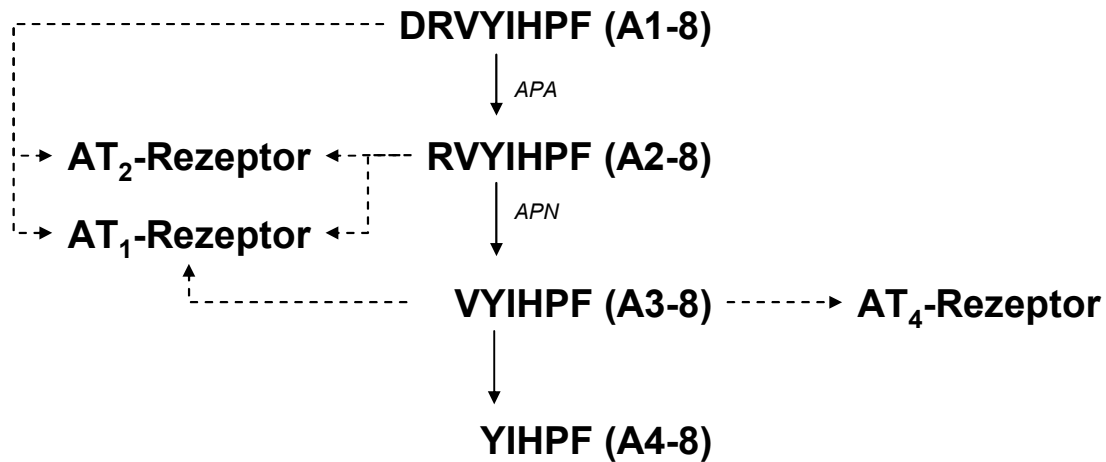


Abbildung 3. Alternative Abbauwege von Angiotensin 1-8. Angiotensin 1-8 kann gewebespezifisch proteolytisch durch die Aminopeptidase A zu Angiotensin 2-8 umgesetzt werden. Sowohl A1-8 als auch A2-8 vermitteln ihre biologische Wirkung nach Bindung an den AT₁- bzw. AT₂-Rezeptor. Aus dem Angiotensin 2-8 kann durch die Aminopeptidase N anschließend das Angiotensin 3-8 generiert werden, welches an den AT₁-Rezeptor als auch den AT₄-Rezeptor binden kann. APA: Aminopeptidase A, APN: Aminopeptidase N.

Neben der proteolytischen Prozessierung von A1-8 zu A1-7 sind alternative Wege der A1-8-Prozessierung beschrieben worden. Diese sind in Abbildung 3 dargestellt. Semple und Nussberger *et al.* wiesen die A1-8-Metaboliten Angiotensin 2-8 (A2-8, meist als Angiotensin III bezeichnet), Angiotensin 3-8 (A3-8, meist als AIV bezeichnet) und Angiotensin 4-8 (A4-8) in humanem Blut nach.^{170, 171} Die genauen Mechanismen der Generierung dieser Peptide sowie ihre Interaktion mit Angiotensin-Rezeptoren wurden im Menschen bisher nur teilweise beschrieben. Speziell über die Generierung von A4-8 ist nichts bekannt. A2-8 entsteht durch Abspaltung des N-terminalen Asp1 von A1-8 durch die Aminopeptidase A^{88, 172} und vermittelt seine biologische Wirkung sowohl über den AT₁- und den AT₂-Rezeptor. A3-8 wird durch Abspaltung des N-terminalen Arg1 vom A2-8 durch die Aminopeptidase N (APN)¹⁷³, sowie durch die Aminopeptidase O generiert.¹⁷⁴ Eine direkten Konvertierung von A1-8 in A3-8 wurde bisher nicht beschrieben. A3-8 vermag sowohl an den AT₁-Rezeptor¹⁰⁰ als auch an den AT₄-Rezeptor¹⁴¹ zu binden.

A2-8 und A3-8 entstehen hauptsächlich gewebsspezifisch. Ihre Generierung wurde unter anderem im Gehirn¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ in glatten Gefäßmuskelzellen¹⁷⁷, in den Nieren¹⁷⁸, in Nebennieren¹⁷⁹ und in den Ovarien¹⁸⁰ beschrieben.

Da die Angiotensin-Peptide A2-8 und A3-8 aus A1-8 hervorgehen, verlangt die Generierung dieser Peptide aus A1-10 eine initiale Spaltung durch Carboxypeptidasen zu A1-8, bevor A1-8 anschließend durch Aminopeptidasen zu A2-8 und A3-8 gespalten werden kann. Im Menschen sind bisher keine Angiotensin-Peptide bekannt, welche durch ausschließliche N-terminale Prozessierung von A1-10 durch Aminopeptidaseaktivität generiert werden. Von der Generierung solcher Angiotensin-Peptiden wurde jedoch in anderen Säugetieren berichtet.

Chapell *et al.* wies über einen Radioimmunoassay die Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10 und A4-10 im Gehirn von Ratten nach.¹⁸¹ Neves *et al.* zeigten, dass A1-10 durch Inkubation mit Herzgewebe der Ratte in die Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10 gespalten wird.¹⁸² Weiterhin wurde von der Generierung des Angiotensin-Peptides A5-10 aus A1-10 in murinen vaskulären Extrakten berichtet.¹⁸³ Es wurde ebenfalls festgestellt, dass die Generierung von A5-10 durch Anwesenheit des Serinprotease-Inhibitors Chymostatin nahezu vollständig inhibiert werden kann.

1.5 Problemstellung

Bisher wird davon ausgegangen, dass A1-10 im Menschen lediglich in Angiotensin-Peptide prozessiert wird, welche durch Mitwirkung von Carboxypeptidasen entstehen. In anderen Spezies wurde jedoch von der Generierung von Angiotensin-Peptiden wie z.B. A3-10, A4-10 und A5-10 berichtet^{182, 183}, welche durch Aminopeptidaseaktivität aus A1-10 generiert werden können.

Ziel dieser Arbeit war daher zu prüfen, ob A1-10 durch humane Plasmaproteasen in Angiotensin-Peptide prozessiert werden kann, welche ausschließlich durch Aminopeptidaseaktivität hervorgehen. Des Weiteren sollten die Peptide hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung untersucht und ihre Generierung näher charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Entwicklung eines Massenspektrometrie-basierten Enzym-Assays zur Detektion Angiotensin-generierender Aktivität

Zum Nachweis der Angiotensin-generierenden Proteaseaktivitäten wurde ein Massenspektrometrie-basierter Enzym-Assay (*Mass spectrometry assisted enzyme screening system*, MES)¹⁸⁴ etabliert. Er beinhaltet die Immobilisierung von Proteinen an aktivierte Chromatographiepartikel, die Inkubation der immobilisierten Proteine mit einem definierten Peptidsubstrat (A1-10, A3-10, A4-10 oder A5-10) sowie die anschließende massenspektrometrische Analyse der zu definierten Zeitpunkten abgenommenen Aliquots. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte dabei entweder durch Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (*Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry*; MALDI-TOF-MS) oder durch *selected-reaction-monitoring* (SRM) an einem Elektrospray-Ionisations-Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (ESI-QQQ-MS) mit vorgeschalteter Flüssigkeitschromatographie (*Liquid chromatography*; LC).

Mithilfe der MALDI-TOF-Analyse lässt sich die Gesamtheit der während der Inkubation entstandenen Reaktionsprodukte analysieren, die SRM-Methode dient dagegen der relativen Quantifizierung der Reaktionsprodukte. Im Verlauf dieser Messung wird ein Elternion im Massenspektrometer isoliert, fragmentiert und die Signalintensität eines definierten Fragmentions gemessen. Das Paar des Elternions und seines zugehörigen Fragmentions wird auch als SRM-Übergang bezeichnet. Durch eine Anreicherung des Elternions im Quadrupol des Massenspektrometers wird eine hohe Sensitivität und Selektivität gewährleistet.

Die Signalintensitäten richten sich nach der Anzahl der Moleküle, die den Detektor erreichen. Die in Abhängigkeit der Zeit erfassten Messpunkte der Signalintensitäten werden zu einem Chromatogramm extrapoliert. Die relative Quantifizierung der Angiotensin-Peptide erfolgt durch die Integration der Flächen der im Chromatogramm dargestellten Signale.

Für den Nachweis der enzymatischen Angiotensin-metabolisierenden Aktivität in humanem Plasma wurde ein MES-Assay entwickelt. Innerhalb dieses MES-Assays wurden Plasmaproteine mit synthetisch hergestellten Angiotensin-Peptiden inkubiert und die Bildung der Reaktionsprodukte massenspektrometrisch verfolgt. In Gegenwart humaner Plasmaproteasen wurde das Peptidsubstrat A1-10 zu den

Reaktionsprodukten A1-9, A1-8, A1-7, A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 umgesetzt.

2.2 Quantifizierung von Angiotensin-Peptiden mit LC-MS-SRM

2.2.1 Bestimmung der massenspektrometrischen Parameter zur SRM-basierten relativen Quantifizierung von Angiotensin-Peptiden

Zum Nachweis und zur relativen Quantifizierung der Angiotensin-Peptide A1-10, A1-8, A1-7, A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 mit LC-MS-SRM wurde jedes Peptid in 0,2 % (v/v) Ameisensäure (*formic acid*, FA) gelöst. Die molaren Massen und Aminosäuresequenzen der Angiotensin-Peptide sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Übersicht der für die SRM-Etablierung verwendeten Angiotensin-Peptide.

Angiotensin-Peptid	Aminosäuresequenz	Theoretische Masse [M+H] ⁺
A1-10	DRVYIHPFHL	1296,7
A1-9	DRVYIHPFH	1183,6
A1-8	DRVYIHPF	1046,5
A1-7	DRVYIHP	899,5
A2-10	RVYIHPFHL	1181,7
A3-10	VYIHPFHL	1025,1
A4-10	YIHPFHL	925,8
A5-10	IHPFHL	763,3
A6-10	HPFHL	650,1

Die Optimierung wurde für jedes Angiotensin-Peptid separat durchgeführt. Eine 10⁻⁵ molare Lösung des jeweiligen Angiotensin-Peptids wurde mithilfe einer Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 5 µl/min über einen Infusions-HPLC-Chip in Verbindung mit einem sogenannten Chip Cube-System in die Elektrospraykammer des Massenspektrometers injiziert. Mithilfe der Software Mass Hunter Workstation Qualitative Analysis (Version B.03.01) wurden während der ESI-QQQ-MS-Messung im Fullscan-Modus (MS2Scan) Spektren der Angiotensin-Lösung aufgenommen. Die

allgemeinen technischen Einstellungen des LC-ESI-MS/MS sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die anschließende Optimierung der massenspektrometrischen Parameter erfolgte auf das Signal des Angiotensin-Ions mit der höchsten Signalintensität, welches das Elternion repräsentiert. Im Falle von A3-10 wurde beispielsweise das dreifach geladene Angiotensin-Ion mit einem m/z -Wert von 342,6 als Signal mit der höchsten Signalintensität identifiziert und als Elternion ausgewählt.

Das Elternion wurde anschließend im ersten Quadrupol isoliert und im zweiten Quadrupol unter Zufuhr individueller Kollisionsenergie und Fragmentorspannung durch kollisionsinduzierte Dissoziation (*Collision induced dissociation*, CID) fragmentiert. Für die relative Quantifizierung wurden Fragmentationen mit der höchsten Intensität für die relative Quantifizierung der jeweiligen Angiotensin-Peptide herangezogen. Im Falle von A3-10 wurden hier die beiden einfach geladenen Fragmentationen mit einem m/z -Wert von 364 sowie 268 als Fragmentationen für den Übergang ausgewählt. Die Isolierung und Fragmentierung der Elternionen erfolgte unter Verwendung der höchstmöglichen Auflösung (Unit). Die Akquirierung der Massenspektren erfolgte im 10s-Intervall im positiven Ionenmodus.

Für die SRM-Methode wurden auf die soeben beschriebene Art und Weise pro Angiotensin-Peptid jeweils zwei SRM-Übergänge optimiert. Die optimierten Parameter der SRM-Methode für die relative Quantifizierung der Angiotensin-Peptide über ESI-MS/MS sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 2. Technische Parameter des ESI-MS/MS für die relative Quantifizierung

Parameter	Einstellung
Stickstofffluss	3 l/min
Temperatur an der Transferkapillare-	300 °C
Kapillarspannung	1800 V

Tabelle 3. Optimierte Parameter des ESI-QQQ-MS für die relative Quantifizierung von Angiotensin-Peptiden.

Peptid	m/z-Wert		Fragmentor- spannung [V]	Kollisions- energie [eV]
	Elternion (Ladung)	m/z-Wert Fragmention		
A1-10	433,0 (3+)	647,0	200	13
A1-10	433,0 (3+)	269,0	170	15
A1-8	524,0 (2+)	263,2	170	17
A1-8	392,0 (3+)	135,1	170	15
A2-10	394,6 (3+)	532,5	135	15
A2-10	394,6 (3+)	269,3	135	15
A3-10	342,6 (3+)	364,0	180	18
A3-10	342,6 (3+)	268,0	170	20
A4-10	309,5 (3+)	251,0	220	10
A4-10	309,5 (3+)	234,0	200	12
A5-10	382,2 (2+)	251,2	135	10
A5-10	382,2 (2+)	234,0	170	13
A6-10	325,6 (2+)	382,1	165	7
A6-10	325,6 (2+)	235,0	155	8
A1-7	450,3 (2+)	647,3	135	15
A1-7	450,3 (2+)	619,3	135	20
A1-9	395,4 (2+)	619,2	135	15
A1-9	395,4 (2+)	156,0	135	15

2.2.2 Bestimmung der Chromatographieparameter für die relative Quantifizierung von Angiotensin-Peptiden

Eine Trennung und Entsalzung der Aliquots aus den nach Abschnitt 2.6, 2.7 und 2.8 durchgeführten Inkubationen fand über das Chip Cube-Interface der Firma Agilent statt. Dieses war mit einem HPLC-Chip welcher mit einer *reversed phase* (RP) PRLP-Anreicherungssäule (4mm, 40 nl Innenvolumen) und einer PRLP-Trennsäule (75mm x 43mm) sowie einem Nanospray-Emitter ausgestattet. Um eine Optimierung der Chromatographieparameter für die Angiotensin-Peptide zu erzielen, wurde eine Lösung eines Angiotensin-Peptidgemisches, welches A1-10, A1-9, A1-7, A1-8, A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A 6-10 in einer jeweiligen Konzentration von 10^{-5} M enthielt, in 0,2 % FA hergestellt. Über einen Autosampler wurden 2 μ l dieser Angiotensin-Lösung in das HPLC-System injiziert.

Für den Probenauftrag auf die Anreicherungssäule des Chips wurde eine Kapillar-LC-Pumpe (Serie 1100, Agilent) verwendet. Diese pumpte eine Mischung des Lösungsmittels A (0,2% FA) und Lösungsmittel B (Acetonitril, ACN) in einem prozentualen Verhältnis von 97:3 mit einer konstanten Flussrate von 6 μ l/min. Für die Gradiententrennung wurde eine nano-LC-Pumpe verwendet, welche eine Mischung des Lösungsmittels A und Lösungsmittel B in einem prozentualen Verhältnis von 97:3 mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,6 μ l/min förderte. Der Chromatographielauf wurde unter Verwendung der in Abschnitt 2.2.1 aufgeführten Parameter massenspektrometrisch analysiert. Der optimierte Gradient für die Elution der Angiotensin-Peptide von der Säule hatte folgende Parameter:

Tabelle 4. Gradient zur Elution von Angiotensin-Peptiden

Zeit [min]	FA [%]	ACN [%]
0	97	3
11	70	30
11,5	70	30
12	97	3
14	97	3

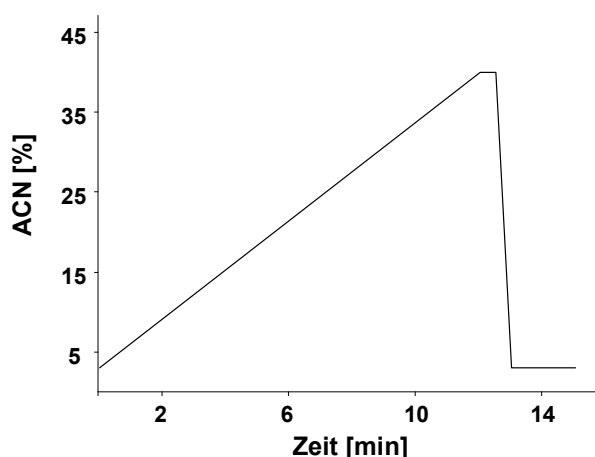


Abbildung 4. ACN-Gradient zur Elution von Angiotensin Peptiden

2.3 Massenspektrometrische Identifizierung von Angiotensin-Peptiden

2.3.1 Identifizierung von Angiotensin-Peptiden über MALDI-TOF-MS

Um verschiedene Reaktionsprodukte der Hydrolyse des Substrates A1-10 zu detektieren und zu identifizieren, erfolgten die Analysen der nach Abschnitt 2.6 und 2.8 gewonnenen Reaktionslösungen an einem MALDI-TOF-MS der Firma Bruker (Reflex IV, Bruker, Bremen, Deutschland). Für die Messungen wurde die Matrix 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) verwendet, welche in ACN / 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in HPLC-Wasser (Verhältnis 1:1) in einer Konzentration von 30 mg/ml gelöst war. Der Probenauftrag erfolgte jeweils durch Vorlegen von 0,5 μ l der Matrix und dazupipettieren von 0,5 μ l der Analytenlösung auf den MALDI-Probenteller.

Für Analyse von Reaktionslösungen mit dem MALDI-TOF-MS erfolgte unter Verwendung der in Tabelle 5 angegebenen Parameter.

Tabelle 5. Optimierte Parameter des MALDI-TOF-MS für die Detektion von Angiotensin-Peptiden

Parameter	Einstellung
Laserschüsse pro Einzelspektrum	20
Anzahl aufsummierter Spektren	100
Laserintensität	40-50 %
Laserfrequenz	9,0 Hz
Glättungsbereich m/z	0,2
Basisliniensubtraktion	an
Reflektion	an
Matrix-Suppressionsmodus	Deflektion bis 500 Da
Polarität	Positiv
Gepulste Ionenextraktion	400 ns
Spannung Ionenquelle 1	20 kV
Spannung Ionenquelle 2	16,35 kV
Linsenspannung	8,9 kV
Reflektorspannung	23 kV
Massenbereich	600-1400 Da
Detektorverstärkung (Reflektor)	6,9fach
Elektronische Verstärkung	100 mV

2.3.2 Identifizierung von Angiotensin-Peptiden mit LC-ESI-IT-MS

Eine Validierung der Identifizierung der mit MALDI-TOF-MS identifizierten Angiotensin-Peptide der Reaktionslösung der Inkubation von A1-10 mit humanen Plasmaproteinen wurde mittels Flüssigkeitschromatographie-gekoppelter Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein Elektrospray-Ionisations-Ionenfallenmassenspektrometer (Electrospray ionisation *ion-trap mass spectrometer*; ESI-IT-MS) (XCT, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) verwendet, welches mit dem bereits in Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Chip Cube-Interface ausgestattet ist. Die Probe wurde über einen Autosampler in das HPLC-System injiziert. Das Injektionsvolumen betrug 25 µl der Reaktionslösung, welche nach 24stündiger Inkubation analysiert wurde. Eine Kapillar-LC-Pumpe (Serie 1100, Agilent) pumpte mit einer Flussrate von 3 µl/min eine Mischung des

Lösungsmittels A (0,2% FA) und Lösungsmittel B (ACN) in einem prozentualen Verhältnis von 98:2 für den Probenauftrag auf die Anreicherungssäule des HPLC Chips (PRLP, 4mm, 40 nl Innenvolumen). Für die Gradiententrennung wurde eine nano-LC-Pumpe verwendet, welche durch Flusssplittung eine Mischung des Lösungsmittels A und Lösungsmittel B in einem prozentualen Verhältnis von 98:2 mit einer Flussrate von 0,4 µl/min förderte. Der für die Elution der Angiotensin-Peptide von der RP-Trennsäule (PRLP, 75mm x 43mm) verwendete Gradient ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6. Gradient zur Elution der Peptide vom RP-HPLC-Chip

Zeit [min]	0,2% FA [%]	ACN [%]
0	98	2
40	70	30
42	30	70
43	30	70
44	98	2
54	98	2

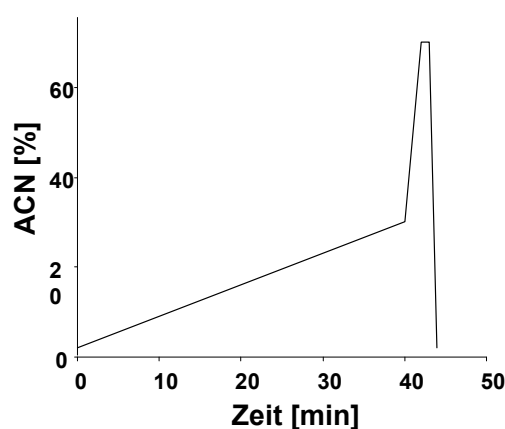


Abbildung 5. ACN-Gradient zur Elution von Angiotensin Peptiden

Das ESI-IT-MS scannte in einem Massenbereich von 300-2000 m/z. Als Trocknungsgas für die Desolvatisierung des Sprays wurde Stickstoff, welcher auf eine Temperatur von 325°C geheizt und mit einer Flussrate von 4 l/min infundiert wurde, verwendet.

MS-Spektren zur Detektion der Elternionen wurden in 0,5 s Intervallen im positiven Ionenmodus akquiriert. Anhand automatischer datenabhängiger Auswahl wurden drei der intensivsten Elternionen vom MS-Scan selektiert und isoliert. Hierbei bestand eine Präferenz für die Isolierung und Fragmentierung von zweifach geladenen Elternionen, wobei die Detektion einfach geladener Ionen vollständig ausgeschlossen wurde.

Die MS/MS-Experimente wurden über einen automatischen MS/MS-Modus ausgeführt, in dem die Selektion der Elternionen innerhalb eines Massenfensters von 4 Da stattfand. Nach 3 MS/MS-Spektren wurde die erneute Isolierung und Fragmentierung bereits fragmentierter Elternionen für einen Zeitraum von 1 min aktiv ausgeschlossen. Die MS- und MS/MS-Daten der Messung wurden über die Software

Data Analysis (Version 4.0) aus dem erhaltenen *total-ion-chromatogramm* (TIC) extrahiert und dekonvolutiert.

2.4 Gewinnung von Blutplasma

2.4.1 Gewinnung von humanem Blutplasma

Von einem gesunden weiblichen Probanden wurden mithilfe einer mit 9 ml 3,13%igem Natriumcitratpuffer gefüllten Perfusionspritze über eine 21G-Schmetterlingskanüle 50 ml Blut aus der Cubitalvene entnommen. Das Blut welches für die Quantifizierung der Angiotensin-Peptide aus dem Plasma verwendet werden sollte wurde sofort mit 1 ml Proteaseinhibitorcocktail (AEBSF (4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid) 2 mM, Aprotinin 0,3 µM, Bestatin 130 µM, EDTA, 1 mM, E-64 14 µM, Leupeptin 1 µM) vermischt. Das Blut wurde anschließend sofort in ein 50 ml Falcongefäß überführt und bei 4000 x g für 15 min zentrifugiert (Kühlzentrifuge 4-16K, Sigma, Osterode). Das abgetrennte Plasma wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Gewinnung von murinem Blutplasma

Das murine Plasma von Ratten und Mäusen wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Horst Pagel (Universität zu Lübeck, Institut für Physiologie) zur Verfügung gestellt.

2.5 Immobilisierung von Proteinen

Die Proteine wurden an aktivierte Chromatographiepartikel (Bromcyan-aktivierte Sepharosebeads® 6MB) immobilisiert. Diese wurden 30 min in 0,1 mM Salzsäure (HCl) auf dem Überschlagsrotor gequollen und anschließend mit destilliertem Wasser sowie Kopplungspuffer (100 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, pH 8,3) gewaschen. Die Immobilisierung der Proteine an die aktivierten Chromatographiepartikel erfolgte während einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) in Kopplungspuffer

auf dem Überschlagsrotor. Das Volumen der aktivierten Chromatographiepartikel betrug 40 µl pro Probe.

Nach der Immobilisierung der Proteine wurden die Chromatographiepartikel mit destilliertem Wasser und anschließend mit Blockierungspuffer (100 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, pH 8,3, 1 M Glycin, pH 8,3) gewaschen. Freie Bindungsstellen an den aktivierten Chromatographiepartikeln wurden durch zweistündige Inkubation mit 200 µl Blockierungspuffer bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf dem Überschlagsrotor blockiert. Der Blockierungspuffer wurde durch Waschen mit HPLC-Wasser entfernt. Danach wurden die aktivierten Chromatographiepartikel mit HPLC-Wasser equilibriert.

2.5.1 Immobilisierung von Proteinen aus humanem und murinem

Plasma

Aufgrund der Lagerung der nach Abschnitt 2.4 erhaltenen humanen und murinen Plasmaproben bei -80 °C, wurden nach dem Auftauen des Plasmas zunächst Kryoproteine durch Zentrifugation (14000 x g für 2 Minuten) aus der Lösung entfernt. Anschließend wurden die Plasmaproben gemäß Abschnitt 2.5.1 immobilisiert.

Für die Kopplung der Plasmaproteine wurden pro Ansatz 50 µl des Plasmas in 200 µl Kopplungspuffer mit den aktivierten Chromatographiepartikeln inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Chromatographiepartikel mit 50 µl HPLC-Wasser und 200 µl Kopplungspuffer inkubiert.

2.6 Bestimmung von Enzymaktivitäten immobilisierter Proteine

2.6.1 Bestimmung der Enzymaktivitäten immobilisierter Proteine mit ESI-QQQ-SRM und MALDI-TOF-MS

Um die Enzymaktivitäten immobilisierter Plasmaproteine über SRM-gekoppelte ESI-
QQQ-MS zu bestimmen, wurden diese jeweils mit einer 10⁻⁵ molaren Lösung eines Peptidsubstrates (A1-10, A2-10, A3-10, A4-10, A5-10) in HPLC-Wasser in einem Reaktionsvolumen von 30 µl auf einem Überschlagsrotor inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten erfolgte die Abnahme von Aliquots à 3 µl, welche sofort mit 27 µl 0,2 % FA verdünnt wurden. Bis zu ihrer Analyse wurden die Proben bei -20°C gelagert. Für

die ESI-QQQ-SRM-Analyse wurden von dieser Lösung 6 µl über die LC-Anlage ins Massenspektrometer injiziert.

Für die Messung von Peptiden mit MALDI-TOF-MS wurden jeweils 0,5 µl der Matrix DHB sowie 0,5 µl der abgenommenen Aliquots direkt auf den MALDI-Proben-teller pipettiert (siehe Abschnitt 2.3.1).

2.7 Bestimmung von Enzymaktivitäten nicht immobilisierter Proteine

2.7.1 Bestimmung der Enzymaktivitäten nicht immobilisierter Proteine mit ESI-QQQ-SRM

Um die Enzymaktivitäten nicht immobilisierter Plasmaproteine über SRM-gekoppelte ESI-QQQ-MS zu bestimmen, wurde jeweils 100 µl unbehandeltes Plasma sowie mit HPLC-Wasser 1000fach verdünntes Plasma mit einer A1-10-Lösung in einer Endkonzentration von 10^{-5} M auf einem Überschlagsrotor inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten erfolgte die Abnahme von Aliquots à 20 µl. Anschließend erfolgte eine Fällung der in der Reaktionslösung enthaltenen Proteine durch sofortige Zugabe von 40 µl einer ACN/0.1% TFA (v/v)-Mischung in HPLC-Wasser. Dieses Gemisch wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden durch anschließende 10minütige Zentrifugation mit 4000 xg abgetrennt. Der Überstand, welcher die Peptide enthielt, wurde abgenommen und mit einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingedampft.

Anschließend wurden die Peptidfraktionen in 100 µl 0,2 % FA aufgenommen und über eine Festphasenextraktion auf Basis eines hydrophil-lipophilen-balance (HLB)-Sorbens (Divinylbenzol und N-Vinylpyrrolidol, Oasis HLB 30 µm µElution plate, Waters) entsalzt (Ausführliche Beschreibung erfolgt in Abschnitt 2.9.2). Die Eluate wurden bis zur Trockne eingedampft und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

Für die ESI-QQQ-SRM-Analyse wurden die Peptidfraktionen in 20 µl 0,2 % FA gelöst und von dieser Lösung 6 µl über die LC-Anlage ins Massenspektrometer injiziert.

Für die Messung von Peptiden mit MALDI-TOF-MS wurden jeweils 0,5 µl der Matrix DHB sowie 0,5 µl der abgenommenen Aliquots direkt auf den MALDI-Proben-teller pipettiert (siehe Abschnitt 2.3.1).

2.8 Versuche zur Charakterisierung der Angiotensin-generierenden Proteasen

2.8.1 Inkubation immobilisierter Plasmaproteine mit unterschiedlichen Angiotensin-Substraten

Die Inkubation der nach Abschnitt 2.5 immobilisierten Plasmaproteine fand grundsätzlich in HPLC-Wasser statt und wurde durch Zugabe des individuellen Angiotensin-Peptides (A1-10, A1-8, A2-10, A3-10, A4-10 oder A5-10) zu den immobilisierten Proteinen in einer Endkonzentration von 10^{-5} M in einem Reaktionsvolumen von 30 μ l gestartet. Die Inkubation fand im Überschlagsrotor bei 37°C statt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Aliquots aus der Reaktionslösung entnommen und vor weiteren massenspektrometrischen Analysen in 0,2% FA in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt.

Für die Messung von Peptiden mit MALDI-TOF-MS wurden jeweils 0,5 μ l der Matrix DHB sowie 0,5 μ l der abgenommenen Aliquots direkt auf den MALDI-Probenteller pipettiert (siehe Abschnitt 2.3.1).

2.8.2 Inkubation rekombinanter Aminopeptidase N mit unterschiedlichen Angiotensin-Substraten

Für die Inkubation mit rekombinanter APN wurden die jeweiligen Angiotensin-Peptide (ANG-1-10, ANG-1-8, ANG-2-10, ANG-3-10, ANG-4-10 or ANG-5-10) zu einer Endkonzentration von 10^{-5} M in HPLC-Wasser gelöst. Das Reaktionsvolumen betrug 100 μ l pro Ansatz. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 0,25 μ g der APN zur jeweiligen Angiotensinlösung gestartet. Anschließend wurden die Proben bei 37°C inkubiert.

Zu definierten Zeitpunkten wurden Aliquots aus der Reaktionslösung entnommen und durch Zugabe von Ameisensäure auf eine Endkonzentration von 0,2% FA eingestellt. Für die Messung von Peptiden mit MALDI-TOF-MS wurden jeweils 0,5 μ l der Matrix DHB sowie 0,5 μ l der abgenommenen Aliquots direkt auf den MALDI-Probenteller pipettiert (siehe Abschnitt 2.3.1).

2.8.3 Inkubation rekombinanter humaner Chymase mit A1-10

Die Inkubation von A1-10 (finale Konzentration: 10^{-5} M) mit 0,5 μ g rekombinanter Chymase also auch die nachfolgende Analyse der Reaktionslösung über MALDI-MS erfolgte wie bereits unter Abschnitt 2.8.2 für die Inkubation rekombinanter APN beschrieben.

2.8.4 Inkubation immobilisierter Plasmaproteine mit A1-10 in Anwesenheit und Abwesenheit verschiedener Inhibitoren

Die nach Abschnitt 2.5 immobilisierten humanen Plasmaproteine wurden vor dem Start der eigentlichen Inkubation jeweils für 5 min mit folgenden Proteaseinhibitoren inkubiert: 100 μ M Chymostatin, 150 μ M Bestatin, 50 μ M Antipain, 0,2 mM, Aprotinin 0,03 μ M, AEBSF, 10 μ M Captopril und 0,1 mM EDTA. Als Kontrolle diente eine Probe, welche keinen Inhibitor enthielt. Die Inkubation wurde anschließend durch Zugabe von 10^{-5} M A1-10 gestartet.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Graph Pad Prism (Version 4.00). Zur Bestimmung der p-Werte wurde ein Einstichproben-t-Test angewandt, wobei das Signifikanzniveau auf 5% festgelegt war.

2.9 Fraktionierung von humanem Blutplasma

2.9.1 Abreicherung von Plasmaproteinen aus Blutplasma

Um Plasmapeptide von Plasmaproteinen zu trennen, erfolgte eine Proteinfällung durch Zugabe von 30 ml ACN/0,1% TFA (v/v) in Wasser zu 15 ml des nach Abschnitt 2.4.1 gewonnenen humanen Plasmas und anschließender 30minütiger Inkubation. Die gefällten Proteine wurden durch anschließende 10minütige Zentrifugation mit 4000 xg abgetrennt. Der Überstand, welcher die Plasmapeptide enthielt, wurde abgenommen und lyophilisiert (Lyophilisator alpha 1-2, Christ).

2.9.2 Fraktionierung einer Plasmapeptidfraktion durch Festphasenextraktion

Die Plasmapeptide wurden in 15 ml 0,2 % FA gelöst und über eine Festphasenextraktion auf Basis eines hydrophil-lipophilen-balance (HLB)-Sorbens (Divinylbenzol und N-Vinylpyrrolidol, Oasis HLB cartridge 35cc/ 6g 60 µm, Waters) aufgereinigt und angereichert.

Das HLB-Sorbens wurde mit 15 ml Methanol konditioniert und anschließend durch mehrfaches Waschen mit 0,2% FA equilibriert. Um den Durchfluss der Lösungsmittel durch die Säule zu beschleunigen, wurde die HLB-Kartusche zwischen allen Waschschritten mit 500 x g für eine Dauer von 1 min zentrifugiert.

Die Plasmaproteinfraktion wurde auf die equilibrierte HLB-Kartusche aufgetragen und der Durchfluss wurde in einem separaten Gefäß aufgefangen. Ungebundene Moleküle wurden durch wiederholtes Waschen des Chromatographiematerials mit 0,2% FA entfernt. Die gebundenen Peptide wurden mit 15 ml 60 % Methanol eluiert und das Lösungsmittel in einer Vakuumzentrifuge (RC 10, Thermo Fisher Scientific) bis zur Trockne eingedampft.

2.9.3 Fraktionierung einer Plasmapeptidfraktion über reversed phase-Chromatographie

Die Peptide wurden dann in 500 µl 0,1 % (v/v) TFA in Wasser gelöst und über eine silicabasierte monolithische RP-HPLC-Säule (RP18e, 100 mm x 4 mm, Chromolith®performance, Merck KgaA) getrennt. Während der Trennung wurde mithilfe eines UV-Detektors die Absorption bei 220 nm sowie 280 nm verfolgt.

Die Probe wurde durch einen Autosampler injiziert. Die Probenzuführung und die Säulenbeladung erfolgten bei einem Fluss von 500 µl/min des Lösungsmittels A (0.1% TFA (v/v) in HPLC-Wasser) durch einer Kapillarpumpe (Agilent Technologies, Waldbronn). Die Elution der gebundenen Peptide vom RP-Sorbens erfolgte durch einen Lösungsmittelgradienten aus 0,1 % TFA (Lösungsmittel A) und 100 % ACN (Lösungsmittel B), dessen Parameter in Tabelle 7 dargestellt sind.

Tabelle 7. Gradient zur Elution der Peptide von der RP-HPLC

Zeit [min]	0,1% TFA [%]	ACN [%]
0	97	3
5	97	3
10	79	21
50	75	25
51	40	60
53	40	60
54	97	3
60	97	3

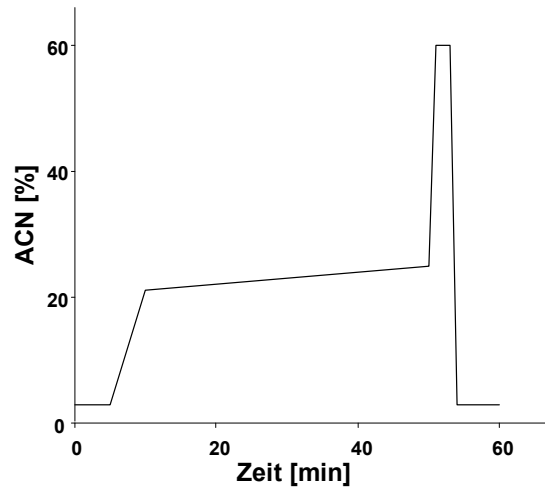


Abbildung 6. ACN-Gradient zur Elution von Angiotensin Peptiden

Die eluierten Fraktionen wurden mit einem Fraktionssammler (ÄKTA prime, GE Healthcare, Germany) gesammelt. Unter gleichen chromatographischen Bedingungen wurden 600 µl einer 10^{-5} molaren, äquimolaren Mischung der synthetischen Angiotensin-Peptide A1-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 aufgetrennt. Alle Fraktionen beider Chromatographien wurden anschließend mit MALDI-TOF-MS analysiert.

Die Retentionszeiten der synthetischen Angiotensin-Peptide wurden mithilfe einer MALDI-TOF-Analyse bestimmt. Die nach chromatographischer Trennung erhaltenen Fraktionen der Plasmapeptidfraktionen, welche sich mit den Retentionszeiten der synthetischen Angiotensine deckten, wurden gepoolt, bis zur Trockne eingedampft und anschließend für den Fluoreszenz-Immunoassay (siehe Abschnitt 2.10) verwendet.

2.10 Nachweis von Angiotensin-Peptiden in humanem Plasma

2.10.1 Bestimmung der Konzentration von Angiotensin-Peptiden in humanem Plasma durch einen Fluoreszenz-Immunoassay

Für die Bestimmung der Konzentration der Angiotensin-Peptide A1-10, A4-10, A5-10 und A6-10 wurde ein Fluoreszenz-Immunoassay von Phoenix Pharmaceuticals verwendet. Die Durchführung des Assays erfolgte nach dem Arbeitsprotokoll des Herstellers. Zur Herstellung der Standardkurven der synthetischen Peptide A1-10, A4-10, A5-10, A6-10 wurden folgende Konzentrationen verwendet (pg/ml): 1, 10, 100, 1000, 10000.

2.10.2 Bestimmung der Fluoreszenzintensität

Die Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensität erfolgte mit einem Plattenlesegerät (Infinite m200) der Firma Tecan, mit einer Anregungswellenlänge von 325 nm und einer Emissionswellenlänge von 420 nm bei einer Bandweite von 9 nm bzw. 20 nm. Jede Probe wurde dreifach gemessen und die Integrationszeit betrug 20 µs. Die Daten wurden mit der Tecan i-Control Software (Version 1.5.14.0) prozessiert und mit Graph Pad Prism Software (Version 4.00) graphisch und statistisch ausgewertet.

2.11 Versuche zur physiologischen Wirkung von Angiotensin-Peptiden

2.11.1 *In vitro*-Untersuchung der physiologischen Wirkung von Angiotensin-Peptiden auf murine Blutgefäße mittels Druck-Myographie

Die folgend beschriebenen Experimente wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Martin Tepel (Universitätsklinikum Odense, Institut für Nephrologie, Dänemark) durchgeführt.

Die physiologischen Effekte der Angiotensin-Peptide wurden mithilfe der Druck-Myographie untersucht. Mithilfe dieser Methode kann der Querschnitt des untersuchten Gefäßes während des Versuches durch ein Mikroskop betrachtet und durch eine Kamera verfolgt und aufgezeichnet werden. Anhand der Videoaufnahmen kann anschließend bestimmt werden, inwiefern sich der Innen- oder Außendurchmesser des Gefäßes verändert.

Bei den hier untersuchten Gefäßen handelte es sich um frisch präparierte Halsschlagaderschnitte von Wildtyp-Mäusen. Das Experiment wurde mit einem Druck-Myographen der Firma Danish Myo Technology (Modell 110P, durchgeführt, Aarhus, Dänemark). Die Schnitte wurden während des Experiments in einem Bad mit einer 37°C warmen Perfusionslösung perfundiert (145 mM NaCl, 1,2 mM NaH₂PO₄, 4,7 mM KCl, 1,2 mM Mg SO₄, 2 mM CaCl₂, 5 mM Glukose, 2 mM Pyruvat, 3 mM 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS), pH 7,4). Die Halsschlagadern wurden zu 80mmHg vorkontrahiert und kontinuierlich mit einer Flussrate von 0,2 ml/min perfundiert.

Die Angiotensin-Peptide A1-8, A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 wurden im Perfusionspuffer gelöst und jeweils gewünschte Volumina von 1 mM Stocklösungen zur Perfusionslösung hinzugegeben, um die gewünschte Endkonzentration der Angiotensin-Peptide zu erhalten (200 nM für A1-8, 1 µM für alle weiteren Angiotensin-Peptide). Nach einer Equilibrierungszeit von 30 min wurde der Perfusionspuffer gegen den entsprechenden Angiotensin-Peptid-haltigen Perfusionspuffer getauscht.

Die Kontrollexperimente wurden in Abwesenheit der Angiotensin-Peptide durchgeführt. Am Ende des Experimentes wurde die maximale Vasokonstriktion durch Austausch der Perfusionslösung gegen eine Perfusionslösung, welche 60 mM Kalium enthielt, bestimmt. Die Bestimmung der maximalen Vasodilatation erfolgte im Anschluss durch Austausch der Perfusionslösung gegen eine Perfusionslösung welche 10 µM Natrium-Nitroprussid (NNP) enthielt.

Die Daten wurden dargestellt als prozentuale Anteile der maximalen Vasodilatation durch NNP bzw. maximaler Vasokonstriktion zu 200 nM A1-8. Die Kontrollexperimente wurden 10fach, alle weiteren Experimente 4fach wiederholt.

2.11.2 *In vivo*-Untersuchung der physiologischen Wirkung von Angiotensin-Peptiden in Mäusen

Die physiologische Wirkung der Angiotensin-Peptide auf den Blutdruck sollte weiterhin *in vivo* in Mäusen untersucht werden. Dies wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Florian Weinberger und Frau Birgit Geertz mithilfe einer Doppler-Sonographie am Aortenbogen der Maus durchgeführt.

Die Doppler-Sonographie ist ein bildgebendes Verfahren, welches auf dem sogenannten Dopplereffekt beruht. Dieser beschreibt eine Frequenzverschiebung von Wellen, welche bei relativen Bewegungen zwischen einer Schallquelle und einem Reflektor auftritt. Bei der Doppler-Sonographie dient ein Schallkopf als Schallquelle, welcher über piezoelektrische Kristalle Schwingungen im Frequenzbereich von Ultraschallwellen (20 kHz-1Ghz) aussendet. Da Luft die Ausbreitung von Schallwellen stark dämpft, funktioniert die Übertragung der Schallwellen am besten, wenn umliegendes Gewebe ohne Luftzwischenräume vorhanden ist. Um den Kontakt zwischen Schallkopf und Gewebe zu verbessern, wird daher mit Ultraschallgel gearbeitet.

Treffen die vom Schallkopf ausgesendeten Schwingungen auf umliegendes Gewebe, kommt es dort zur Ausbreitung von Ultraschallwellen. Dabei ist zu beachten, dass nicht der gesamte Anteil der vom Schallkopf erzeugten Ultraschallwellen wieder vom Gewebe reflektiert wird, da diese anteilig sowohl absorbiert und gestreut als auch transmittiert werden. Diese Effekte stellen sich in verschiedenen Geweben unterschiedlich dar und werden von der Impedanz der betrachteten Gewebeart beeinflusst, welche sowohl von der Gewebsdichte als auch von der Schallgeschwindigkeit abhängt.

Die Fähigkeit Ultraschallwellen zu reflektieren wird als Echogenität bezeichnet. Der Anteil der reflektierten Ultraschallwellen („Echo“) werden von den im Schallkopf enthaltenen piezoelektrischen Kristallen detektiert, wobei das piezoelektrische Prinzip dabei invers genutzt wird.

Das Prinzip des Dopplereffektes kann zur Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeit verwendet werden.^{185, 186} Dabei treffen die vom Schallkopf generierten Ultraschallwellen auf die im Blut vorhandenen Erythrozyten, welche eine gute Echogenität besitzen. Fließt das Blut dem Schallkopf entgegen wird die

Wellenfrequenz der reflektieren Ultraschallwellen höher, als die der gesendeten Wellen. Entfernen sich die im Blut enthaltenen Erythrozyten vom Schallkopf, so verlangsamt sich entsprechend die reflektierte Wellenfrequenz.

