

# Kooperative Wirkungen von Peptidasen beim Abbau Natriuretischer Peptide

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Apothekerin Kristin Pankow

aus Bernau bei Berlin

März 2012



Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde unter Leitung von Dr. Wolf-Eberhard Siems am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP, Direktor und Abteilungsleiter: Prof. Dr. Walter Rosenthal) in Berlin im Zeitraum von 2004 bis 2008 durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig
2. Gutachter: Prof. Dr. Günther Weindl

Disputation am 5. Juli 2012



Teile dieser Arbeit wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

WALTHER, T.; STEPAN, H.; PANKOW, K.; BECKER, M.; SCHULTHEISS, H. P.; SIEMS, W. E.: Biochemical analysis of neutral endopeptidase activity reveals independent catabolism of atrial and brain natriuretic peptide. *Biological Chemistry* 385 (2004), Nr. 2, S. 179–184  
(<http://dx.doi.org/10.1515/BC.2004.036>)

PANKOW, K.; WANG, Y.; GEMBARDT, F.; KRAUSE, E.; SUN, X.; KRAUSE, G.; SCHULTHEISS, H. P.; SIEMS, W. E.; WALTHER, T.: Successive action of meprin A and neprilysin catabolizes B-type natriuretic peptide. *Circulation Research* 101 (2007), Nr. 9, S. 875–882  
(<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.153585>)

PANKOW, K.; SCHWIEBS, A.; BECKER, M.; SIEMS, W. E.; KRAUSE, G.; WALTHER, T.: Structural substrate conditions required for neutral endopeptidase-mediated natriuretic peptide degradation. *Journal of Molecular Biology* 393 (2009), Nr. 2, S. 496–503  
(<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.08.025>)



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis . . . . .	ix
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Natriuretische Peptide . . . . .	2
1.1.1. Vorkommen und Regulation der Natriuretischen Peptide . . . . .	2
1.1.2. Rezeptoren für Natriuretische Peptide . . . . .	4
1.1.3. Funktion der Natriuretischen Peptide . . . . .	5
1.2. Neutrale Endopeptidase . . . . .	8
1.2.1. NEP und der Abbau Natriuretischer Peptide . . . . .	8
1.3. Das Natriuretische Peptidsystem in der Medizin . . . . .	10
1.3.1. Intravenöse Gabe von Natriuretischen Peptiden . . . . .	11
1.3.2. NEP- und Vasopeptidase-Inhibitoren . . . . .	13
1.3.3. Einsatz in der Diagnostik . . . . .	15
1.4. Ziel der Arbeit . . . . .	15
<b>2. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>17</b>
2.1. ANP- und BNP-Abbau mit Maus-Membranpräparationen . . . . .	17
2.2. Natriuretische Peptide und NEP . . . . .	21
2.2.1. Abbau Natriuretischer Peptide durch rekombinante Maus-NEP . . . . .	21
2.2.2. Modell für die Interaktion von NEP und den Natriuretischen Peptiden . . . . .	23
2.2.3. Überprüfung des Modells mit trunkierten Natriuretischen Peptiden . . . . .	26
2.2.4. Überprüfung des Modells mit in der Ringstruktur modifizierten Natriuretischen Peptiden . . . . .	28