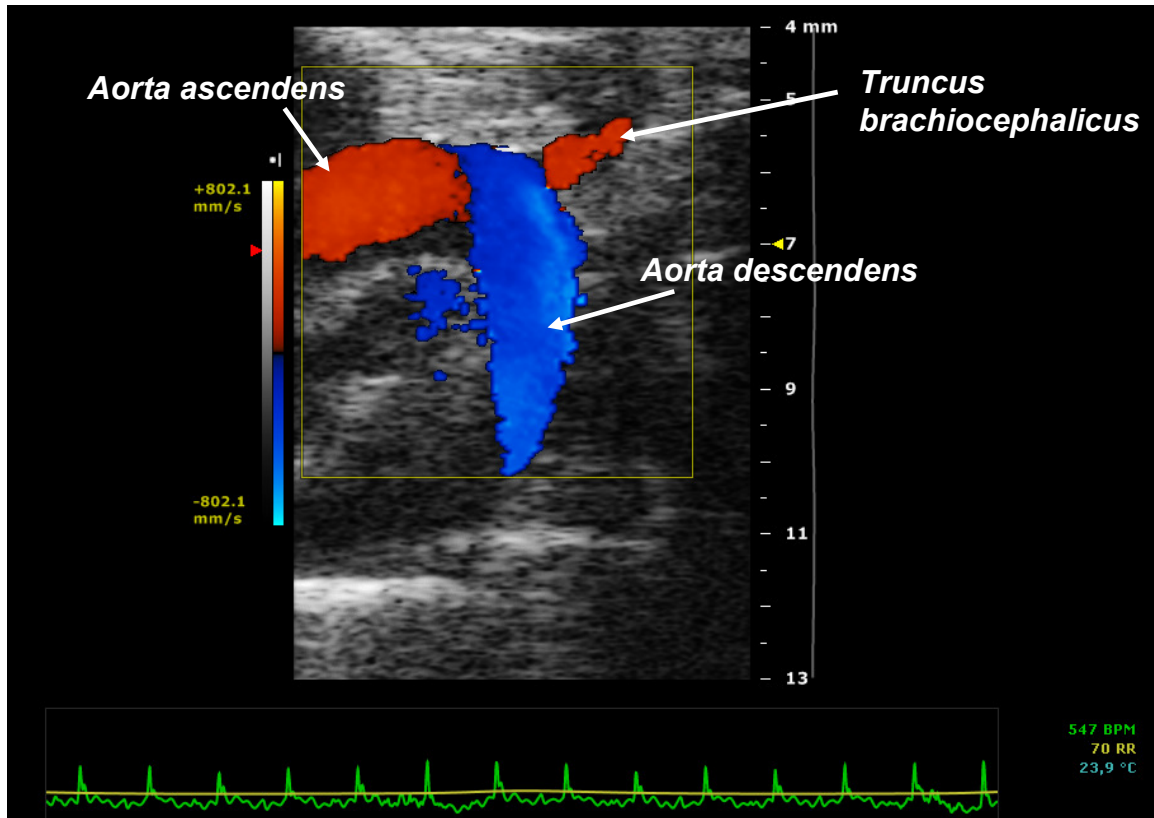


Abbildung 7. Farb-Doppler-Sonographie des Maus-Aortenbogens. Rot: Blutfluss entgegen dem Schallkopf (links: *Aorta ascendens*; rechts abgehend: *Truncus brachiocephalicus*). Blau: Blutfluss vom Schallkopf weg (*Aorta descendens*).

Bei der Farb-Doppler-Sonographie kann die Fließrichtung des Blutes der untersuchten Blutgefäße anhand einer Farbcodierung dargestellt werden. Das Ergebnis einer solchen Farb-Doppler-Sonographie des Aortenbogens der Maus, welcher in diesem Experiment betrachtet wurde, ist in Abbildung 7 dargestellt. Der Schallkopf wurde dabei so positioniert, dass der Blutfluss der ansteigenden Aorta (*Aorta ascendens*) dem Schallkopf entgegenläuft. In diesem Fall wird der Blutfluss rot dargestellt. In der Darstellung ist neben der Aorta ascendens noch der erste Aortenabgang (*Truncus brachiocephalicus*) zu sehen.

Fließt das Blut vom Schallkopf weg, wird dies durch blaue Färbung angezeigt. Somit kann eindeutig zwischen der rot gefärbten ansteigenden Aorta (*Aorta ascendens*) und der blau gefärbten absteigenden Aorta (*Aorta descendens*) unterschieden werden.

Um zu untersuchen, inwiefern die Applikation von A3-10 zu einer Modulation des Blutdruckes führt, wurde die Pulswellengeschwindigkeit (PWG) ermittelt. Als Pulswelle (PW) bezeichnet man im Allgemeinen die durch die Kontraktion des Herzens entstehende Druckwelle¹⁸⁷. Die PWG ist demnach die Geschwindigkeit, mit der eine Druckwelle Arterien, z. B. die Aorta, durchläuft. Diese kann zur indirekten Bestimmung der arteriellen Steifigkeit genutzt werden. Zur Bestimmung der Pulswellengeschwindigkeit wird die Eintreffzeit der Pulswelle an zwei unterschiedlichen Orten einer definierten und durchgehenden Gefäßstrecke bestimmt. Als Gefäßstrecke wurde in diesem Experiment der Aortenbogen gewählt, da er aufgrund seines großen Gefäßdurchmessers gut über Doppler-Sonographie identifiziert werden kann.

Die PWG ist durch den Gefäßtonus bzw. der Steifigkeit der Arterienwand sowie durch den Gefäßdurchmesser beeinflussbar. Kommt es z. B. zu einer Vasokonstriktion so versteift sich die Arterienwand, woraus im Vergleich zum basalen Gefäßtonus ein erhöhter Gefäßtonus resultiert. Dies hat zur Folge, dass sich die PW schneller durch die Arterie fortpflanzt, da der Druck schlechter von der Gefäßwand kompensiert wird und daher nur in Blutflussrichtung ausweichen kann. Mit Erhöhung des systolischen Blutdrucks geht demnach eine Erhöhung der PWG einher. Im Falle einer Vasodilatation erhöht sich die Elastizität der Gefäße (niedriger Gefäßtonus) und die PW setzt sich entsprechend langsamer fort.

Besitzt A3-10 einen Blutdruckmodulierenden Effekt, sollte sich dies in einer Änderung der PWG im Vergleich zur basalen PWG äußern.

Bei der Doppler-Sonographie wird jedoch nicht der Druck-, sondern der Strömungspuls des Blutes gemessen. Der Strömungspuls gibt den zeitlichen Verlauf der Blutströmungsgeschwindigkeit wieder.¹⁸⁷ Da der Strömungspuls aus einem Druckgefälle resultiert, pflanzt er sich mit der Geschwindigkeit der Druckwelle fort. Deshalb kann die Pulswellengeschwindigkeit auch über den Strömungspuls unter Zuhilfenahme der Doppler-Sonographie bestimmt werden.¹⁸⁸

Zur Durchführung der Sonographie wurde die Maus mit Isofluran narkotisiert (1,5% Isofluran, 98,5% Sauerstoff) und in Rückenlage mit Klebeband an den Extremitäten auf einer Wärmeplatte (37°C) fixiert. Über in der Wärmeplatte integrierte Elektrodenplättchen wurde kontinuierlich ein Elektrokardiogramm (EKG) aufgenommen. Die Sedierung des Tieres erfolgte über den gesamten Zeitraum des

Experimentes über eine Atemmaske. Mithilfe einer Enthaarungscreme wurde dann im Bereich des Herzens das Haarkleid entfernt.

Anschließend wurde ein Schwanzvenenkatheter gelegt. Der Katheter bestand dabei aus einer abgetrennten 21G-Spritzenkanüle, welche in einem Katheterschlauch platziert war. Vor den Injektionen der Angiotensin-Lösungen wurde das EKG- als auch das Doppler-Signal zum Ruhezeitpunkt der Maus aufgenommen. Für die Sonographie wurde etwas Ultraschallgel im Herzbereich aufgetragen. Die Messung erfolgte über einen MS 400 Schallkopf, dessen technische Parameter in Tabelle 8 aufgeführt sind. Die technischen Parameter des Doppler-Sonographen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 8. Technische Parameter des MS 400 Schallkopfes für die Doppler-Sonographie.

Technische Parameter	Einstellungen
Frequenz	30 Mhz
Bandweite	18-38 Mhz
Geometrischer Fokus	9 mm
Bildbreite (max)	15,4 mm
Bildtiefe (max)	20 mm
Bildwechselfrequenz (Einzelzone)	449 (5,36 mm)
SOV (Width)	
Axiale Bildauflösung	50 µm
Laterale Bildauflösung	110 µm
Basiskontrast	Ja
Nichtlinearer Kontrast	Nein
Maximaler Lenkung (Doppler)	15°
Aufstandsfläche	20 mm x 5 mm

Tabelle 9. Einstellungen der technischen Parameter zur Doppler Sonographie. Messungen erfolgten im gepulsten Wellen-Modus (Pulsquelle, PW). Einstellungen sind exemplarisch für das obere Gate (Anfangspunkt der Gefäßstrecke) dargestellt.

Technische Parameter	Einstellungen (oberes Gate)
Transmission:	
Frequenz	24 MHz
Power	100 %
PRF	50 kHz
Akquisitionseinstellungen:	
Doppler-Verstärkung	30 dB
Strahlwinkel	0°
Wandfilter	1250 Hz
Simultanität	Aus
Displayeinstellung:	
Dynamischer Bereich	35 db
Doppler-Schlagvolumen (SV):	
Tiefe	6,61 mm
Größe	0,27 mm
Winkel	10°

Um die Auswirkung des Injektionsvolumens auf die PWG zu bestimmen, wurden 100 µl einer sterilen 0,9 % Natriumchloridlösung über den Schwanzvenenkatheter injiziert. Alle zu untersuchenden Substanzen lagen in dieser Lösung vor. Im Anschluss erfolgten die Injektionen von jeweils 100 µl A3-10 in aufsteigenden Konzentrationen (10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M), gefolgt von einer Injektion von 100 µl einer 10^{-4} molaren A3-8-Lösung.

Nach jeder Injektion fand eine 5minütige Injektionspause statt. Um die Funktionsfähigkeit des Versuchsaufbaus zu überprüfen, wurde als Kontrolle nach Injektion aller zu untersuchenden Substanzen 100 µl einer 10^{-6} M A1-8-Lösung injiziert.

Die Aufnahme der Signale des Doppler-Sonographen sowie des EKGs erfolgte 30 Sekunden nach jeder durchgeführten Injektion. Pro Zeitpunkt wurde das Dopplersignal jeweils an 2 unterschiedlichen Orten in der Aorta aufgenommen.

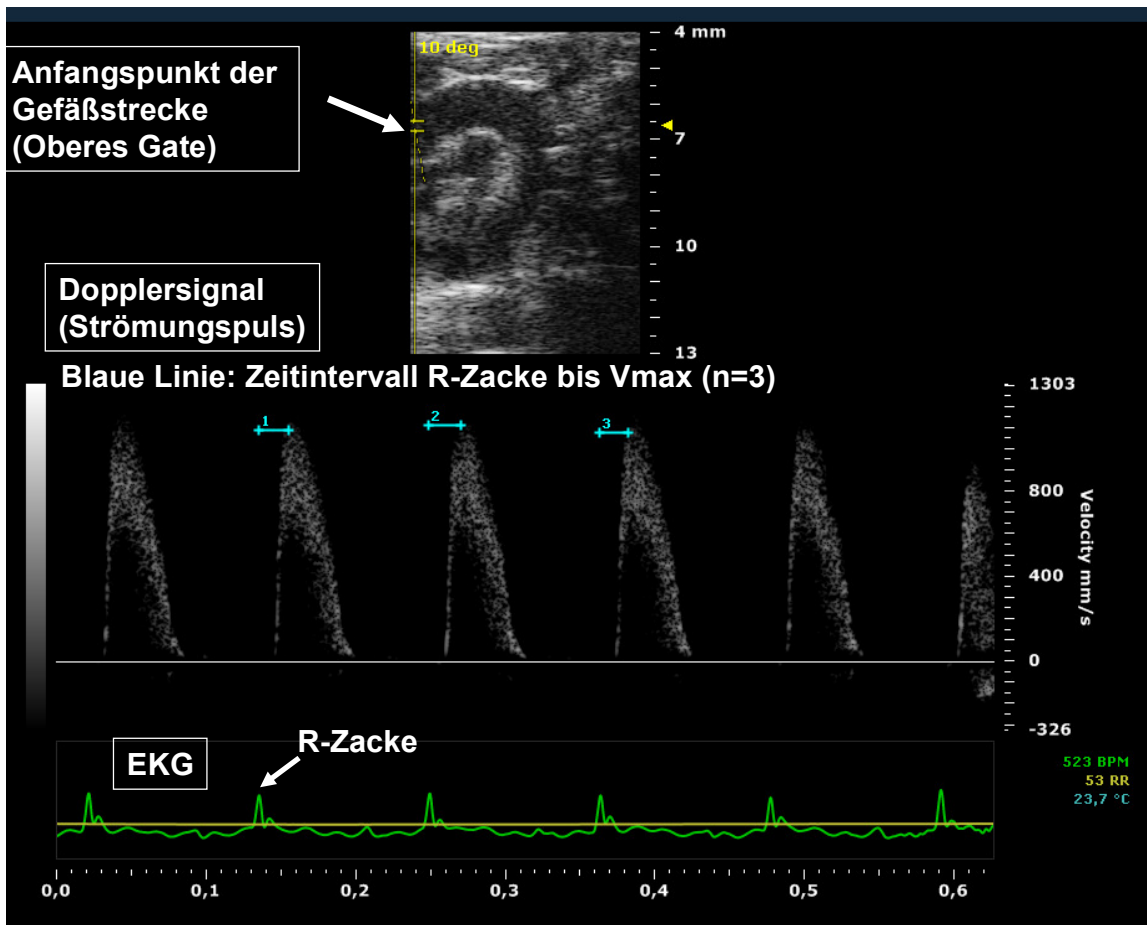


Abbildung 8. Doppler-Sonographie des Maus-Aortenbogens: Darstellung des Aortenbogens mit markiertem Streckenanfangspunkt der Messung (Oben, Brightness (B)-Modus). Blutflussgeschwindigkeit in mm/s (Mitte, Doppler-Signal im Pulswellen (PW)-Dopplermodus). Elektrokardiogramm (EKG, unten). Die blaue Linie markiert die Zeitspanne der größten Herzmuskelerregung (R-Zacke) bis zur maximalen Blutflussgeschwindigkeit (V_{max} , Mitte des Dopplersignals) ($n=3$).

Dabei wurden die Daten der Sonographie unter Verwendung unterschiedlicher Messmodi erhoben. Die Messung des Strömungspulses fand im pulsed wave (PW)-Dopplermodus statt. Hierbei wird der zeitliche Verlauf der Blutströmungsgeschwindigkeit nur an einem bestimmten Ort, welcher als Gate bezeichnet wird, aufgezeichnet. Als Gate wurde ein Punkt an der *Aorta ascendens* (oberes Gate) sowie an der *Aorta descendens* (unters Gate) definiert (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9). Um die Lage der Gates im Aortenbogen bestimmen zu können, wurde im Helligkeits-modulations-(*brightness modulation*, *B*)-Modus gemessen, welcher die zurückreflektierten Ultraschallwellen in helligkeitsabgestuften Bildpunkten darstellt, wobei die Helligkeit mit der Amplitude der Ultraschallwellen korreliert.

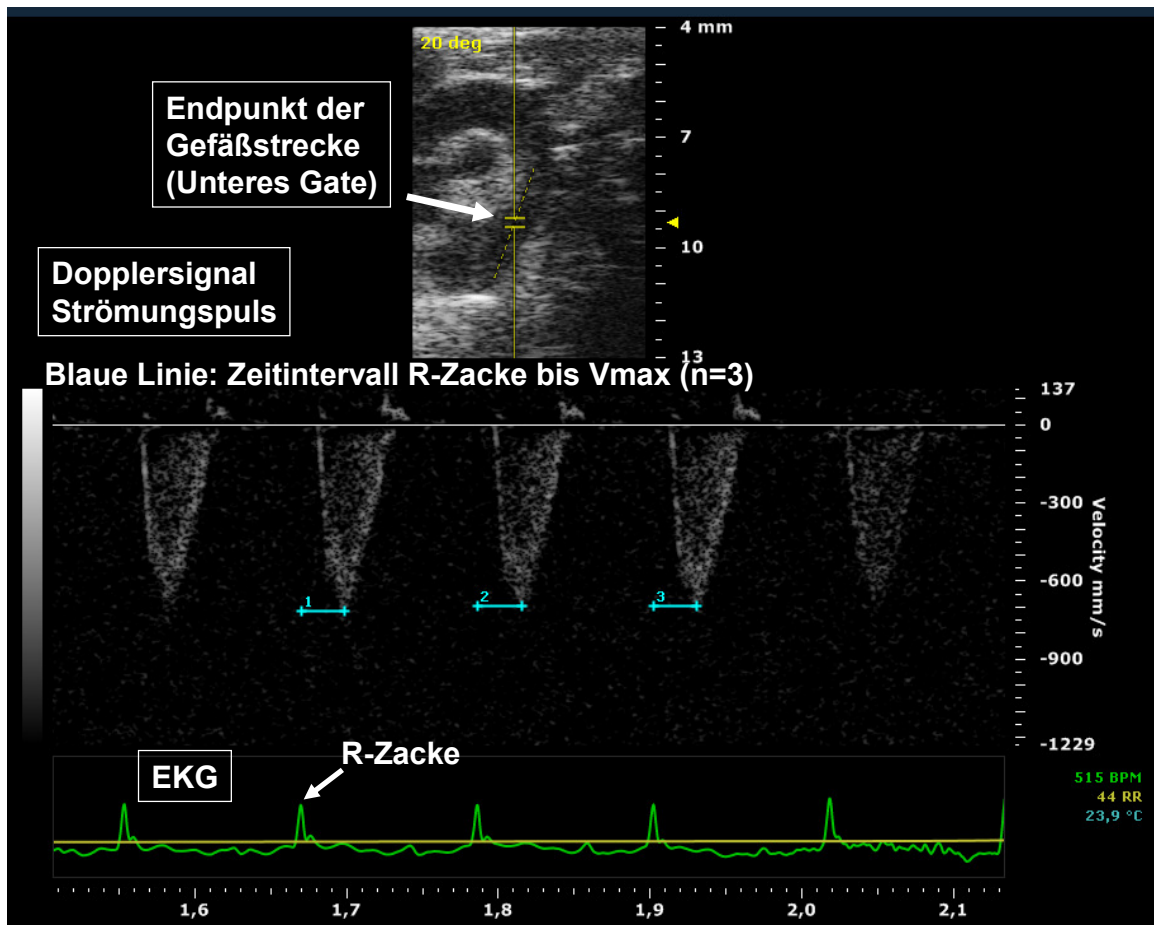


Abbildung 9. Doppler-Sonographie des Maus-Aortenbogens: Darstellung des Aortenbogens mit markiertem Streckenendpunkt der Messung (Oben, B-Modus). Strömungspuls geschwindigkeit in mm/s (Mitte, Doppler-Signal im Pulswellen (PW)-Dopplermodus). Elektrokardiogramm (EKG, unten). Die blaue Linie markiert die Zeitspanne der größten Herzmuskelerregung (R-Zacke) bis zur maximalen Blutfluss geschwindigkeit (V_{max} , Mitte des Dopplersignals) (n=3).

Die Bestimmung der PWG erfolgte dann anhand der gewonnenen Daten. Die Auswertung der Bilddaten erfolgte mit der Vevo2100 Software (Version 1.0.0). Zunächst wurde eine definierte Strecke (s) des Aortenbogens bestimmt (siehe Abbildung 10). Der Anfangs- und Endpunkt dieser Strecke war dabei die Position der für den PW-Dopplermodus bestimmten Gates.

Anschließend wurde sowohl für am Anfangs- als auch am Endpunkt der Strecke das Zeitintervall zwischen dem Zeitpunkt der höchsten Erregung der Herzmuskelzellen (R-Zacke) und der maximalen Blutfluss geschwindigkeit (V_{max}) bestimmt (n=3).

Um die eigentliche Pulswellentransitzeit (t) zu berechnen, die die PW benötigt, um die Strecke (s) zurückzulegen, wurde die Differenz der Zeitintervalle die das Maximum

der Strömungspulswelle jeweils von der R-Zacke bis zum Streckenendpunkt bzw. bis zum Streckenanfang benötigt, gebildet.

Die PWG (v) wurde dann aus dem Quotienten der Strecke (s) und der Pulswellentransitzeit (t) berechnet.



Abbildung 10. Darstellung des Maus-Aortenbogens über Doppler-Sonographie (B-Modus). Die blaue Linie kennzeichnet die Strecke (s), welche zur Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeit herangezogen wird.

2.12 Material

2.12.1 Geräte

Gerät	Hersteller
1100 LC/MSD trap XCT Ultra	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland) / Agilent (Santa Clara, USA)
6430 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Analysenwaage ALS 120-4	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern, Deutschland)
Chip Cube-System	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
nanoHPLC-Anlage 1100 Series bzw. 1200 Series	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
MALDI Elektronikeinheit und Pumpen Balzers TPG300	Pfeiffer Vacuum GmbH (Asslar, Deutschland)
MALDI-TOF-Massenspektrometer Reflex IV	Bruker Daltonics (Billerica, USA)
Vakuumpumpen TPG300	Balzers AG (Balzers, Lichtenstein)
Hamilton-Spritze 250 µl	GE Healthcare (Fairfield, Deutschland)
InLab®422 Combination Semi-mirco pH-Elektrode	METTLER TOLEDO (Columbus, USA)
pH-Meter pHM 210	MeterLab (Villeurbanne Cedex, Frankreich)
Kühl-Zentrifuge 4-16 K	Christ (Osterode, Deutschland)
Vakuumentrifuge RCF10 mit Kühlfalle	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Lyophilisator alpha 1-2	Christ (Osterode, Deutschland)
UV-Photometer infinite m200	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Ultraschallgerät Vevo 2100	Visualsonics (Toronto, Kanada)
Druck Myograph Modell 110P	Danish Myo Technology (Aarhus, Denmark)

2.12.2 Chemikalien

Chemikalie	Firma
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Bruker Daltonics (Billerica, USA)
Acetonitril	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ameisensäure	Fluka/Sigma (Steinheim, Deutschland)
CNBr-activated Sepharose Beads TM 6MB	GE Healthcare (München, Deutschland)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Bio-Rad (Hercules, USA)
Glycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchloridlösung steril 0,9 %	Braun (Melsungen, Deutschland)
Natriumcitratlösung 3.13 %	Eifelfango (Bad Neuenahr-Ahrweiler, Deutschland)
Natriumhydrogenkarbonat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Proteaseinhibitorcocktail	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Salzsäure konz.	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trifluoressigsäure	Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Wasser HPLC grade Lichrosolv	Merck (Darmstadt, Deutschland)

2.12.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Reaktionsgefäße safe lock 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Gefäße 15 ml und 50 ml	Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich)
Insulinspritzen 1 ml	B.Braun (Melsungen, Deutschland)
Oasis HLB μ Elution plate 30 μ M	Waters (Eschborn, Deutschland)
Oasis HLB Kartuschen 6 g	Waters (Eschborn, Deutschland)
Perfusionsspritzen 50 ml	B.Braun (Melsungen, Deutschland)
Pipettenspitzen 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Sarstedt (Hamburg, Deutschland)
Katheterschlauch Fine Bore Polythene Tubing 0.28mm ID, 0.61 mm OD	Smiths Medical International (Kent, Großbritannien)

2.12.4 Biomaterialien

Material	Firma
Aminopeptidase N	R&D-Systems (Minneapolis, USA)
4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF)	Applichem (Darmstadt, Germany)
Angiotensin-Peptide: A1-10 DRVYIHPFHL A1-9 DRVYIHPFH A1-8 DRVYIHPF A1-7 DRVYIHP A2-10 RVYIHPFHL A3-10 VYIHPFHL A4-10 YIHPFHL A5-10 IHPFHL A6-10 HPFHL A3-8 IHPFH	Projektgruppe Peptidsynthese der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter-Michael Klötzel, Leitung Dr. Petra Henklein (Charité Berlin, Deutschland)
Antipain	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Aprotinin	Applichem (Darmstadt, Germany)
Bestatin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Captopril	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Chymostatin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Fluoreszenzbasiertes Al-Immuno-Assay-Kit	Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, USA)
Humanes Plasma	Freiwillige Probanden
Mäuse (C57BL/6)	Dr. Florian Weinberger (UKE, Institut für experimentelle Pharmakologie und Toxikologie)
Murines Blutplasma	Prof Dr. Horst Pagel (Universität zu Lübeck, Institut für Physiologie)

2.12.5 Software

Software	Hersteller
Chemstation	Agilent Technologies
GraphPad Prism 4	GraphPad Software Inc. (La Jolla, USA)
HPLC: ChemStation (Rev. B.01.03)	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Mass Hunter Workstation Version	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Microsoft Office Professional Edition 2003	Microsoft (USA)
Peptide Digester Software	AG Prof. Dr. Knut Reinert (Freie Universität Berlin)
QQQ und nanoHPLC: MassHunter Aquisition (Version B.02.01) und Qualitative Analysis (Version B.02.00)	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Reflex IV: flexControl und flexAnalysis	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
Sonographie: Vevo2100	Visualsonics (Toronto, Kanada)

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Angiotensin 1-10-metabolisierenden Aktivitäten in humanem Plasma

3.1.1 Massenspektrometrischer Nachweis der Angiotensin 1-10-metabolisierenden Aktivitäten in humanem Plasma

Die Angiotensin 1-10 (A1-10)-metabolisierende Aktivität in humanem Plasma wurde mithilfe eines Massenspektrometrie-basierten Enzymassays (MES-Assay)¹⁸⁴ untersucht. Hierfür wurden humane Plasmaproteine an CNBr-aktivierte Sepharosebeads immobilisiert und anschließend mit A1-10 (Aminosäuresequenz: DRVYIHPFHL) inkubiert. Während der Inkubation wurden zu definierten Zeitpunkten Aliquots aus der Reaktionslösung entnommen. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mit einem Matrix-unterstützten Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometer (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer*, MALDI-TOF-MS). Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 11 zu sehen.

Um zu überprüfen, ob die zur Immobilisierung verwendeten Chromatographiepartikel oder Bestandteile des Substratpuffers zu einer Spaltung des Peptidsubstrates A1-10 führen, wurde A1-10 mit Glycin-derivatisierten Chromatographiepartikeln ohne Proteine inkubiert (Kontrolle). In dieser Kontrolle wurden nach 24stündiger Inkubation lediglich 4 Peaks detektiert, welche anhand ihrer m/z -Werte keinem Angiotensin-Metaboliten zugeordnet werden konnten. Da diese Peaks nicht auf die proteolytische A1-10-prozessierende Aktivität der Plasmaproteine zurückzuführen sind, wurden diese nicht in die Auswertung der Spektren der Inkubation von Plasmaproteinen mit A1-10 einbezogen.

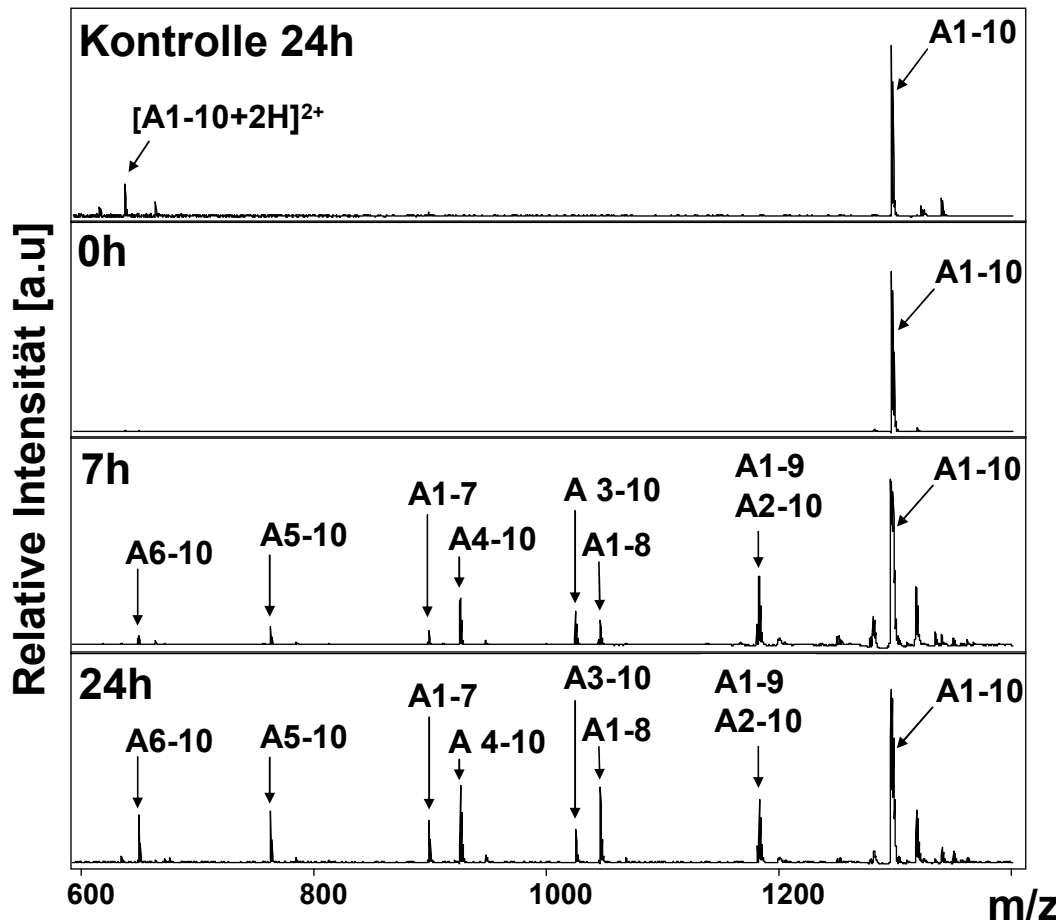


Abbildung 11. MALDI-Spektren der Reaktionsprodukte nach Inkubation von 10^{-5} M A1-10 mit humanen Plasmaproteinen. Aliquots der Reaktionslösungen wurden nach 0h, 7h und 24h analysiert. MALDI-Signale, die Angiotensin-Peptiden zugeordnet werden konnten, sind mit einem Pfeil markiert. Kontrolle: Glycin-derivatisierte Sepharosebeads ohne Protein.

In Reaktionslösungen der Inkubation von A1-10 mit immobilisierten humanen Plasmaproteinen wurden mehrere Peaks nach 7stündiger Inkubation detektiert, deren Signalintensität sich mit fortschreitender Inkubationszeit weiter erhöhte. Durch Vergleich der gemessenen m/z -Werte der Peaks mit den theoretischen m/z -Werten möglicher Angiotensin-Reaktionsprodukte wurden mehrere Angiotensin-Peptide identifiziert, die in Tabelle 10 aufgelistet sind.

Da die m/z -Werte von A1-9 sowie A2-10 nah beieinander liegen, überlappen sich die MALDI-Signale beider Peptide im MALDI-Spektrum (vgl. Abbildung 41). Die Präsenz von A2-10 wurde daher erst kurz vor Beendigung des experimentellen Teils dieser Arbeit entdeckt. Aus diesem Grund sind in einigen der nachfolgend gezeigten Ergebnisse keine Daten zu A2-10 vorhanden.

Tabelle 10. Proteolyseprodukte der Inkubation von A1-10 mit immobilisierten humanen Plasmaproteinen. Gezeigt sind die m/z-Werte der einfach protonierten Peptidionen der MALDI-Massenspektren aus Abbildung 11 mit den zugeordneten Peptidsequenzen und ihren theoretischen m/z-Werten.

Angiotensin-Peptid	Aminosäuresequenz	Gemessener m/z-Wert [M+H]⁺	Theoretischer m/z Wert [M+H]⁺
A1-10	DRVYIHPFHL	1297,2	1296,7
A1-9	DRVYIHPFH	1183,5	1183,6
A1-8	DRVYIHPF	1046,9	1046,5
A1-7	DRVYIHP	899,9	899,5
A2-10	RVYIHPFHL	1181,6	1181,7
A3-10	VYIHPFHL	1025,5	1025,1
A4-10	YIHPFHL	926,4	925,8
A5-10	IHPFHL	763,4	763,3
A6-10	HPFHL	650,3	650,1

Abbildung 12 und Abbildung 13 zeigen MALDI-Spektren der bei der Inkubation von Maus- bzw. Ratten-Plasmaproteinen mit A1-10 entstandenen Reaktionsprodukte. In beiden Kontrollansätzen traten nach 6stündiger Inkubation der Glycin-derivatisierten Chromatographiepartikel mit A1-10 neben dem Substratpeak keine zusätzlichen Signale auf.

Nach 3stündiger Inkubation von A1-10 mit Plasmaproteinen der Maus wurden die Signale der Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10, A1-9, A1-8 sowie A1-7 gemessen. Zu einem Inkubationszeitpunkt von acht Stunden waren lediglich noch das Signal des Peptidsubstrates A1-10 sowie des Reaktionsproduktes A1-8 vorhanden.

Nach Inkubation von Plasmaproteinen der Ratte mit A1-10 wurden nach einer Stunde mehrere Peaks detektiert, bei denen es sich um A2-10, A3-10, A4-10, A5-10, A1-9, A1-8 und A1-7 handelte. Nach 8stündiger Inkubation waren ausschließlich Signale von A5-10, A1-8 und A1-7 vorhanden, wobei die Signalintensität der beiden Letztgenannten hier im Vergleich zu Spektren früherer Inkubationszeitpunkte zunahm.

Bis auf A6-10, dessen Signal in den Spektren der Inkubation muriner Plasmaproteine mit A1-10 nicht detektiert werden konnte, ließen sich alle Reaktionsprodukte den

bereits in Tabelle 10 aufgelisteten Angiotensin-Peptiden zuordnen. Dies zeigt, dass die proteolytischen Aktivitäten in murinem Plasma zwar Ähnlichkeiten mit denen von humanem Plasma aufweisen, jedoch keine vollständige Kongruenz zwischen den Spezies besteht.

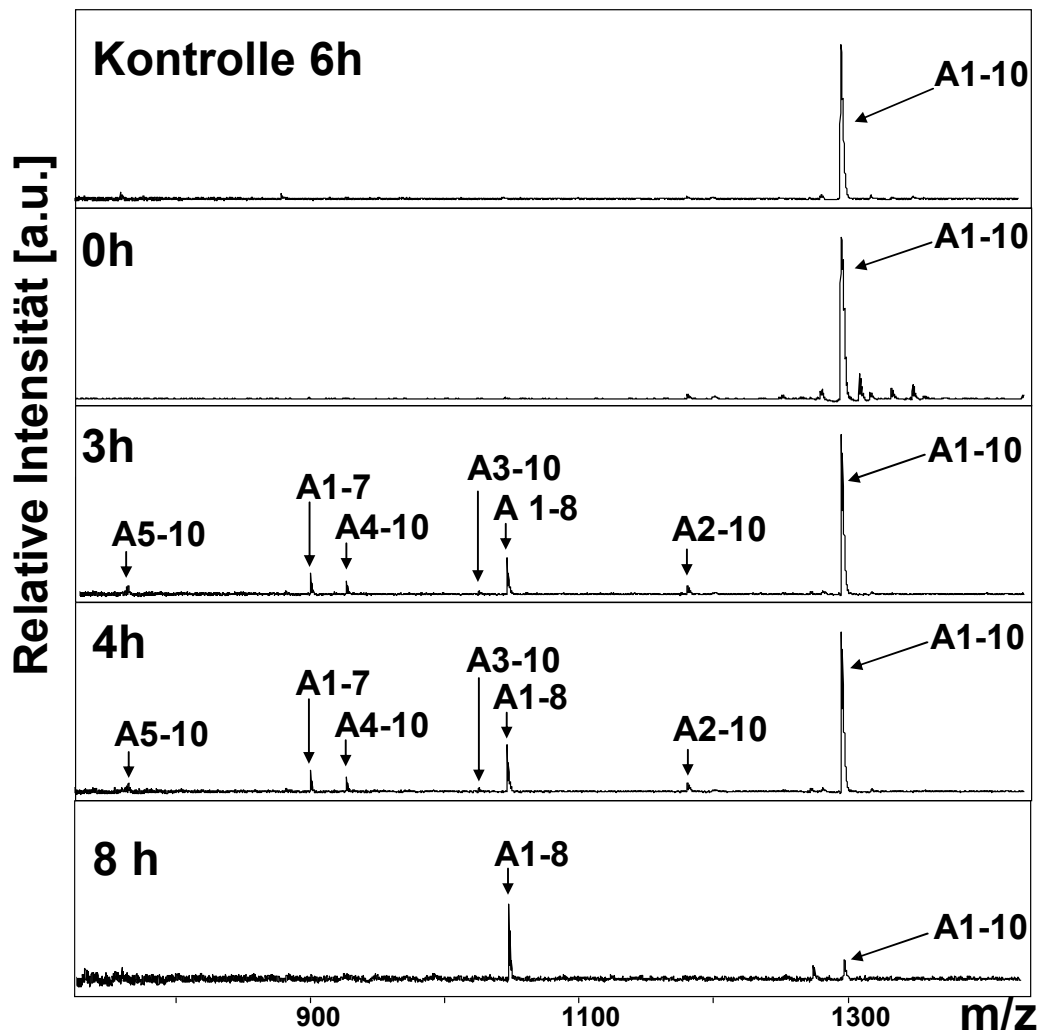


Abbildung 12. MALDI-Spektren der Reaktionsprodukte nach Inkubation von 10^{-5} M A1-10 mit immobilisierten Maus-Plasmaproteinen. Aliquots der Reaktionslösungen wurden nach 0h, 3h, 4h, und 8h analysiert. MALDI-Signale, die Angiotensin-Peptiden zugeordnet werden konnten, wurden mit einem Pfeil markiert. Kontrolle: Glycin-derivatisierte Sepharosebeads ohne Protein.

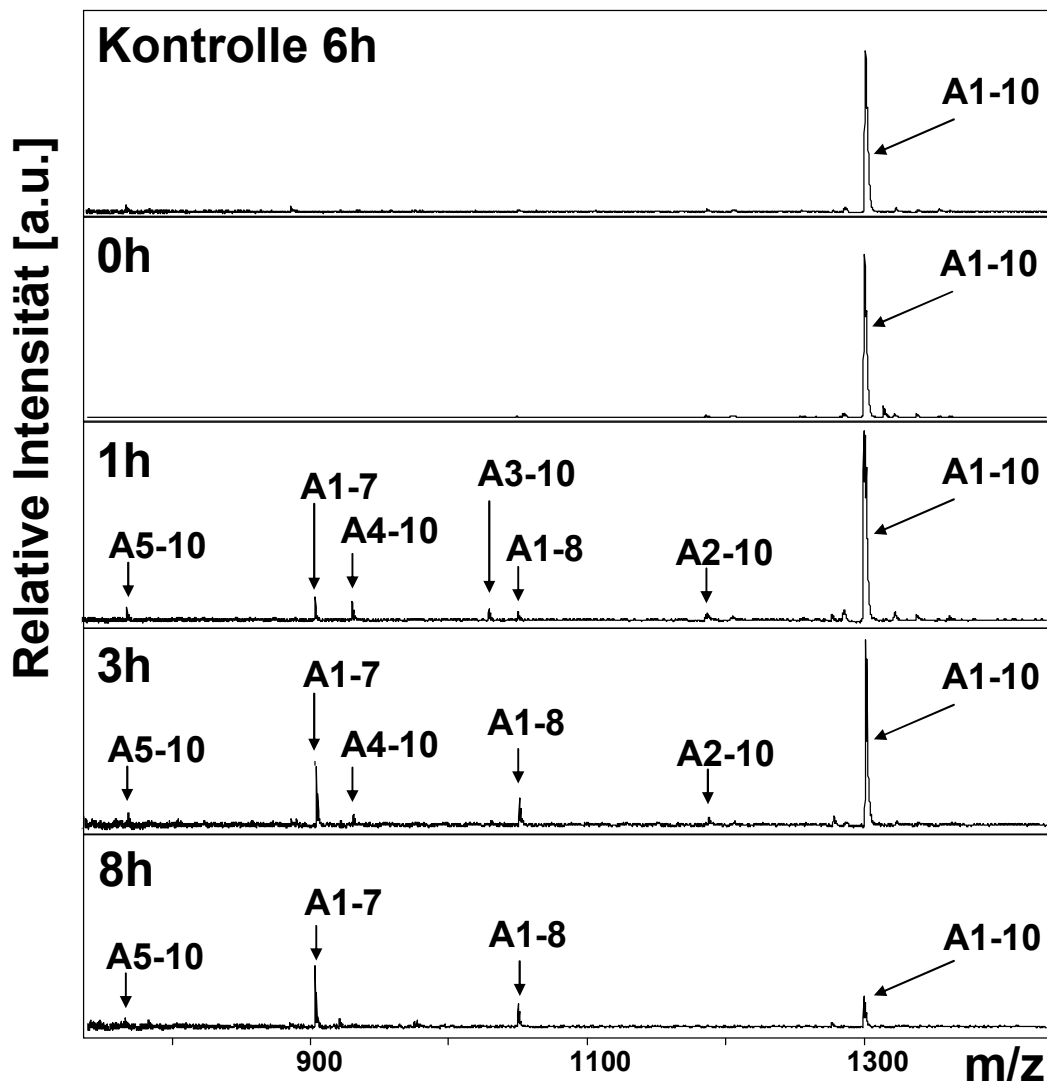


Abbildung 13. MALDI-Spektren der Reaktionsprodukte nach Inkubation von 10^{-5} M A1-10 mit immobilisierten Plasmaproteinen der Ratte. Aliquots der Reaktionslösungen wurden nach 0h, 1h, 3h und 8h analysiert. MALDI-Signale, welche Angiotensin-Peptiden zugeordnet werden konnten, sind mit einem Pfeil markiert. Kontrolle: Glycin-derivatisierte Sepharosebeads ohne Protein.

In der Literatur wurde beschrieben, dass A1-8 als Substrat für die proteolytische Bildung der Angiotensin-Peptide A1-7¹⁸⁹, A2-8¹⁹⁰ und A3-8¹⁹¹ dienen kann. Die Angiotensin-Peptide A2-8 und A3-8 wurden bereits endogen im Plasma nachgewiesen. Daher kann vermutet werden, dass diese Peptide auch aus A1-8 in Gegenwart von Plasmaproteinen entstehen. Es wurden jedoch nach Inkubation von A1-10 mit humanen oder murinen Plasmaproteinen keine MALDI-Signale für A2-8 und A3-8 detektiert (vgl. Abschnitt 3.1.1)

In diesen Inkubationsexperimenten wurde A1-10 in einer Konzentration von 10^{-5} M mit humanen Plasmaproteinen inkubiert. Da während der Inkubation eine Vielzahl von

Angiotensin-Peptiden generiert wird (siehe Tabelle 10), ist die entstehende Konzentration an A1-8, dem Vorläuferpeptid der Angiotensin-Peptide A2-8 und A3-8, möglicherweise nicht hoch genug, um A2-8 und A3-8 in detektierbaren Mengen zu generieren, die noch über der Nachweisgrenze des MALDI-MS liegen.

Aufgrund dessen wurde die Angiotensin1-8-metabolisierende Aktivität in humanem Plasma mit dem MES-Assay bestimmt. Dafür wurden immobilisierte Plasmaproteine mit 10^{-5} M A1-8 inkubiert und die zu definierten Zeitpunkten abgenommenen Reaktionslösungen mit MALDI-MS analysiert. Die MALDI-Spektren nach der Analyse sind in Abbildung 14 dargestellt.

Mit zunehmender Inkubationszeit konnte die Bildung von A1-7 beobachtet werden. Es traten mehrere Peaks im Massenbereich von 400-600 Da auf, welche sowohl bereits direkt nach dem Start der Inkubation, als auch im Kontrollansatz zu beobachten waren. Diese Peaks konnten keinen Angiotensin-Peptiden zugeordnet werden. Vermutlich handelt es sich dabei um Peaks von Photoreaktionsprodukten der MALDI-Matrix DHB.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Signale der A1-8-derivate A2-8 und A3-8 selbst in Anwesenheit hoher Konzentrationen von A1-8 nicht in den MALDI-Spektren detektiert werden können. Daher kann die Aussage getroffen werden, dass diese Peptide nicht durch humane Plasmaproteasen aus A1-8 generiert werden. A1-7 stellt das einzige Reaktionsprodukt dar, welches in Gegenwart immobilisierter Plasmaproteine aus dem Substrat A1-8 entsteht.

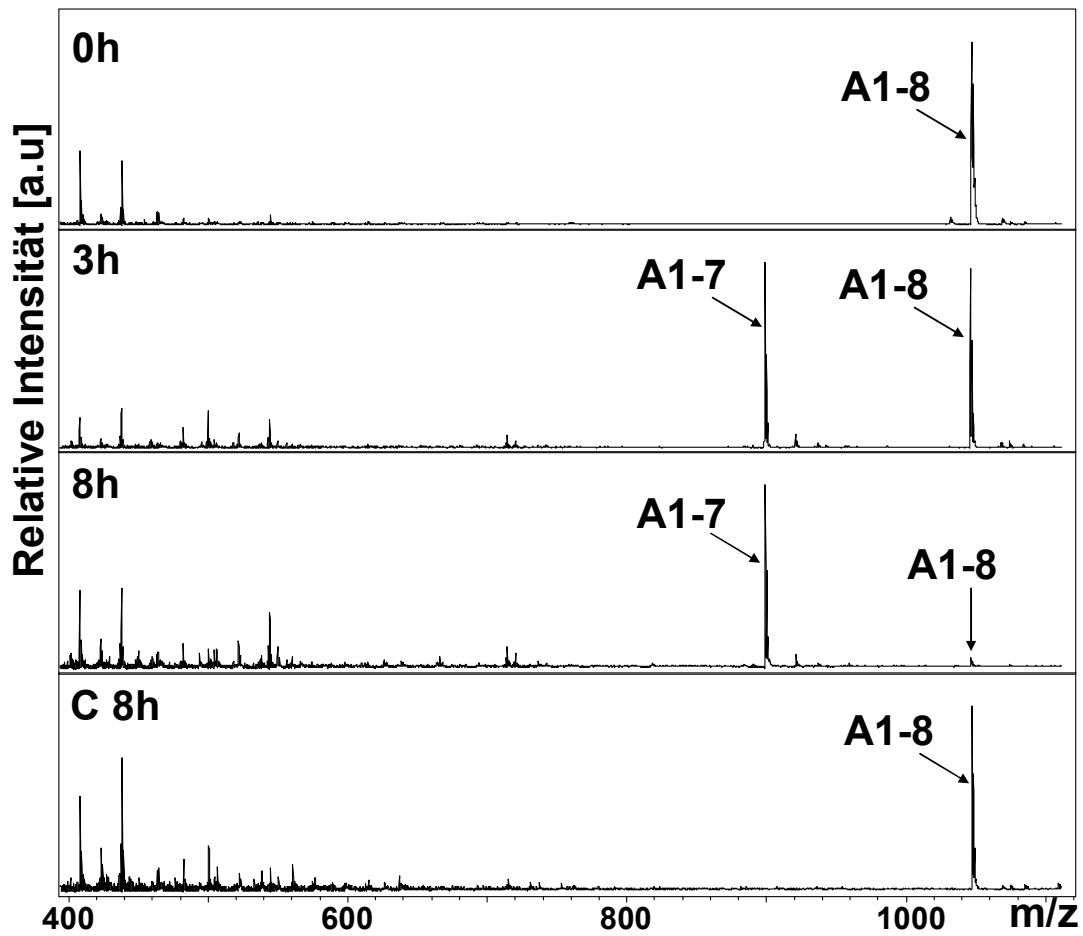


Abbildung 14. MALDI-Spektren der Reaktionsprodukte nach Inkubation von 10^{-5} M A1-8 mit immobilisierten humanen Plasmaproteinen. Aliquots der Reaktionslösung wurden nach 0h, 3h und 8h analysiert. MALDI-Signale, welche Angiotensin-Peptiden zugeordnet werden konnten, sind mit Pfeilen markiert. Kontrolle: Glycin-derivatisierte Sepharosebeads ohne Protein.

3.1.2 Untersuchung des Desorptions- und Ionisationsverhaltens von Angiotensin-Peptiden mittels MALDI-MS

Um die Nachweisgrenze der Angiotensin-Peptide zu bestimmen sowie um zu prüfen, ob die in Abschnitt 3.1 gemessenen Angiotensin-Peptide die Signale der A1-8-Metabolite supprimieren, wurde eine Verdünnungsreihe eines äquimolaren Gemisches aus den Angiotensin Peptiden A3-10, A4-10, A5-10, A6-10, A2-8, A3-8, A4-8, A5-8 und A6-8 auf einen MALDI-Probenteller aufgetragen, mit der MALDI-Matrix DHB vermischt und nach Trocknung der Proben mit MALDI-MS analysiert. Die Ergebnisse dieser MALDI-Messung sind in Abbildung 15 dargestellt.

Lagen die Angiotensin-Peptide in 10^{-5} M oder 10^{-6} M Konzentration vor, konnten alle im Gemisch enthaltenen Angiotensin-Peptide anhand ihrer m/z-Werte identifiziert werden. In einer Konzentration von 10^{-7} M gelang dies ebenfalls, ausgenommen für A6-8, dessen Nachweisgrenze hier erreicht war. Die Signalintensitäten der von A1-8-abgeleiteten Angiotensin-Peptide waren jedoch insgesamt etwas niedriger als die der von A1-10 abstammenden Angiotensin-Peptide. Dieser Effekt ist vermutlich durch den höheren Gehalt basischer Aminosäuren in den A1-10 abstammenden Peptiden im Vergleich zu den A1-8-abstammenden Peptiden begründet. Die Aminosäuren Arginin, Histidin und Lysin besitzen nachweislich eine hohe Basizität und damit eine hohe Protonenaffinität.¹⁹²⁻¹⁹⁴ Dies begünstigt die Ionisierbarkeit und hat deshalb hohe Signalintensitäten der Peptidionen zur Folge. Die Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10, A5-10, A6-10 enthalten jeweils 2 Histidine sowie ein C-Terminales Lysin, wohingegen die Angiotensin-Peptide A3-8, A4-8, A5-8 und A6-8 lediglich ein Histidin enthalten. A2-8 besitzt zusätzlich ein C-terminales Arginin.

Zusammenfassend zeigen die in Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse, dass alle untersuchten Angiotensin-Peptide selbst in gering konzentrierter Lösung ein gutes Desorptions- und Ionisationsverhalten aufweisen. Zudem kann darauf geschlossen werden, dass das Vorliegen der Angiotensin-Peptide in einer äquimolaren Mischung nicht zur übermäßigen Supprimierung einzelner Angiotensin-Peptid-Signale führt.

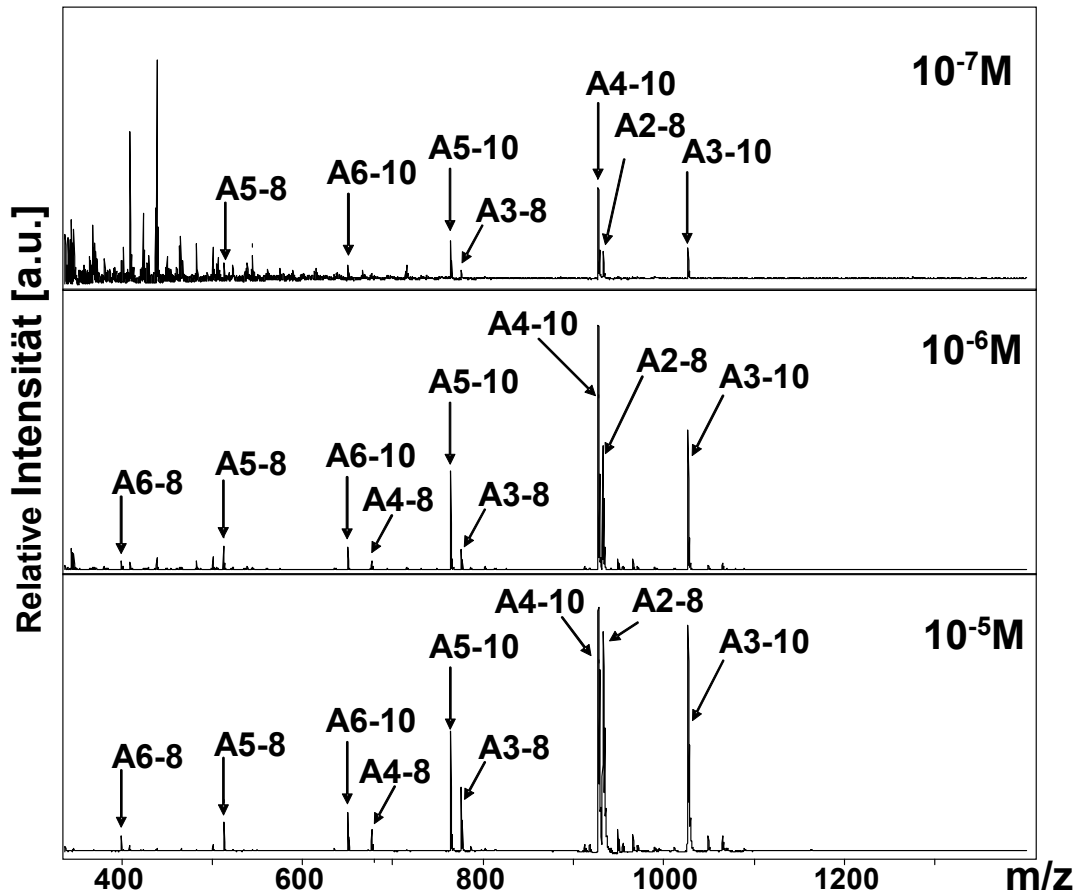


Abbildung 15. MALDI-Spektren verschiedener Angiotensin-Peptide unterschiedlicher Konzentrationen. Dargestellt sind die MALDI-Spektren der Verdünnungsreihe einer äquimolaren Lösung, welche A3-10, A4-10, A5-10, A6-10, A2-8, A3-8, A4-8, A5-8 und A6-8 enthält. Die Signale sind den entsprechenden Angiotensin-Peptiden zugeordnet und durch Pfeile markiert.

3.1.3 Validierung der Angiotensin1-10-metabolisierenden Aktivitäten in humanem Plasma mit LC-ESI-IT-MS

Obwohl bei der Inkubation eines einzelnen Substrates wie A1-10 mit einem komplexen Proteingemisch nur eine absehbare Anzahl an möglichen Reaktionsprodukten generiert werden kann, ist die Identifizierung anhand von MS-Daten problematisch, wenn Reaktionsprodukte gleicher m/z Werte, jedoch mit unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung generiert werden. Eine eindeutige Identifizierung der Peptid-Signale anhand ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses ist in solchen Fällen nicht möglich.

Aufgrund dessen wurden die Reaktionslösungen des MALDI-MS basierten MES-Assay aus Abschnitt 3.1.1 nochmals mithilfe eines Tandem-fähigen Massenspektrometers untersucht. Für diese Analysen wurde ein Flüssigkeitschromatographie gekoppeltes (*Liquid chromatography*, LC) Elektrospray-ionisations-Ionenfallen-Massenspektrometer (ESI-IT-MS) verwendet.

Die Bestimmung einer Aminosäuresequenz eines Peptids mittels Tandem-MS wird im Folgenden erläutert. Zunächst wird der zu untersuchende Analyt, in diesem Falle ein Angiotensin-Peptid, in der ESI-Ionenquelle desolvatisiert und ionisiert. Detektiert man die Gesamtheit der Molekül-Ionen, welche die Ionenfalle passiert haben, erhält man ein MS-Spektrum. Anhand des MS-Spektrums wird im Anschluss ein definiertes Peptidion (Elternion) selektiert, welches dann im Massenspektrometer isoliert und nach Zuführen eines Kollisionsgases durch Kollisions-induzierte Dissoziation (CID) fragmentiert wird. Dieser Fragmentierungsmechanismus führt nachweislich vorwiegend zur Generierung sogenannter γ - und b -Fragmentationenserien.^{195, 196} Beiden Fragmentierungsarten gemeinsam ist der Bruch zwischen dem Kohlenstoff- und dem Stickstoffatom innerhalb des Peptidrückgrats. Dabei tragen alle Fragmentionen einer γ -Fragmentationenserie die Ladung am ursprünglichen C-Terminus, die einer b -Ionenserie am ursprünglichen N-Terminus. Durch Detektion der Fragmentionen erhält man ein MS/MS-Spektrum, auch Fragmentspektrum genannt. Anhand des MS/MS-Spektrums lässt sich die Aminosäuresequenz und somit die Identität eines Peptids anhand der Massendifferenzen zweier benachbarter Signale aus den γ - bzw. b -Ionenserien bestimmen.

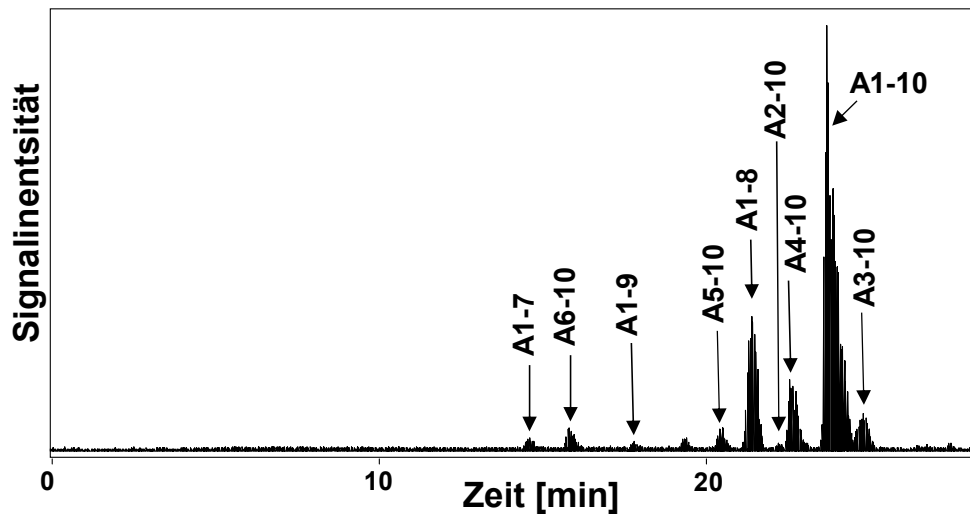


Abbildung 16. Chromatogramm nach Trennung von Angiotensin-Peptiden mittels RP-HPLC. Gezeigt ist das Base-Peak-Chromatogramm der Reaktionslösung nach 24stündiger Inkubation von A1-10 mit humanen Plasmaproteinen nach Analyse mit LC-ESI-IT-MS. Die Retentionszeiten der jeweiligen Angiotensin-Peptide sind mit Pfeilen markiert.

Vor der massenspektrometrischen Analyse der Angiotensin-Peptide aus der Reaktionslösung nach 24stündiger Inkubation humaner Plasmaproteine mit A1-10 erfolgte zunächst die Trennung der in der Reaktionslösung enthaltenen Peptide entsprechend ihrer Hydrophobizität über eine *Reversed-Phase* (RP)-Chromatographie-Säule, welche mit dem ESI-IT-MS gekoppelt war. Die Peptide wurden über einen Lösungsmittelgradienten von der Säule eluiert und anschließend in der ESI-Ionenquelle ionisiert und desolvatisiert. Die Selektion und die Fragmentierung der ionisierten Analyten fanden im Ionenfallen-Massenanalysator statt.

Das resultierende Base-Peak-Chromatogramm ist in Abbildung 16 dargestellt: Im Base-Peak-Chromatogramm werden die Intensitäten der Peaks mit der höchsten Signalintensität zum Zeitpunkt ihrer Detektion dargestellt. Die Retentionszeiten der jeweiligen in der Reaktionslösung identifizierten Angiotensin-Peptide sind mit Pfeilen markiert. Aus dem Base-Peak-Chromatogramm wurden anschließend die MS- und MS/MS-Daten extrahiert.

In Abbildung 17 sind die MS/MS-Spektren der Angiotensin-Peptide dargestellt und die y- und b-Ionenserien den Signalen im Spektrum zugeordnet. Somit wurde durch die ESI-IT-MS-Analyse validiert, dass in der Reaktionslösung nach 24stündiger Inkubation humaner Plasmaproteine mit A1-10 alle in Tabelle 10 angegebenen Angiotensin-Peptide vorliegen.

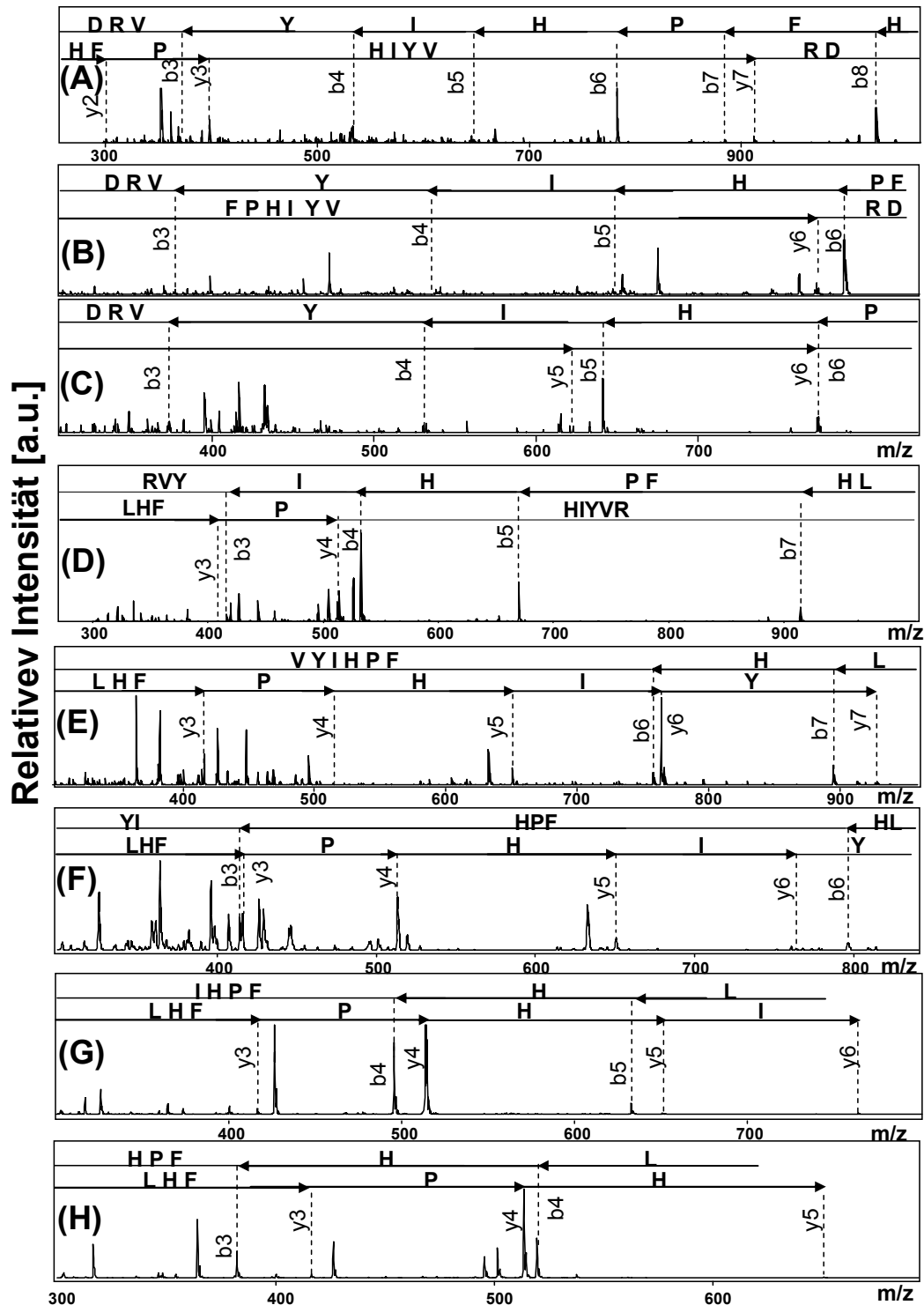


Abbildung 17. LC-ESI-IT-MS/MS-Spektren der Reaktionsprodukte A1-9 (A), A1-8 (B), A1-7 (C), A2-10 (D), A3-10 (E), A4-10 (F), A5-10 (G), A6-10 (H) nach Inkubation von A1-10 mit humanen Plasmaproteinen. Die Analyse der Reaktionslösung erfolgte nach 24h. Die Fragmentierung erfolgte mit CID. Identifizierte b- and y-Fragmentionen wurden mit unterbrochenen Linien, die dazugehörigen Aminosäuresequenzen der Angiotensin-Peptide mit durchgängigen Pfeilen markiert.

3.1.4 Untersuchung des Einflusses der Immobilisierung humaner Plasmaproteine auf die Angiotensin-generierenden Aktivitäten in humanem Plasma

Die oben beschriebenen Experimente zur Untersuchung der Metabolisierung von A1-10 (vgl. Abschnitt 3.1.1) durch Plasmaproteine wurden mit immobilisierten Plasmaproteinen durchgeführt.

Die Immobilisierung der Proteine an Chromatographiepartikel erlaubt es Substanzen durch Waschen zu entfernen, welche mit der nachfolgenden massenspektrometrischen Analyse interferieren könnten. Ein weiterer Vorteil liegt darin, die Inkubation in einer Reaktionslösung der Wahl durchführen zu können. Die Immobilisierung der Proteine minimiert zudem deren proteolytischen Abbau durch die anwesenden Proteasen, welcher im ungünstigsten Fall den Verlust der betrachteten proteolytischen Aktivität zur Konsequenz haben kann.

Eine Vielzahl proteolytischer Aktivitäten humaner Plasmaproteasen werden durch abundante, zirkulierende Proteaseinhibitoren wie z. B. dem Plasmin-, Kallikrein- und Thrombin-Inhibitor Alpha-2-macroglobulin¹⁹⁷ reguliert. Lew *et al.* fanden heraus, dass die katalytische A1-7-generierende Aktivität des ACE-2, einer im zirkulierenden RAS wirkenden Protease, im Plasma durch einen endogenen Inhibitor maskiert ist, welcher sich chromatographisch abtrennen ließ.¹⁹⁸

Eine Verdünnung des Plasmas kann mit dem Abdissoziieren von Inhibitoren oder von Kofaktoren einhergehen, wie beispielsweise für Cathepsin B gezeigt wurde.¹⁹⁹ Das Waschen der immobilisierten Proteine könnte also zu einer Abreicherung endogener Protease-Cofaktoren oder –Inhibitoren führen und somit die proteolytischen Aktivitäten im Plasma auf unerwünschte Art und Weise modulieren. Daher muss ausgeschlossen werden, dass der Prozess der Immobilisierung zu einem Verlust der Proteaseinhibitoren oder zur Abdissoziation von Cofaktoren von den an der Generierung der Angiotensin-Peptide beteiligten Proteasen führt.

Um zu prüfen, ob die A2-10, A3-10-, A4-10-, A5-10- und A6-10-generierende Aktivität in humanem Plasma das Ergebnis einer durch die Immobilisierung demaskierten proteolytischen Aktivität ist, oder ob eine Dissoziation bzw. Abtrennung von essenziellen Kofaktoren eine Rolle spielt, wurde humanes unbehandeltes Plasma

sowie mit HPLC-Wasser um den Faktor 1000 verdünntes Plasma mit A1-10 inkubiert und die Menge der entstandenen Angiotensin-Peptide in den erhaltenen Reaktionslösungen mittels SRM-gekoppelter LC-ESI-QQQ-MS relativ quantifiziert. Das Resultat der SRM-Analysen ist in Abbildung 18 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass alle bei der Inkubation immobilisierter humaner Plasmaproteine entstandenen Angiotensin-Peptide (vgl. Abbildung 11), auch in unverdünntem sowie in verdünntem Plasma generiert wurden.

In unverdünntem Plasma wurde A1-10 bereits innerhalb 0,5h in die Angiotensin-Peptide A1-8, A1-7, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 konvertiert. Die maximale Menge an A1-9 und A2-10 lag bereits bei 0h vor. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass diese Peptide bereits einige Sekunden nach der Zugabe des Substrates A1-10 von Plasmaproteasen generiert wurde, was auf eine hohe A1-9- und A2-10 generierende Aktivität im Plasma schließen lässt. Nach 1stündiger Inkubation waren die meisten Angiotensin-Peptide, ausgenommen A1-8 und A1-9, nicht mehr nachweisbar.

Wurde 1:1000 verdünntes Plasma mit A1-10 inkubiert, stieg die Menge der Angiotensin-Peptide in Abhängigkeit der Inkubationszeit an, wobei die maximal gebildete Menge dabei generierten Angiotensin-Peptide, A5-10 und A3-10 nach 8h, die Menge aller weiteren Angiotensin-Peptide nach 24h gemessen wurde. Eine Ausnahme bildete hierbei A2-10, dessen maximale Menge nach 0,5h gemessen wurde. Nach 24h wurde kaum noch A2-10 in der Reaktionslösung detektiert.

Anhand dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die Immobilisierung bis auf eine Verlangsamung der Angiotensin-Generierung keine signifikanten Änderungen der Angiotensin-generierenden Aktivitäten bewirkt. Infolge dessen wurden alle Inkubationen mit immobilisierten Proteinen durchgeführt.

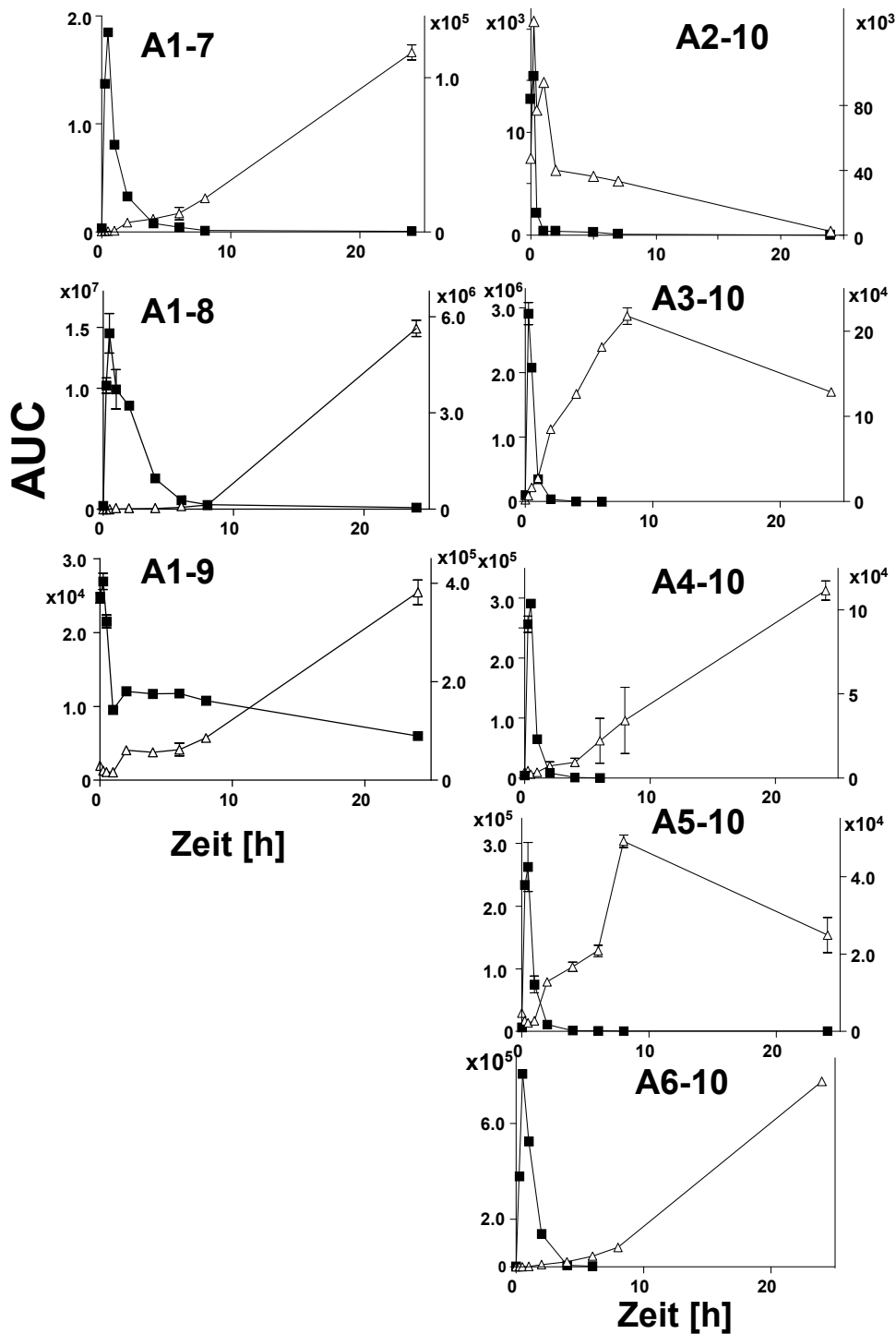


Abbildung 18. Zeitabhängiger Verlauf der relativen Mengen der nach Inkubation von 10^{-5} M A1-10 mit unbehandeltem und verdünntem humanem Plasma entstandenen Reaktions-produkte. Abgebildet sind die Flächen unter den Kurven (AUC) von A1-10, A1-9, A1-8, A1-7, A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 des SRM-MES. Verdünnungen: reines Plasma (schwarze Quadrate) 1:1000 (weiße Dreiecke). Die rechte Y-Achse bezieht sich auf die AUCs des reinen Plasmas, die linke auf die AUCs des verdünnten Plasmas. Aliquots der Reaktionslösungen wurden mit SRM-gekoppelter LC-ESI-QQQ-MS nach 0h, 0,25h, 0,5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h und 24h analysiert.

3.2 Untersuchungen der Generierung humaner Angiotensin-Peptide

3.2.1 Untersuchung der zeitabhängigen Generierung der Angiotensin-Peptide

Zur Untersuchung der zeitabhängigen Generierung der Angiotensin-Peptide wurde die A1-10-metabolisierende Aktivität über den MES-Assay bestimmt. Während der Inkubation immobilisierter humaner Plasmaproteine mit A1-10 wurden zu definierten Zeitpunkten Aliquots aus der Reaktionslösung entnommen und die Reaktionsprodukte mit einem Flüssigkeitschromatographie-gekoppelten Elektrospray-Ionisations-Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (LC-ESI-MS) analysiert und die Reaktionsprodukte mithilfe einer Selected-Reaction-Monitoring (SRM)-basierten Methode relativ quantifiziert. Bei einer SRM-Messung wird ein definiertes Elternion im Massenspektrometer selektiert, isoliert und anschließend fragmentiert. Durch die Messung der Signalintensität eines definierten Fragmentions wird sowohl eine hohe Selektivität als auch eine hohe Sensitivität gewährleistet.

Durch die vorgeschaltete RP-Chromatographiesäule werden die in der Reaktionslösung enthaltenen Angiotensin-Peptide zunächst ihrer Hydrophobizität nach getrennt und durch einen Lösungsmittelgradienten eluiert. Trägt man die Intensität des gemessenen Angiotensin-Fragmentions gegen die Retentionszeit der Chromatographie auf, erhält man ein SRM-Chromatogramm. Die relative Quantifizierung der Angiotensin-Peptide gelingt durch Integration der Peakfläche (area under the curve, AUC) des SRM-Signals. Stellt man die AUCs der jeweiligen Angiotensin-Peptide in Abhängigkeit ihrer Inkubationszeit dar, erhält man schließlich indirekt die Information über die zum betrachteten Zeitpunkt in der Reaktionslösung vorliegende Menge des jeweiligen Peptids.

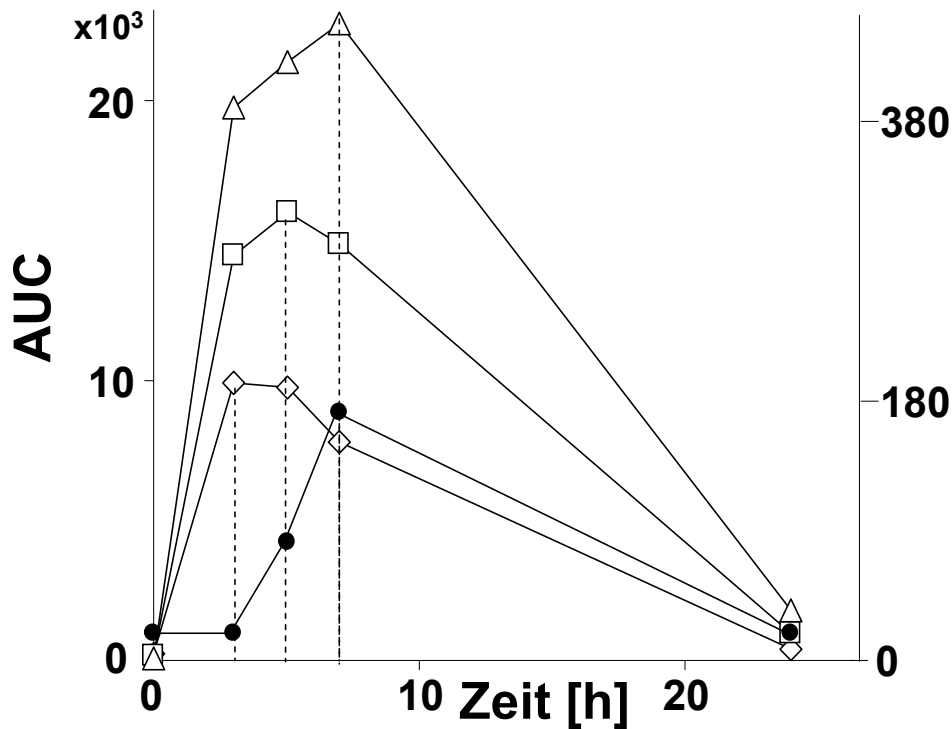


Abbildung 19. Zeitabhängiger Verlauf der relativen Mengen der nach Inkubation von 10^{-5} M A1-10 mit humanen Plasmaproteinen entstandenen Reaktionsprodukte. Abgebildet sind die Flächen unter den Kurven (AUC) von A3-10 (weiße Rauten), A4-10 (weiße Quadrate), A5-10 (weiße Dreiecke), A6-10 (schwarze Kreise) der SRM-Analyse nach Inkubation humaner Plasmaproteine mit 10^{-5} M A1-10. Die gemessenen Maxima der Kurven der Generierung der Angiotensin-Peptide wurden mit unterbrochenen Linien gekennzeichnet. Die rechte Y-Achse bezieht sich auf die AUCs von A6-10. Aliquots der Reaktionslösungen wurden mit LC-ESI-QQQ-SRM nach 0h, 3h, 5h, 7h und 24h analysiert.

Abbildung 19 zeigt die Mengen der Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 in Abhängigkeit der Inkubationszeit nach Inkubation von A1-10 mit humanen Plasmaproteinen. Es fällt auf, dass die Generierung dieser Peptide zeitlich versetzt stattfand. Die maximal gebildete Menge an A3-10 wurde bereits nach 3h erreicht. Die Maxima der Generierung von A4-10 lagen dagegen bei 5h, für A5-10 und A6-10 bei 7h. Nach 24stündiger Inkubation konnte keines der Angiotensin-Peptide mehr nachgewiesen werden.

Obwohl es sich hierbei um eine einzelne Analyse handelt, lassen die zeitlich versetzten maximalen gemessenen Mengen dieser Angiotensin-Peptide die Vermutung zu, dass die Peptide A4-10, A5-10 und A6-10 nicht einzeln durch Endoproteasen aus A1-10 generiert werden, sondern das Produkt sukzessiver Aminopeptidaseaktivität sind. Obwohl die generierte Menge an A2-10 in diesem

Experiment nicht gemessen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass nicht A3-10, sondern A2-10 den Startpunkt der proteolytischen Aminopeptidasekaskade im Plasma darstellt.

3.2.2 Nachweis der Angiotensin-metabolisierenden Aktivitäten von Angiotensin 2-10, Angiotensin 3-10, Angiotensin 4-10 und Angiotensin 5-10 in humanem Plasma

Die zeitlich versetzte Bildung der Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 deutet darauf hin, dass diese Peptide sukzessiv durch Aminopeptidaseaktivität aus A1-10 entstehen. Eine sukzessive Generierung setzt jedoch voraus, dass Proteasen im Plasma vorhanden sind, welche die Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, und A5-10 als Substrat erkennen und katalysieren können. Um dies zu prüfen, wurde die Angiotensin-generierende Aktivität in humanem Plasma unter Verwendung unterschiedlicher Angiotensin-Substrate mit dem SRM-gekoppelten MES-Assay untersucht. Es erfolgten jeweils Inkubationen von immobilisierten humanen Plasmaproteinen mit den Substraten A2-10, A3-10, A4-10 und A5-10. Die Mengen an A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 in den zu definierten Inkubationszeitpunkten abgenommenen Reaktionslösungen wurden anschließend über SRM-gekoppelte Analyse mit dem LC-ESI-QQQ-MS bestimmt. Das Ergebnis dieser SRM-Messung ist in Abbildung 20 dargestellt.

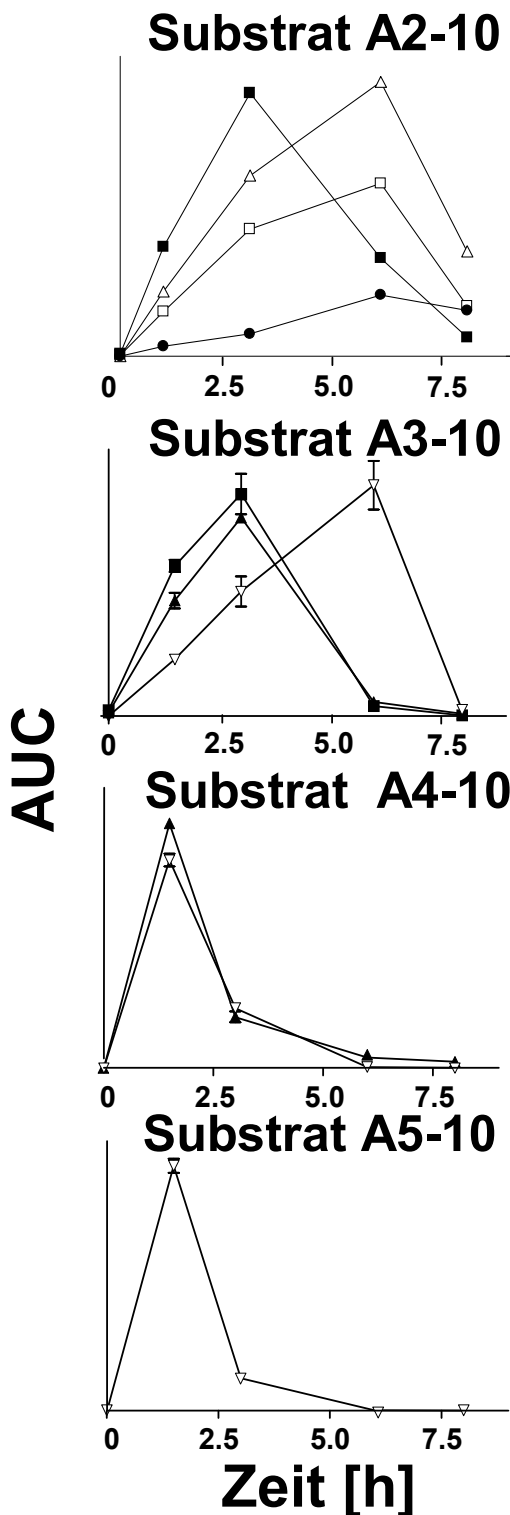


Abbildung 20. Zeitabhängiger Verlauf der relativen Mengen der nach Inkubation von 10^{-5} M A2-10, A3-10, A4-10 oder A5-10 mit humanen Plasmaproteinen entstandenen Reaktionsprodukte. Die Flächen unter den Kurven (area under the curve, AUC) der SRM- Signale der generierten Angiotensin-Peptide sind dargestellt. A4-10 (schwarze Quadrate), A5-10 (schwarze Dreiecke), A6-10 (weiße Dreiecke). Aliquots wurden mit LC-ESI-QQQ-SRM nach 0h, 3h, 5h, 7h und 24h analysiert. Die SRM-Daten sind, bis auf A2-10 ($n=1$), als Mittelwerte der Dreifachmessung \pm Standardabweichung dargestellt.

Es wurde beobachtet, dass alle Angiotensin-Substrate von humanen Plasmaproteasen proteolytisch prozessiert wurden. In der Reaktionslösung in der A2-10 als Substrat vorlag, entstanden in Abhängigkeit der Inkubationszeit A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10. Die höchste gemessene Menge an A3-10 wurde dabei nach 3h detektiert, die der Angiotensin-Peptide A4-10, A5-10 sowie A6-10 nach 6h. Bei der Inkubation von A3-10 mit humanen Plasmaproteinen entstanden die Reaktionsprodukte A4-10, A5-10 und A6-10. Die größte Menge an A4-10 und A5-10 entstand nach dreistündiger, an A6-10 erst nach sechsstündiger Inkubation. Nach Erreichen der maximal gebildeten Angiotensin-Mengen sank die Konzentration aller Angiotensin-Peptide bis zum Endzeitpunkt der Inkubation nach 8h.

In Gegenwart des Substrates A4-10 entstand sowohl A5-10 als auch A6-10, wobei die Verläufe ihre Generierung in Abhängigkeit Inkubationszeit starke Ähnlichkeiten aufweisen und die höchsten Mengen beider Angiotensin-Peptide nach anderthalb Stunden detektiert wurden.

In Gegenwart des Substrates A5-10 konnte die Generierung von A6-10 beobachtet werden. Wie auch bei der Inkubation mit A4-10 wurde die größte Menge an A6-10 hier ebenfalls in dem Ansatz nach anderthalbstündiger Inkubation von A5-10 mit humanen Plasmaproteasen gemessen.

Anhand dieser Ergebnisse wird sichtbar, dass die im humanen Plasma vorhandenen Proteasen nicht nur A1-10 sondern auch die Reaktionsprodukte A3-10, A4-10 und A5-10 als Substrat erkennen und diese zu den jeweils kleineren Angiotensin-Peptiden umsetzen können. Somit ist die Grundvoraussetzung zur Beteiligung von Exoproteasen an der Generierung der Angiotensin-Peptide erfüllt, was die Vermutung der sukzessiven Generierung der Angiotensin-Peptide unterstützt.

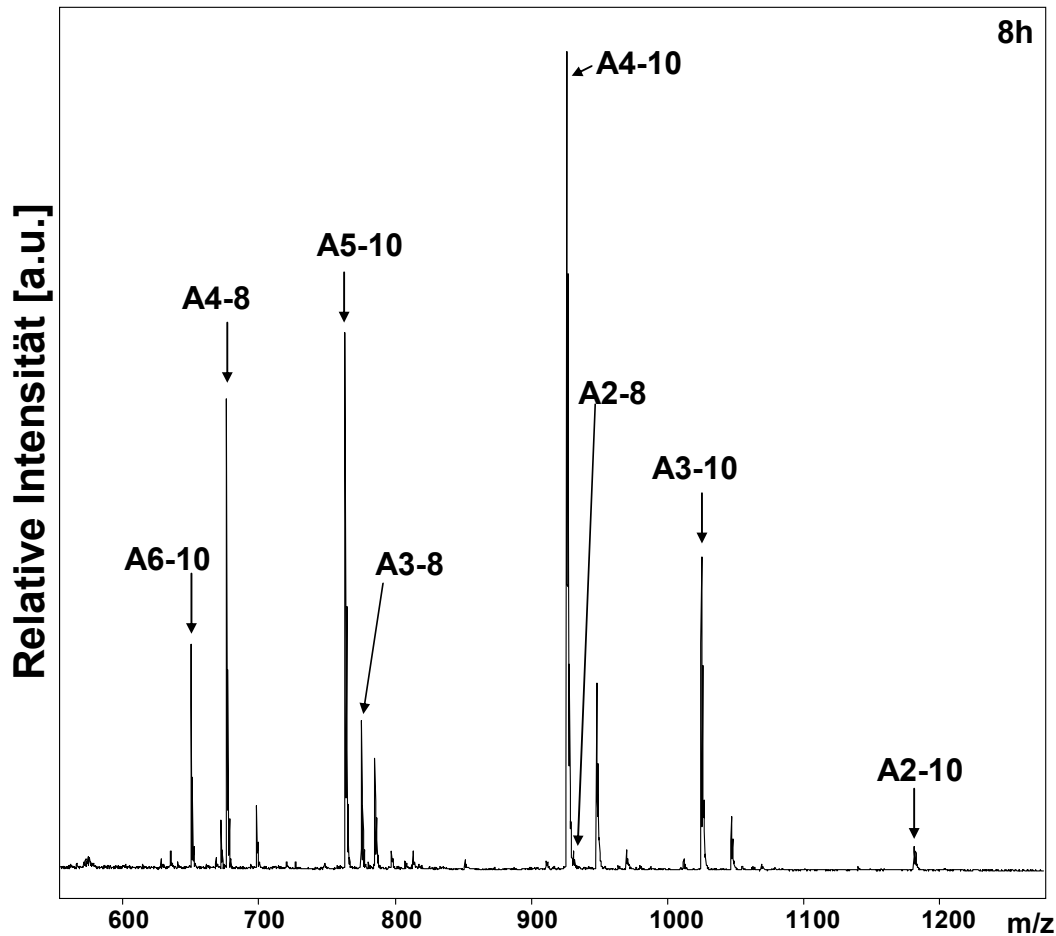


Abbildung 21. MALDI-Spektren der Reaktionsprodukte nach Inkubation von A2-10 mit humanen Plasmaproteinen. A2-10-Konzentration: 10^{-5} M. Aliquots der Reaktionslösungen wurden nach 8h analysiert. MALDI-Signale, die Angiotensin-Peptiden zugeordnet werden konnten, sind mit einem Pfeil markiert.

Ergänzend wurden die Reaktionslösung nach 8h einer Analyse mit dem MALDI-MS unterzogen (Abbildung 21). Hierbei zeigte sich, dass in der Reaktionslösung der Inkubation von A2-10 mit humanen Plasmaproteinen neben den Signalen der Angiotensin-Peptiden A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 auch die Signale der Peptide A2-8 ($m/z=931,5$), A3-8 ($m/z=775,4$) und A4-8 ($m/z=676,3$) detektiert wurden. Die Signalintensität von A2-8 war jedoch sehr gering. Dies deutet an, dass A2-8 in Gegenwart humaner Plasmaproteasen zügig proteolytisch in die Angiotensin-Peptide A3-8 und A4-8 umgesetzt wird. In den Inkubationsansätzen bei denen A3-10, A4-10 oder A5-10 als Substrat vorlag, wurde die Generierung dieser Peptide nicht beobachtet (nicht gezeigt). Dies kann als Indiz dafür gesehen werden, dass A2-8 das Ausgangssubstrat für eine sukzessive proteolytische Generierung von A-3-8 und A4-8 darstellt.

Dies würde ebenfalls erklären, weshalb die Generierung dieser Peptide bei der Inkubation von A1-10 mit humanen Plasmaproteinen nicht beobachtet wurde. Sofern A2-10 zügig in die Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 weiterprozessiert wird und steht es nicht oder nur geringfügig für die Generierung von A2-8 in der Reaktionslösung zur Verfügung.

Es kann hier jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die Angiotensin-Peptide A2-8, A3-8 oder A4-8 auch in den Inkubationsansätzen mit A3-10, A4-10 entstehen. Die Generierung dieser Reaktionsprodukte könnte aufgrund einer schnellen proteolytischen Hydrolyse in geringer Konzentration vorliegen, welche möglicherweise unter dem Detektionslimit des MALDI-MS liegt.

3.2.3 Untersuchungen der Angiotensin-generierenden Aktivität in humanem Plasma in An- und Abwesenheit von Protease-Inhibitoren

Um zu untersuchen, welche Proteaseklassen an der Generierung der Angiotensin-Peptide beteiligt sind, wurde die Angiotensin-generierende Aktivität in humanem Plasma in An- und Abwesenheit verschiedener Proteaseinhibitoren mithilfe des SRM-basierten MES-Assays bestimmt. Zu diesem Zweck wurden immobilisierte humane Plasmaproteine in Gegenwart der Proteaseinhibitoren Bestatin (kompetitiver Aminopeptidaseinhibitor), Antipain (inhibiert Proteasen der Trypsin-Familie), Chymostatin (Serin- und Cysteinproteaseinhibitor), Aprotinin (Serinproteaseinhibitor), EDTA (Metalloproteaseinhibitor), AEBSF (4-(2-aminoethyl)-benzensulfonylfluorid, Serinproteaseinhibitor), und Captopril (ACE-1-Inhibitor) mit A1-10 inkubiert. Als Referenz diente ein Inkubationsansatz in dem immobilisierte humane Plasmaproteine in Abwesenheit von Inhibitoren mit A1-10 inkubiert wurden. Nach 6h wurden Aliquots aus der Reaktionslösung entnommen und die enthaltenen Reaktionsprodukte über die SRM-Methode mit einem LC-ESI-MS/MS relativ quantifiziert. Das Experiment wurde drei Mal wiederholt. Die Ergebnisse der SRM-Messung sind in Abbildung 22 dargestellt. Um den Effekt der Inhibitoren direkt auf den Ansatz ohne Inhibitoren beziehen zu können, wurde der Quotient der AUCs der Ansätze mit Inhibitoren und dem Ansatz ohne Inhibitoren dargestellt.

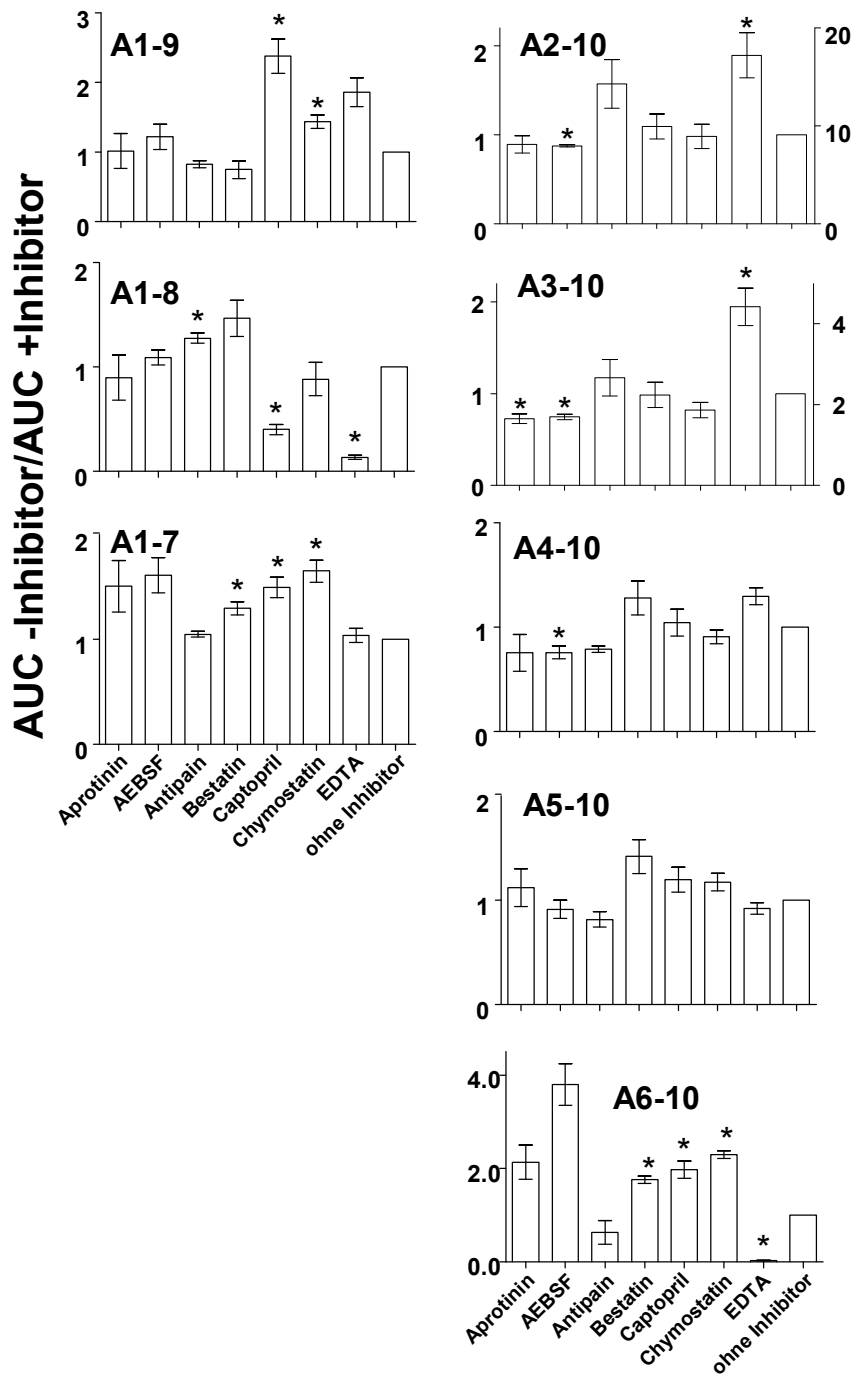


Abbildung 22. Relativen Mengen der nach 6stündiger Inkubation von A1-10 mit humanen Plasmaproteinen in an An- und Abwesenheit unterschiedlicher Protease-Inhibitoren entstandenen Reaktionsprodukte. Die Flächen unter den Kurven (AUC) der Angiotensin-Peptide der SRM-Messung nach einem MES-Assay mit verschiedenen Inhibitoren sind gezeigt. Eine 10^{-5} molare A1-10-Lösung wurde inkubiert mit immobilisierten humanen Plasmaproteinen in Gegenwart von 30 nM Aprotinin, 200 μ M AEBSF, 50 μ M Antipain, 150 μ M Bestatin, 10 μ M Captopril, 100 μ M Chymostatin, 100 μ M EDTA und ohne Inhibitor. Die SRM-Daten wurden als Mittelwert der Dreifachmessung \pm Standardabweichung dargestellt. Die rechte y-Achse der Profile von A2-10 und A3-10 beziehen sich auf die AUCs der Ansätze mit EDTA. Signifikante Änderungen ($P < 0.05$) der Mittelwerte im Vergleich zum Ansatz ohne Inhibitor wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Im Folgenden werden alle Ergebnisse in Gegenwart von Inhibitoren im Vergleich zum Inkubationsansatz ohne Inhibitoren dargestellt.

In Gegenwart von Antipain und Bestatin wurden verminderte Mengen an A1-9 im Vergleich zum Ansatz ohne Inhibitor detektiert. Die Verwendung von AEBSF und EDTA jedoch führten zu erhöhten Mengen an A1-9. In Gegenwart von Captopril, Chymostatin war die gebildete Menge an A1-9 signifikant erhöht.

EDTA und Captopril zeigten einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die A1-8-Generierung, wobei in Gegenwart von Aprotinin lediglich ein geringer Effekt beobachtet wurde. Signifikant höhere Mengen von A1-8 wurden in den Ansätzen mit Antipain gemessen. In den Ansätzen mit AEBSF und Bestatin wurde ebenfalls eine tendenziell erhöhte A1-8 Menge detektiert.

Die generierte Menge an A1-7 wurde durch keinen der verwendeten Inhibitoren vermindert. In Gegenwart von Antipain und EDTA konnte keine signifikante Änderung der A1-7-Menge im Vergleich zum Ansatz ohne Inhibitor beobachtet werden. Erhöhte Mengen von A1-7 wurden dagegen in den Ansätzen mit AEBSF, Bestatin, Captopril und Chymostatin beobachtet, wobei die Erhöhung lediglich in Gegenwart der drei letztgenannten Inhibitoren signifikant war.

Das Inhibitionsprofil von A2-10 zeigt eine verringerte Menge in Anwesenheit von AEBSF. Erhöhte Mengen an A2-10 wurden dagegen in Anwesenheit von EDTA, Antipain beobachtet. Alle weiteren Inhibitoren hatten keinen nennenswerten Effekt auf die Generierung von A2-10.

Eine Verminderung der Menge an A3-10 war bei der Verwendung von Aprotinin, AEBSF, Antipain und Chymostatin zu beobachten. Die Anwesenheit von Captopril im Inkubationsansatz führte zu keiner Veränderung der A3-10-generierenden Aktivität. Signifikant erhöhte Mengen an A3-10 wurden jedoch in Gegenwart von EDTA beobachtet. Bestatin führte ebenfalls zu einer erhöhten A3-10-Menge.

Im Inhibitionsprofil von A4-10 konnten ähnliche Effekte auf die generierten Mengen, wie sie auch für A3-10 beschrieben wurden, beobachtet werden. In Gegenwart von Antipain wurde eine signifikante Verringerung der gebildeten Menge an A4-10

detektiert. Insgesamt lassen die Inhibitionsprofile von A2-10, A3-10, A4-10 vermuten, dass diese Peptide durch eine Protease der Cystein/Serine-Familie handelt.

Die Generierung von A5-10 wurde durch AEBSF und Antipain sowie EDTA inhibiert. Letzteres lässt auf die Gegenwart einer Metalloprotease im Plasma mit A6-10-generierender Aktivität schließen. Im Gegensatz zur A3-10- und A4-10-Generierung führte die Gegenwart von Aprotinin hier zu erhöhten Mengen an A5-10.

Es wurde beobachtet, dass das Inhibitionsprofil der A6-10-Generierung deutliche Unterschiede im Vergleich zu denen der A3-10, A4-10 und A5-10-Generierung aufzeigt. EDTA führte hier zu einer signifikanten und nahezu vollständigen Inhibition der A6-10-generierenden Aktivität. Antipain führte dagegen zu einer geringen Inhibition. Signifikant erhöhte Mengen an A6-10 wurden in Anwesenheit von AEBSF, Bestatin, Captopril und Chymostatin detektiert.

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2 einbeziehend müsste bei einer sukzessiven Generierung der Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 der proteolytische Schnitt des A1-10 zwischen dem Asp1 und Arg2 zum A2-10 den terminierende Faktor für die Generierung der weiteren Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 darstellen.

Demnach müsste eine Inhibition der A2-10-generierenden Aktivität zu einer signifikant verringerten Menge an A4-10, A5-10 und A6-10 führen. Das die A2-10-generierende Aktivität in humanem Plasma durch Anwesenheit des Cystein/Serine-Proteaseinhibitors AEBSF signifikant gehemmt wurde und dies ebenso für A3-10 und A4-10 beobachtet wurde bestätigt diese Theorie. Hinzu kommt, dass die Angiotensin-Generierenden Proteasen von A5-10 und vor allem A6-10 sich deutlich von den A2-10, A3-10 A4-10-generierenden Proteasen unterscheidet. Da die Generierung von A2-10 durch AEBSF jedoch nicht komplett inhibiert wurde und die Inhibitionsprofile von A5-10 und A6-10 sich deutlich von denen von A2-10, A3-10 und A4-10 unterscheiden, kann diese Frage hier nicht eindeutig beantwortet werden.

3.3 Untersuchung der Angiotensin-prozessierenden Aktivität der Aminopeptidase N

Die APN ist eine Aminopeptidase welche A2-8 zwischen dem Arg2 und dem Val3 sowohl *in vitro*²⁰⁰ als auch *in vivo* spalten kann.^{81, 82} Daher könnte es sich bei der APN um eine potentielle A3-10-generierende Protease handeln. Um die Angiotensin-prozessierende Aktivität zu untersuchen, wurde humane rekombinante APN mit verschiedenen Angiotensin-Substraten inkubiert. Das Ergebnis der Reaktionsprodukte dieser Inkubationen nach Analyse der Reaktionslösungen mit MALDI-MS sind in den Abbildungen Abbildung 23 bis Abbildung 28 abgebildet.

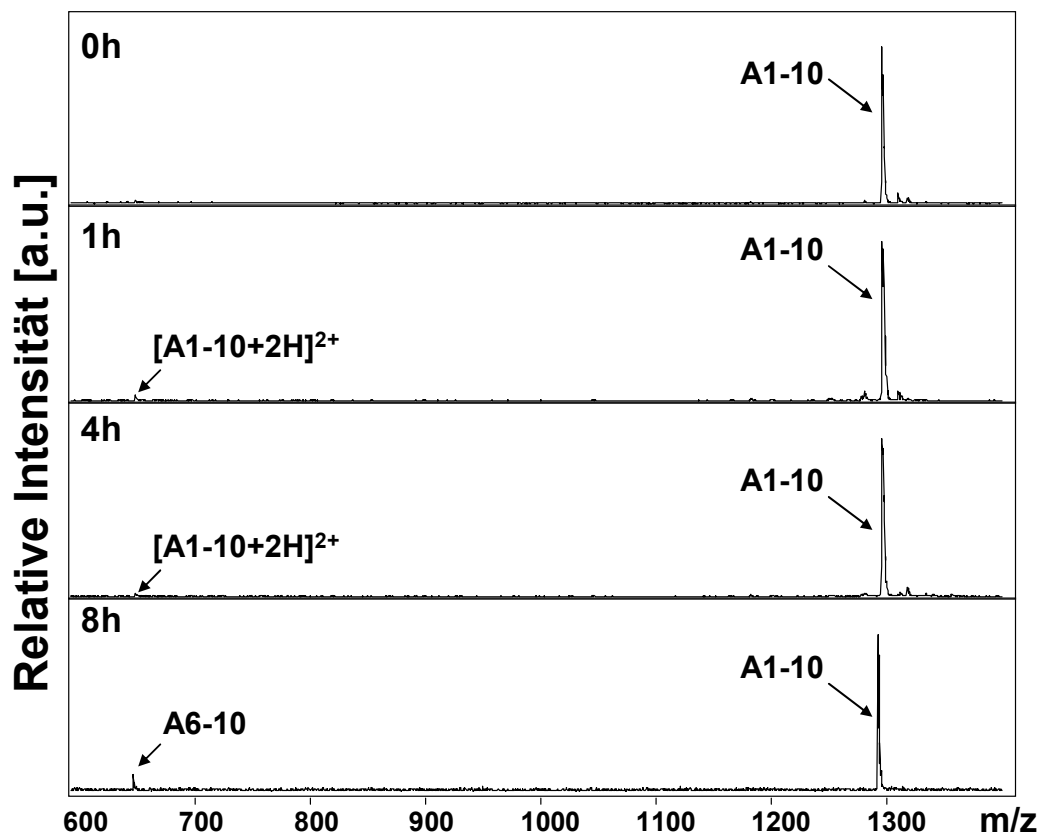


Abbildung 23. MALDI-Spektren der Reaktionsprodukte nach Inkubation von 10^{-5} M A1-10 mit humaner rekombinanter Aminopeptidase N. Aliquots der Reaktionslösungen wurden nach 0h, 1h, 4h und 8h analysiert. MALDI-Signale, die Angiotensin-Peptiden zugeordnet werden konnten, sind mit einem Pfeil markiert.

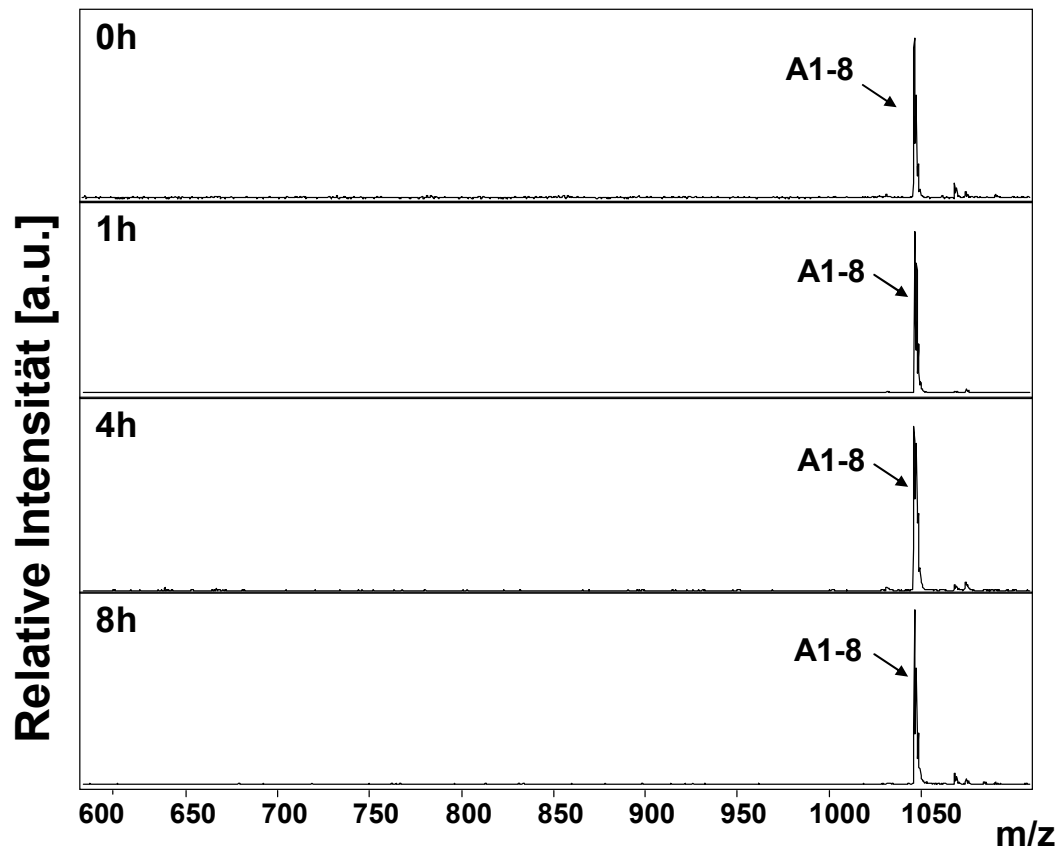


Abbildung 24. MALDI-Spektren der Reaktionsprodukte nach Inkubation von 10^{-5} M A1-8 mit humaner rekombinanter Aminopeptidase N. Aliquots der Reaktionslösungen wurden nach 0h, 1h, 4h und 8h analysiert. MALDI-Signale, die Angiotensin-Peptiden zugeordnet werden konnten, sind mit einem Pfeil markiert.

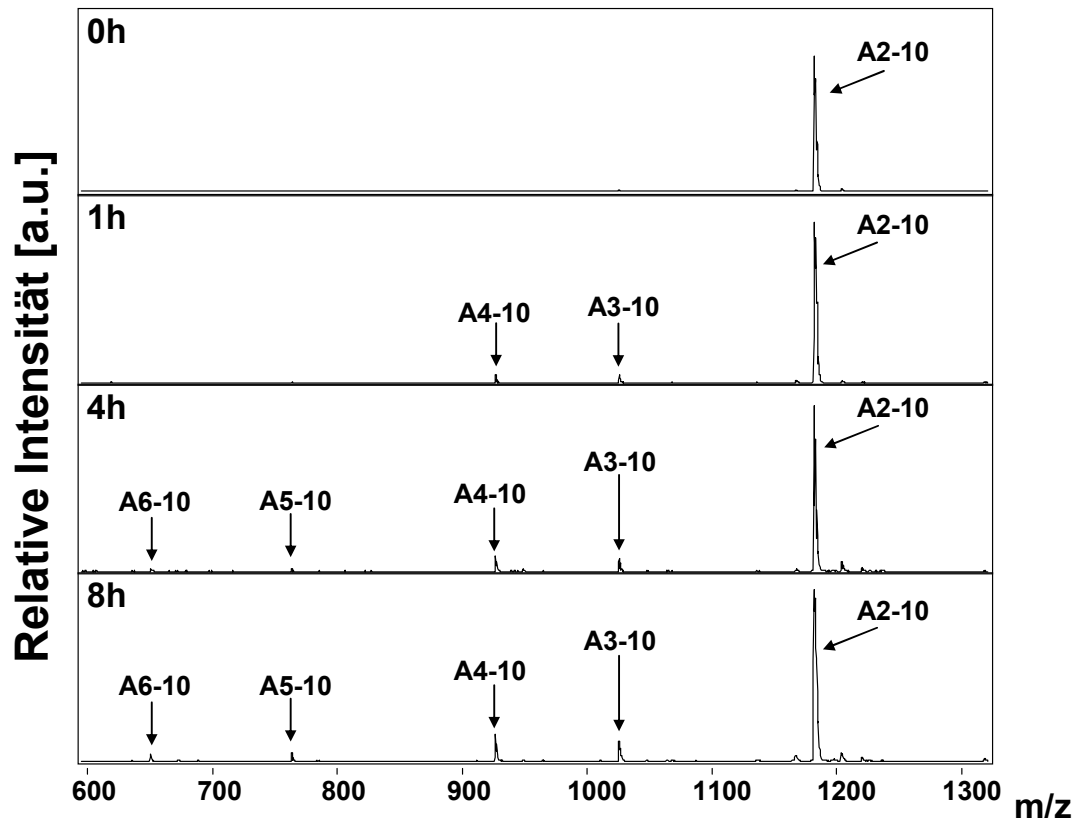


Abbildung 25. MALDI-Spektren der Reaktionsprodukte nach Inkubation von 10^{-5} M A2-10 mit humaner rekombinanter Aminopeptidase N. Aliquots der Reaktionslösungen wurden nach 0h, 1h, 4h und 8h analysiert. MALDI-Signale, die Angiotensin-Peptiden zugeordnet werden konnten, sind mit einem Pfeil markiert.

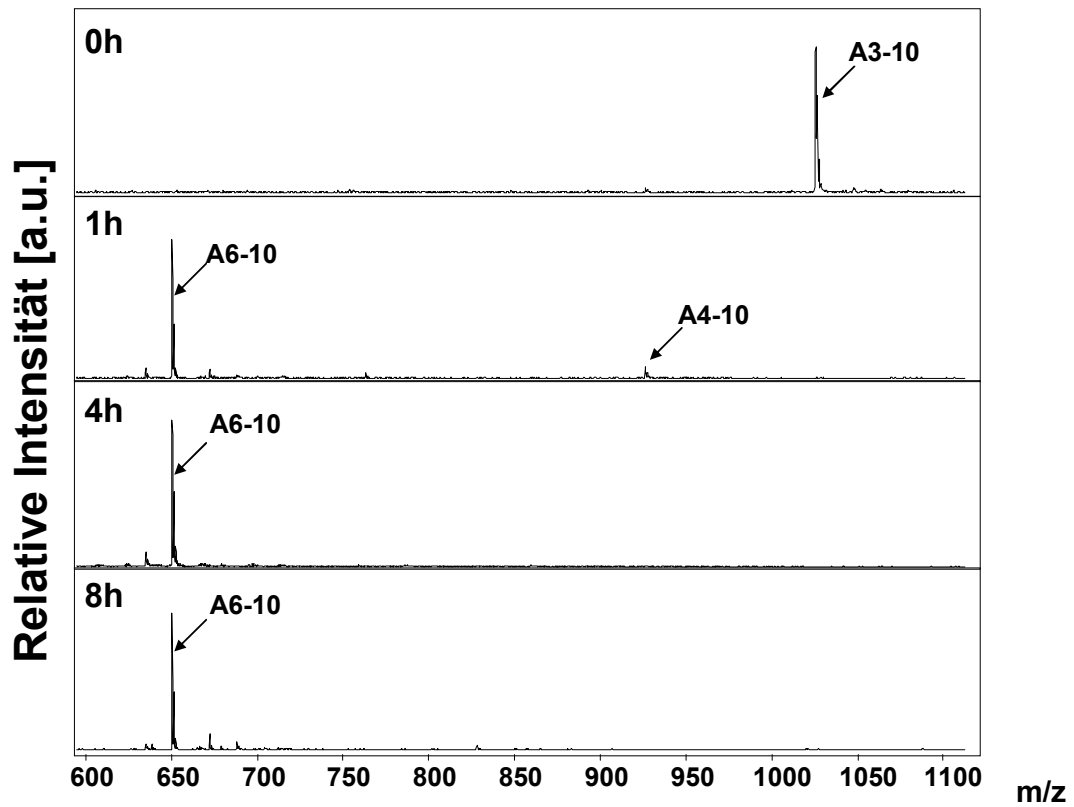


Abbildung 26. MALDI-Spektren der Reaktionsprodukte nach Inkubation von 10^{-5} M A3-10 mit humaner rekombinanter Aminopeptidase N. Aliquots der Reaktionslösungen wurden nach 0h, 1h, 4h und 8h analysiert. MALDI-Signale, die Angiotensin-Peptiden zugeordnet werden konnten, sind mit einem Pfeil markiert.

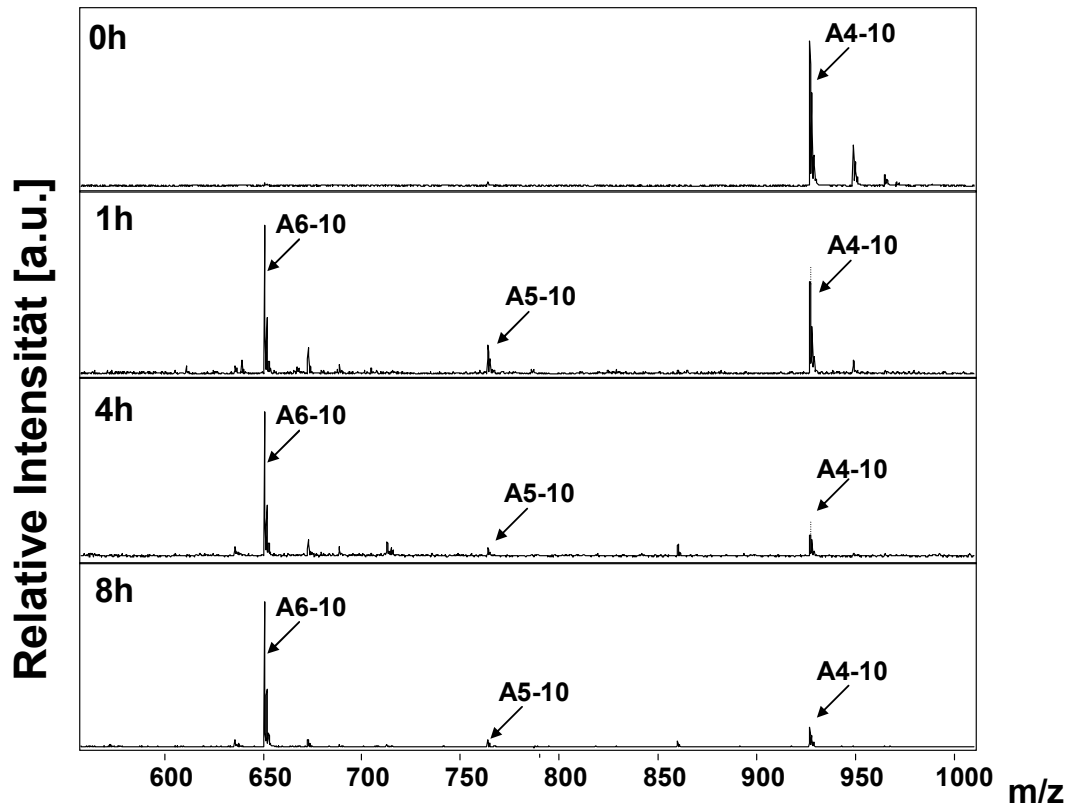


Abbildung 27. MALDI-Spektren der Reaktionsprodukte nach Inkubation von 10^{-5} M A4-10 mit humaner rekombinanter Aminopeptidase N. Aliquots der Reaktionslösungen wurden nach 0h, 1h, 4h und 8h analysiert. MALDI-Signale, die Angiotensin-Peptiden zugeordnet werden konnten, sind mit einem Pfeil markiert.

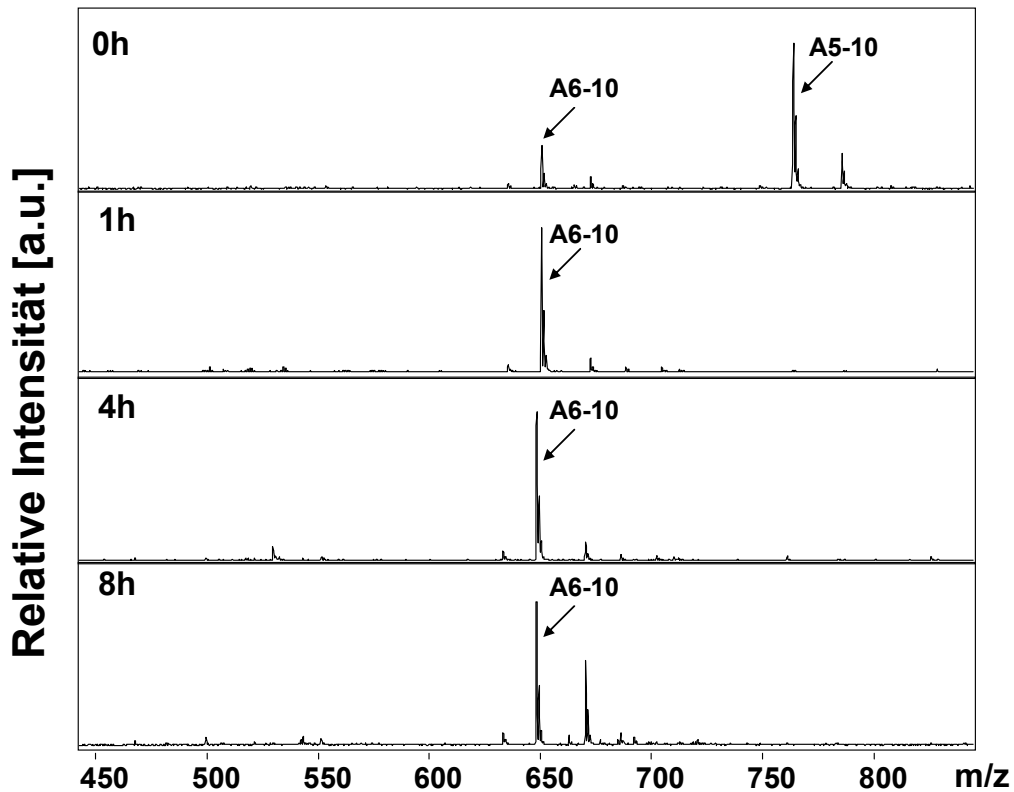


Abbildung 28. MALDI-Spektren der Reaktionsprodukte nach Inkubation von 10^{-5} M A5-10 mit humaner rekombinanter Aminopeptidase N. Aliquots der Reaktionslösungen wurden nach 0h, 1h, 4h und 8h analysiert. MALDI-Signale, die Angiotensin-Peptiden zugeordnet werden konnten, sind mit einem Pfeil markiert.

Abbildung 23 zeigt das Ergebnis der Inkubation von A1-10 mit APN. Nach einer Inkubationszeit von 8h wurde das Signal von A6-10 im Spektrum detektiert.

In den Spektren der Inkubation von A1-8 mit APN wurden in Abhängigkeit der Inkubationszeit bis auf das Signal des Substrates A1-8 keine weiteren Signale detektiert. Dies zeigt, dass die APN A3-8 lediglich aus A2-8 und nicht direkt aus A1-8 generieren kann.

Wenn A2-10 als Substrat verwendet wurde, konnten mit fortschreitender Inkubationszeit Signale in den MALDI-Spektren detektiert werden, welche den Angiotensin-Peptiden A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 entsprechen. Dies impliziert, dass die APN eine höhere Affinität zu Angiotensin-Peptiden hat, welchen das N-terminale Asp1 fehlt.

In den Inkubationslösungen der Inkubation von A3-10 mit APN wurde das Signal von A4-10 als auch A6-10 nach 1h detektiert. Zu diesem Zeitpunkt war bereits kein Signal

des Substrates A3-10 detektierbar. Das Signal von A6-10 stellte das einzige Signal dar, welches nach 4h und 8h gemessen werden konnte. Im Vergleich zur Prozessierung von A3-10 durch APN wiesen die MALDI-Profile der Inkubation von A4-10 und A5-10 mit APN starke Ähnlichkeiten in Bezug auf ihre Angiotnesinprozessierenden Aktivität auf. Die Substratsignale waren bereits nach 1h nicht (A5-10; vgl. Abbildung 28), oder kaum (A4-10; vgl. Abbildung 27) vorhanden. Statt dessen wurde bereits nach 1h ein deutliches Signal für A6-10 detektiert. Bei der Inkubation von A4-10 mit APN wurde neben A6-10 auch A5-10 detektiert, wobei dessen Signalintensität von 1h bis zum ende der Inkubationszeit von 8h abnahm. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass A6-10 das Endprodukt der proteolytischen Prozessierung von A3-10 durch die APN ist.

3.4 Nachweis von Angiotensin-Peptiden in humanem Plasma

3.4.1 Chromatographische Trennung von Angiotensin-Peptiden in humanem Plasma

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 durch humane Plasmaproteine generiert werden, sollte überprüft werden, ob und in welcher Konzentration die Angiotensin-Peptide in humanem Plasma nachweisbar sind. Um die Angiotensin-Peptide spezifisch in humanem Plasma über eine immuno-analytische Methode nachweisen zu können, mussten die Peptide zunächst in voneinander getrennten Fraktionen vorliegen.

Zu diesem Zweck wurden die Peptide durch eine Fällungsreaktion von humanen Plasmaproteinen abgetrennt und eine Peptidfraktion aus dem Überstand über eine Festphasenextraktion ankonzentriert. Die eigentliche Trennung der Peptide erfolgte über einen zweiten Aufreinigungsschritt über eine RP-Chromatographie. Die Peptide wurden dabei über einen Lösungsmittelgradienten ihrer Hydrophobizität entsprechend getrennt eluiert. Um die Retentionszeiten der jeweiligen Angiotensin-Peptide zu bestimmen, wurde ein Gemisch der synthetischen Angiotensin-Peptide (A1-10, A3-10, A4-10, A5-10, A6-10) unter gleichen chromatographischen Bedingungen getrennt und die Fraktionen mittels MALDI-MS analysiert.

Das Chromatogramm der RP-Chromatographie der Plasmapeptidfraktion und der synthetischen Peptide ist in Abbildung 29 abgebildet. Die über die MALDI-Messung

bestimmten Retentionszeiten der jeweiligen synthetischen Angiotensin-Peptide (Abbildung 30) wurden durch Pfeile im Chromatogramm gekennzeichnet.

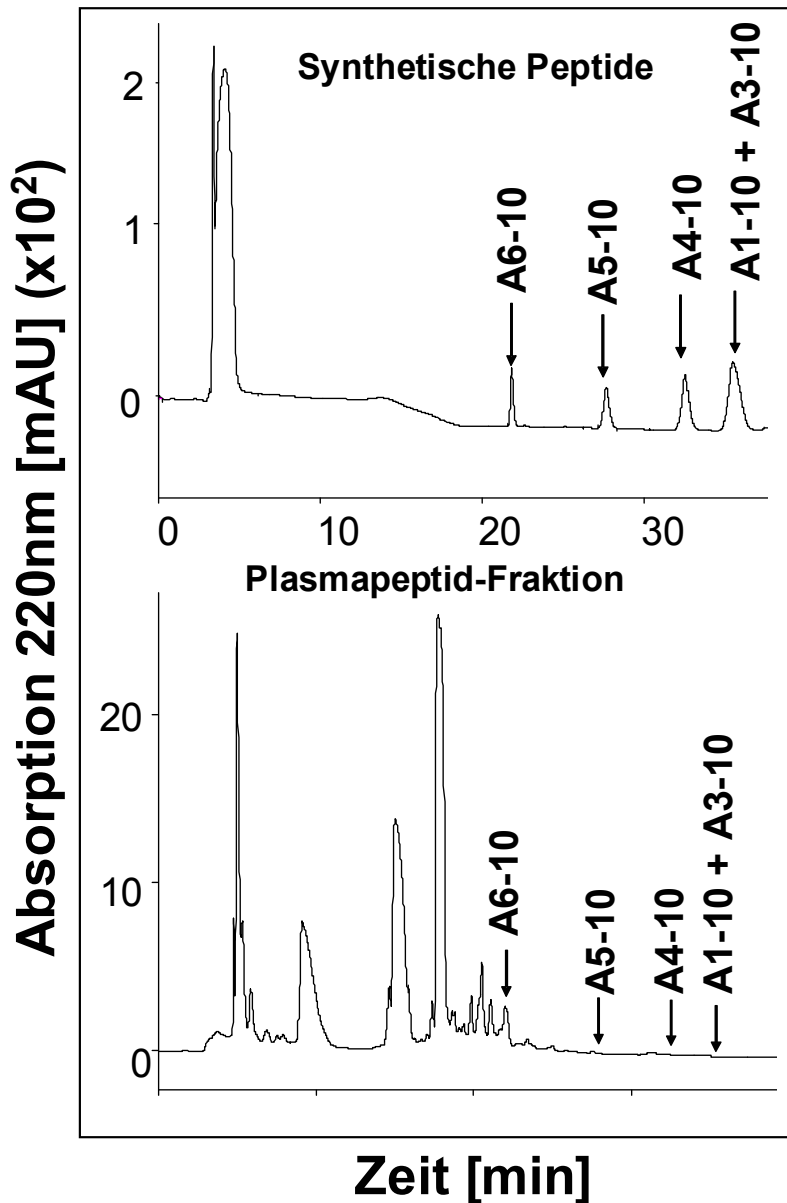


Abbildung 29. Nachweis von Angiotensin-Peptiden in humanem Plasma. Trennung von Angiotensin-Peptiden mittels RP-Chromatographie. Dargestellt ist die Absorption bei 220 nm in Abhängigkeit der Zeit. Oberes Chromatogramm: RP-HPLC der synthetischen Angiotensin-Peptid-Mischung aus A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 in jeweils einer Konzentration von 10^{-5} M. Retentionszeiten der jeweiligen Angiotensin-Peptide sind durch Pfeile markiert. Unteres Chromatogramm: RP-HPLC der Plasmapeptid-Fraktion. Plasmapeptid-Fractionen, welche mit den Retentionszeiten der synthetischen Angiotensin-Peptide übereinstimmen, sind mit Pfeilen markiert.

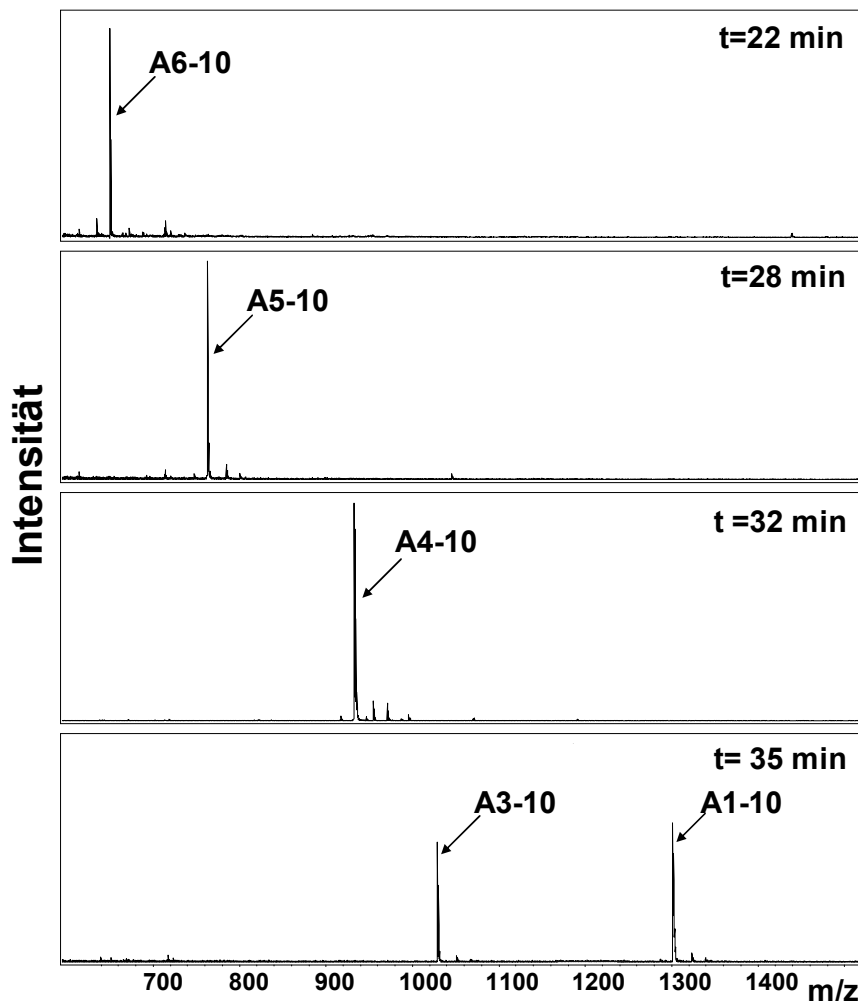


Abbildung 30. MALDI-Spektren der Eluatfraktionen nach chromatographischer Trennung von Angiotensin-Peptiden mit RP-HPLC. Die Retentionszeiten (t) der Angiotensin-Peptide nach chromatographischer Trennung einer synthetischen äquimolaren Angiotensin-Peptid-Mischung (10^{-5} M) aus A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 sind angegeben. MALDI-Signale, welche Angiotensin-Peptiden zugeordnet wurden, sind mit Pfeilen markiert.

Das Chromatogramm sowie die MALDI-Analyse der Eluate der RP-HPLC zeigte, dass alle synthetischen Angiotensin-Peptide A4-10, A5-10 sowie A6-10 vollständig voneinander getrennt werden konnten, da in einzelnen Eluatfraktionen neben den Peaks einzelner Angiotensin-Peptide keine weiteren Signale im MALDI-Spektrum detektiert wurden. Die Angiotensin-Peptide A3-10 und A1-10 konnten vermutlich aufgrund ähnlicher Hydrophobizität nicht vollständig voneinander getrennt werden. Während der Chromatographie eluierte A6-10 nach 22 Minuten, A5-10 nach 28 Minuten, A4-10 nach 32 Minuten. A1-10 und A3-10 coeluierten nach einer Retentionszeit von 35 Minuten.

Anschließend wurden die Plasmapeptid-Fractionen der RP-Chomatographie, welche den Retentionszeiten der jeweiligen Angiotensin-Peptide (A1-10/A3-10, A4-10, A5-10, A6-10, A1-10) entsprachen, für den fluoreszenzbasierten Immuno-Assay verwendet.

3.4.2 Nachweis von Angiotensin-Peptiden in humanen Plasmapeptidfraktionen mit Hilfe eines fluoreszenzbasierten Immuno-Assays

Der Nachweis der Angiotensin-Peptide in den gewonnenen Plasmapeptidfraktionen erfolgte mithilfe eines fluoreszenzbasierten Immuno-Assays (*Enzym-Immunoassay*, EIA). Hierzu wurde das EIA-Kit der Firma Phoenix Pharmaceuticals verwendet. Dieses Kit wurde ursprünglich für den Nachweis von A1-10 hergestellt. Das Prinzip dieses Assays wird daher am Beispiel von A1-10 erläutert.

Zunächst wird eine mit einem Sekundärantikörper vorbeschichtete 96-Well-Platte mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert. Die Fragment-Antigen-Bindungs (Fab)-Region des Sekundärantikörpers erkennt und bindet dabei die Fragment-kristallisierbare (*Fragment crystallizable*; Fc)-Region des Anti-A1-10-Primärantikörpers. Die Fc-Region des Primärantikörpers hingegen ist gegen das Antigen A1-10 gerichtet und kann sowohl mit N-Terminal biotinylierten A1-10-Standardpeptiden als auch mit den A1-10-Peptiden der Probe interagieren.

Erfolgt die Zugabe von biotinylierten A1-10-Peptiden oder A1-10-Peptiden aus Proben oder Standardlösungen zu dem Anti-A1-10-Primärantikörper, kommt es zur kompetitiven Bindungsreaktion der A1-10-Peptide mit den biotinylierten A1-10-Peptiden um freie Bindungsplätze am Primärantikörper.

Die Menge der Primärantikörper-gebundenen biotinylierten A1-10-Peptide kann dann über eine Interaktion mit Streptavidin-gekoppelter Horse-Raddish-Peroxidase (SA-HRP) an die biotinylierten A1-10-Peptide und die anschließende Zugabe eines Fluoreszenzsubstrates quantifiziert werden. Dabei kommt es in Anwesenheit der SA-HRP zur Umsetzung des Fluoreszenzsubstrates in eine fluoreszierende Substanz. Die Quantifizierung der gebundenen Angiotensin-Peptide in der zu untersuchenden Probe erfolgt über die Messung der Fluoreszenzintensität, wobei die Menge an biotinylierten A1-10-Peptiden in direkter Proportionalität zur Fluoreszenzintensität

steht. Folglich ist die Menge an A1-10-Peptiden in der Probe umgekehrt proportional zur gemessenen Fluoreszenzintensität.

Da der Anti-A1-10-Antikörper gegen den C-Terminus von A1-10 gerichtet ist, sollte der Anti-A1-10-Primärantikörper ebenfalls die Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 erkennen können, da diese die gleiche C-terminale Aminosäuresequenz besitzen.

Wie in Abschnitt 3.3.1 erwähnt, konnten die Angiotensin-Peptide A3-10 und A1-10 nicht optimal voneinander getrennt werden. Aufgrund ihrer Coelution wurde im Folgenden auf eine direkte Konzentrationsbestimmung von A3-10 in humanem Plasma verzichtet. Obwohl daher ebenso die Möglichkeit besteht, dass auch die Quantifizierung von A1-10 in humanem Plasma verfälscht sein kann, wurde zur prinzipiellen Überprüfung der Messmethode trotzdem eine Quantifizierung von A1-10 vorgenommen, da das gewählte EIA-Kit den Herstellerangaben nach speziell für dessen Quantifizierung ausgelegt ist.

Um die Konzentrationen der Angiotensin-Peptide im humanen Plasma bestimmen zu können, wurden in Doppelbestimmung für die Angiotensin-Peptide A1-10, A4-10, A5-10 und A6-10 Verdünnungsreihen der synthetischen Standardpeptide in folgenden Konzentrationen angefertigt: 1, 10, 100, 1000, 10000 (Angaben in pg/ml) und die relative Fluoreszenzintensität durch photometrische Messung bestimmt. Die Berechnung der Konzentration der Angiotensin-Peptide im Plasma erfolgte anhand der Geradengleichung der sigmoidalen Standardkurven der jeweiligen Angiotensin-Peptide, welche in Abbildung 31 dargestellt sind.

Die mit einer logistischen nicht linearen Regression erstellten Standardkurve von A4-10 zeigt einen optimalen sigmoidalen Kurvenverlauf. Die Standardkurven von A5-10 und A6-10 weisen dagegen keinen optimalen sigmoidalen Verlauf auf. Möglicherweise spielt hierbei die Länge der Peptide sowie die unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung eine Rolle. Diese Abweichungen könnten eventuell zu einer höheren Fehlertoleranz und somit zu einer weniger exakten Quantifizierung von A6-10 oder A5-10 führen.

Folgende Angiotensin-Plasmakonzentrationen wurden in humanem Plasma nachgewiesen: A1-10 = 15 pg/ml (12 nmol/L), A4-10 = 8 pg/ml (9 nmol/L), A5-10 = 53 pg/ml (70 nmol/L), A6-10 = 6607 pg/ml (10 µmol/L).

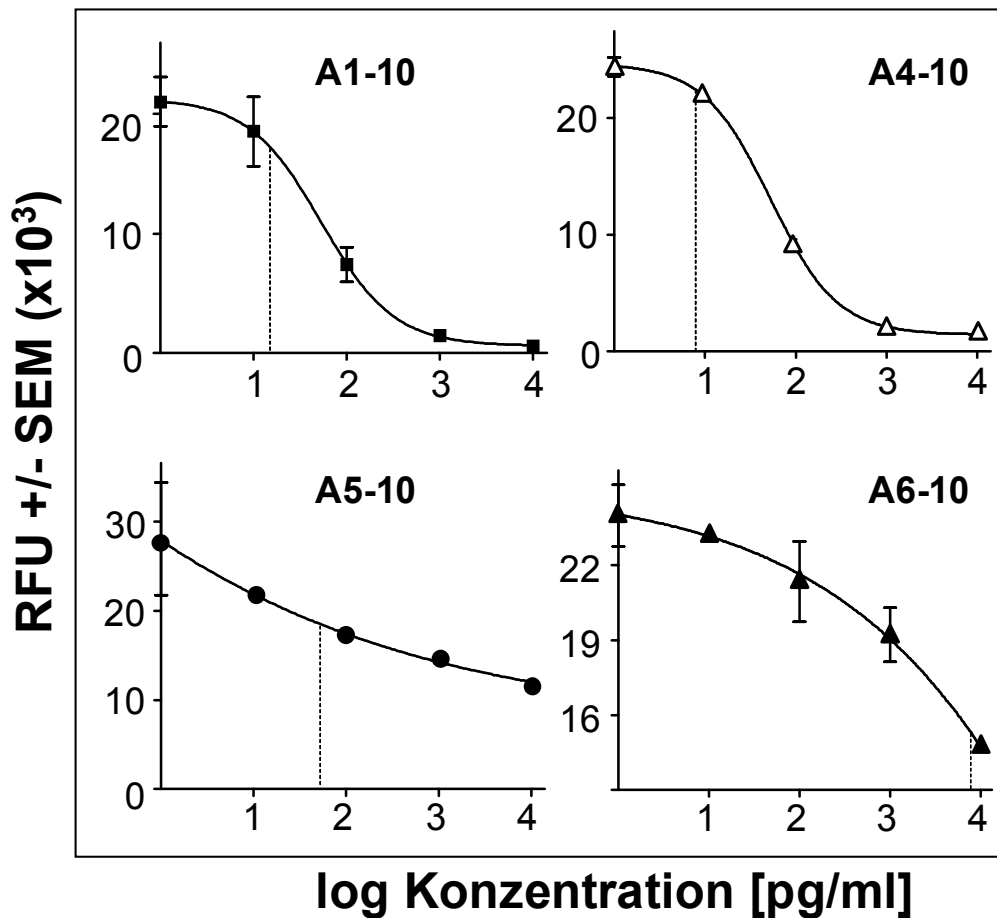


Abbildung 31. Kalibrierkurven der Angiotensin-Peptide A1-10, A4-10, A5-10 und A6-10. Methode: Fluoreszenzbasierter Immunoassay. Peptide: A1-10 (schwarze Quadrate), A4-10 (weiße Dreiecke), A5-10 (schwarze Kreise), A6-10 (schwarze Dreiecke). Aufgetragen sind die Werte der relativen Fluoreszenzeinheiten (relative fluorescence units, RFU) gegen die logarithmisierten Angiotensinkonzentrationen. Konzentrationen (log): 1(0), 10 (1), 100 (2), 1000 (3), 10000 (4) pg/ml. Die Daten, welche den Standardkurven zugrunde liegen, sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM; n=2) dargestellt. Die bestimmten logarithmischen Angiotensin-Konzentrationen in den chromatographisch aufgereinigten Plasmapeptid-Fractionen sind durch eine unterbrochene Linie gekennzeichnet. Errechnete Angiotensin-Plasmakonzentrationen: A1-10 = 15 pg/ml, A4-10 = 8 pg/ml, A5-10 = 53 pg/ml, A6-10 = 6607 pg/ml.

Das von den Angiotensin-Peptiden A1-10, A4-10, A5-10 und A6-10 Standardkurven produziert werden konnten zeigt, dass nicht nur A1-10, sondern auch die Peptide A4-10, A5-10 und A6-10 konzentrationsabhängig und kompetitiv an den Sekundärantikörper binden können. Dies weist darauf hin, dass der Antikörper tatsächlich mit Angiotensin-Peptiden welche den gleichen C-Terminus wie A1-10 besitzen kreuzreagiert.

Es kann angenommen werden, dass der Antikörper keine nennenswerte Bindungsaffinität zu Angiotensin-Peptiden aufweist, deren C-terminale Sequenz von der des A1-10 abweicht. Den Angaben des Herstellers (Phoenix Pharmaceuticals) nach zeigt der verwendete Antikörper keine Kreuzreaktivität zu den Angiotensin-Peptiden A1-8 oder A2-8 welche nachweislich in humanem Plasma vorkommen.¹⁷¹ Da die Retentionszeiten dieser Peptide nicht über die RP-Chromatographie bestimmt wurden, kann hier keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Peptide sich ebenfalls in den chromatographisch gewonnenen Plasmapeptidfraktionen befinden. Aufgrund der Herstellerangaben zur Kreuzreaktivität des Angiotensinbindenden Antikörpers kann jedoch ausgeschlossen werden, dass eine Anwesenheit dieser Angiotensin-Peptide zu einer Beeinflussung der Messergebnisse führt.

Die hier bestimmte Plasmakonzentration von A5-10 betrug 53 pg/ml, die Konzentration von A4-10 lag bei 8 pg/ml. Im Vergleich liegen die über den Immunfluoreszenzbasierten Assay nachgewiesenen Plasma Konzentrationen dieser Angiotensin-Peptide in einem ähnlichen Bereich wie A1-8, welches im Plasma in einer Konzentration von ca. 41pg/ml nachgewiesen wurde.^{201, 202} Reyes Engel *et al.* berichteten in einer Studie, dass A1-10 in humanem Plasma in einer durchschnittlichen Konzentration von 92 pg/ml vorkommt.²⁰³ Zudem wurde A1-8 mit einer Konzentration von A1-8 mit ca. 22 pg/ml, A1-7 mit ca. 32 pg/ml in humanem Plasma nachgewiesen. Die Autoren zeigten des weiteren, dass die Konzentration dieser Angiotensin-Peptide im Plasma stark abhängig vom Geschlecht und vom Genotyp ist. Lag bei den an dieser Studie teilnehmenden Probanden einer Doppeldeletion des ACE-1-Gens vor, wurden die höchsten A1-10-Konzentrationen im Plasma gemessen.

Die gemessene Plasmakonzentration von A6-10 ist im Vergleich zu den gemessenen Plasmakonzentrationen von A3-10 und A4-10 deutlich höher. Dies kann als Hinweis gesehen werden, dass A6-10 das Endprodukt der proteolytischen Kaskade im Plasma ist.

Velloso *et al.* berichtete bereits über eine Kreuzreaktion eines A1-10-Antikörpers mit A3-10 und A4-10.²⁰⁴ Da der für den Fluoreszenzassay verwendete gegen A1-10 gerichtete Antikörper sowohl A4-10, als auch A5-10 und A6-10 bindet, besteht auch in diesem Fall die Möglichkeit, dass auch A3-10 mit dem verwendeten Antikörper interagiert. Chapell *et al.* wiesen A3-10 im Plasma der Ratte mit einer Konzentration

von 30pg/ml nach.¹⁸¹ Da die Angiotensin-Peptide A4-10, A5-10 und A6-10 in humanem Plasma nachgewiesen werden konnten, wird davon ausgegangen, dass auch A3-10 in humanem Plasma zirkuliert. Wie bereits erwähnt, lies sich jedoch A3-10 durch eine RP-Chromatographie nicht von A1-10 trennen. Somit konnte mithilfe des Fluoreszenzassays weder die exakte physiologische Menge an A1-10, noch an A3-10 im Plasma bestimmt werden. Als Näherung kann angenommen werden, dass es sich bei der über den Fluoreszenzassay bestimmten Plasmakonzentration von A1-10 von 15 pg/ml um einen Wert handelt, der sich sowohl aus der Plasmakonzentration von A1-10 als auch A3-10 zusammensetzt. Demnach würde die Plasmakonzentration von A3-10 ungefähr im Picogrammbereich pro Milliliter Plasma liegen.

3.5 Nachweis physiologischer Effekte von Angiotensin-Peptiden

3.5.1 Untersuchung der physiologischen Effekte von Angiotensin-Peptiden auf die Blutdruckmodulation an isolierten Mauseaortenringen

Ein weiterer Aspekt, welcher im Hinblick auf die physiologische Relevanz der Angiotensin-Peptide neben ihrer Präsenz im Blut gegeben sein muss ist ihre biologische Aktivität. Ausgehend von der blutdruckregulierenden Funktion des RAS, welche von A1-8 oder A1-7 vermittelt werden, wurde untersucht, ob die Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 ebenfalls vasoaktiv wirken. Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurden diese Peptide mithilfe eines Druck-Myographen an isolierten Mauseaortenschlagadern auf ihre vasomodulierende Wirkung untersucht. Dieser Versuch wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Martin Tepel am Universitätsklinikum Odense durchgeführt.

Das verwendete Blutgefäß wird im Druck-Myographen in einem Perfusionsbad fixiert und anschließend vorkontrahiert. Während des gesamten Experimentes wird das Gefäß über eine mit einem Mikroskop verbundene Kamera beobachtet. Die vasomodulierenden Effekte werden dann anhand des aufgenommenen Videomaterials durch Messung der Änderung des Gefäßdurchmessers bestimmt. Die Ergebnisse der Druck-Myographie sind in Abbildung 32 und Abbildung 33 dargestellt.

Die in Abbildung 32 dargestellten Ergebnisse nach Perfusion der Maushalsschlagadern mit Angiotensin-Peptid-haltiger Perfusionslösung wurden auf die maximale Vasodilatation des Vasodilators Natrium-Nitroprussid (NNP) normiert. NNP gehört zur Klasse der Cyanide und gilt als stärkster bekannter Vasodilator, welcher die Vasodilatation über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt.²⁰⁵ Die isolierten Halsschlagadern wurden nach Untersuchung der Angiotensin-Peptide (n=4) mit NNP-haltiger Perfusionslösung perfundiert (n=10).

Alle Angiotensin-Peptide ausser A2-10 lösten nach Applikation auf die isolierten Maus-Halsschlagadern eine Vasodilatation aus. Am stärksten stellte sich dieser Effekt mit einer Vasodilatation von $15\% \pm 8\%$ bei A5-10 dar. Somit besitzt A 5-10 ca. 1/6 der Vasodilatationsstärke von NNP. Da in der Literatur kein direkter Vergleich der vasodilatationseffizient von Angiotensin-Peptiden in Bezug auf die vasodilatierende Wirkung von NNP beschrieben wurde, kann an dieser Stelle jedoch nicht bewertet werden in welchem Verhältnis die die vasodilatierende Aktivität von A5-10 im Vergleich mit bereits bekannten vasodilatierenden Angiotensin-Peptiden wie A1-7⁷¹ steht.

Um zu bewerten, ob die beobachtete vasodilatatorische Aktivität der Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10, A5-10 oder A6-10 physiologisch relevant sind, kann die physiologische Plasmakonzentration des Preprohormons Angiotensinogen herangezogen werden. Kobori *et al.* wiesen in männlichen BALBc Mäusen eine Plasma Angiotensinogenkonzentration von ca. $1,3 \cdot 10^{-6}$ M nach.²⁰⁶ Dies stellt die maximale theoretische Konzentration der Angiotensin-Peptide dar, welche in der Zirkulation aus Angiotensinogen generiert werden könnte, sofern es zu einer kompletten Proteolyse des Angiotensinogens kommt. Eine physiologische Relevanz könnte demnach vorliegen, wenn die gleiche, oder eine geringere molare Konzentration der Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10, A5-10 oder A6-10 zu einer physiologischen Wirkung führt. Die den Maushalsschlagadern zugeführte Perfusionslösung enthielt die entsprechenden Angiotensin-Peptide in 10^{-6} molarer Konzentration. Da dies die murine Angiotensinogenkonzentration im Plasma überschreitet deutet darauf hin, dass die getesteten Angiotensin-Peptide keine physiologische Relevanz in der Maus besitzen. Möglicherweise könnte jedoch eine Konzentration an Angiotensinogen von 10^{-6} M lokal bzw. Gewebsspezifisch erreicht werden.

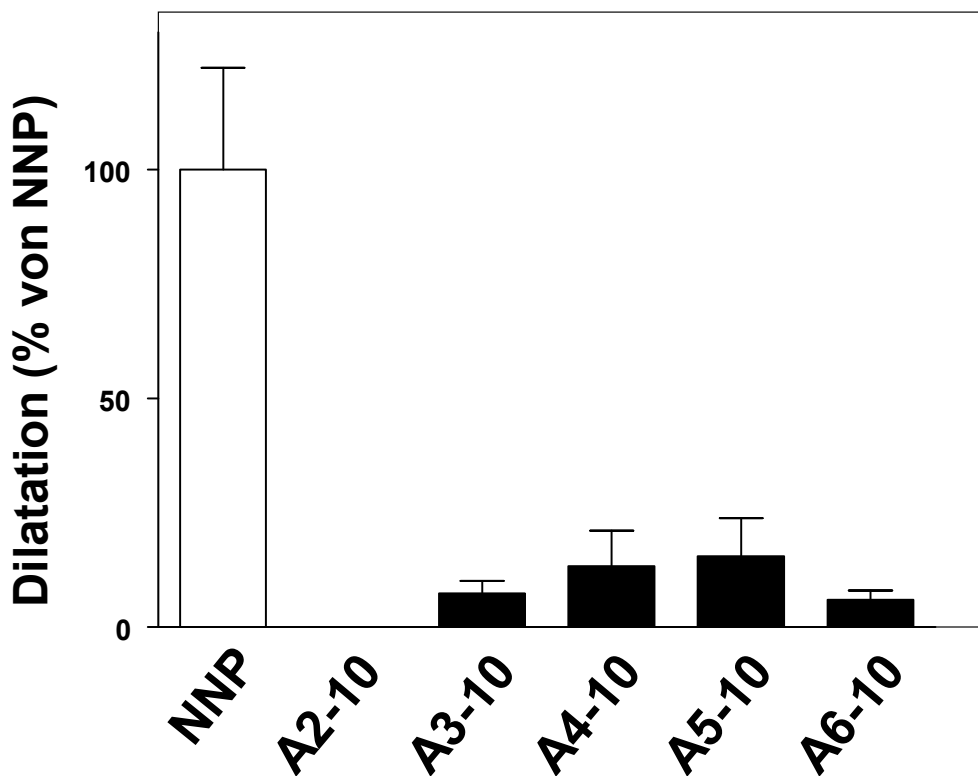


Abbildung 32. Effekte von Angiotensin-Peptiden auf den Gefäßtonus isolierter Maus-Halsschlagadern. Apparat: Druck-Myographie. Relative Veränderung der Dilatation im Vergleich Natrium-Nitroprussid (NNP, weiße Säule) nach Applikation of A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 (schwarze Säulen). Die dargestellten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM; Angiotensin-Peptide n=4, Kontrollsubstanzen NNP n=10) dargestellt.

Da im ersten Experiment (vgl. Abbildung 32) bereits gezeigt werden konnte, dass die Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 eine Vasodilatation vermitteln können, muss dieser Effekt durch Bindung der Angiotensin-Peptide an einen Rezeptor stattfinden. Daher sollte untersucht werden inwiefern die Angiotensin-Peptide den Effekt einer Perfusion mit A1-8 modulieren können. Zu diesem Zweck wurde zuerst eine Perfusion der Gefäße mit den Angiotensin-Peptiden A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 (n=4) durchgeführt und im Anschluss eine weitere Perfusion mit A1-8-haltiger Perfusionslösung vorgenommen. Zwischen beiden Perfusionen lag eine 30minütige Pause in der die vasodilatativen Effekte durch die erstapplizierten Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 bzw. A6-10 (vgl. Abbildung 32) nicht mehr zu beobachten waren.

A1-8 gilt als starker Vasokonstriktor und diente in diesem Experiment auch als Referenz für die maximale Vasokonstriktion. Die maximale Vasokonstriktion nach Perfusion von 200 nM A1-8 wurde zehnfach bestimmt. Alle gewonnenen Messwerte in diesem Experiment wurden auf den Mittelwert der Vasokonstriktion durch A-1-8 normiert. In Abbildung 33 sind die Ergebnisse des Experimentes gezeigt.

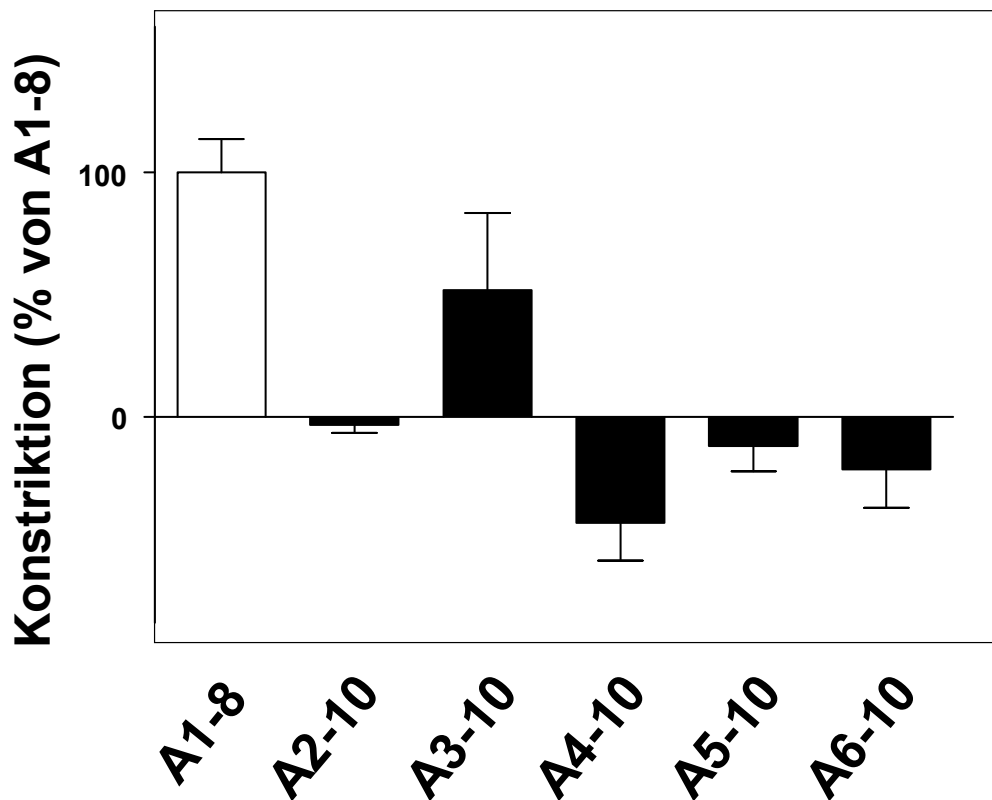


Abbildung 33. Effekte von Angiotensin-Peptiden auf den Gefäßtonus isolierter Maus-Halsschlagadern. Apparat: Druck-Myographie. Relative Veränderung der Kontraktion im Vergleich zum Effekt von A1-8 (weiße Säule) nach Applikation von A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 (finale Konzentration von 1 μ M) und nachfolgender Applikation von A1-8 (finale Konzentration von 200 nM, schwarze Säulen). Die dargestellten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM; Angiotensin-Peptide n=4, Kontrollsubstanzen A1-8 n=10) dargestellt.

Bei ausschließlicher Perfusion der Maus-Halsschlagadern mit A1-8, kommt es erwartungsgemäß zu einer starken Vasokonstriktion. Führt man jedoch vor der Perfusion mit A1-8 eine Perfusion mit den jeweiligen Angiotensin-Peptiden A3-10, A4-10, A5-10 oder A6-10 durch, wird zunächst wie im vorhergehenden Experiment bereits gezeigt, eine Vasodilatation ausgelöst. Sollten die Peptide (A3-10, A4-10, A5-10 oder A6-10) 30 Minuten nach dem Auslösen der Vasodilatation noch an einen Rezeptor, welcher auch an der Vermittlung der durch A1-8-abhängigen

Vasokonstriktion beteiligt ist, gebunden sein, wäre zu erwarten, dass nach anschließender Perfusion mit A1-8 eine Modulation des vasokonstriktiven Effektes von A1-8 stattfindet. Dies war, wie in Abbildung 33 dargestellt, tatsächlich zu beobachten. Wurde nach Perfusion mit den jeweiligen Angiotensin-Peptiden (A3-10, A4-10, A5-10 oder A6-10) mit A1-8-haltiger Perfusionslösung perfundiert, kam es in allen Fällen zu einer starken Modulation der A1-8-vermittelten Vasoaktivität. Eine vorhergehende Perfusion mit A3-10 führte zu einer Reduktion der durch A1-8 vermittelten Vasokonstriktion um $52 \% \pm 32\%$.

Enthielt die erste Perfusionslösung die Angiotensin-Peptide A4-10, A5-10 oder A6-10 fand nach einer anschließenden Perfusion mit A1-8 sogar eine Vasodilatation statt, wobei der modulatorische Effekt hier am stärksten bei A4-10 zu beobachten war (Vasokonstriktion: A4-10= $-43 \% \pm 16\%$, A5-10= $-8 \% \pm 7\%$, A6-10= $-22 \% \pm 16\%$).

3.5.2 In vivo-Untersuchung der physiologischen Effekte von Angiotensin-Peptiden auf die Blutdruckmodulation bei Mäusen

Da die Applikation der Angiotensin-Peptide auf isolierte Mauseitenringe vasomodulierende Effekte auslöste, wurde anschließend untersucht, ob diese Effekte auch in vivo auftreten. Für die Bestimmung der Vasomodulation sollte die Veränderung der Pulswellengeschwindigkeit (PWG) nach Injektion der Angiotensin-Peptide in Mäuse mithilfe einer Farb-Doppler-Sonographie untersucht werden.

Die PWG beschreibt die Geschwindigkeit, mit der eine Blutdruckwelle Arterien durchläuft. Die PWG ist durch den Gefäßtonus bzw. der Steifigkeit der Arterienwand sowie durch den Gefäßdurchmesser beeinflussbar und kann daher zur indirekten Bestimmung der arteriellen Steifigkeit genutzt werden. Kommt es z. B. zu einer Vasokonstriktion so versteift sich die Arterienwand, woraus im Vergleich zum basalen Gefäßtonus ein erhöhter Gefäßtonus resultiert. Dies hat zur Folge, dass sich die Pulswelle (PW) schneller durch die Arterie fortpflanzt, da der Druck schlechter von der Gefäßwand kompensiert wird und daher nur in Blutflussrichtung ausweichen kann. Mit Erhöhung des systolischen Blutdrucks geht demnach eine Erhöhung der PWG einher. Im Falle einer Vasodilatation erhöht sich die Elastizität der Gefäße (niedriger Gefäßtonus) und die PW setzt sich entsprechend langsamer fort.

Besitzen die Angiotensin-Peptide einen Blutdruckmodulierenden Effekt, sollte sich dies in einer Änderung der PWG im Vergleich zur basalen PWG äußern.

In einem Vorversuch wurde bestimmt, welche Angiotensin-Peptide den Blutfluss am stärksten modulieren. Zu diesem Zweck wurden alle Angiotensin-Peptide in 10^{-3} molarer Konzentration über die Schwanzvene injiziert und die Veränderung des Strömungspulses (zeitlicher Verlauf der Blutströmungsgeschwindigkeit) im Aortenbogen der Maus mithilfe eines Farb-Doppler-Sonographen der Firma Visual Sonics beobachtet. Dabei zeigte sich, dass A3-10 die stärksten Änderungen des Strömungspulses bewirkte. Aufgrund dessen sollte die Änderung der PWG durch A3-10 untersucht werden. Zudem sollte geprüft werden, ob der beobachtete Effekt Dosisabhängig ist. Hierzu wurde zunächst die basale PWG im Aortenbogen der Maus bestimmt. Um zu untersuchen, inwiefern das Injektionsvolumen selbst eine Vasomodulation auslöst, wurden $100\ \mu\text{l}$ einer Natriumchloridlösung injiziert, welche auch für die Herstellung der unterschiedlichen Verdünnungsstufen der Angiotensin-Peptide verwendet wurde. Anschließend wurden jeweils Einzeldosen von A3-10 in ansteigenden Konzentrationen von 10^{-3} M bis 10^{-7} M über die Schwanzvene injiziert und die PWG im Aortenbogen nach 30 Sekunden bestimmt.

Zwischen allen Einzeldosen erfolgte eine Injektionspause, bis der Strömungspuls wieder den basalen Wert erreicht hatte. Anschließend wurden auf die gleiche Art und Weise jeweils A3-8 in 10^{-4} molarer Konzentration und A1-8 in 10^{-6} molarer Konzentration injiziert. Die anhand dieser Experimente bestimmten PWGs sind in Abbildung 34 zusammengefasst.

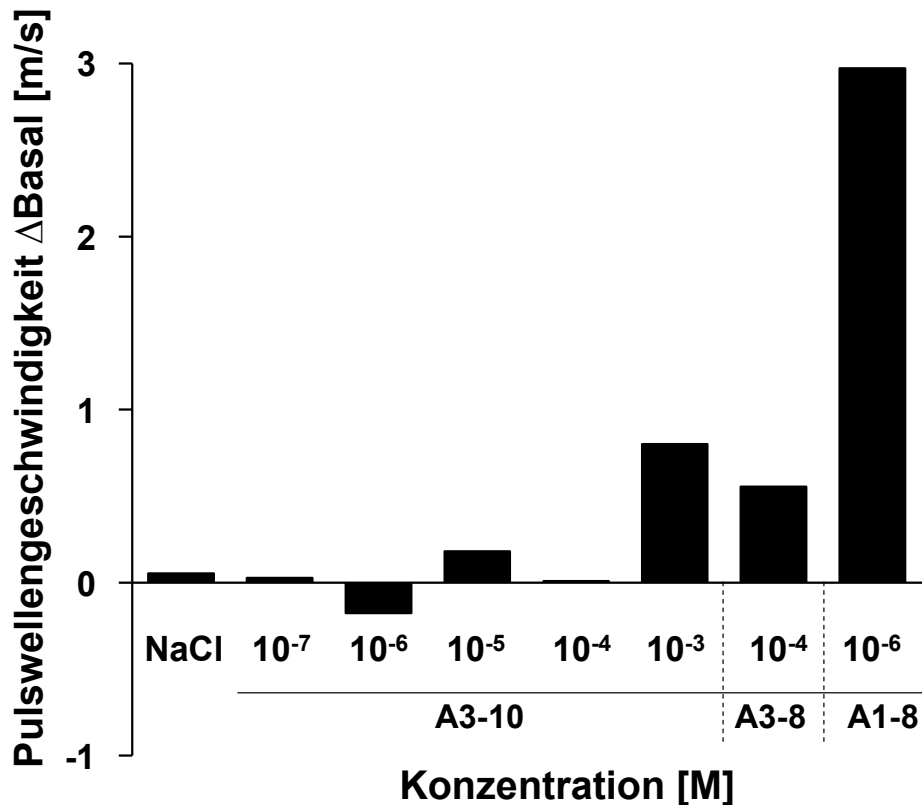


Abbildung 34. Effekte von Angiotensin-Peptiden auf den Gefäßtonus der Maus. Apparatur: Doppler-Sonographie. Dargestellt ist die Differenz zur basalen Pulswellengeschwindigkeit im Aortenbogen der Maus 30 s nach Schwanzveneninjektion von jeweils 100 µl folgender Substanzen: Natriumchlorid (0,9 % v/v), A3-10 (10⁻³M, 10⁻⁴M, 10⁻⁵M, 10⁻⁶M, 10⁻⁷M), A IV (10⁻⁴M) und A1-8 (10⁻⁶M).

Eine Injektion von NaCl führte im Vergleich zur basalen PWG zu einem geringfügigen Anstieg der PWG. Ähnlich führte eine Injektion von A3-10 in einer Konzentration von 10⁻⁷ M sowie 10⁻⁴ M zu einer sehr schwachen Erhöhung der PWG, die selbst noch unter dem Level der Erhöhung der PGW nach Injektion von NaCl lag. In 10⁻⁶ molarer Konzentration führte A3-10 zu einer Verlangsamung der PWG. Erst ab einer Konzentration von 10⁻⁵ M konnte eine deutliche Erhöhung der PWG beobachtet werden. Nach Injektion einer 10⁻³ molaren A3-10-Lösung war die PGW im Vergleich zu 10⁻⁵ M um das ca. 4fache erhöht.

Nach Injektion von A3-8 in 10⁻⁴ molarer Konzentration trat ebenfalls eine Erhöhung der PWG auf, die markanter ausfiel als nach Injektion von A3-10 bei gleicher Konzentration, jedoch geringer als nach Injektion von 10⁻³ molarem A3-10. A1-8 (10⁻⁶ M) löste die stärkste Erhöhung der PWG im Vergleich mit allen anderen Angiotensin-Peptiden aus. Sie war ca. 3fach so hoch wie die PWG nach Injektion von A3-10 in 10⁻³ molarer Konzentration.

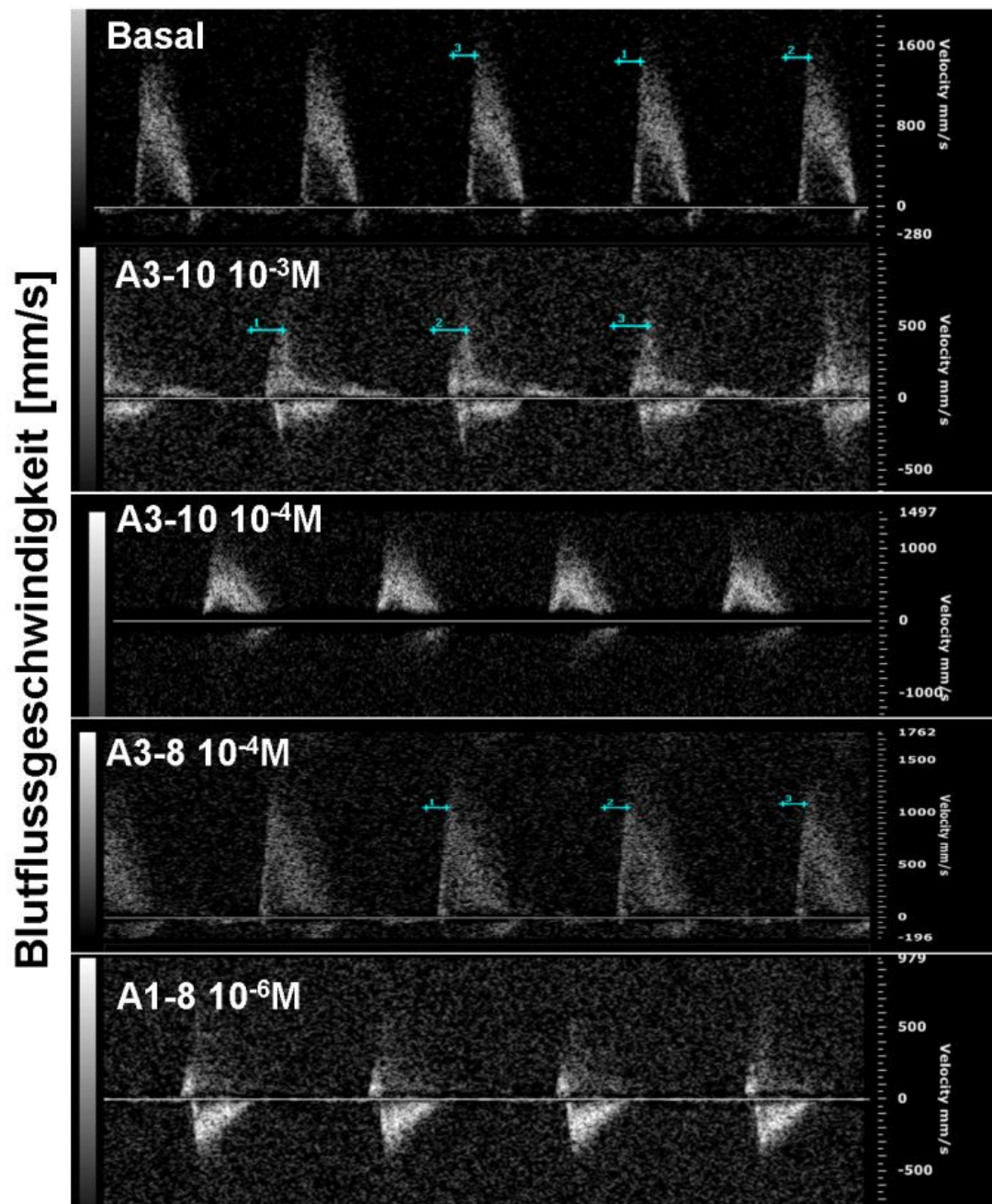


Abbildung 35. Effekte von Angiotensin-Peptiden auf den Gefäßtonus isolierter Halsschlagadern der Maus. Dargestellt ist die Blutflussgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Zeit im Ruhezustand der Maus (basal), sowie 30 Sekunden nach der Injektion von: A3-10 ($10^{-4}M$), A3-10 ($10^{-3}M$), A3-8 ($10^{-4}M$), A1-8 ($10^{-6}M$), gemessen mit Doppler Sonographie.

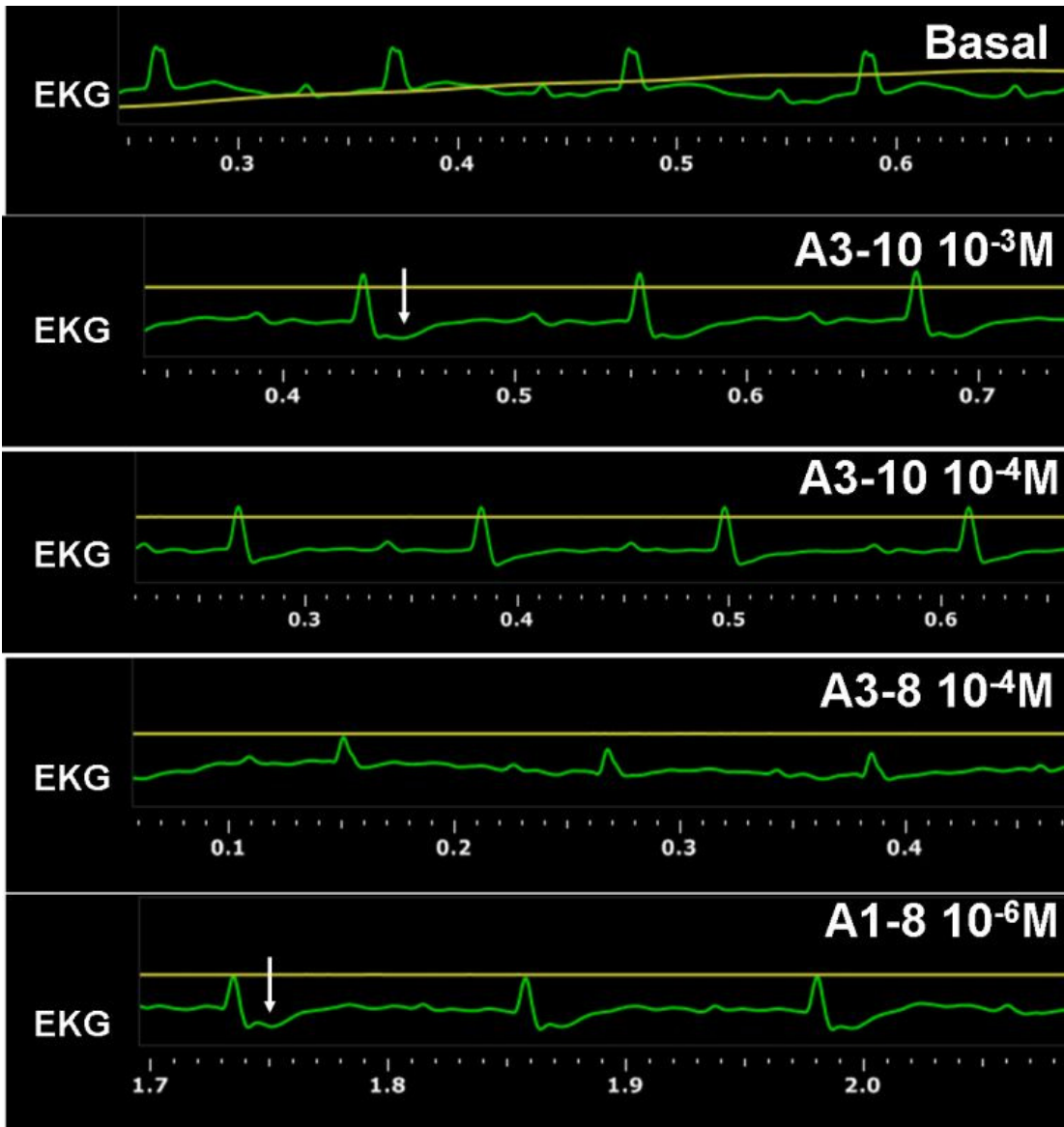


Abbildung 36. Effekte von Angiotensin-Peptiden auf das Elektrokardiogramm (EKG) der Maus. Dargestellt ist die Herzspannungskurve in Abhängigkeit der Zeit im Ruhezustand der Maus (basal), sowie 30 Sekunden nach der Injektion von: A3-10 (10^{-4}M), A3-10 (10^{-3}M), A3-8 (10^{-4}M), A1-8 (10^{-6}M). Die Senkung der ST-Strecke wurde durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Neben der Betrachtung der PWG konnten optisch auch anhand der Veränderungen der Strömungspulsprofile (Abbildung 35) und des EKGs (Abbildung 36) deutliche Effekte von A3-10 beobachtet werden. So wurde im Vergleich zum basalen Strömungspuls die Amplitude des Strömungspulses nach Injektion mit 10^{-3} molarem A3-10 kleiner. Dies zeigt an, dass im Vergleich zum basalen Zustand weniger Blut die Aorta passiert, was wahrscheinlich auf die durch eine Vasokonstriktion verursachte Verminderung des Gefäßdurchmessers zurückzuführen ist. Zudem war ein Rückfluss des Blutes zu beobachten, der sich in einer negativen Blutflussgeschwindigkeit d. h. in

einer Bewegung der Blutkörperchen vom Schallkopf weg, äußert. Ein Rückfluss des Blutes kann aufgrund zu starker Vasokonstriktion durch Aufbau eines hohen Gefäßgedruckes auftreten. Dieser Effekt war in abgemilderter Form bereits nach Injektion von A3-10 in 10^{-4} molarer Konzentration zu beobachten. Für A3-8 ergab sich nach Injektion in einer Konzentration von 10^{-4} M im Vergleich zum basalen Strömungspuls nur eine geringe Änderung des Blutflussprofils. Zudem war ebenfalls das EKG nach Injektion von A3-8 dem EKG im basalen Zustand sehr ähnlich. Insgesamt ähnelt sich der durch A3-10 vermittelte Effekt in 10^{-3} molarer Konzentration im Vergleich mit A1-8 sowohl im Hinblick auf das Strömungspulsprofil als auch auf den Verlauf des EKGs stark, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass eine Injektion von A3-10 in 10^{-3} molarer Konzentration in Mäusen *in vivo* eine eindeutige Vasokonstriktion bewirkt.

4 Diskussion

Das Prohormon Angiotensin1-10 wird in murinen Spezies proteolytisch zu einer Vielzahl an unterschiedlichen Angiotensin-Peptiden gespalten. Einige dieser Peptide, welche ausschließlich durch Aminopeptidaseaktivität aus A1-10 hervorgehen, sind bisher im Menschen nicht beschrieben worden. So berichteten Neves und Cole *et al.* über die Prozessierung von A1-10 in die Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10 und A4-10 sowie A5-10 in verschiedenen Geweben der Ratte.^{182, 207}

Ziel dieser Arbeit war es, die proteolytische Prozessierung von Angiotensin 1-10 (A1-10) in humanem Plasma zu untersuchen und zu überprüfen, ob aus A1-10 Angiotensin-Peptide generiert werden, welche ähnlich den murinen Angiotensin-Peptiden exklusiv durch Aminopeptidasen generiert werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass A1-10 in humanem Plasma nicht nur in die bereits bekannten und gut charakterisierten Angiotensin-Peptide A1-9, A1-8 und A1-7, sondern auch in die Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10, A6-10 prozessiert wird (vgl. Abbildung 11 und Tabelle 10). Die Aminosäuresequenz des humanen A1-10 ist der von Mäusen und Ratten zu 100% homolog.²⁰⁸⁻²¹⁰ Die MALDI-Profile der Reaktionsprodukte der Inkubation von A1-10 mit Plasmaproteinen von Mensch, Maus und Ratte sind sehr ähnlich (vgl. Abbildung 11 bis Abbildung 13) Diese Beobachtung legt die Schlussfolgerung nahe, dass das System der A1-10-prozessierenden Proteasen in diesen drei Spezies konserviert ist. Die Generierung von A1-9 und A6-10 bildete dabei eine Ausnahme, da beide Peptide ausschließlich im Inkubationsansatz mit humanen Plasmaproteinen entstanden. Ein Großteil der im zirkulierenden RAS involvierten Proteasen kommt sowohl im Menschen als auch in murinen Spezies vor. Hierzu gehören unter anderem das ACE-1²¹¹, ACE-2²¹² oder Neprilysin²¹³, wobei die Sequenzhomologie dieser Proteasen im Vergleich der Spezies oftmals im Bereich von 80% und mehr liegt.

Dass die Generierung von A1-9 und A6-10 aus A1-10 lediglich nach Inkubation mit humanen Plasmaproteinen und nicht in Gegenwart von Ratten- oder Mausplasmaproteinen nachgewiesen werden konnte, weist darauf hin, dass die A2-10- bzw. A6-10-generierende Aktivität in humanem Plasma wahrscheinlich auf eine Protease zurückzuführen ist, welche im Plasma der Maus und der Ratte nicht vorhanden ist. Möglich ist auch, dass die A1-9-generierende Proteaseaktivität im

murinen Plasma durch einen endogenen Inhibitor maskiert wird. Dies wurde für die humane A1-9-generierende Protease ACE-2 bereits berichtet.¹⁹⁸

Matsui *et al.* wiesen die Angiotensin-Peptide A3-8, A4-8, A5-8 und A3-4 über fluoreszenzbasierte chromatographische Methoden²¹⁴ in humanem Plasma nach. Die Konzentration dieser Peptide im Plasma lag bei über 37 fmol/ml, wobei der Gehalt dieser Peptide stark durch die Körperhaltung der Versuchspersonen abhing. Wurde das Blut der Probanden in aufrechter Haltung abgenommen und anschließend die Menge der Angiotensin-Peptide quantifiziert, ergaben sich im Vergleich zur Rückenlage höhere Plasmalevel für A3-8, A4-8, A5-8 und A3-4.

Darüber hinaus untersuchten Matsui *et al.* die Prozessierung der Angiotensin-Peptide A1-10, A1-8, A3-8 und A4-8 in humanem Plasma²¹⁴. Die Autoren wiesen nach Inkubation von A1-10 mit humanem Plasma die Angiotensin-Peptide A2-8, A3-8 in der Reaktionslösung nach²¹⁴. Weiterhin zeigten Sie, dass A1-8 in humanem Plasma in die Angiotensin-Peptide A2-8, A3-8 und A4-8 prozessiert wird.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Matsui *et al.* konnte die *in vitro* Generierung der Angiotensin-Peptide A2-8, A3-8 und A4-8 in humanem Plasma in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Diese Angiotensin-Peptide konnten weder nach Inkubation humaner Plasmaproteine mit A1-10 noch mit A1-8 mithilfe massenspektrometrischer Methoden in den resultierenden Reaktionslösungen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 11 bis Abbildung 14). Daher wurde überprüft, ob sich diese Angiotensin-Peptide überhaupt mit MALDI-MS detektieren lassen. Zudem wurde die Nachweisgrenze für diese Peptide bestimmt. Durch MALDI-MS-Messungen von Verdünnungsreihen einer äquimolaren Angiotensin-Peptidmischung, welche die Angiotensin-Peptide A2-8, A3-8, A4-8, A5-8 und A6-8 enthielt, konnte gezeigt werden, dass diese Peptide durch die MALDI gut ionisierbar und desorbierbar sind (vgl. Abbildung 15). Lagen die Peptide in einem äquimolaren Gemisch mit den Angiotensin-Peptiden A3-10, A4-10, A5-10, A6-10 vor, waren die erstgenannten Angiotensin-Peptide selbst noch in einer Konzentration von 10^{-7} M in der Lösung mittels MALDI-MS detektierbar.

Wie in Abbildung 21 gezeigt konnten die Angiotensin-Peptide A2-8, A3-8 und A4-8 ebenso in der Reaktionslösung nach Inkubation von A2-10 mit humanen Plasmaproteinen detektiert werden. Falls die Peptide A2-8, A3-8 und A4-8 auch während der Inkubation von A1-10 oder A1-8 mit humanen Plasmaproteinen generiert werden, müssten sich diese demnach ebenso in der Reaktionslösung mittels MALDI-

MS detektieren lassen. Da dies nicht der Fall war, muss davon ausgegangen werden, dass die Peptide A2-8, A3-8 und A4-8 in humanem Plasma nicht oder nur in sehr geringer Menge aus A1-10 oder A1-8 generiert werden. Weshalb die Diskrepanz zu den Ergebnissen zu Matsui *et al.* besteht, kann an daher dieser Stelle nicht eindeutig aufgeklärt werden.

Um zu überprüfen, ob die Angiotensin-Peptiden A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 physiologisch relevant sind, muss zunächst die Frage geklärt werden, ob es sich bei diesen Peptiden um Artefakte handeln könnte. Eine Verdünnung des Plasmas, wie sie beispielsweise bei der Immobilisierung der Plasmaproteine geschieht, kann mit dem Abdissoziieren von Inhibitoren oder von Kofaktoren einhergehen, wie beispielsweise für Cathepsin B gezeigt wurde.¹⁹⁹ Die Immobilisierung der Plasmaproteine könnte daher Quelle einer artifiziellen Generierung der Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 sein. Die in Abbildung 18 in Abschnitt 3.1.4 dargestellten Ergebnisse zeigten jedoch, dass A1-10 sowohl in Anwesenheit von verdünntem als auch von unverdünntem Plasma in die Angiotensin-Peptide A1-9, A1-8, A1-7, A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 umgesetzt wird. Dies lässt den Schluss zu, dass Kofaktoren oder Inhibitoren für die Generierung dieser Peptide keine primäre Rolle spielen. Es kann also angenommen werden, dass die nach Inkubation von A1-10 mit immobilisierten Plasmaproteinen beobachtete Generierung von A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 nicht das Produkt demaskierter Proteaseaktivitäten ist.

Eine Grundvoraussetzung für eine signifikante physiologische Relevanz der Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 ist ihre Präsenz im Blut. Durch Verwendung eines Immunfluoreszenz-Assays gelang in dieser Arbeit der Nachweis der Angiotensin-Peptide A4-10, A5-10 und A6-10 im Plasma (vgl. Abbildung 31). Die in dieser Arbeit bestimmte Plasmakonzentration von A4-10 lag bei 8 pg/ml, die Konzentration an A5-10 betrug 53 pg/ml. Verglichen mit den von Reyes-Engel *et al.* beschriebenen Plasmaleveln der Angiotensin-Peptide A1-8 (ca. 22pg/ml) oder A1-7 (ca. 32pg/ml)²⁰³ liegen die hier bestimmten Plasmalevel von A4-10 und A5-10 in einem ähnlichen Bereich. Die in dieser Arbeit bestimmte Plasmakonzentration von A6-10 betrug 7 ng/ml. Verglichen mit den gemessenen Konzentrationen an A3-10, A4-10 und A5-10 stellt dies eine ca. um den Faktor 1000 höhere Konzentration dar. Diese überraschend hohe Plasmakonzentration an A6-10 könnte darauf

hinweisen, dass A6-10 das Endprodukt der proteolytischen Kaskade darstellt. Die Tatsache, dass über MALDI-MS keine kleineren peptidischen Reaktionsprodukte in den Reaktionslösungen nach Inkubation von humanem Plasma mit A1-10 detektiert werden konnten, unterstützt diese Hypothese.

Um die Generierung der Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 näher zu charakterisieren, sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob diese Peptide sukzessiv durch Aminopeptidasen aus A1-10 generiert werden oder das Produkt endoproteolytischer Proteaseaktivitäten sind. Wie die Ergebnisse aus Abbildung 11 zeigen, sind die in humanem Plasma vorhandenen Aminopeptidasen fähig, sowohl A2-10, A3-10, A4-10 als auch A5-10 als Substrate zu erkennen und diese in die N-terminalen Proteolyseprodukte zu spalten. Damit ist eine Grundvoraussetzung für die sukzessive proteolytische Generierung der Peptide A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 gegeben. Die Prozessierung von A1-10 durch Aminopeptidasen in humanem Plasma wird in Abbildung 37 veranschaulicht. Folglich müsste der proteolytische Schnitt des A1-10 zwischen dem Asp1 und Arg2 zum A2-10 den terminierenden Schritt für die Generierung der weiteren Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 darstellen.

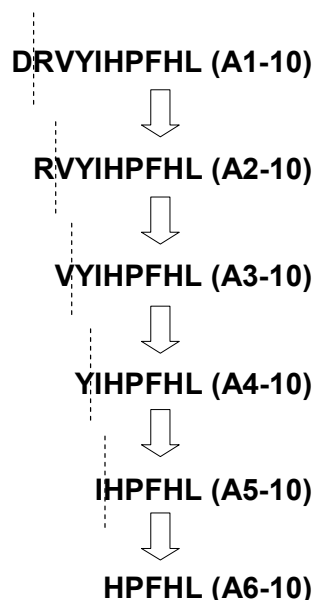


Abbildung 37. Prozessierung von Angiotensin A1-10 durch Aminopeptidasen in humanem Plasma. Die Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 werden sukzessiv durch Abspaltung der N-terminal gelegenen Aminosäuren durch Aminopeptidasen (unterbrochene Linien) generiert.

Des Weiteren galt es zu untersuchen, welche Proteasen im Plasma an der Generierung der Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 aus A1-10 beteiligt sind. Durch die Datenbank MEROPS (Version 9.7)²¹⁵ wurden anhand ihrer Schnittspezifitäten mehrere Proteasen vorgeschlagen, welche A1-10 theoretisch zu den Angiotensin-Peptiden A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 spalten könnten. Eine Übersicht der humanen Proteasen ist in Tabelle 11 zusammengefasst.

Für die Generierung von A2-10 muss die N-terminale Aminosäure Asp1 von A1-10 (DRVYIHPFHL) abgespalten werden. Die Aminopeptidase X, die Aspartyl-Aminopeptidase als auch die Endoplasmatische Retikulum Aminopeptidase 1 wurden als mögliche Proteasen für diese Hydrolyse vorgeschlagen. Bei der Aminopeptidase X handelt es sich um eine Metalloprotease, welche bisher lediglich von Sim *et al.* in der Ratte beschrieben wurde.²¹⁶ Dort ist sie nachweislich für die Generierung von A2-10 aus A1-10 zuständig. Die Präsenz dieser Protease wurde einer Vielzahl von Geweben und im Plasma der Ratte nachgewiesen.²¹⁶ Bei der Aspartyl-Aminopeptidase handelt es sich um eine cytosolische zinkabhängige Protease²¹⁷, welche bevorzugt am N-Terminus gelegenes Asp aber auch Glu abspaltet.²¹⁸

Die Aspartyl-Aminopeptidase kommt in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe im Menschen und anderen Säugetieren vor. Aufgrund ihrer cytosolischen Lokalisation wirkt diese Protease wahrscheinlich nicht als A2-10-generierende Protease.

Die Endoplasmatische Retikulum Aminopeptidase 1 (ERAP-1) spaltet präferenziell 9-16 Aminosäuren lange Peptide.²¹⁹ Die Spaltung des Substrates erfolgt präferenziell nach Leu.²²⁰ Dabei werden Peptide mit hydrophobem C-Terminus werden bevorzugt durch ERAP-1 hydrolysiert. Weiterhin wurde beschrieben, dass die proteolytische Prozessierung von längeren Peptidsubstraten durch ERAP-1 nur in Kombination mit ERAP-2 stattfindet.²²¹ Da es sich bei der ERAP-1 um eine membranständige Protease handelt, welche in der Membran des endoplasmatischen Retikulums vorkommt, kann angenommen werden, dass diese Protease keine Anteil an der Generierung von A2-10 aus A1-10 hat.

Diskussion

Tabelle 11. Vergleich der Eigenschaften potentieller A2-10-, A3-10-, A4-10-, A5-10- und A6-10-generierender Proteasen mit den in dieser Arbeit beobachteten Eigenschaften der A2-10-, A3-10-, A4-10-, A5-10- und A6-10-generierenden Plasmaproteasen. Die in dieser Tabelle aufgelisteten Proteasen wurden aus der Proteasedatenbank MEROPS (Version 9.7). nach folgenden Kriterien aufgelistet: Proteasen, welche entsprechend ihrer bereits bekannten Schnittspezifität die mit jeweils einem Stern gekennzeichnete Peptidbindung der vorgegebene Peptidsequenz von A1-10 spalten könnten. Zusätzlich wurden die über die Inkubationsversuche von A1-10 mit Plasmaproteinen gewonnenen Ergebnisse über die Plasmaproteaseinhibitoren der Angiotensin-Generierenden Plasmaproteasen dargestellt (vgl. Abbildung 22). ER: Endoplasmatisches Retikulum. Xaa: Beliebige Aminosäure.

Sequenzvorgabe für MEROPS	Protease	Accession no. (Swiss Prot)	Schnittspezifität	Lokalisation	Inhibierbar durch:
D*RVYIHPFHL (A2-10)	Aspartyl-Aminopeptidase	Q9ULA0	Nach N-terminalem Asp	Cytoplasma	EDTA, o-Phenantrolin
	Endoplasmatische Retikulum Aminopeptidase 1	Q9NZ08	Nach Leu sowie Peptide mit hydrophobem C-Terminus ²²⁰	ER Membran	EDTA, Bestatin
	Plasmaprotease		Zwischen Asp-Arg	Blutplasma	AEBFS
DR*VYIHPFHL (A3-10)	Nepriylisin	P08473	Thermolysin-ähnlich, vor Leu oder Phe, hydrophoben AS	Membran, Blutplasma	EDTA, Thiorphan, Phosphoramidon
	Plasmaprotease		Zwischen Arg2-Val3	Blutplasma	Aprotinin, AEBFS
DRV*YIHPFHL (A4-10)	<i>Endothelin converting enzyme 1</i> ²²²	P42892	Pro7-Phe8, auch Val3-Tyr4 und Tyr4-Ile5, Trp-Val ²²³	Membran	EDTA, Captopril, Phosphoramidon
	Tripeptidyl-Peptidase I	O14773	Unspezifisch	Lysosom, Melanosom	Chymostatin, Aprotinin
	Nepriylisin	P08473	Thermolysin-ähnlich, hydrophobe AS	Membran, Blutplasma	EDTA, Thiorphan, Phosphoramidon
	Neutrophile Elastase	P08246	Chymotrypsin-ähnlich Tyr-Xaa, Trp-Xaa, Phe-Xaa, Leu-Xaa sowie nach Val und Ala	Neutrophile, Blutplasma	Alpha 1-antitrypsin
	Plasmaprotease		Zwischen Val3-Tyr4	Blutplasma	AEBFS
DRVY*IHPFHL (A5-10)	Thimet Oligopeptidase	P52888	Zwischen hydrophoben AA an P1, P2 und P3' und einem kleinen Rest an P1'	Cytoplasma, Zellkern, Blutplasma	o-Phenantrolin, EDTA
	Nepriylisin	P08473	Thermolysi-ähnlich, hydrophobe AS	Membran, Blutplasma	EDTA, Thiorphan, Phosphoramidon
	Nepriylisin 2	Q495T6	hydrophobe AS	Membran, Blutplasma	EDTA, Thiorphan, Phosphoramidon
	<i>Endothelin converting enzyme 1</i>	P42892	Zwischen Pro7-Phe8, Val3-Tyr4, Tyr4-Ile5 und Trp-Val ²²³	Membran	EDTA, Captopril, Phosphoramidon
	Cathepsin G	P08311	Chymotrypsin-ähnlich: Leu-Xaa, Tyr-Xaa, Phe-Xaa, Met-Xaa, Trp-Xaa, Gln-Xaa, Asn-Xaa.	Neutrophile, Blutplasma	Chymostatin
	Chymase	P23946	Nach Phe> Tyr >Trp > Leu	Mastzellen, Blutplasma	Chymostatin, Antipain, Aprotinin,
	Plasmaprotease		Zwischen Tyr4-Ile5	Blutplasma	Bestatin, EDTA

Die Protease Neprilysin (NEP) könnte ihrer Schnittspezifitäten zufolge A1-10 zwischen den Aminosäuren Arg2-Val3 spalten.⁸³ Somit kommt sie als potenzielle A3-10-generierende Proteasen infrage.

NEP ist eine zinkabhängige Metalloprotease mit relativ breiter, Thermolysin-ähnlicher Schnittspezifität.²²⁴ Bevorzugt spaltet sie vor hydrophoben Aminosäuren. NEP existiert sowohl in membranständiger, als auch in zirkulierender Form.²²⁵ Die lösliche Form des NEP kann aus neutrophilen oder alveolaren Epithelzellen ins Plasma sekretiert werden, wobei der genaue Mechanismus der Sekretion noch nicht bekannt ist. Die katalytische Aktivität des NEP lässt sich effizient durch den bivalenten Metallionenchelator EDTA hemmen.²²⁶ Bei EDTA handelt es sich um einen Chelator, welcher stabile Chelatkomplexe mit mindestens zweiwertigen Metallkationen bilden kann. Da die im katalytischen Zentrum der Metalloproteasen befindenden Metallionen für die Hydrolyse des Substrates essenziell sind, wie es beispielsweise für ACE-1 beschrieben wurde²²⁷, ist eine proteolytische Aktivität nach Entzug des Metallions nicht mehr möglich. Weder die A3-10- noch die A4-10- oder die A5-10-generierende Aktivität wurde in Gegenwart von EDTA im Vergleich zum Ansatz ohne Inhibitor verringert (vgl. Abbildung 22). Daher kann die Beteiligung von NEP an der Generierung dieser Peptide mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Für die Generierung von A4-10 (YIHPFHL), das heißt für die Spaltung der A1-10-Peptidbindung zwischen dem Val3-Tyr4, kommen anhand ihrer bisher bekannten Schnittspezifitäten folgende Proteasen infrage: NEP, ECE-1, neutrophile Elastase (NE) sowie die Tripeptidyl-Peptidase 1 (TP1). Da die A4-10-generierende Aktivität in Gegenwart von EDTA nicht inhibiert wurde, ist NEP als A4-10-generierende Protease mit hohem Wahrscheinlichkeitsgrad auszuschließen.

ECE-1 gilt als membrangebundenes Enzym. Korth *et al.* gelang es eine katalytisch aktive lösliche Form des ECE-1 zu exprimieren. Diese weist im Vergleich zur membranösen Form gleiche Substratspezifitäten auf.²²⁸ Johnson *et al.* fanden durch Inkubation der rekombinant exprimierten löslichen Form des ECE-1 und anschließende Analyse der Reaktionslösung mit MALDI-MS heraus, dass die lösliche Form des ECE-1 A1-10 zwischen Val3-Tyr4, dem Tyr4-Ile5 sowie zwischen den Aminosäuren Pro7-Phe8 spalten kann, wobei Letzteres die bevorzugte Schnittstelle darstellt.²²³ Als Metalloprotease ist die ECE-1-Aktivität durch EDTA inhibierbar, wobei nach Matsuura *et al.* der inhibitorische Effekt durch Zugabe von 10 mM Zn^{2+} aufgehoben werden kann.²²⁹ Sollte eine lösliche Form des ECE-1 in humanem

Plasma existieren, wäre dessen Beteiligung an der Hydrolyse von A1-10 zu A4-10 unwahrscheinlich, da die A4-10-generierende Aktivität in Gegenwart von EDTA nicht inhibiert wurde.

Die NE ist eine ca. 30 kDa große glykosylierte Serin-Protease mit Chymotrypsin-ähnlicher, breiter Schnittspezifität. Sie wird von Neutrophilen gespeichert und spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort und steht in Verbindung mit inflammatorischen Prozessen.²³⁰ Weiterhin ist sie an der Blutgerinnungskaskade beteiligt, da sie mitunter an der Spaltung von Koagulationsfaktoren wie Fibrinogen²³¹, Plasminogen²³² oder Fibronectin²³³ mitwirkt. Während der Blutkoagulation wird die NE hauptsächlich durch Kallikrein aus Neutrophilen freigesetzt. Im gesunden Organismus werden nur sehr geringe Mengen der NE ins Plasma sezerniert. Diese werden zügig durch endogene Proteaseinhibitoren wie α 1-Antitrypsin oder α 2-Macroglobulin komplexiert und die Aktivität der NE somit inhibiert.²³⁴ Eine Beteiligung der NE an der Generierung von A4-10 ist demnach relativ unwahrscheinlich, jedoch nicht ausgeschlossen. Die Beteiligung der TP1 an der Generierung von A4-10 ist ebenfalls nicht wahrscheinlich, da diese Calcium-abhängige Serinprotease im Lysosom als auch in Melanosomen lokalisiert ist.²³⁵ Zudem liegt der optimale pH-Wert für die katalytische Aktivität der TP1 bei 5.²³⁶

Die im Vergleich zur Abwesenheit von Inhibitoren reduzierte Generierung von A4-10 nach Inkubation humaner Plasmaproteine mit A1-10 in Gegenwart der Serinproteaseinhibitoren Chymostatin, Aprotinin und Antipain deutet auf eine mögliche Beteiligung der NE an der Generierung von A4-10 hin. Es kann jedoch keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob die beobachtete verminderte A4-10-generierende Aktivität in Gegenwart dieser Inhibitoren auf eine direkte Inhibition der A4-10 generierenden Protease zurückzuführen ist. Die Generierung von A3-10 war in Anwesenheit von Aprotinin, Antipain und Chymostatin ebenfalls reduziert.

Ausgehend von der Annahme, dass die Angiotensin-Peptide sukzessiv durch Aminopeptidaseaktivität aus A1-10 generiert werden, könnte die Generierung von A4-10 demnach auch durch eine verringerte A3-10-generierende Aktivität beeinflusst worden sein. Trotz großer Ähnlichkeit der Inhibitionsprofile für A3-10, A4-10 und A5-10 kann hier nicht geklärt werden, ob es sich um ein und dieselbe Protease handelt, welche die genannten Angiotensin-Peptide generiert. Es muss sich jedoch um ähnliche Proteasen der Serin- oder Cysteinfamilie handeln.

Im Hinblick auf die bisher bekannten Schnittspezifitäten könnte die Thimet Oligopeptidase (TOP), ECE-1, NEP, NEP-2, Cathepsin G oder die Chymase A1-10 zwischen dem Tyr4 und dem Ile5 spalten und somit A5-10 (IHPFHL) generieren.

Die TOP, früher als Pz-Peptidase oder Oligopeptidase A bekannt, ist eine Zinkabhängige Endopeptidase²³⁷, welche an der proteolytischen Prozessierung vieler Peptidsubstrate wie Neurotensin, Enkephalin-Precursor und Bradykinin beteiligt ist.²³⁸ Sie wird hauptsächlich in Geweben wie dem Gehirn, der Hirnanhangdrüse und den Hoden exprimiert und es wurden hohe Konzentrationen der TOP in T- und B-Lymphozyten nachgewiesen.²³⁹ Es ist bekannt, dass TOP sowohl in cytosolischer bzw. zirkulierender Form sowie als membranassoziierte Form vorkommt und im Nukleus lokalisiert ist.²⁴⁰ TOP ist auch in den Hinterextremitäten von Ratten vorhanden und fähig A1-7 aus A1-10 zu generieren.¹⁸¹ Knight *et al.* berichteten, dass TOP ihre Peptidsubstrate präferiert in der Nähe des C-Terminus spaltet, wobei die Länge der abgespaltenen Peptide bis zu 6 Aminosäuren betragen kann.²⁴¹

Bei TOP handelt es sich um eine Metalloprotease. Die A5-10-generierende Aktivität war in Gegenwart von EDTA im Vergleich zum Ansatz ohne Inhibitor leicht erniedrigt. Demnach könnte TOP teilweise an der Generierung von A5-10 beteiligt sein. Der Hauptanteil der Generierung von A5-10 wird wahrscheinlich durch andere Proteasen katalysiert.

Die Serinprotease Chymase kommt potenziell auch als A5-10-generierende Protease infrage. Der stärkste inhibitorische Effekt auf die Generierung von A5-10 wurde in Gegenwart von Antipain, einem reversiblen Serin- und Cysteinprotease-Inhibitor von Trypsin-ähnlichen Proteasen, festgestellt.

Chymase wird in humanen Mastzellen gespeichert und sezerniert. Ihre Aktivität im Plasma wird durch den endogenen Plasmaproteaseinhibitor alpha2-Macroglobulin gehemmt, wodurch ihre Fähigkeit zur Spaltung großer Substrate z. B. Serpinen inhibiert wird, die Fähigkeit zur Spaltung kleinerer Peptidsubstrate wie A1-10 jedoch erhalten bleibt.²⁴² In pathophysiologischem Geschehen wie der Präeklampsie ließen sich zudem erhöhte Chymaseaktivitäten im Plasma nachweisen.²⁴³ Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann jedoch die Chymase als A5-10-generierende Protease ausgeschlossen werden, da in dieser Arbeit *in vitro* gezeigt werden konnte, dass nach Inkubation rekombinanter Chymase mit A1-10 als einziges Reaktionsprodukt A1-8 entsteht (vgl. Abbildung 40). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurden in der Literatur neben der Generierung von A1-8 keine weiteren A1-10 abstammenden Reaktionsprodukte durch Chymaseaktivität beschrieben.

Cathepsin G ist fähig A1-10 katalytisch in A1-8 zu spalten. Es ist ebenfalls Mitglied der Serinproteasenfamilie mit chymotrypsin-ähnlicher Schnittspezifität, wird von Neutrophilen exprimiert und kommt hauptsächlich in membrangebundener Form auf deren Zelloberfläche vor²⁴⁴, wird aber auch ins Blutplasma sezerniert. Cathepsin G ist eine Protease mit Trypsin- bzw. Chymotrypsin-ähnlicher Schnittspezifität. Daher kommt Cathepsin G als A5-10 generierende Protease infrage. Chymotrypsin ist ein potenter Cathepsin G Inhibitor. Die A5-10-generierende Aktivität wurde jedoch in Anwesenheit von Chymostatin nicht signifikant inhibiert.

NEP2 kommt in zwei unterschiedlichen membrangebundenen Proteinspezies vor, NEP2 und NEP2^Δ, welche durch alternatives Spleißen hervorgehen.²⁴⁵ NEP2 existiert im Menschen sowohl als membrangebundenes als auch als lösliches Protein. NEP2^Δ selbst kommt in zwei membrangebundenen hochglykosylierten Proteinspezies vor. Thomas *et al.* identifizierten auch in der Fruchtfliege eine lösliche Form von NEP2.²⁴⁶ Zwischen NEP und NEP2 besteht eine Sequenzhomologie von 54%, wobei sich NEP2 sowohl die Substratspezifitäten betreffend, als auch bezüglich Inhibitorsensitivitäten deutlich von NEP unterscheidet.²⁴⁵ Nach Whyteside *et al.* hydrolysiert NEP effektiv die Peptide Bradykinin, Substanz P und Neurotensin sowie A1-10 und A1-8. NEP2 prozessierte Substanz P und A1-10 mit hoher Aktivität. Die Bradykinin-prozessierende Aktivität von NEP2 betrug jedoch lediglich 57% im Vergleich mit NEP. A1-8 wurde während der Inkubation mit NEP2 lediglich zu 2% abgebaut.

Da die in Gegenwart von EDTA generierte Menge an A5-10 etwas geringer ausfiel als in Abwesenheit von EDTA, ist es denkbar, dass die lösliche Form von NEP2 oder NEP als A5-10-generierende Protease im Plasma beteiligt ist. Da der inhibitorische Effekt von EDTA jedoch gering ausgeprägt war, sind neben NEP2 oder NEP vermutlich auch andere Proteasen der Generierung von A5-10 verantwortlich. Da bisher keine im Plasma zirkulierende Form des ECE-1 beschrieben wurde, spielt diese Protease aufgrund ihrer Membranständigkeit bei der Generierung von A5-10 im Plasma keine Rolle

Für die Generierung von A6-10 (HPFHL) muss die proteolytische Hydrolyse von A1-10 bzw. A5-10 zwischen den Aminosäuren Ile5 und His6 stattfinden. In MEROPS²¹⁵ wurden hierzu keine humanen Proteasen gefunden, die A1-10 zwischen diesen Aminosäuren spalten. Demzufolge muss die A6-10-generierende Protease eine noch nicht beschriebene substratspezifische Schnittspezifität besitzen. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit die APN als A6-10 generierende Protease charakterisiert werden

(Abbildung 23 bis Abbildung 28). Dieses Ergebnis wird in einem späteren Abschnitt näher diskutiert.

Eine weitere Frage war, ob die Generierung der Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 auch von ein und derselben Aminopeptidase bewerkstelligt wird. Die in Abbildung 22 gezeigten Inhibitionsprofile zeigen, dass die gleiche Protease welche A2-10 generiert auch für die Generierung von A3-10 und A4-10 zuständig sein könnte. Da die Generierung dieser Peptide durch Antipain (Cystein- und Serinproteaseinhibitor)²⁴⁷ inhibiert wurde, muss diese Protease der Cystein- oder Serin-Proteasenfamilie angehören. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der A6-10-generierenden Protease höchstwahrscheinlich um eine Metalloprotease, da die Anwesenheit von EDTA die Bildung von A6-10 aus A1-10 vollständig inhibiert.

Der spezifische ACE-1-Hemmer Captopril führte wie erwartet zu einer deutlich verringerten Bildung an A1-8, jedoch nicht zu einer verminderten Generierung von A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 oder A6-10, weshalb das ACE-1 für die Generierung dieser Peptide ausgeschlossen werden kann.

Takai *et al.* berichteten in der Ratte von der Chymostatin-sensitiven Generierung von A5-10.¹⁸³ In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die in Gegenwart des Inhibitors Chymostatin während der Inkubation humaner Plasmaproteine mit A1-10 generierte Menge an A5-10 im Vergleich zum Ansatz ohne Inhibitor erhöht war. Dies zeigt, dass sich die murine A5-10-generierende Protease von der A5-10-generierenden Protease im Menschen unterscheidet.

Die Aminopeptidase A (APA) ist eine Metalloprotease, welche in einer Vielzahl verschiedener Gewebe^{248, 249} und in Serum¹⁷² nachgewiesen wurde. Theoretisch könnte die APA eine A2-10-generierende Aktivität besitzen, da sie A1-8 zwischen den N-terminal gelegenen Aminosäuren Asp-Arg hydrolysiert und damit A2-8 generiert.²⁵⁰ Diese Vermutung wird durch die kürzlich veröffentlichte Arbeit von Velez *et al.* unterstützt. Dort wurde gezeigt, dass A1-10 in humanen Podozyten zu A2-10 gespalten wird und dass die APA in diesen Zellen exprimiert wird.²⁵¹ Da die A2-10-generierende Aktivität in humanem Plasma jedoch in Gegenwart von EDTA erhöht war, spielt die APA im Plasma bei der Generierung von A2-10, wenn überhaupt, eine eher untergeordnete Rolle.

Palmieri *et al.* berichteten, dass A2-8 durch die Aminopeptidase N (APN) zwischen den N-terminalen Aminosäuren Arg2-Val3 weiter zu A3-8 gespalten werden kann.¹⁷³ Da es sich dabei um die gleiche Schnittstelle handelt, die zur Generierung von A3-10 aus A1-10 gespalten werden müsste, kommt die APN als A3-10 generierende Protease in Betracht. Velez *et al.* postulierten, dass A2-10 durch APN in humanen Podozyten weiter zu A3-10 gespalten wird.²⁵¹ Durch Palmieri *et al.* wurde gezeigt, dass die APN kultivierter porciner Endothelzellen und Glatter Gefäßmuskelzellen fähig ist A2-10 abzubauen.¹⁷³ Es handelt es sich bei der APN um eine zinkabhängige Metalloprotease, welche sowohl als membrangebundene Form als auch als lösliche Form vorkommt.²⁵² Die lösliche Form der APN wurde sowohl aus humanem Urin²⁵³ als auch aus Plasma²⁵² isoliert. Favoloro *et al.* fanden heraus, dass die lösliche Form der APN die dominierende funktionelle Aktivität im Vergleich zur membrangebundenen Form im Plasma ausübt.²⁵²

Das Ergebnis der in dieser Arbeit untersuchten Prozessierung der Angiotensin-Peptide A1-10, A1-8, A2-10, A3-10, A4-10 und A5-10 durch die APN ist schematisch in Abbildung 38 dargestellt.

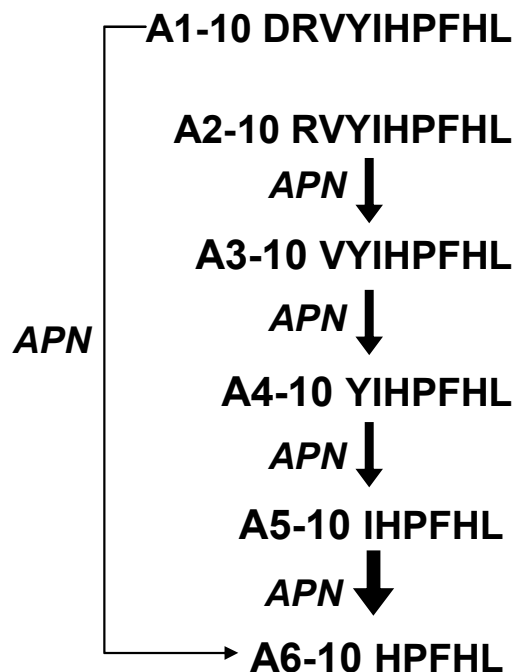


Abbildung 38. Prozessierung von unterschiedlichen Angiotensin-Peptiden durch rekombinante Aminopeptidase N (APN) *in vitro*. Die diesem Schema zugrunde liegenden Ergebnisse wurden nach Inkubation von APN mit den Angiotensin-Peptiden A1-10, A2-10, A3-10, A4-10 und A5-10 und anschließender Analyse der Reaktionsprodukte mittels MALDI-MS gewonnen (vgl. Abschnitt 3.2, Abbildung 23 bis Abbildung 28).

Hier wurde gezeigt, dass nach Inkubation von A1-10 mit rekombinanter APN entgegen der Erwartung nicht A3-10, sondern A6-10 entsteht (Abbildung 23). A1-8 wurde *in vitro* nicht von der APN prozessiert, was zeigt, dass diese Protease substratspezifisch agiert. Die Generierung von A3-8 durch APN verlangt demnach zunächst eine initiale Spaltung von A1-8 zu A2-8. Insgesamt entsteht der Eindruck, dass die APN bevorzugt kürzere Peptidsubstrate umsetzt (vgl. Abbildung 23 bis Abbildung 28). Vor allem scheint das Vorhandensein des N-terminalen Asp1 des A1-10 dessen Prozessierung durch APN stark zu hemmen. Scheinbar hydrolysiert die APN bevorzugt Peptidsubstrate mit basischen oder neutralen Aminosäureresten am N-Terminus.

Lag A2-10 als Substrat vor, generierte die APN nicht nur A6-10, sondern auch die Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10. Dies bestätigt die Hypothese von Velez *et al.*, erweitert jedoch auch das bisher bekannte Substratspektrum der APN. Da auch im Plasma die Peptide A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 aus A2-10 generiert werden (vgl. Abbildung 21) liegt die Vermutung nahe, dass die APN auch im Plasma für die Generierung der Angiotensin-Peptide katalysiert. Da die A2-10-, A3-10-, A4-10-generierende Aktivität jedoch weder durch den APN-Inhibitor Bestatin noch in Gegenwart von EDTA inhibiert wurde, spielt die APN im Vergleich zu Proteasen der Cystein/Serin-Familie wahrscheinlich eine Nebenrolle bei der Generierung dieser Angiotensin-Peptide im Plasma.

In vitro zeigte sich, dass die APN die Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10 und A5-10 effizient in A6-10 prozessiert. Da A6-10 auch nach längeren Inkubationszeiten nicht weiter abgebaut wurde (vgl. Abbildung 25 bis Abbildung 28) kann vermutet werden, dass dieses Peptid das Endprodukt der APN-Kaskade darstellt. Als zinkabhängige Metalloprotease käme die APN tatsächlich als A6-10 generierende Protease im Plasma infrage. Aufgrund der in dieser Arbeit gemessenen hohen A6-10-Plasmakonzentrationen wurde bereits die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei A6-10 möglicherweise um das Endprodukt der Aminopeptidasekaskade im Plasma handelt. Die effiziente Generierung von A6-10 durch rekombinante APN untermauert diese Vermutung. Da die A6-10-generierende Aktivität zwar in Gegenwart von EDTA jedoch nicht von Bestatin, einem potenten APN-Inhibitor²⁵⁴ inhibiert wurde weist darauf hin, dass eine weitere Metalloprotease mit A6-10-generierender Aktivität im Plasma existieren muss.

Garcia *et al.* schlugen vor, dass die Generierung von A2-10 aus A1-10 im Blut von Ratten als zusätzlicher Weg für die proteolytische Prozessierung von A1-10 existiert.²⁵⁵ Die Autoren vermuteten, dass ACE-1 *in vivo* für die Degradation von A2-10 in A2-8 verantwortlich ist, da nach intravenöser Injektion von A2-10 in Ratten die Generierung von A2-8 vollständig durch den ACE-1-Inhibitor Captopril inhibiert wurde. Es erscheint naheliegend, dass auch im Menschen durch ACE-1 welches hauptsächlich auf Endothelzellen und im Plasma vorkommt, die letzten zwei C-terminalen Aminosäuren His-Leu von A-1-10 abgespalten werden. Somit könnte ACE-1 theoretisch zur *in vivo*-Prozessierung von A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 im Plasma beitragen. Wie das Ergebnis in Abbildung 11 zeigt, scheint auch eine Plasmaprotease zu existieren, welche A2-10 in die Angiotensin-Peptide A2-8, A3-8 und A4-8 prozessiert. Möglicherweise wird dies durch die lösliche Form des ACE-1-katalysiert.

Eine Zusammenfassung der Prozessierung von A1-10 in humanem Plasma unter Einbezug der in dieser Arbeit dazugewonnenen Ergebnisse ist in Abbildung 39 dargestellt.

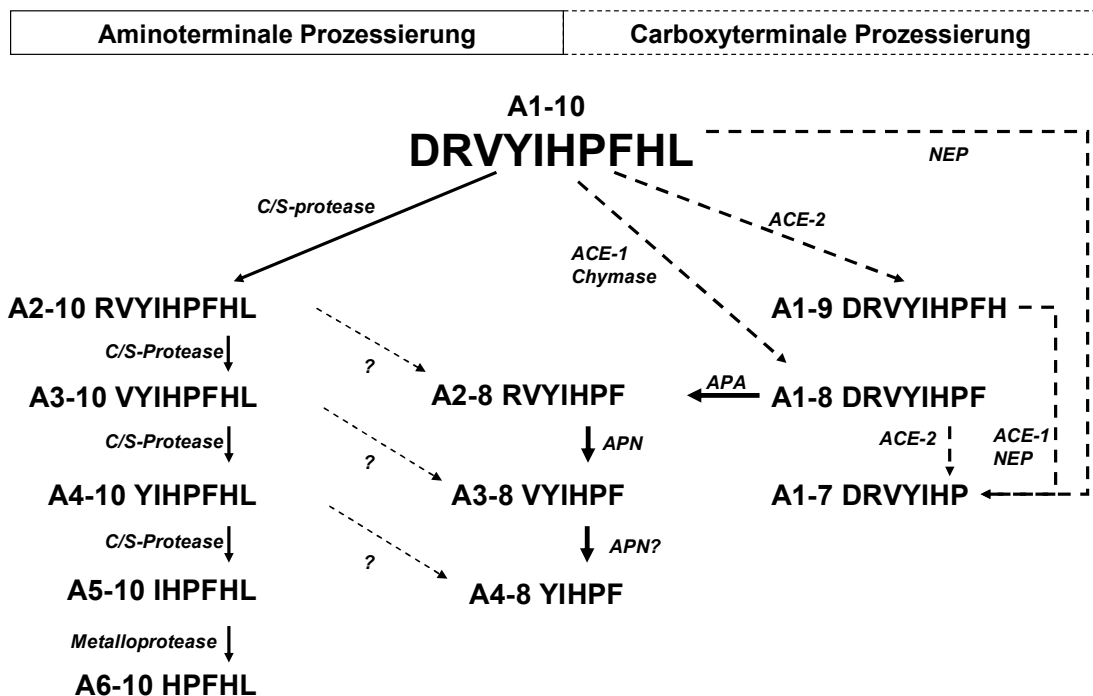


Abbildung 39. Prozessierung von A-1-10 in humanem Plasma. Aminoterminal-Modifikation der Angiotensin-Peptide wird durch durchgezogene Linien, carboxyterminal-Modifikation durch unterbrochene Linien angezeigt. C/S: Cystein/Serin-Protease. APA: Aminopeptidase A, APN: Aminopeptidase N, NEP: Neprilysin.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen vermuten, dass die Angiotensin-Peptide A2-8, A3-8 und A4-8 in humanem Plasma bevorzugt aus A2-10 und eher zu einem geringen Anteil aus A1-8 generiert werden. Dafür spricht, dass die Generierung der Peptide A2-8, A3-8 oder A4-8 nicht in den Reaktionslösungen nach Inkubation von A1-10 mit Plasmaproteinen detektiert wurden, obwohl A1-8 generiert wurde. Es wurde gezeigt, dass A2-10 in humanem Plasma offensichtlich zügig aus A1-10 generiert und in die Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 weiterprozessiert wird (vgl. Abbildung 11, Abbildung 18, Abbildung 20). Scheinbar erfolgt die N-terminale Hydrolyse von A2-10 im Plasma, im Vergleich zur C-terminalen Prozessierung, welche zur Generierung von A2-8 führen würde, bevorzugt. Sind jedoch hohe Konzentrationen an A2-10 vorhanden, lässt sich *in vitro* auch die Generierung der Angiotensin-Peptide A2-8, A3-8 und A4-8 in Gegenwart humaner Plasmaproteine nachweisen (vgl. Abbildung 21).

In dieser Arbeit sollte zudem untersucht werden, ob die Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 physiologisch aktiv sind. Da die hier untersuchten Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 im Blut nachgewiesen wurden, sind sie Teil des zirkulären Systems. Demnach bieten sich Experimente mit isolierten Blutgefäßen an, da die Angiotensin-Peptide nach ihrer Generierung im Plasma die Möglichkeit haben mit Endothel-ständigen Rezeptoren zu interagieren.

A1-8 beispielsweise kann seine Vasoaktivität im Menschen entweder über den AT₁-Rezeptor oder über den AT₂-Rezeptor vermitteln, wobei der AT₁-Rezeptor eine Vasokonstriktion auslöst und der AT₂-Rezeptor eine Vasodilatation vermittelt.^{58, 129} In Mäusen²⁵⁶ und Ratten²⁵⁷ wird der der AT₁-Rezeptor in zwei Subtypen, AT_{1a} und AT_{1b}, unterschieden.

Mithilfe einer Druck-Myographie an der Halsschlagader der Maus wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 ebenfalls vasoaktiv sind. Wie in Abbildung 32 dargestellt, wurde ein vasodilatatorischer Effekt der Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 auf die Maus-Halsschlagadern gemessen. Die untersuchten Peptide besitzen demnach eine, wenn auch im Vergleich zum potenten Vasodilator NNP geringe, vasodilatatorische Aktivität.

Für die Vermittlung dieser beobachteten vasodilatatorischen Effekte kommt der AT₂-Rezeptor als auch der Mas-Rezeptor infrage, da beide Rezeptoren bereits im Zusammenhang mit der Vermittlung vasodilatatorischer Effekte beschrieben wurden.

Der AT₂-Rezeptor ist im Menschen als auch in murinen Spezies hauptsächlich in fötalem Gewebe präsent²⁵⁸, wurde jedoch von Utsunomiya *et al.* ebenfalls in kardiovaskulärem Gewebe nachgewiesen.²⁵⁹

Yamaka *et al.* zeigten, dass über die Bindung von A1-8 an den AT₂-Rezeptor eine Aktivierung des Kinin-Systems initialisiert werden kann¹²⁹, was in einer durch NO^{130, 131} bzw. cGMP-vermittelten Vasodilatation resultiert.

Der Mas-Rezeptor wird hauptsächlich im Hippocampus und dem zerebralen Cortex der Ratte²⁶⁰ und in den Hoden²⁶¹ exprimiert. Seine Expression wurde auch in der Niere und im Herzen nachgewiesen.

Über den Mas-Rezeptor ist bekannt, dass er an der Vermittlung einer durch Bindung von A1-7 ausgelösten Vasodilatation beteiligt ist. Diese Vasodilatation kann sowohl über Stimulation der Prostaglandinsynthese²⁶² als auch über NO²⁶³ erfolgen. Sampaio *et al.* zeigten, dass die Ausschüttung von NO dabei über einen Akt-abhängigen Signalweg erfolgt, welcher zur Aktivierung der NO-Synthase führt.²⁶⁴ Nach Heitsch *et al.* ist die Bildung von NO als Folge eines intrazellulären Anstiegs an Ca²⁺-Ionen möglich, scheint jedoch nicht direkt über den Mas-Rezeptor vermittelt zu werden.⁶⁹ Den Ergebnissen von Ueda *et al.* zufolge könnte dieser Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration indirekte über Bradykinin bzw. über die Stimulation des endothelialen B₂-Rezeptors, einem Bradykinin-Rezeptor, stattfinden.⁷⁰

In einem weiteren Experiment wurde gezeigt, dass diese Peptide auch die vasokonstriktorisches Antwort auf A1-8 modulieren können (vgl. Abbildung 33).

Eine alleinige Applikation von A1-8 auf die Maushalsschlagader führte erwartungsgemäß zu einer deutlichen Vasokonstriktion. Wie oben erwähnt findet dies über den AT₁-Rezeptor statt. In der Maus muss jedoch unterschieden werden, über welchen Rezeptorsubtyp des AT₁-Rezeptors diese Vasokonstriktion vermittelt wird. Der AT_{1a}-Rezeptor kommt im Vergleich zum AT_{1b}-Rezeptor dominierend in einer Vielzahl von Organen wie dem Herzen, dem Gehirn, der Leber und den Nieren vor. Der AT_{1b}-Rezeptor wird jedoch vorwiegend in den Hoden, im Gehirn und in den Nebennieren exprimiert.²⁶⁵ Zhou *et al.* fanden heraus, dass der AT_{1b}-Rezeptor stark in der abdominalen Aorta der Maus exprimiert wird und dort vorwiegend an der Vermittlung vasokonstriktiver Effekte beteiligt ist.²⁶⁶

Generell scheinen beide Rezeptorsubtypen an der Vermittlung vasokonstriktiver Effekte beteiligt zu sein, da sowohl die Deletion des AT_{1a} als auch des AT_{1b}-Rezeptors in Mäusen zu deren Hypotonie führte, wie von van Esch *et al.* gezeigt wurde.²⁶⁷ Die Autoren berichteten außerdem, dass die kardialen durch A1-8 vermittelten Effekte von A1-8 auf das Herz von Mäusen ausschließlich durch den AT_{1a}-Rezeptor vermittelt werden, da Bolusinjektionen von A1-8 in AT_{1a}-defiziente Mäuse keinerlei Effekt auf das murine Herz auslösten. Diese Beobachtungen stehen in Kontrast zu den Ergebnissen von Zhou *et al.*.

Da es bei vorausgehender Applikation der Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 zu einer Verminderung der A1-8-vermittelten Vasokonstriktion oder gar zur einer A1-8-vermittelten Vasodilatation kommt (Abbildung 32), muss die Bindung dieser Peptide an den AT₂- oder Mas-Rezeptor einen Einfluss auf den AT_{1a} oder AT_{1b}-Rezeptor ausüben. Denkbar wäre jedoch auch eine irreversible Bindung der Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 an den AT₁-Rezeptor und eine damit einhergehende Blockierung dieses Rezeptors. Die Blockierung des AT₁-Rezeptors könnte eine AT₂-vermittelte Vasodilatation demaskieren.

Es ist bekannt, dass der AT₂-Rezeptor den AT₁-Rezeptor vermittelten physiologischen Wirkungen entgegenwirken kann.²⁶⁸ Tatsächlich scheint eine durch A1-8 vermittelte Vasodilatation scheint in murinen Spezies jedoch nicht allein durch den AT₂-Rezeptor, sondern als viel mehr über eine komplexe Interaktion des AT₁- mit dem AT₂- Rezeptor stattzufinden.²⁶⁹

Gohlke und Li *et al.* zeigten beispielsweise, dass eine durch A1-8 induzierte Vasodilatation in spontan hypertensiven Ratten nach Blockierung des AT₁-Rezeptors ausgelöst werden konnte. Sie postulierten, dass der für die Vasodilatation verantwortliche Signalweg über eine AT₂-abhängige Stimulation des Bradykinin- und Stickstoffmonoxidsystems funktioniert.^{270, 271} Ähnliche Mechanismen scheinen auch in Mäusen zu existieren. Von van Esch *et al.* wurden gezeigt, das A1-8 vasomodulierende Effekte über den AT_{1a}- und den AT₂-Rezeptor vermittelt, wobei der AT₂-Signalweg eine NO-abhängige Vasodilatation vermittelte, welche lediglich in Verbindung mit einer Aktivierung des AT_{1a}-Rezeptors stattfand.²⁵⁹ Diese Ergebnisse stützen die Hypothese der AT₁-Blockierung durch die Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10.

Eine über den AT₁-Rezeptor vermittelte Vasodilatation wurde jedoch bisher nicht berichtet. Jedoch ist eine AT₁-abhängige und durch A1-8 initialisierte Freisetzung von

NO Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen.^{272, 273} Interessanterweise berichtete Kostenis *et al.*, dass der antagonistische Effekt von A1-7 zur vasokonstriktorischen Wirkung von A1-8 auf die Bildung eines hetero-oligomeren Komplexes des Mas-Rezeptors mit dem AT₁-Rezeptor zurückzuführen ist.²⁷⁴ Giani *et al.* zeigten zudem in Ratten, dass die nach Aktivierung des Mas-Rezeptors vermittelten antiproliferativen und A1-8-antagonisierenden Effekte unter anderem auf eine Inhibition der Phosphorylierung der an der AT₁-Signalkaskade beteiligten ERK1/2 und Rho-Kinase zurückzuführen sind.²⁷⁵

Aufgrund dieser Sachverhalte kann die Hypothese aufgestellt werden, dass eine Bindung der Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 oder A6-10 an den Mas-Rezeptor stattfindet, was nachfolgend eine Dimerisierung mit dem AT₁-Rezeptor sowie eine Inhibition der Phosphorylierung der an der AT₁-Signalkaskade beteiligten ERK1/2 und Rho-Kinase bewirkt.

Eine Dimerisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kann sowohl einen Einfluss auf deren Desensitivierung, als auch auf ihre Internalisierung ausüben (Bai²⁷⁶). Würde der Mas-AT₁-Rezeptor-Komplex nach Bindung der Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 rascher internalisiert werden, könnte dies zu einer verminderten Menge an AT₁-Rezeptoren an der Endothelzelloberfläche führen und dadurch das Verhältnis der AT₁- zu AT₂-Rezeptoren auf der Zelloberfläche zugunsten der AT₂-Rezeptoren verschieben.

Eine durch A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 oder A6-10 induzierte Dimerisierung des AT₁- und des Mas-Rezeptors könnte ebenso zu einer Desensitivierung des AT₁-Rezeptors führen. Dies hätte zur Folge, dass der AT₁-Rezeptor eine stark verminderte Ligandenaffinität für A1-8 aufweist.

In beiden Fällen könnte die erwartete durch A1-8 vermittelte Vasokonstriktion moduliert werden, da A1-8 in höherem Maße für die Bindung an den AT₂-Rezeptor zur Verfügung stehen würde und folglich eine AT₂-abhängige Vasodilatation auslösen kann. In ihrer vasoaktiven Wirkung würden die Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 demnach A1-7 ähneln.

Um diese Hypothesen zu überprüfen und nähere Informationen über die an der A3-10-, A4-10, A5-10 oder A6-10-vermittelten Vasodilatation beteiligten Rezeptoren zu gewinnen, könnten Rezeptorbindungsstudien unter Verwendung von Rezeptorantagonisten dienen.

Nachdem eine physiologische Wirkung der Angiotensin-Peptide auf Maushalsschlagadern *in vitro* beobachtet werden konnte, galt es zu prüfen, ob die Peptide auch *in vivo* eine biologische Aktivität vermitteln können. Daher wurde eine Infusion der Angiotensin-Peptide in anästhesierte Mäuse vorgenommen und die Pulswellengeschwindigkeit (PWG) welche als indirekter Messwert für die Änderung der Blutflussgeschwindigkeit herangezogen werden kann, durchgeführt. Da es sich bei diesem Versuch jedoch um ein einmalig durchgeführtes Experiment handelt, sind die in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse lediglich richtungsweisend. Da am Ende des Experimentes zur Kontrolle eine Infusion mit 10^{-6} molarem A1-8 stattfand, was zu einer deutlichen Erhöhung der PWG und damit einer zuverlässigen Vasokonstriktion führte, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass sich diese Methode zur Bestimmung der Vasoaktivität der Angiotensin-Peptide eignet (Abbildung 34).

Erst nach Injektion von A3-10 in 10^{-3} molarer Konzentration wurde eine Vasokonstriktion beobachtet. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass zumindest A3-10 in der Maus *in vivo* keine physiologische Relevanz in Bezug auf die Modulation des Blutdruckes besitzt, da eine Konzentration von 10^{-3} M wie sie in diesem Experiment zur Vasokonstriktion führte, selbst bei einem vollständigen Umsatz von Angiotensinogen mit einer Plasmakonzentration von ca. $1,3 \cdot 10^{-6}$ M in A3-10 nicht *in vivo* erreicht werden kann.²⁰⁶ In einer 10^{-6} molaren Konzentration wurde eine leichte Vasodilatation beobachtet. In Bezug auf die hier eingesetzte Konzentration könnte dieser Effekt von A3-10 eher physiologische Relevanz besitzen. Zudem deckt sich dieses Ergebnis mit der über Druckmyographie beobachtete Vasodilatation durch A3-10 (vgl. Abbildung 32).

Da A3-10 proteolytisch *in vivo* zu A3-8 umgesetzt werden könnte, wurde die Vasoaktivität von A 3-8 ebenfalls durch Injektion getestet. Im Vergleich bewirkte A3-8 in 10^{-4} molarer Konzentration eine deutliche Vasokonstriktion, wohingegen A3-10 in 10^{-4} M Konzentration fast keine Vasokonstriktion auslöste. Jedoch zeigten die Blutströmungsprofile nach Injektion beider Peptide unterschiede im EKG als auch im Blutströmungsprofil (Abbildung 35 und Abbildung 36). Die im EKG beobachtete ST-Streckensenkung deutet darauf hin, das A3-10 zu einer Koronarinsuffizienz (Sauerstoffunterversorgung) des Herzens führt.²⁷⁷ Dieser Effekt war bei A3-8 in gleicher Konzentration schwächer ausgeprägt.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die nach Injektion von A-3-10 beobachtete vasokonstriktive Wirkung wahrscheinlich kein autonom vermittelter Effekt ist, sondern das Produkt einer proteolytischen Umsetzung von A3-10 in A3-8. Jedoch

lässt das unterschiedliche Profil im EKG und Blutströmungsprofil auch die Interpretation zu, dass A3-10 trotzdem eigenständige Wirkung auf das kardiovaskuläre System besitzen könnte.

Des Weiteren bleibt die Frage der Autonomie der durch die Angiotensin-vermittelten Wirkung offen. Da die Angiotensin-Peptide im Perfusionsbad mit einem intakten Blutgefäß in Kontakt kommen, muss auch eine mögliche proteolytische Prozessierung durch membranständige, im Endothel des Gefäßes lokalisierte Proteasen in Betracht gezogen werden. Somit kann hier nicht differenziert werden, ob der physiologische beobachtete Effekt dieser Angiotensin-Peptide autonom ist.

Denkbar wäre eine proteolytische Prozessierung der Angiotensin-Peptide durch Ecto-Carboxypeptidasen. Dies liegt nahe, da bereits Angiotensin-Peptide wie A3-8 und A4-8 in humanem Plasma nachgewiesen wurden. Bisher galt jedoch A1-8 als Vorläufer für die proteolytische Generierung dieser Peptide. Die in dieser Arbeit beschriebene Generierung der Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10, A5-10 oder A6-10 zeigt, dass diese Peptide neben A1-8 als Vorstufen für die Generierung der Angiotensin-Peptide A3-8, A4-8, A5-8 oder A6-8 dienen könnten.

A3-8 löste in Arteriolen des Kaninchens A3-8 eine Vasodilatation aus, die vermutlich über die Freisetzung von NO vermittelt wird, da die Vasodilatation nur auftrat, wenn kurz vorher L-Arginin, der Vorstufe des NO, verabreicht wurde.⁵³ Weiterhin vermittelt A3-8 in porcinen pulmonalen Endothelzellen eine endothelabhängige Relaxation, welche in Kombination mit erhöhter endothelialer NO-Synthaseaktivität und cGMP Menge beobachtet wurde.²⁷⁸ Mehrere Autoren zeigten dagegen, dass A3-8 höheren Konzentrationen zur Vasokonstriktion führte.^{80, 192, 279-281} Zudem wurde in einigen dieser Studien beobachtet, dass die Vasopressoraktivität von A3-8 im Vergleich zu A1-8 ca. 100fach schwächer ausfiel.

In der Ratte wurde beschrieben, dass A3-8 durch Aminopeptidaseaktivität in die Peptide A4-8, A5-8 und A6-8 prozessiert wird.²⁸² Interessant dabei erscheint, dass A5-8 das Hauptprodukt dieser proteolytischen Kaskade ist. Weiterhin wurde durch Inhibitorversuche gezeigt, dass es sich bei der A5-8-generierenden Protease neben APN um die Dipeptidylaminopeptidase (DAP) handeln könnte. Sie zeigten zudem, dass die APN und DAP vor allem in den Glomeruli der Niere eine hohe Aktivität haben. Dies impliziert, dass diese Protease möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Generierung der Angiotensin-Peptide A3-10, A4-10 A5-10 und A6-10 spielen. Den

in dieser Arbeit beschriebenen Inhibitorergebnissen nach sind im Plasma jedoch andere Proteasen für den Hauptanteil ihrer Generierung zuständig.

Diese Ergebnisse überblickend kann gesagt werden, dass zwischen den Angiotensin-Peptiden, welche ausschließlich durch eine C-terminale proteolytische Kaskade aus A1-10 generiert werden und dem Angiotensin-Peptid A3-8 Ähnlichkeiten hinsichtlich der hier beobachteten physiologischen Wirkung bestehen. Obwohl bisher noch keine Studien für A4-8 und A5-8 vorliegen, welche von einer vasomodulierenden Aktivität dieser Peptide berichten, liegt es nahe, dass es sich bei den Angiotensin-Peptiden A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 in der Maus vermutlich nicht um die vasoaktiven Haupteffektorpeptide handelt.

Eher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Angiotensin-Peptiden um durch im Plasma vorhandene Aminopeptidaseaktivität aus A1-10 hervorgehende Vorstufen der vasoaktiven Angiotensin-Peptide handelt, welche jedoch nicht durch Plasmaproteasen, sondern erst durch Kontakt mit gewebeständigen Carboxypeptidasen generiert werden.

Jedoch könnten die Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10 A5-10 und vor allem A6-10 autonom an anderen physiologischen Prozessen beteiligt sein. Diese Effekte liegen vermutlich nicht im Bereich der Blutdruckregulation, sondern in anderen physiologischen Prozessen, bei denen das RAS nachweislich eine Rolle spielt. Hierzu gehört beispielsweise die Wundheilung, bei der sowohl die Zellproliferation als auch das Immunsystem aktiv durch das RAS reguliert wird.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass A1-10 in humanem Plasma neben der bisher bekannten Carboxypeptidasen-Kaskade zusätzlich auch über eine Aminopeptidasen-Kaskade metabolisiert wird, die die Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 entstehen lässt. Zudem wurde hier die Existenz der Peptide A4-10, A5-10 und A6-10 im Plasma erstmals nachgewiesen und deren Konzentrationen bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Proteasen an der Generierung dieser Angiotensin-Peptide beteiligt sind. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist die APN an der Generierung der Peptide A3-10, A4-10 und A5-10, hauptsächlich jedoch an der Generierung von A6-10 im Plasma beteiligt. Zusätzlich zur APN muss eine weitere Bestatin-insensitive Metalloprotease mit A6-10-generierender Aktivität existieren. Bei der an der Generierung der Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10 und A4-10 beteiligten Protease handelt es sich dagegen um eine oder mehrere Proteasen der Cystein/Serin-Familie.

Die Generierung der Peptide A2-8, A3-8, A4-8 aus A2-10 durch humane Plasmaproteasen zeigt, dass A2-10 und möglicherweise ebenso A3-10, A4-10 als weitere Vorläufer-Peptide neben A1-8 für die Generierung der Angiotensin-Peptide A2-8, A3-8, A4-8 zur Verfügung stehen.

In dieser Arbeit wurden Hinweise gesammelt, dass diese Peptide mit gleicher C-terminaler Sequenz wie A1-10 neben ihrer Vorläuferfunktion auch autonome physiologische Funktionen haben. In Bezug auf die Wirkung der Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 auf das vaskuläre System lässt sich sagen, dass die durch Aminopeptidaseaktivität entstandenen Angiotensin-Peptide in isolierten Blutgefäßen der Maus eine A1-7-ähnliche vasoprotektive Wirkung zeigen. Neben vasomodulatorischen Wirkungen dieser Peptide sind weitere physiologische Wirkungen denkbar, wobei hier A6-10 als Endprodukt der proteolytischen APN-Kaskade und aufgrund der hohen A6-10-Plasmakonzentrationen im Fokus steht.

Somit erweitern die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse das klassische zirkuläre RAS. Der Peptidhormonvorläufer A1-10 wird demnach effizient genutzt, um proteolytisch eine große Vielfalt an A1-10-abstammenden Peptidhormonen zu generieren. Schlussendlich konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass ein von einem Gen abstammenden Peptidhormonvorläufer nicht nur in eines, sondern in mehrere biologisch aktive Peptidhormone mit unterschiedlichen oder sogar antagonisierenden Wirkungen hervorgehen können.

5 Literatur

1. Benjamin N, Collier JG, Webb DJ. Angiotensin II augments sympathetically induced venoconstriction in man. *Clin Sci (Lond)*. Oct 1988;75(4):337-340.
2. Stadeager C, Hesse B, Henriksen O, Bonde-Petersen F, Mehlsen J, Rasmussen S. Influence of the renin-angiotensin system on human forearm blood flow. *J Appl Physiol*. Feb 1990;68(2):527-532.
3. Caligiorne SM, Silva AQ, Fontes MA, Silva JR, Baltatu O, Bader M, Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Baroreflex control of heart rate and renal sympathetic nerve activity in rats with low brain angiotensinogen. *Neuropeptides*. Apr 2008;42(2):159-168.
4. Gupta P, Franco-Saenz R, Mulrow PJ. Locally generated angiotensin II in the adrenal gland regulates basal, corticotropin-, and potassium-stimulated aldosterone secretion. *Hypertension*. Mar 1995;25(3):443-448.
5. Montiel M, Jimenez E, Narvaez JA, Morell M. Renin-angiotensin-aldosterone system in hyper- and hypothyroid rats during sodium depletion. *Endocr Res Commun*. 1982;9(3-4):249-260.
6. Yosypiv IV. Renin-angiotensin system-growth factor cross-talk: a novel mechanism for ureteric bud morphogenesis. *Pediatr Nephrol*. Jun 2009;24(6):1113-1120.
7. Mezzano S, Droguett A, Burgos ME, Ardiles LG, Flores CA, Aros CA, Caorsi I, Vio CP, Ruiz-Ortega M, Egido J. Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl*. Oct 2003(86):S64-70.
8. Yang L, Bataller R, Dulyx J, Coffman TM, Gines P, Rippe RA, Brenner DA. Attenuated hepatic inflammation and fibrosis in angiotensin type 1a receptor deficient mice. *J Hepatol*. Aug 2005;43(2):317-323.
9. Ingelfinger JR, Schunkert H, Ellison KE, Pivor M, Zuo WM, Pratt R, Dzau VJ. Intrarenal angiotensinogen: localization and regulation. *Pediatr Nephrol*. Jul 1990;4(4):424-428.
10. Paul M, Hermann K, Printz M, Lang RE, Unger T, Ganten D. The brain angiotensin system: subcellular localization and interferences with converting enzyme inhibitors. *J Hypertens Suppl*. Oct 1983;1(1):9-15.
11. Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev*. Jul 1998;78(3):583-686.

12. Harrison-Bernard LM. The renal renin-angiotensin system. *Adv Physiol Educ.* Dec 2009;33(4):270-274.
13. Skott O, Briggs JP. Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. *Science.* Sep 25 1987;237(4822):1618-1620.
14. Gordon RD, Kuchel O, Liddle GW, Island DP. Role of the sympathetic nervous system in regulating renin and aldosterone production in man. *J Clin Invest.* Apr 1967;46(4):599-605.
15. Loeffler JR, Stockigt JR, Ganong WF. Effect of alpha- and beta-adrenergic blocking agents on the increase in renin secretion produced by stimulation of the renal nerves. *Neuroendocrinology.* 1972;10(3):129-138.
16. Vander AJ. Effect of catecholamines and the renal nerves on renin secretion in anesthetized dogs. *Am J Physiol.* Sep 1965;209(3):659-662.
17. Assaykeen TA, Castellino RA, Love TA, Stamey TA. Peripheral and renal vein renin activity. Effect of postural stimulation in normotensive healthy adults. *Arch Intern Med.* Sep 1971;128(3):378-379.
18. Boonshaft B, O'Connell JM, Hayes JM, Schreiner GE. Serum renin activity during normal pregnancy: effect of alterations of posture and sodium intake. *J Clin Endocrinol Metab.* Nov 1968;28(11):1641-1644.
19. Lee HJ, Larue JN, Wilson IB. Human plasma converting enzyme. *Arch Biochem Biophys.* Feb 1971;142(2):548-551.
20. Bunkenburg B, van Amelsvoort T, Rogg H, Wood JM. Receptor-mediated effects of angiotensin II on growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* Dec 1992;20(6):746-754.
21. Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension.* Jul 1996;28(1):104-108.
22. Bader M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 50:439-465.
23. Internet-Zitat. Abbildung Leber. <http://2600uk.com/fatty-liver-hepatitis-cirrhosis/>. 12.11.2012.
24. Internet-Zitat. Abbildung Lunge. <http://news.discovery.com/tech/zooms/lungs-reseeding-transplant.html>. 12.11.2012.
25. Vander AJ, Geelhoed GW. Inhibition of renin secretion by angiotensin. II. *Proc Soc Exp Biol Med.* Nov 1965;120(2):399-403.
26. Page IH, Helmer OM. A Crystalline Pressor Substance (Angiotonin) Resulting from the Reaction between Renin and Renin-Activator. *J Exp Med.* Jan 1 1940;71(1):29-42.

27. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med.* Sep 2008;264(3):224-236.
28. Tigerstedt R, Bergman P. Niere und Kreislauf. *Scand Arch Physiol* 1898(8):223–271.
29. Brown JJ, Davies DL, Lever AF, Robertson JI, Tree M. The estimation of renin in human plasma. *Biochem J.* Dec 1964;93(3):594-600.
30. Sealey JE, Atlas SA, Laragh JH, Oza NB, Ryan JW. Human urinary kallikrein converts inactive to active renin and is a possible physiological activator of renin. *Nature.* Sep 14 1978;275(5676):144-145.
31. Dzau VJ, Gonzalez D, Kaempfer C, Dubin D, Wintroub BU. Human neutrophils release serine proteases capable of activating prorenin. *Circ Res.* Apr 1987;60(4):595-601.
32. Davis JO, Carpenter CC, Ayers CR. Relation of renin and angiotensin II to the control of aldosterone secretion. *Circ Res.* Jul 1962;11:171-184.
33. Silver RB, Reid AC, Mackins CJ, Askwith T, Schaefer U, Herzlinger D, Levi R. Mast cells: a unique source of renin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 14 2004;101(37):13607-13612.
34. Deschepper CF, Mellon SH, Cumin F, Baxter JD, Ganong WF. Analysis by immunocytochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal, and pituitary of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 1986;83(19):7552-7556.
35. Naruse K, Murakoshi M, Osamura RY, Naruse M, Toma H, Watanabe K, Demura H, Inagami T, Shizume K. Immunohistological evidence for renin in human endocrine tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* Jul 1985;61(1):172-177.
36. Saint-Andre JP, Rohmer V, Alhenc-Gelas F, Menard J, Bigorgne JC, Corvol P. Presence of renin, angiotensinogen, and converting enzyme in human pituitary lactotroph cells and prolactin adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* Jul 1986;63(1):231-237.
37. Slater EE, Defendini R, Zimmerman EA. Wide distribution of immunoreactive renin in nerve cells of human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 1980;77(9):5458-5460.
38. Naruse M, Naruse K, Inagaki T, Inagami T. Immunoreactive renin in mouse adrenal gland. Localization in the inner cortical region. *Hypertension.* Mar-Apr 1984;6(2 Pt 1):275-280.

39. Chiang TS, Erdos EG, Miwa I, Tague LL, Coalson JJ. Isolation from a salivary gland of granules containing renin and kallikrein. *Circ Res.* Oct 1968;23(4):507-517.
40. Ferris TF, Gorden P, Mulrow PJ. Rabbit uterus as a source of renin. *Am J Physiol.* Mar 1967;212(3):698-702.
41. Sarzani R, Fallo F, Dessi-Fulgheri P, Pistorello M, Lanari A, Paci VM, Mantero F, Rappelli A. Local renin-angiotensin system in human adrenals and aldosteronomas. *Hypertension.* Jun 1992;19(6 Pt 2):702-707.
42. Ihara Y, Taii S, Mori T. Expression of renin and angiotensinogen genes in the human placental tissues. *Endocrinol Jpn.* Dec 1987;34(6):887-896.
43. Kohlstaedt KG, Page IH. The Liberation of Renin by Perfusion of Kidneys Following Reduction of Pulse Pressure. *J Exp Med.* Jul 31 1940;72(2):201-216.
44. Page IH, Helmer OM. Angiotonin-Activator, Renin- and Angiotonin-Inhibitor, and the Mechanism of Angiotonin Tachyphylaxis in Normal, Hypertensive, and Nephrectomized Animals. *J Exp Med.* Mar 31 1940;71(4):495-519.
45. Campbell DJ, Bouhnik J, Coezy E, Menard J, Corvol P. Characterization of precursor and secreted forms of human angiotensinogen. *J Clin Invest.* Jun 1985;75(6):1880-1893.
46. Tewksbury DA, Frome WL, Dumas ML. Characterization of human angiotensinogen. *J Biol Chem.* Jun 10 1978;253(11):3817-3820.
47. Kageyama R, Ohkubo H, Nakanishi S. Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence. *Biochemistry.* Jul 31 1984;23(16):3603-3609.
48. Gaillard-Sanchez I, Mattei MG, Clauser E, Corvol P. Assignment by in situ hybridization of the angiotensinogen gene to chromosome band 1q4, the same region as the human renin gene. *Hum Genet.* Mar 1990;84(4):341-343.
49. Nakamura A, Iwao H, Fukui K, Kimura S, Tamaki T, Nakanishi S, Abe Y. Regulation of liver angiotensinogen and kidney renin mRNA levels by angiotensin II. *Am J Physiol.* Jan 1990;258(1 Pt 1):E1-6.
50. Ohkubo H, Nakayama K, Tanaka T, Nakanishi S. Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *J Biol Chem.* Jan 5 1986;261(1):319-323.
51. Lai KN, Leung JC, Lai KB, To WY, Yeung VT, Lai FM. Gene expression of the renin-angiotensin system in human kidney. *J Hypertens.* Jan 1998;16(1):91-102.

52. Humpel C, Lippoldt A, Stromberg I, Bygdeman M, Wagner J, Hilgenfeldt U, Ganten D, Fuxe K, Olson L. Human angiotensinogen is highly expressed in astrocytes in human cortical grafts. *Glia*. Mar 1994;10(3):186-192.
53. Haberl RL, Decker PJ, Einhaupl KM. Angiotensin degradation products mediate endothelium-dependent dilation of rabbit brain arterioles. *Circ Res*. Jun 1991;68(6):1621-1627.
54. Lyons D, Webster J, Nixon A, Young MM, Smith J, Benjamin N. Effect of the non peptide angiotensin II antagonist, GR117289C on the vasoconstrictor actions of angiotensin II in the human forearm. *Br J Clin Pharmacol*. Mar 1997;43(3):323-326.
55. Ray PE, Bruggeman LA, Horikoshi S, Aguilera G, Klotman PE. Angiotensin II stimulates human fetal mesangial cell proliferation and fibronectin biosynthesis by binding to AT1 receptors. *Kidney Int*. Jan 1994;45(1):177-184.
56. Liu G, Espinosa E, Oemar BS, Luscher TF. Bimodal effects of angiotensin II on migration of human and rat smooth muscle cells. Direct stimulation and indirect inhibition via transforming growth factor-beta 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jul 1997;17(7):1251-1257.
57. Carey RM, Padia SH. Angiotensin AT2 receptors: control of renal sodium excretion and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab*. Apr 2008;19(3):84-87.
58. Batenburg WW, Tom B, Schuijt MP, Danser AH. Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation. Focus on bradykinin, NO and endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Vascul Pharmacol*. Feb 2005;42(3):109-118.
59. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res*. Dec 1997;81(6):970-976.
60. Jones BH, Standridge MK, Moustaid N. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology*. Apr 1997;138(4):1512-1519.
61. Yang H, Lu D, Yu K, Raizada MK. Regulation of neuromodulatory actions of angiotensin II in the brain neurons by the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci*. Jul 1 1996;16(13):4047-4058.
62. Kramkowski K, Mogielnicki A, Leszczynska A, Buczek W. Angiotensin-(1-9), the product of angiotensin I conversion in platelets, enhances arterial thrombosis in rats. *J Physiol Pharmacol*. Jun;61(3):317-324.
63. Singh R, Singh AK, Leehey DJ. A novel mechanism for angiotensin II formation in streptozotocin-diabetic rat glomeruli. *Am J Physiol Renal Physiol*. Jun 2005;288(6):F1183-1190.

64. Ocaranza MP, Lavandero S, Jalil JE, Moya J, Pinto M, Novoa U, Apablaza F, Gonzalez L, Hernandez C, Varas M, Lopez R, Godoy I, Verdejo H, Chiong M. Angiotensin-(1-9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. *J Hypertens*. May;28(5):1054-1064.
65. Flores-Munoz M, Work LM, Douglas K, Denby L, Dominiczak AF, Graham D, Nicklin SA. Angiotensin-(1-9) attenuates cardiac fibrosis in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat via the angiotensin type 2 receptor. *Hypertension*. Feb;59(2):300-307.
66. Chen Z, Deddish PA, Minshall RD, Becker RP, Erdos EG, Tan F. Human ACE and bradykinin B2 receptors form a complex at the plasma membrane. *Faseb J*. Nov 2006;20(13):2261-2270.
67. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 8 2003;100(14):8258-8263.
68. Roks AJ, van Geel PP, Pinto YM, Buikema H, Henning RH, de Zeeuw D, van Gilst WH. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system. *Hypertension*. Aug 1999;34(2):296-301.
69. Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G. Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. *Hypertension*. Jan 2001;37(1):72-76.
70. Ueda S, Masumori-Maemoto S, Wada A, Ishii M, Brosnihan KB, Umemura S. Angiotensin(1-7) potentiates bradykinin-induced vasodilatation in man. *J Hypertens*. Nov 2001;19(11):2001-2009.
71. Gorelik G, Carhini LA, Scicli AG. Angiotensin 1-7 induces bradykinin-mediated relaxation in porcine coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther*. Jul 1998;286(1):403-410.
72. Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*. Mar 1996;27(3 Pt 2):523-528.
73. le Tran Y, Forster C. Angiotensin-(1-7) and the rat aorta: modulation by the endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol*. Nov 1997;30(5):676-682.
74. Osei SY, Ahima RS, Minkes RK, Weaver JP, Khosla MC, Kadowitz PJ. Differential responses to angiotensin-(1-7) in the feline mesenteric and hindquarters vascular beds. *Eur J Pharmacol*. Mar 30 1993;234(1):35-42.

75. Akhtar S, Yousif MH, Dhaunsi GS, Chandrasekhar B, Al-Farsi O, Benter IF. Angiotensin-(1-7) inhibits epidermal growth factor receptor transactivation via a Mas receptor-dependent pathway. *Br J Pharmacol*. Mar;165(5):1390-1400.
76. Jaiswal N, Tallant EA, Diz DI, Khosla MC, Ferrario CM. Subtype 2 angiotensin receptors mediate prostaglandin synthesis in human astrocytes. *Hypertension*. Jun 1991;17(6 Pt 2):1115-1120.
77. Jaiswal N, Diz DI, Tallant EA, Khosla MC, Ferrario CM. Characterization of angiotensin receptors mediating prostaglandin synthesis in C6 glioma cells. *Am J Physiol*. May 1991;260(5 Pt 2):R1000-1006.
78. Trachte GJ, Meixner K, Ferrario CM, Khosla MC. Prostaglandin production in response to angiotensin-(1-7) in rabbit isolated vasa deferentia. *Prostaglandins*. Apr 1990;39(4):385-394.
79. Kono T, Oseko F, Shimpo S, Nanno M, Endo J. Biological activity of des-asp1-angiotensin II (angiotensin III) in man. *J Clin Endocrinol Metab*. Dec 1975;41(06):1174-1177.
80. Li Q, Feenstra M, Pfaffendorf M, Eijnsman L, van Zwieten PA. Comparative vasoconstrictor effects of angiotensin II, III, and IV in human isolated saphenous vein. *J Cardiovasc Pharmacol*. Apr 1997;29(4):451-456.
81. Reaux A, Fournie-Zaluski MC, Llorens-Cortes C. Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab*. May-Jun 2001;12(4):157-162.
82. Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 15 1996;93(21):11968-11973.
83. Yamamoto Y, Yamamguchi T, Shimamura M, Hazato T. Angiotensin III is a new chemoattractant for polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. Jun 30 1993;193(3):1038-1043.
84. Lorenzo O, Ruiz-Ortega M, Suzuki Y, Ruperez M, Esteban V, Sugaya T, Egido J. Angiotensin III activates nuclear transcription factor-kappaB in cultured mesangial cells mainly via AT(2) receptors: studies with AT(1) receptor-knockout mice. *J Am Soc Nephrol*. May 2002;13(5):1162-1171.
85. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Egido J. Angiotensin III increases MCP-1 and activates NF-kappaB and AP-1 in cultured mesangial and mononuclear cells. *Kidney Int*. Jun 2000;57(6):2285-2298.

86. Yatabe J, Yoneda M, Yatabe MS, Watanabe T, Felder RA, Jose PA, Sanada H. Angiotensin III stimulates aldosterone secretion from adrenal gland partially via angiotensin II type 2 receptor but not angiotensin II type 1 receptor. *Endocrinology*. Apr;152(4):1582-1588.
87. Clark MA, Tran H, Nguyen C. Angiotensin III stimulates ERK1/2 mitogen-activated protein kinases and astrocyte growth in cultured rat astrocytes. *Neuropeptides*. Oct;45(5):329-335.
88. Teranishi J, Ishiguro H, Hoshino K, Noguchi K, Kubota Y, Uemura H. Evaluation of role of angiotensin III and aminopeptidases in prostate cancer cells. *Prostate*. Nov 1 2008;68(15):1666-1673.
89. Luoh HF, Chan SH. Participation of AT1 and AT2 receptor subtypes in the tonic inhibitory modulation of baroreceptor reflex response by endogenous angiotensins at the nucleus tractus solitarii in the rat. *Brain Res*. Jan 26 1998;782(1-2):73-82.
90. Gard PR. Cognitive-enhancing effects of angiotensin IV. *BMC Neurosci*. 2008;9 Suppl 2:S15.
91. Olson ML, Olson EA, Qualls JH, Stratton JJ, Harding JW, Wright JW. Norleucine1-Angiotensin IV alleviates mecamylamine-induced spatial memory deficits. *Peptides*. Feb 2004;25(2):233-241.
92. Wright JW, Kramar EA, Myers ED, Davis CJ, Harding JW. Ethanol-induced suppression of LTP can be attenuated with an angiotensin IV analog. *Regul Pept*. May 15 2003;113(1-3):49-56.
93. Gard PR, Daw P, Mashhour ZS, Tran P. Interactions of angiotensin IV and oxytocin on behaviour in mice. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. Sep 2007;8(3):133-138.
94. Caron AZ, Arguin G, Guillemette G. Angiotensin IV interacts with a juxtamembrane site on AT(4)/IRAP suggesting an allosteric mechanism of enzyme modulation. *Regul Pept*. May 15 2003;113(1-3):9-15.
95. Beyer CE, Dwyer JM, Platt BJ, Neal S, Luo B, Ling HP, Lin Q, Mark RJ, Rosenzweig-Lipson S, Schechter LE. Angiotensin IV elevates oxytocin levels in the rat amygdala and produces anxiolytic-like activity through subsequent oxytocin receptor activation. *Psychopharmacology (Berl)*. May;209(4):303-311.
96. Yang R, Walther T, Gembardt F, Smolders I, Vanderheyden P, Albiston AL, Chai SY, Dupont AG. Renal vasoconstrictor and pressor responses to angiotensin IV in mice are AT1a-receptor mediated. *J Hypertens*. Mar;28(3):487-494.

97. Wright JW, Miller-Wing AV, Shaffer MJ, Higginson C, Wright DE, Hanesworth JM, Harding JW. Angiotensin II(3-8) (ANG IV) hippocampal binding: potential role in the facilitation of memory. *Brain Res Bull.* 1993;32(5):497-502.
98. Li Q, Zhang L, Pfaffendorf M, van Zwieten PA. Comparative effects of angiotensin II and its degradation products angiotensin III and angiotensin IV in rat aorta. *Br J Pharmacol.* Dec 1995;116(7):2963-2970.
99. van Esch JH, Oosterveer CR, Batenburg WW, van Veghel R, Jan Danser AH. Effects of angiotensin II and its metabolites in the rat coronary vascular bed: is angiotensin III the preferred ligand of the angiotensin AT2 receptor? *Eur J Pharmacol.* Jul 7 2008;588(2-3):286-293.
100. Le MT, Vanderheyden PM, Szaszak M, Hunyady L, Vauquelin G. Angiotensin IV is a potent agonist for constitutive active human AT1 receptors. Distinct roles of the N-and C-terminal residues of angiotensin II during AT1 receptor activation. *J Biol Chem.* Jun 28 2002;277(26):23107-23110.
101. Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 30 1989;163(1):284-291.
102. Furuta H, Guo DF, Inagami T. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 28 1992;183(1):8-13.
103. Criscione L, Thomann H, Whitebread S, de Gasparo M, Buhlmayer P, Herold P, Ostermayer F, Kamber B. Binding characteristics and vascular effects of various angiotensin II antagonists. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990;16 Suppl 4:S56-59.
104. Tsuzuki S, Ichiki T, Nakakubo H, Kitami Y, Guo DF, Shirai H, Inagami T. Molecular cloning and expression of the gene encoding human angiotensin II type 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* May 16 1994;200(3):1449-1454.
105. Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, DeGasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach MJ, Taylor DG, Jr., Timmermans PB. Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension.* May 1991;17(5):720-721.
106. Matsubara H, Sugaya T, Murasawa S, Nozawa Y, Mori Y, Masaki H, Maruyama K, Tsutumi Y, Shibasaki Y, Moriguchi Y, Tanaka Y, Iwasaka T, Inada M. Tissue-specific expression of human angiotensin II AT1 and AT2 receptors and cellular localization of subtype mRNAs in adult human renal cortex using in situ hybridization. *Nephron.* Sep 1998;80(1):25-34.

107. Takayanagi R, Ohnaka K, Sakai Y, Nakao R, Yanase T, Haji M, Inagami T, Furuta H, Gou DF, Nakamuta M, et al. Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 angiotensin II receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* Mar 16 1992;183(2):910-916.
108. Sechi LA, Grady EF, Griffin CA, Kalinyak JE, Schambelan M. Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat and human kidney. *Am J Physiol.* Feb 1992;262(2 Pt 2):F236-240.
109. Bullock GR, Steyaert I, Bilbe G, Carey RM, Kips J, De Paepe B, Pauwels R, Praet M, Siragy HM, de Gasparo M. Distribution of type-1 and type-2 angiotensin receptors in the normal human lung and in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Histochem Cell Biol.* Feb 2001;115(2):117-124.
110. Shanmugam S, Llorens-Cortes C, Clauser E, Corvol P, Gasc JM. Expression of angiotensin II AT2 receptor mRNA during development of rat kidney and adrenal gland. *Am J Physiol.* May 1995;268(5 Pt 2):F922-930.
111. Jöhren O, Inagami T, Saavedra JM. AT1A, AT1B, and AT2 angiotensin II receptor subtype gene expression in rat brain. *Neuroreport.* Dec 15 1995;6(18):2549-2552.
112. Husain A. The chymase-angiotensin system in humans. *J Hypertens.* Nov 1993;11(11):1155-1159.
113. Obermüller N, Schlamp D, Hoffmann S, Gentili M, Inagami T, Gretz N, Weigel M. Localization of the mRNA for the angiotensin II receptor subtype 2 (AT2) in follicular granulosa cells of the rat ovary by nonradioactive in situ hybridization. *J Histochem Cytochem.* Aug 1998;46(8):865-870.
114. Brillante DG, O'Sullivan AJ, Johnstone MT, Howes LG. Evidence for functional expression of vascular angiotensin II type 2 receptors in patients with insulin resistance. *Diabetes Obes Metab.* Feb 2008;10(2):143-150.
115. Widdop RE, Vinh A, Henrion D, Jones ES. Vascular angiotensin AT2 receptors in hypertension and ageing. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* Apr 2008;35(4):386-390.
116. Jones ES, Vinh A, McCarthy CA, Gaspari TA, Widdop RE. AT2 receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther.* Dec 2008;120(3):292-316.
117. Malmqvist K, Kahan T, Edner M, Held C, Hagg A, Lind L, Müller-Brunotte R, Nystrom F, Ohman KP, Osbakken MD, Ostergern J. Regression of left ventricular hypertrophy in human hypertension with irbesartan. *J Hypertens.* Jun 2001;19(6):1167-1176.

- 118.** Lenz O, Schmid B, Kilter H, La Rosee K, Flesch M, Kuhn-Regnier F, Sudkamp M, Bohm M. Effects of angiotensin II and angiotensin-converting enzyme inhibitors on human myocardium. *Eur J Pharmacol.* Dec 27 1995;294(1):17-27.
- 119.** Navar LG, Harrison-Bernard LM, Imig JD, Cervenka L, Mitchell KD. Renal responses to AT1 receptor blockade. *Am J Hypertens.* Jan 2000;13(1 Pt 2):45S-54S.
- 120.** Chen HH, Redfield MM, Nordstrom LJ, Cataliotti A, Burnett JC, Jr. Angiotensin II AT1 receptor antagonism prevents detrimental renal actions of acute diuretic therapy in human heart failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* May 2003;284(5):F1115-1119.
- 121.** Chiodera P, Volpi R, Caiazza A, Giuliani N, Magotti MG, Coiro V. Arginine vasopressin and oxytocin responses to angiotensin II are mediated by AT1 receptor subtype in normal men. *Metabolism.* Aug 1998;47(8):893-896.
- 122.** Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem.* Nov 25 1993;268(33):24539-24542.
- 123.** Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, Inagami T. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem.* Nov 25 1993;268(33):24543-24546.
- 124.** Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 7 1995;92(23):10663-10667.
- 125.** Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest.* Feb 1995;95(2):651-657.
- 126.** Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci.* 1998;63(19):PL289-295.
- 127.** Rompe F, Artuc M, Hallberg A, Alterman M, Stroder K, Thone-Reineke C, Reichenbach A, Schacherl J, Dahlof B, Bader M, Alenina N, Schwaninger M, Zuberbier T, Funke-Kaiser H, Schmidt C, Schunck WH, Unger T, Steckelings UM. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through

- epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension*. Apr;55(4):924-931.
- 128.** Ruiz-Ortega M, Esteban V, Suzuki Y, Ruperez M, Mezzano S, Ardiles L, Justo P, Ortiz A, Egido J. Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage. *Kidney Int Suppl*. Oct 2003(86):S21-26.
- 129.** Yayama K, Okamoto H. Angiotensin II-induced vasodilation via type 2 receptor: role of bradykinin and nitric oxide. *Int Immunopharmacol*. Feb 2008;8(2):312-318.
- 130.** Carey RM, Jin X, Wang Z, Siragy HM. Nitric oxide: a physiological mediator of the type 2 (AT2) angiotensin receptor. *Acta Physiol Scand*. Jan 2000;168(1):65-71.
- 131.** Gwathmey TM, Shaltout HA, Pendergrass KD, Pirro NT, Figueroa JP, Rose JC, Diz DI, Chappell MC. Nuclear angiotensin II type 2 (AT2) receptors are functionally linked to nitric oxide production. *Am J Physiol Renal Physiol*. Jun 2009;296(6):F1484-1493.
- 132.** Kang J, Posner P, Sumners C. Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal K⁺ currents involves an inhibitory GTP binding protein. *Am J Physiol*. Nov 1994;267(5 Pt 1):C1389-1397.
- 133.** Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, Yamada T, Dzau VJ. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *J Biol Chem*. Jul 25 1997;272(30):19022-19026.
- 134.** AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem*. Oct 26 2001;276(43):39721-39726.
- 135.** Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell*. Jun 6 1986;45(5):711-719.
- 136.** Jackson TR, Blair LA, Marshall J, Goedert M, Hanley MR. The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature*. Sep 29 1988;335(6189):437-440.
- 137.** Fraga-Silva RA, Pinheiro SV, Goncalves AC, Alenina N, Bader M, Santos RA. The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. *Mol Med*. Jan-Feb 2008;14(1-2):28-35.
- 138.** Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczek W. Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertension*. Nov 2002;40(5):774-779.

139. Gironacci MM, Adamo HP, Corradi G, Santos RA, Ortiz P, Carretero OA. Angiotensin (1-7) induces MAS receptor internalization. *Hypertension*. Aug;58(2):176-181.
140. Ascher DB, Cromer BA, Morton CJ, Volitakis I, Cherny RA, Albiston AL, Chai SY, Parker MW. Regulation of insulin-regulated membrane aminopeptidase activity by its C-terminal domain. *Biochemistry*. Apr 5;50(13):2611-2622.
141. Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FA, Simpson RJ, Connolly LM, Chai SY. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem*. Dec 28 2001;276(52):48623-48626.
142. Harding JW, Wright JW, Swanson GN, Hanesworth JM, Krebs LT. AT4 receptors: specificity and distribution. *Kidney Int*. Dec 1994;46(6):1510-1512.
143. Demaegdt H, De Backer JP, Lukaszuk A, Toth G, Szemenyei E, Tourwe D, Vauquelin G. Angiotensin IV displays only low affinity for native insulin-regulated aminopeptidase (IRAP). *Fundam Clin Pharmacol*. Apr;26(2):194-197.
144. Chai SY, Bastias MA, Clune EF, Matsacos DJ, Mustafa T, Lee JH, McDowall SG, Paxinos G, Mendelsohn FA, Albiston AL. Distribution of angiotensin IV binding sites (AT4 receptor) in the human forebrain, midbrain and pons as visualised by in vitro receptor autoradiography. *J Chem Neuroanat*. Dec 2000;20(3-4):339-348.
145. Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Munoz JM. The substance causing renal hypertension. *J Physiol*. Jul 24 1940;98(3):283-298.
146. Burton J, Quinn T. The amino-acid residues on the C-terminal side of the cleavage site of angiotensinogen influence the species specificity of reaction with renin. *Biochim Biophys Acta*. Jan 4 1988;952(1):8-12.
147. Azaryan A, Barkhudaryan N, Galoyan A, Lajtha A. Action of brain cathepsin B, cathepsin D, and high-molecular-weight aspartic proteinase on angiotensins I and II. *Neurochem Res*. Nov 1985;10(11):1525-1532.
148. Klickstein LB, Kaempfer CE, Wintroub BU. The granulocyte-angiotensin system. Angiotensin I-converting activity of cathepsin G. *J Biol Chem*. Dec 25 1982;257(24):15042-15046.
149. Tonnesen MG, Klempner MS, Austen KF, Wintroub BU. Identification of a human neutrophil angiotensin II-generating protease as cathepsin G. *J Clin Invest*. Jan 1982;69(1):25-30.
150. Ramaha A, Patston PA. Release and degradation of angiotensin I and angiotensin II from angiotensinogen by neutrophil serine proteinases. *Arch Biochem Biophys*. Jan 1 2002;397(1):77-83.

151. Takada Y, Maruta H, Wagner B, Fa XG, James HL, Erdos EG. Activation of human prorenin by neutrophil elastase. *J Clin Endocrinol Metab.* Dec 1987;65(6):1225-1230.
152. Sheikh AM, Li X, Wen G, Tauqeer Z, Brown WT, Malik M. Cathepsin D and apoptosis related proteins are elevated in the brain of autistic subjects. *Neuroscience.* Jan 20;165(2):363-370.
153. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* Sep 1 2000;87(5):E1-9.
154. Skeggs LT, Jr., Marsh WH, Kahn JR, Shumway NP. The existence of two forms of hypertension. *J Exp Med.* Mar 1954;99(3):275-282.
155. Zisman LS, Meixell GE, Bristow MR, Canver CC. Angiotensin-(1-7) formation in the intact human heart: in vivo dependence on angiotensin II as substrate. *Circulation.* Oct 7 2003;108(14):1679-1681.
156. Jackman HL, Massad MG, Sekosan M, Tan F, Brovkovych V, Marcic BM, Erdos EG. Angiotensin 1-9 and 1-7 release in human heart: role of cathepsin A. *Hypertension.* May 2002;39(5):976-981.
157. Gafford JT, Skidgel RA, Erdos EG, Hersh LB. Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides. *Biochemistry.* Jun 21 1983;22(13):3265-3271.
158. Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J.* Oct 1 2004;383(Pt 1):45-51.
159. Rykl J, Thiemann J, Kurzawski S, Pohl T, Gobom J, Zidek W, Schluter H. Renal cathepsin G and angiotensin II generation. *J Hypertens.* Sep 2006;24(9):1797-1807.
160. Krivoy N, Schluter H, Karas M, Zidek W. Generation of angiotensin II from human plasma by tissue kallikrein. *Clin Sci (Lond).* Oct 1992;83(4):477-482.
161. Reilly CF, Tewksbury DA, Schechter NM, Travis J. Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. *J Biol Chem.* Aug 10 1982;257(15):8619-8622.
162. Becari C, Sivieri DO, Jr., Santos CF, Moyses MK, Oliveira EB, Salgado MC. Role of elastase-2 as an angiotensin II-forming enzyme in rat carotid artery. *J Cardiovasc Pharmacol.* Oct 2005;46(4):498-504.

163. Boucher R, Asselin J, Genest J. New enzyme leading to direct formation of angiotensin-II *Circulation Res.* 1974;34:1203-1212.
164. Grise C, Boucher R, Thibault G, Genest J. Formation of angiotensin II by tonin from partially purified human angiotensinogen. *Can J Biochem.* Apr 1981;59(4):250-255.
165. Welches WR, Santos RA, Chappell MC, Brosnihan KB, Greene LJ, Ferrario CM. Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *J Hypertens.* Jul 1991;9(7):631-638.
166. Moriyama A, Nakanishi M, Sasaki M. Porcine muscle prolyl endopeptidase and its endogenous substrates. *J Biochem.* Jul 1988;104(1):112-117.
167. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* Apr 26 2002;277(17):14838-14843.
168. Kumamoto K, Stewart TA, Johnson AR, Erdos EG. Prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) in human lung and cultured cells. *J Clin Invest.* Jan 1981;67(1):210-215.
169. Yang HY, Erdos EG, Chiang TS. New enzymatic route for the inactivation of angiotensin. *Nature.* Jun 29 1968;218(5148):1224-1226.
170. Nussberger J, Brunner DB, Waeber B, Brunner HR. Specific measurement of angiotensin metabolites and in vitro generated angiotensin II in plasma. *Hypertension.* Jun 1986;8(6):476-482.
171. Semple PF, Boyd AS, Dawes PM, Morton JJ. Angiotensin II and its heptapeptide (2-8), hexapeptide (3-8), and pentapeptide (4-8) metabolites in arterial and venous blood of man. *Circ Res.* Nov 1976;39(5):671-678.
172. Nagatsu I, Nagatsu T, Yamamoto T, Glenner GG, Mehl JW. Purification of aminopeptidase A in human serum and degradation of angiotensin II by the purified enzyme. *Biochim Biophys Acta.* Feb 11 1970;198(2):255-270.
173. Palmieri FE, Petrelli JJ, Ward PE. Vascular, plasma membrane aminopeptidase M. Metabolism of vasoactive peptides. *Biochem Pharmacol.* Jul 1 1985;34(13):2309-2317.
174. Diaz-Perales A, Quesada V, Sanchez LM, Ugalde AP, Suarez MF, Fueyo A, Lopez-Otin C. Identification of human aminopeptidase O, a novel metalloprotease with structural similarity to aminopeptidase B and leukotriene A4 hydrolase. *J Biol Chem.* Apr 8 2005;280(14):14310-14317.

175. Lanckmans K, Stragier B, Sarre S, Smolders I, Michotte Y. Nano-LC-MS/MS for the monitoring of angiotensin IV in rat brain microdialysates: limitations and possibilities. *J Sep Sci.* Sep 2007;30(14):2217-2224.
176. Wright JW, Tamura-Myers E, Wilson WL, Roques BP, Llorens-Cortes C, Speth RC, Harding JW. Conversion of brain angiotensin II to angiotensin III is critical for pressor response in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Mar 2003;284(3):R725-733.
177. Mentlein R, Roos T. Proteases involved in the metabolism of angiotensin II, bradykinin, calcitonin gene-related peptide (CGRP), and neuropeptide Y by vascular smooth muscle cells. *Peptides.* 1996;17(4):709-720.
178. Wolf G, Mentzel S, Assmann KJ. Aminopeptidase A: a key enzyme in the intrarenal degradation of angiotensin II. *Exp Nephrol.* Sep-Oct 1997;5(5):364-369.
179. Fallo F, Pistorello M, Pedini F, D'Agostino D, Mantero F, Boscaro M. In vitro evidence for local generation of renin and angiotensin II/III immunoreactivity by the human adrenal gland. *Acta Endocrinol (Copenh).* Sep 1991;125(3):319-330.
180. Jarry H, Meyer B, Holzapfel G, Hinney B, Kuhn W, Wuttke W. Angiotensin II/III and substance P in human follicular fluid obtained during IVF: relation of the peptide content with follicular size. *Acta Endocrinol (Copenh).* Oct 1988;119(2):277-282.
181. Chappell MC, Brosnihan KB, Diz DI, Ferrario CM. Identification of angiotensin-(1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *J Biol Chem.* Oct 5 1989;264(28):16518-16523.
182. Neves LA, Almeida AP, Khosla MC, Santos RA. Metabolism of angiotensin I in isolated rat hearts. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Biochem Pharmacol.* Oct 26 1995;50(9):1451-1459.
183. Takai S, Sakaguchi M, Jin D, Yamada M, Kirimura K, Miyazaki M. Different angiotensin II-forming pathways in human and rat vascular tissues. *Clin Chim Acta.* Mar 2001;305(1-2):191-195.
184. Schluter H, Jankowski J, Rykl J, Thiemann J, Belgardt S, Zidek W, Wittmann B, Pohl T. Detection of protease activities with the mass-spectrometry-assisted enzyme-screening (MES) system. *Anal Bioanal Chem.* Dec 2003;377(7-8):1102-1107.
185. Fox JL, Richards JR, Luessenhop AJ. Method for detecting intracranial arteriovenous malformation with an ultrasonic transducer using the Doppler phenomenon. *J Neurosurg.* Mar 1967;26(3):322-326.
186. Franklin DL, Schlegel W, Rushmer RF. Blood flow measured by Doppler frequency shift of back-scattered ultrasound. *Science.* Aug 25 1961;134(3478):564-565.

187. . *Endspurt – die Skripten fürs Physikum - Physiologie 1*. 1 ed: Georg Thieme Verlag KG; 2011.
188. Laogun AA, Newman DL, Gosling RG. Comparison of pulse wave velocity measured by Doppler shifted ultrasound and electromagnetic flowmetry. *Ultrasound Med Biol*. 1978;3(4):367-371.
189. Ferrario CM. ACE2: more of Ang-(1-7) or less Ang II? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. Jan;20(1):1-6.
190. Ahmad S, Ward PE. Role of aminopeptidase activity in the regulation of the pressor activity of circulating angiotensins. *J Pharmacol Exp Ther*. Feb 1990;252(2):643-650.
191. Sakura H, Kobayashi H, Mizutani S, Sakura N, Hashimoto T, Kawashima Y. Kinetic properties of placental aminopeptidase A: N-terminal degradation of angiotensin II. *Biochem Int*. May 1983;6(5):609-615.
192. Harrison AG. The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides. *Mass Spectrometry Reviews*. 1997;16:201-217.
193. Mallick P, Schirle M, Chen SS, Flory MR, Lee H, Martin D, Ranish J, Raught B, Schmitt R, Werner T, Kuster B, Aebersold R. Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nat Biotechnol*. Jan 2007;25(1):125-131.
194. Olumee Z, Sadeghi M, Tang X, VerteSf A. Amino Acid Composition and Wavelength Effects in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization *Rapid communications in mass spectrometry* 1995;9: 744-752
195. Huang X, Zhang S, Schultz GA, Henion J. Surface-alkylated polystyrene monolithic columns for peptide analysis in capillary liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*. May 15 2002;74(10):2336-2344.
196. Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom*. Nov 1984;11(11):601.
197. Barrett AJ, Starkey PM. The interaction of alpha 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem J*. Aug 1973;133(4):709-724.
198. Lew RA, Warner FJ, Hanchapola I, Yarski MA, Manohar J, Burrell LM, Smith AI. Angiotensin-converting enzyme 2 catalytic activity in human plasma is masked by an endogenous inhibitor. *Exp Physiol*. May 2008;93(5):685-693.

- 199.** Assfalg-Machleidt I, Jochum M, Klaubert W, Inthorn D, Machleidt W. Enzymatically active cathepsin B dissociating from its inhibitor complexes is elevated in blood plasma of patients with septic shock and some malignant tumors. *Biol Chem Hoppe Seyler*. May 1988;369 Suppl:263-269.
- 200.** Ward PE, Benter IF, Dick L, Wilk S. Metabolism of vasoactive peptides by plasma and purified renal aminopeptidase M. *Biochem Pharmacol*. Oct 15 1990;40(8):1725-1732.
- 201.** Dusterdieck G, McElwee G. Estimation of angiotensin II concentration in human plasma by radioimmunoassay. Some applications to physiological and clinical states. *Eur J Clin Invest*. Nov 1971;2(1):32-38.
- 202.** Kosunen KJ. A simple method for measurement of angiotensin II in plasma. *Scand J Clin Lab Invest*. Sep 1976;36(5):467-472.
- 203.** Reyes-Engel A, Morcillo L, Aranda FJ, Ruiz M, Gaitan MJ, Mayor-Olea A, Aranda P, Ferrario CM. Influence of gender and genetic variability on plasma angiotensin peptides. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. Jun 2006;7(2):92-97.
- 204.** Velloso EP, Vieira R, Cabral AC, Kalapothakis E, Santos RA. Reduced plasma levels of angiotensin-(1-7) and renin activity in preeclamptic patients are associated with the angiotensin I- converting enzyme deletion/deletion genotype. *Braz J Med Biol Res*. Apr 2007;40(4):583-590.
- 205.** Marks GS, McLaughlin BE, Jimmo SL, Poklewska-Koziell M, Brien JF, Nakatsu K. Time-dependent increase in nitric oxide formation concurrent with vasodilation induced by sodium nitroprusside, 3-morpholinopyrrolidine, and S-nitroso-N-acetylpenicillamine but not by glyceryl trinitrate. *Drug Metab Dispos*. Nov 1995;23(11):1248-1252.
- 206.** Kobori H, Katsurada A, Miyata K, Ohashi N, Satou R, Saito T, Hagiwara Y, Miyashita K, Navar LG. Determination of plasma and urinary angiotensinogen levels in rodents by newly developed ELISA. *Am J Physiol Renal Physiol*. May 2008;294(5):F1257-1263.
- 207.** Cole KR, Kumar S, Trong HL, Woodbury RG, Walsh KA, Neurath H. Rat mast cell carboxypeptidase: amino acid sequence and evidence of enzyme activity within mast cell granules. *Biochemistry*. Jan 22 1991;30(3):648-655.
- 208.** Clouston WM, Evans BA, Haralambidis J, Richards RI. Molecular cloning of the mouse angiotensinogen gene. *Genomics*. Apr 1988;2(3):240-248.
- 209.** Gaillard I, Clauser E, Corvol P. Structure of human angiotensinogen gene. *DNA*. Mar 1989;8(2):87-99.

- 210.** Ohkubo H, Kageyama R, Ujihara M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S. Cloning and sequence analysis of cDNA for rat angiotensinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 1983;80(8):2196-2200.
- 211.** Bernstein KE, Martin BM, Edwards AS, Bernstein EA. Mouse angiotensin-converting enzyme is a protein composed of two homologous domains. *J Biol Chem*. Jul 15 1989;264(20):11945-11951.
- 212.** Komatsu T, Suzuki Y, Imai J, Sugano S, Hida M, Tanigami A, Muroi S, Yamada Y, Hanaoka K. Molecular cloning, mRNA expression and chromosomal localization of mouse angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (mACE2). *DNA Seq*. Aug 2002;13(4):217-220.
- 213.** Chen CY, Salles G, Seldin MF, Kister AE, Reinherz EL, Shipp MA. Murine common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10 neutral endopeptidase 24.11). Molecular characterization, chromosomal localization, and modeling of the active site. *J Immunol*. May 1 1992;148(9):2817-2825.
- 214.** Matsui T, Matsufuji H, Tamaya K, Kawasaki T, Osajima Y. Metabolic behavior of angiotensins in normotensive human plasma in the supine and upright postures. *Biosci Biotechnol Biochem*. Nov 1997;61(11):1814-1818.
- 215.** Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*. Jan;40(Database issue):D343-350.
- 216.** Sim MK, Lim BC. Determination of aminopeptidase X activity in tissues of normo- and hypertensive rats by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. Sep 12 1997;697(1-2):259-262.
- 217.** Wilk S, Wilk E, Magnusson RP. Identification of histidine residues important in the catalysis and structure of aspartyl aminopeptidase. *Arch Biochem Biophys*. Nov 15 2002;407(2):176-183.
- 218.** Chaikuad A, Pilka ES, De Riso A, von Delft F, Kavanagh KL, Venien-Bryan C, Oppermann U, Yue WW. Structure of human aspartyl aminopeptidase complexed with substrate analogue: insight into catalytic mechanism, substrate specificity and M18 peptidase family. *BMC Struct Biol*. 12:14.
- 219.** Chang SC, Momburg F, Bhutani N, Goldberg AL. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 22 2005;102(47):17107-17112.
- 220.** Nguyen TT, Chang SC, Evnouchidou I, York IA, Zikos C, Rock KL, Goldberg AL, Stratikos E, Stern LJ. Structural basis for antigenic peptide precursor processing

- by the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nat Struct Mol Biol.* May;18(5):604-613.
- 221.** Saveanu L, Carroll O, Lindo V, Del Val M, Lopez D, Lepelletier Y, Greer F, Schomburg L, Fruci D, Niedermann G, van Endert PM. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol.* Jul 2005;6(7):689-697.
- 222.** Keller PM, Lee CP, Fenwick AE, Atkinson ST, Elliott JD, DeWolf WE, Jr. Endothelin-converting enzyme: substrate specificity and inhibition by novel analogs of phosphoramidon. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 14 1996;223(2):372-378.
- 223.** Johnson GD, Stevenson T, Ahn K. Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin. *J Biol Chem.* Feb 12 1999;274(7):4053-4058.
- 224.** Hersh LB, Morihara K. Comparison of the subsite specificity of the mammalian neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) to the bacterial neutral endopeptidase thermolysin. *J Biol Chem.* May 15 1986;261(14):6433-6437.
- 225.** Soleilhac JM, Lafuma C, Porcher JM, Auburtin G, Roques BP. Characterization of a soluble form of neutral endopeptidase-24.11 (EC 3.4.24.11) in human serum: enhancement of its activity in serum of underground miners exposed to coal dust particles. *Eur J Clin Invest.* Nov 1996;26(11):1011-1017.
- 226.** Painter RG, Dukes R, Sullivan J, Carter R, Erdos EG, Johnson AR. Function of neutral endopeptidase on the cell membrane of human neutrophils. *J Biol Chem.* Jul 5 1988;263(19):9456-9461.
- 227.** Sabeur K, Vo AT, Ball BA. Characterization of angiotensin-converting enzyme in canine testis. *Reproduction.* Jul 2001;122(1):139-146.
- 228.** Korth P, Egidy G, Parnot C, LeMoullec JM, Corvol P, Pinet F. Construction, expression and characterization of a soluble form of human endothelin-converting-enzyme-1. *FEBS Lett.* Nov 17 1997;417(3):365-370.
- 229.** Matsuura A, Okumura H, Asakura R, Ashizawa N, Takahashi M, Kobayashi F, Ashikawa N, Arai K. Pharmacological profiles of aspergillomarasmies as endothelin converting enzyme inhibitors. *Jpn J Pharmacol.* Oct 1993;63(2):187-193.
- 230.** Kessenbrock K, Frohlich L, Sixt M, Lammermann T, Pfister H, Bateman A, Belaouaj A, Ring J, Ollert M, Fassler R, Jenne DE. Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. *J Clin Invest.* Jul 2008;118(7):2438-2447.

-
231. Schmidt W, Egbring R, Havemann K. Effect of elastase-like and chymotrypsin-like neutral proteases from human granulocytes on isolated clotting factors. *Thromb Res.* Apr 1975;6(4):315-329.
232. Moroz LA. Mini-plasminogen: a mechanism for leukocyte modulation of plasminogen activation by urokinase. *Blood.* Jul 1981;58(1):97-104.
233. McDonald JA, Kelley DG. Degradation of fibronectin by human leukocyte elastase. Release of biologically active fragments. *J Biol Chem.* Sep 25 1980;255(18):8848-8858.
234. Reilly CF, Travis J. The degradation of human lung elastin by neutrophil proteinases. *Biochim Biophys Acta.* Jan 24 1980;621(1):147-157.
235. Lin L, Sohar I, Lackland H, Lobel P. The human CLN2 protein/tripeptidyl-peptidase I is a serine protease that autoactivates at acidic pH. *J Biol Chem.* Jan 19 2001;276(3):2249-2255.
236. Page AE, Fuller K, Chambers TJ, Warburton MJ. Purification and characterization of a tripeptidyl peptidase I from human osteoclastomas: evidence for its role in bone resorption. *Arch Biochem Biophys.* Nov 1 1993;306(2):354-359.
237. Tisljar U, Barrett AJ. Thiol-dependent metallo-endopeptidase characteristics of Pz-peptidase in rat and rabbit. *Biochem J.* Apr 15 1990;267(2):531-533.
238. Camargo AC, Oliveira EB, Toffoletto O, Metters KM, Rossier J. Brain endo-oligopeptidase A, a putative enkephalin converting enzyme. *J Neurochem.* Apr 1987;48(4):1258-1263.
239. Casale L, Cardozo C, Kalb T, Lesser M. Quantitation of endopeptidase 24.11 and endopeptidase 24.15 in human blood leukocytes. *Enzyme Protein.* 1994;48(3):143-148.
240. Russo LC, Goni CN, Castro LM, Asega AF, Camargo AC, Trujillo CA, Ulrich H, Glucksman MJ, Scavone C, Ferro ES. Interaction with calmodulin is important for the secretion of thimet oligopeptidase following stimulation. *Febs J.* Aug 2009;276(16):4358-4371.
241. Knight CG, Dando PM, Barrett AJ. Thimet oligopeptidase specificity: evidence of preferential cleavage near the C-terminus and product inhibition from kinetic analysis of peptide hydrolysis. *Biochem J.* May 15 1995;308 (Pt 1):145-150.
242. Raymond WW, Su S, Makarova A, Wilson TM, Carter MC, Metcalfe DD, Caughey GH. Alpha 2-macroglobulin capture allows detection of mast cell chymase in serum and creates a reservoir of angiotensin II-generating activity. *J Immunol.* May 1 2009;182(9):5770-5777.

- 243.** Wang Y, Gu Y, Lewis DF, Alexander JS, Granger DN. Elevated plasma chymotrypsin-like protease (chymase) activity in women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*.29(3):253-261.
- 244.** Owen CA, Campbell EJ. Angiotensin II generation at the cell surface of activated neutrophils: novel cathepsin G-mediated catalytic activity that is resistant to inhibition. *J Immunol*. Feb 1 1998;160(3):1436-1443.
- 245.** Whyteside AR, Turner AJ. Human neprilysin-2 (NEP2) and NEP display distinct subcellular localisations and substrate preferences. *FEBS Lett*. Jul 9 2008;582(16):2382-2386.
- 246.** Thomas JE, Rylett CM, Carhan A, Bland ND, Bingham RJ, Shirras AD, Turner AJ, Isaac RE. *Drosophila melanogaster* NEP2 is a new soluble member of the neprilysin family of endopeptidases with implications for reproduction and renal function. *Biochem J*. Mar 1 2005;386(Pt 2):357-366.
- 247.** Suda H, Aoyagi T, Hamada M, Takeuchi T, Umezawa H. Antipain, a new protease inhibitor isolated from actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)*. Apr 1972;25(4):263-266.
- 248.** Herzig CM, Schoeppe W, Scherberich JE. Angiotensinase A (aminopeptidase A): properties of chromatographically purified isoforms from human kidney. *J Chromatogr*. Nov 13 1992;625(1):73-82.
- 249.** Yamada R, Mizutani S, Kurauchi O, Okano K, Imaizumi H, Narita O, Tomoda Y. Purification and characterization of human placental aminopeptidase A. *Enzyme*. 1988;40(4):223-230.
- 250.** Reaux A, Iturrioz X, Vazeux G, Fournie-Zaluski MC, David C, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Aminopeptidase A, which generates one of the main effector peptides of the brain renin-angiotensin system, angiotensin III, has a key role in central control of arterial blood pressure. *Biochem Soc Trans*. 2000;28(4):435-440.
- 251.** Velez JC, Ierardi JL, Bland AM, Morinelli TA, Arthur JM, Raymond JR, Janech MG. Enzymatic processing of angiotensin peptides by human glomerular endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. Jun 15;302(12):F1583-1594.
- 252.** Favalaro EJ, Browning T, Facey D. CD13 (GP150; aminopeptidase-N): predominant functional activity in blood is localized to plasma and is not cell-surface associated. *Exp Hematol*. Dec 1993;21(13):1695-1701.
- 253.** Scherberich JE, Wiemer J, Herzig C, Fischer P, Schoeppe W. Isolation and partial characterization of angiotensinase A and aminopeptidase M from urine and human kidney by lectin affinity chromatography and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. Nov 23 1990;521(2):279-289.

-
254. Inoue T, Kanzaki H, Imai K, Narukawa S, Higuchi T, Katsuragawa H, Maeda M, Mori T. Bestatin, a potent aminopeptidase-N inhibitor, inhibits in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* Jul 1994;79(1):171-175.
255. Garcia Del Rio C, Smellie WS, Morton JJ. des-Asp-angiotensin I: its identification in rat blood and confirmation as a substrate for converting enzyme. *Endocrinology.* Feb 1981;108(2):406-412.
256. Sasamura H, Hein L, Krieger JE, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ. Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem Biophys Res Commun.* May 29 1992;185(1):253-259.
257. Iwai N, Inagami T. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett.* Feb 24 1992;298(2-3):257-260.
258. Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE. Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest.* Sep 1991;88(3):921-933.
259. van Esch JH, Schuijt MP, Sayed J, Choudhry Y, Walther T, Jan Danser AH. AT2 receptor-mediated vasodilation in the mouse heart depends on AT1A receptor activation. *Br J Pharmacol.* Jun 2006;148(4):452-458.
260. Young D, O'Neill K, Jessell T, Wigler M. Characterization of the rat mas oncogene and its high-level expression in the hippocampus and cerebral cortex of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 1988;85(14):5339-5342.
261. Reis AB, Araujo FC, Pereira VM, Dos Reis AM, Santos RA, Reis FM. Angiotensin (1-7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility. *J Mol Histol.* Feb;41(1):75-80.
262. Jaiswal N, Diz DI, Chappell MC, Khosla MC, Ferrario CM. Stimulation of endothelial cell prostaglandin production by angiotensin peptides. Characterization of receptors. *Hypertension.* Feb 1992;19(2 Suppl):II49-55.
263. Porsti I, Bara AT, Busse R, Hecker M. Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. *Br J Pharmacol.* Mar 1994;111(3):652-654.
264. Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension.* Jan 2007;49(1):185-192.

-
- 265.** Burson JM, Aguilera G, Gross KW, Sigmund CD. Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. *Am J Physiol.* Aug 1994;267(2 Pt 1):E260-267.
- 266.** Zhou Y, Chen Y, Dirksen WP, Morris M, Periasamy M. AT1b receptor predominantly mediates contractions in major mouse blood vessels. *Circ Res.* Nov 28 2003;93(11):1089-1094.
- 267.** van Esch JH, Gembardt F, Sterner-Kock A, Heringer-Walther S, Le TH, Lassner D, Stijnen T, Coffman TM, Schultheiss HP, Danser AH, Walther T. Cardiac phenotype and angiotensin II levels in AT1a, AT1b, and AT2 receptor single, double, and triple knockouts. *Cardiovasc Res.* Jun 1;86(3):401-409.
- 268.** Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature.* Oct 26 1995;377(6551):748-750.
- 269.** Chung O, Kuhl H, Stoll M, Unger T. Physiological and pharmacological implications of AT1 versus AT2 receptors. *Kidney Int Suppl.* Sep 1998;67:S95-99.
- 270.** Gohlke P, Pees C, Unger T. AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension.* Jan 1998;31(1 Pt 2):349-355.
- 271.** Li XC, Widdop RE. AT2 receptor-mediated vasodilatation is unmasked by AT1 receptor blockade in conscious SHR. *Br J Pharmacol.* Jul 2004;142(5):821-830.
- 272.** Patzak A, Lai EY, Mrowka R, Steege A, Persson PB, Persson AE. AT1 receptors mediate angiotensin II-induced release of nitric oxide in afferent arterioles. *Kidney Int.* Nov 2004;66(5):1949-1958.
- 273.** Thorup C, Kornfeld M, Goligorsky MS, Moore LC. AT1 receptor inhibition blunts angiotensin II-stimulated nitric oxide release in renal arteries. *J Am Soc Nephrol.* Jan 1999;10 Suppl 11:S220-224.
- 274.** Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, Gembardt F, Kellett E, Martini L, Vanderheyden P, Schultheiss HP, Walther T. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation.* Apr 12 2005;111(14):1806-1813.
- 275.** Giani JF, Gironacci MM, Munoz MC, Turyn D, Dominici FP. Angiotensin-(1-7) has a dual role on growth-promoting signalling pathways in rat heart in vivo by stimulating STAT3 and STAT5a/b phosphorylation and inhibiting angiotensin II-stimulated ERK1/2 and Rho kinase activity. *Exp Physiol.* May 2008;93(5):570-578.

- 276.** Bai M. Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction. *Cell Signal.* Feb 2004;16(2):175-186.
- 277.** Striebel HW. *operative Intensivmedizin: Sicherheit in der klinischen Praxis.* Vol 1: Schattauer; 2007.
- 278.** Patel JM, Martens JR, Li YD, Gelband CH, Raizada MK, Block ER. Angiotensin IV receptor-mediated activation of lung endothelial NOS is associated with vasorelaxation. *Am J Physiol.* Dec 1998;275(6 Pt 1):L1061-1068.
- 279.** Cheng DY, DeWitt BJ, Dent EL, Nossaman BD, Kadowitz PJ. Analysis of responses to angiotensin IV in the pulmonary vascular bed of the cat. *Eur J Pharmacol.* Aug 11 1994;261(1-2):223-227.
- 280.** Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T. Regional haemodynamic effects of angiotensin II (3-8) in conscious rats. *Br J Pharmacol.* Sep 1993;110(1):159-162.
- 281.** Nossaman BD, Feng CJ, Kaye AD, Kadowitz PJ. Analysis of responses to ANG IV: effects of PD-123319 and DuP-753 in the pulmonary circulation of the rat. *Am J Physiol.* Feb 1995;268(2 Pt 1):L302-308.
- 282.** Chansel D, Czekalski S, Vandermeersch S, Ruffet E, Fournie-Zaluski MC, Ardaillou R. Characterization of angiotensin IV-degrading enzymes and receptors on rat mesangial cells. *Am J Physiol.* Oct 1998;275(4 Pt 2):F535-542.

6 Anhang

6.1 Ergänzende Abbildungen

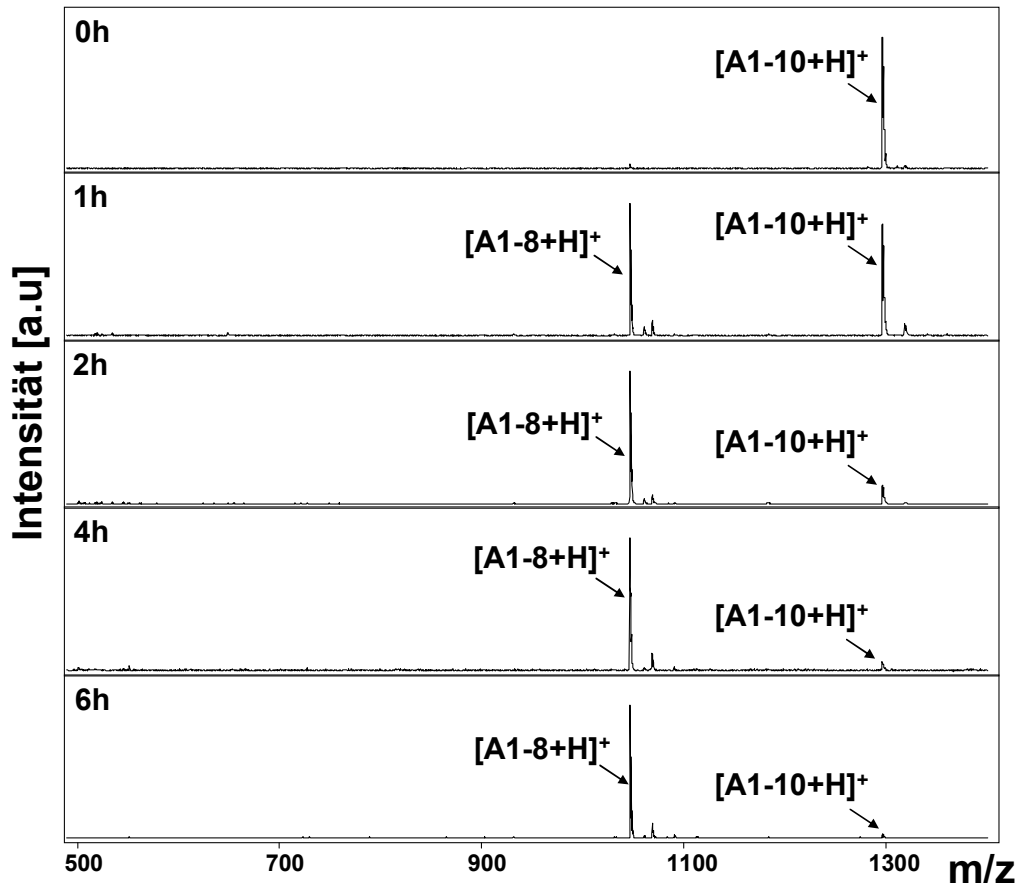


Abbildung 40. MALDI-MS-Spektren der Reaktionslösungen nach Inkubation 0,5 µg rekombinanter Chymase mit A1-10 (10^{-5}M). Die Reaktionslösungen wurden nach 0h, 1h, 2h, 4h und 6h analysiert. MALDI-Signale, die Angiotensin-Peptiden zugeordnet werden konnten, wurden mit einem Pfeil markiert.

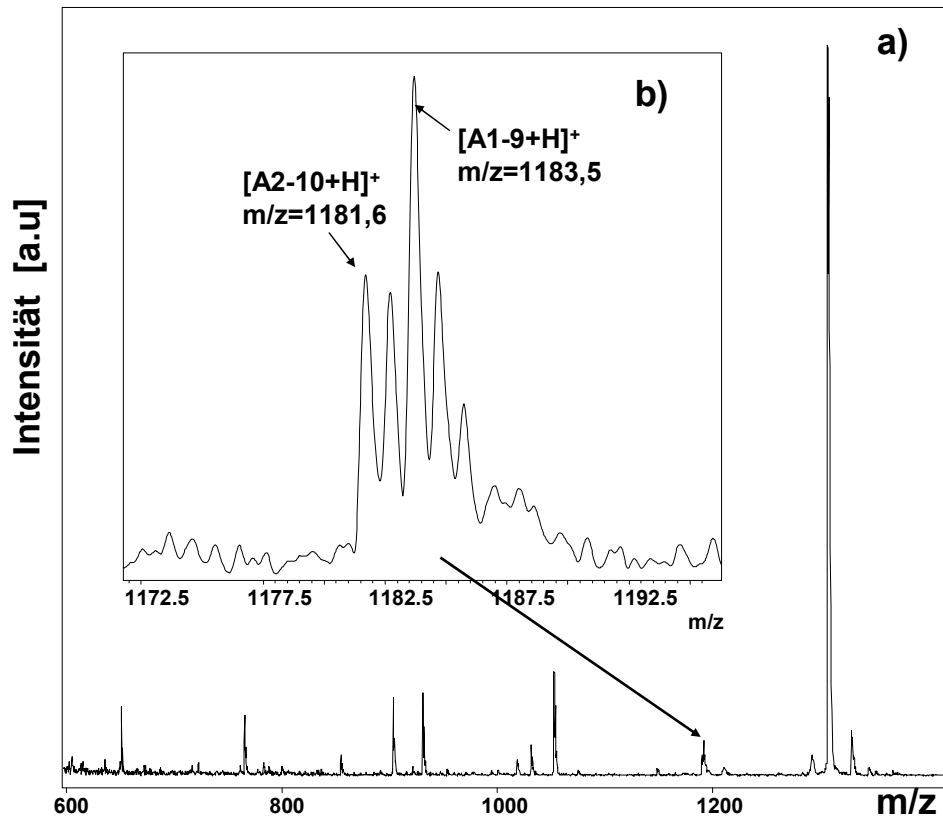


Abbildung 41. MALDI-MS-Spektren der Reaktionslösungen nach Inkubation von A1-10 (10^{-5}M) mit humanen Plasmaproteinen. Die Reaktionslösungen wurden nach 8h analysiert. a) Das Spektrum wurde in einem Bereich von 600-1400 Da aufgenommen. Das zweite Spektrum b) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Originalspektrums (a)) bei dem das mit einem Pfeil markierte Signal bei einem m/z Wert von ca. 1183 im Massenbereich von ca. 1172-1195 Da dargestellt ist. Die monoisotopischen Signale von $[\text{A2-10+H}]^+$ mit einem m/z-Wert von 1181,6 sowie $[\text{A1-9+H}]^+$ mit einem m/z-Wert von 1183,5 wurden jeweils mit einem Pfeil markiert.

6.2 Gefahrenstoffinformationen

Gefahrenstoffsymbole	Bedeutung
F	Leichtentzündlich
T	Giftig
C	Ätzend
Xn	Gesundheitsschädlich
T	Giftig
Xi	Reizend

Chemikalie	Gefahrstoff-		
	symbol	R-Sätze	S-Sätze
Acetonitril	C	R 35	S (1/2)-23-26-45
4-(2-Aminoethyl)- benzensulfonylfluorid	Xn	R 11-20/21/22-36	S (1/2)-16-36/37
Ameisensäure	Xi	R 36	S (2)-26
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Xi		S 24/25
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	T, F	R 11-23/24/25- 39/23/24/25	S (1/2)-7-16-36/37-45
Methanol	C	R 20-35-52/53	S (1/2)-9-26-27-28-45-61
Salzsäure	Xn	R 20/21/22	S 24/25-37/39
Trifluoressigsäure	C	R 34-37	S (1/2)-26-45

6.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Angiotensin
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
a.u.	<i>Absorption units</i> (Absorptionseinheiten)
ACN	Acetonitril
APA	Aminopeptidase A
APN	Aminopeptidase N
AS	Aminosäuren
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i> (Angiotensin generierendes Enzym)
AUC	<i>Area under the curve</i> (Fläche unterhalb der Kurve)
Arg	Arginin
B-Modus	<i>Brightness modulation</i> (Helligkeits-modulations)-Modus
CNBr	Bromcyan
CID	<i>Collision induced dissociation</i> (Kollisionsinduzierte Dissoziation)
C/S	Cystein/Serin
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DAP	Dipeptidylaminopeptidase
EKG	Elektrokardiogramm
ESI	Elektrosprayionisation
ERAP	Endoplasmatische Retikulum Aminopeptidase
ECE	<i>Endothelin converting enzyme</i> (Endothelin generierendes Enzym)
EIA	Enzym-Immunoassay
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FA	Formic acid (Ameisensäure)
Fc	Fragment crystallizable (kristallisierbares Fragment)
Fab	Fragment-Antigen-Bindung
GPCR	<i>G protein coupled receptors</i> (G-Protein gekoppelte Rezeptoren)
	High performance liquid chromatography
HPLC	(Hochleistungsflüssigchromatographie)
His	Histidin
HLB	<i>Hydrophilic lipophilic balance</i> (hydrophile lipophile Balance)
IRAP	Insulin-regulierte Aminopeptidase
IT	<i>Ion trap</i> (Ionenfalle)

Ile	Isoleucin
LC	<i>Liquid chromatography</i> (Flüssigkeitschromatographie)
Lys	Lysin
MES	<i>Mass spectrometry assisted enzyme screening system</i> (Massenspektrometrie-basierter Enzym-Assay)
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
MS	Massenspektrometer/Massenspektrometrie
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation)
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
NEP	Nepilysin
NE	Neutrophile Elastase
NNP	Natriumnitroprussid
NO	<i>Nitrogen monoxide</i> (Stickstoffmonoxid)
PCP	Prolyl Carboxypeptidase
PEP	Prolyl Endopeptidase
PW	Pulswelle
PWG	Pulswellengeschwindigkeit
RFU	<i>Relative fluorescence units</i> (relative Fluoreszenzeinheiten)
RAS	Renin-Angiotensin-System
RP	<i>Reversed phase</i> (Umkehrphase)
SRM	<i>Selected reaction monitoring</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i> (Standardabweichung)
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
TP1	Tripeptidyl-Peptidase 1
TOP	Thimet oligopeptidase
TOF	<i>Time of flight</i> (Flugzeit)
TIC	<i>Total ion current</i> (Totalionenstrom)
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> (Trifluorsäure)
QQQ	Triple quadrupole
Trp	Tryptophan
et al.	und andere
Val	Valin
vgl.	Vergleiche

7 Zusammenfassung

Es war Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob Angiotensin 1-10 (A1-10) im Plasma durch humane Aminopeptidasen prozessiert wird und ob die hierdurch entstehenden Peptide biologische Wirkungen haben. Es gelang über einen Massenspektrometrie-basierten Enzym-Assay (MES-Assay) die Angiotensin-generierende Aktivitäten von Aminopeptidasen im Plasma nachzuweisen, die die sukzessive Generierung der Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 katalysieren. Der Nachweis der Generierung und der Existenz von A6-10 im Plasma gelang in dieser Arbeit das erste Mal. Eine A2-10- bzw. A3-10-generierende Aktivität wurde bisher lediglich in Säugetieren und in humanen kultivierten Zellen beschrieben. Die Präsenz einer A4-10- und A5-10-generierenden Aktivität war bisher im humanen Organismus nicht bekannt. Durch den Einsatz unterschiedlicher Proteaseinhibitoren konnte die Beteiligung verschiedener Plasmaproteasen an der Generierung dieser Angiotensin-Peptide gezeigt werden. Im Plasma existiert mindestens eine bestatin-insensitive Metalloprotease mit A6-10-generierender Aktivität sowie eine oder mehrere Proteasen der Cystein/Serin-Familie, welche die Angiotensin-Peptide A2-10, A3-10 und A4-10 generieren. Über Inkubationsexperimente mit einer rekombinanten Aminopeptidase N (APN) wurde beobachtet, dass die Peptide A3-10-, A4-10-, A5-10- und A6-10 aus A2-10 entstehen können, mit A6-10 als Endprodukt der proteolytischen Kaskade der APN. Deshalb ist wahrscheinlich die APN auch im Plasma an der Generierung dieser Peptide beteiligt. Eine Kombination chromatographischer und Immunfluoreszenz-basierter Methoden ermöglichte den Nachweis der Angiotensin-Peptide A4-10, A5-10 und A6-10 in humanem Plasma. A2-10 und möglicherweise auch A3-10 und A4-10 fungieren neben A1-8 als weitere Vorläufer-Peptide für die Generierung von A2-8, A3-8, A4-8, da diese letztgenannten Peptide nachweislich in humanem Plasma aus A2-10 generiert wurden. Es wurden Hinweise gesammelt, dass A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 und A6-10 auch physiologische Funktionen haben. Hier konnte gezeigt werden, dass diese durch Aminopeptidaseaktivität entstandenen Angiotensin-Peptide in isolierten Blutgefäßen der Maus eine vasodilatierende als auch vasoprotektive Wirkung zeigen. Weitere physiologische Wirkungen dieser Peptide sind denkbar, wobei hier A6-10 als Endprodukt der proteolytischen APN-Kaskade und aufgrund dessen hoher Plasmakonzentrationen im Fokus steht. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse erweitern deutlich die Erkenntnis der vielfältigen Nutzung des Peptidhormonvorläufers A1-10 als Substrat für eine Reihe von physiologisch relevanten Peptidhormonen.

8 Summary

The aim of this work was to investigate if angiotensin (A1-10) is processed by aminopeptidases in human plasma and if these peptides are biologically active. Here, angiotensin-generating aminopeptidase activities which catalyzed the successive proteolytic generation of A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 and A6-10 were determined successfully by a mass spectrometry assisted enzyme screening system assay (MES-assay). This work provides the first evidence of the generation and existence of A6-10 in plasma. Until now A2-10 and A3-10-generating activity was solely reported in mammals and in human cultured cells. Presence of A4-10 and A5-10-generating activity in human organism was not known before. By using different protease inhibitors participation of various plasma proteases was shown. At least one bestatin insensitive metalloprotease with A6-10-generating activity as well as one or more cysteine/serine proteases which are responsible for the generation of A2-10, A3-10 and A4-10 must exist. By incubation experiments with recombinant Aminopeptidase N (APN) it was shown that A6-10 appears as the final product of the proteolytic cascade of APN. Hence the participation of APN on the generation of these angiotensin-peptides in plasma is likely. A combination of chromatographic and immunofluorescence based methods enabled the detection of the angiotensin-peptides A4-10, A5-10 and A6-10 in human plasma. A2-10 and possibly also A3-10 and A4-10 serve as additional precursor peptides beside A1-8 for the generation of the peptides A2-8, A3-8 and A4-8 as the latter were found to be generated in human plasma from A2-10. The results in this work also suggested that A2-10, A3-10, A4-10, A5-10 and A6-10 also bear physiological functions. Here it could be shown that these aminopeptidase derived angiotensin-peptides exert vasodilating as well as vasoprotective actions on isolated mouse blood vessels. Further biological functions are conceivable. Here the focus concentrates on A6-10 as it was shown to be the endproduct of the proteolytic APN-cascade and is present in high plasma concentration. The results gained in this work clearly broaden the knowledge about the varied utilization of the peptide hormone precursor A1-10 as a substrate for a multitude of physiologically relevant peptide hormones.

Curriculum Vitae

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

Publikationen

Zeitschriftenbeiträge

Mass spectrometry for monitoring protease reactions.

Schlüter, H., Hildebrand, D., Gallin, C., Schulz, A., Thiemann, J., Trusch, M.

Anal Bioanal Chem. (2008) 392, 783-92. Review.

Application of displacement chromatography for the analysis of a lipid raft proteome.

Trusch, M., Böhlick, A., Hildebrand, D., Lichtner, B., Bertsch, A., Kohlbacher, O.,

Bachmann, S., Schlüter, H. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* (2010)

878, 309-14

Application of displacement chromatography for the proteome analysis of a human

plasma protein fraction. Ahrends, R., Lichtner, B., Bertsch, A., Kohlbacher, O.,

Hildebrand, D., Trusch, M., Schlüter, H. *J Chromatogr A.* (2010) 1217, 3321-9.

Improved particle-packed HPLC/MS microchips for proteomic analysis.

Trusch, M., Ehlert, S., Bertsch, A., Kohlbacher, O., Hildebrand, D., Schlüter, H.,

Tallarek, U. *J Sep Sci.* (2010) 33, 3283-91.

Comparison of displacement versus gradient mode for separation of a complex

protein mixture by anion-exchange chromatography. Ahrends, R., Lichtner, B., Buck,

F., Hildebrand, D., Kotasinska, M., Kohlbacher, O., Kwiatkowski, M., Wagner, M.,

Trusch, M., Schlüter, H. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* (2012) Jul

901,34-40.

Inferring proteolytic processes from mass spectrometry time series data using

degradation graphs. Aiche, S., Reinert, K., Schütte, C., Hildebrand, D., Schlüter, H.,

Conrad, T.O. *PLoS One.* 7.

Identification of thalidomide-specific transcriptomics and proteomics signatures during differentiation of human embryonic stem cells. Meganathan, K., Jagtap, S., Wagh, V., Winkler, J., Gaspar, J.A., Hildebrand, D., Trusch, M., Lehmann, K., Hescheler, J., Schlüter, H., Sachinidis, A. *PLoS One*. 7.

In Revision:

Proteolytic processing of angiotensin-I in human blood plasma.

Hildebrand, D., Tepel, M., Thoning, J., Liu, Y., Schlüter, H. *PLoS ONE*.

Posterpräsentationen

Investigating protease activities by mass spectrometry in body fluids and tissues

D. Hildebrand, M. Trusch, V. Frochoux, M. Linscheid, H. Schlüter

45. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 04. März – 05. März 2012, Poznan (Polen)

Following Angiotensin I-processing proteases by mass spectrometry assisted enzyme assay.

D. Hildebrand, M. Trusch, W. Bischoff, D. Rohsbach, K. Hecher, H. Schlüter

44. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 27. Februar – 03. März 2011, Dortmund

Mass spectrometric determination of ET-1-generating peptidase activities in protein fractions.

D. Hildebrand, M. Trusch, X. Zhao, H. Schlüter

43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 07. März – 10. März 2011, Halle (Saale)

Mass spectrometric determination of U-II generating peptidase activities in patient samples.

D. Hildebrand, M. Trusch, X. Zhao, M. Tepel, H. Schlüter

18th International Mass Spectrometry Conference, 30. August – 4. September 2009, Bremen

From peptidomes towards disease-associated proteases

D. Hildebrand, M. Trusch, X. Zhao, M. Tepel, V. Frochoux, M. Linscheid, O. Schulz-Trieglaff, K. Reinert, A. Bertsch, O. Kohlbacher, H. Schlüter

6. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), 07. Oktober – 10. Oktober 2009 Leipzig

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die an der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„Untersuchung der proteolytischen Prozessierung von humanen Angiotensin-Peptiden“

im Institut für Klinische Chemie, Abteilung Massenspektrometrische Proteomanalytik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hartmut Schlüter und der Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Dr. Christian Betzel für den Fachbereich Chemie ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner versichere ich, dass ich bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht und weder diese noch eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt habe.

Hamburg, November 2012

Diana Hildebrand

Danksagung

Ich möchte mich hier bei all den Personen bedanken die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. Hartmut Schlüter, der es mir ermöglicht hat an diesem überaus interessanten Thema zu arbeiten. Ich danke ihm ebenfalls sehr für die intensive Betreuung und seine stets geduldige und freundliche Unterstützung während meiner praktischen und theoretischen Arbeit an diesem Thema.

Meinen ganz herzlichen Dank möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Dr. Christian Betzel für die Anfertigung des Zweitgutachtens aussprechen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Martin Tepel für die Durchführung der Druckmyographie und bei Prof. Dr. Horst Pagel für die Bereitstellung der murinen Plasmaproben.

Herzlich danke ich auch Florian Weinberger und Birgit Geertz für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Dopplersonographie. Mein Dank schließt auch Dr. Markus Heine für das legen der Venenkatheter und für seine stete Hilfsbereitschaft ein.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei meiner Mutter Daniela Hildebrand, meinem Bruder Radowan Hildebrand und meinem Freund Volker Deterra für die beständige und liebevolle Unterstützung.

Nicht zuletzt danke ich meiner Freundin Maria Trusch für das fleißige Korrekturlesen und vor allem für ihre langjährige Unterstützung in vielen Lebenslagen.

Weiterhin gilt mein Dank natürlich auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die schöne Zeit innerhalb und ausserhalb des Labors.