2.3.	Experimente zur Ermittlung von weiteren BNP-abbauenden Peptidasen in muriner Nierenmembran . . . . .	29
2.3.1.	Bestimmung der initialen Spaltstelle . . . . .	29
2.3.2.	Einsatz von gruppenspezifischen Enzym-Inhibitoren . . . . .	30
2.3.3.	Einsatz von spezifischen Enzym-Inhibitoren und Identifizierung von Meprin als mBNP-spaltende Peptidase . . . . .	32
2.3.4.	Verminderter mBNP-Abbau in Nieren von Mausstämmen mit fehlender Meprin- $\alpha$ -Expression . . . . .	34
2.3.5.	Abbau von humanen BNP durch Maus-Nierenmembran . . . . .	35
2.4.	Abbau Natriuretischer Peptide durch Meprin . . . . .	37
2.4.1.	Abbau Natriuretischer Peptide durch Meprin A aus Rattenniere . . . . .	37
2.4.2.	Abbau von mBNP und verwandten Peptiden durch humanes rekombinantes Meprin $\alpha$ und $\beta$ . . . . .	38
2.4.3.	Vergleich des hBNP-Abbaus durch humanes und murines Meprin $\alpha$ . . . . .	40
2.5.	Biologische Aktivität von mBNP und mBNP7–32 im Vergleich mit anderen Natriuretischen Peptiden . . . . .	44
2.5.1.	Glatte Muskelzellen . . . . .	44
2.5.2.	NPR-A- bzw. NPR-B-transfizierte HEK-Zellen . . . . .	46
2.6.	Weiterer Abbau von mBNP7–32 durch NEP . . . . .	46
2.7.	Wirkung des Meprin-Inhibitors Actinonin <i>in vivo</i> . . . . .	48
2.8.	Erste Versuche zur Auffindung der BNP-abbauenden Peptidase in muriner Lungenmembran . . . . .	49
2.8.1.	Einsatz verschiedener Metallopeptidase-Inhibitoren . . . . .	50
2.8.2.	Abbau Natriuretischer Peptide durch rekombinantes ECE . . . . .	52
2.9.	Schlussbetrachtung . . . . .	55
<b>3.</b>	<b>Methoden</b> . . . . .	<b>61</b>
3.1.	Materialien . . . . .	61
3.2.	Membrangewinnung . . . . .	64
3.3.	Proteinbestimmung . . . . .	64

3.4. Inkubationen . . . . .	65
3.5. Messung der NEP-Aktivität . . . . .	69
3.6. Zellkultur und cGMP-Messungen zur biologischen Aktivität der Na- triuretischen Peptide (Kap. 2.5) . . . . .	70
3.7. Meprin-Inhibition <i>in vivo</i> durch Actinonin (Kap. 2.7) . . . . .	71
3.8. HPLC-Analytik . . . . .	71
3.9. Massenspektrometrie . . . . .	73
3.10. Modelling . . . . .	73
3.11. Statistik . . . . .	74
<b>4. Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
<b>5. Summary</b>	<b>77</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>91</b>
A.1. Publikationen . . . . .	91
A.2. Ausgewählte Tagungsbeiträge . . . . .	92
A.3. Danksagung . . . . .	94
A.4. Lebenslauf . . . . .	95
A.5. Selbstständigkeitserklärung . . . . .	96



# Abkürzungsverzeichnis

ACE	.....	<i>Angiotensin-Converting Enzyme</i>
AEBSF	.....	4-(2-Aminoethyl)-benzonsulfonylfluorid
ANP	.....	Atriales Natriuretisches Peptid
ATP	.....	Adenosin-Triphosphat
BNP	.....	B-Typ Natriuretisches Peptid
cGMP	.....	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHAPS	.....	3-[3-(Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CNP	.....	C-Typ Natriuretisches Peptid
DALEK	.....	[D-Ala <sup>2</sup> ]-Leucin-Enkephalinamid, Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-NH <sub>2</sub>
DNP	.....	Dendroaspis Natriuretisches Peptid
DPP4	.....	Dipeptidylpeptidase IV
E-64	.....	N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucin-4-guanidinobutylamid
eANP	.....	<i>eel</i> ANP, ANP des Aals
ECE	.....	<i>Endothelin-Converting Enzyme</i>
EDTA	.....	Ethylendiamintetraessigsäure
hANP	.....	humanes ANP
hBNP	.....	humanes BNP
HPLC	.....	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, <i>high performance liquid chromatography</i>
MALDI-TOF-MS	...	Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeit ( <i>time of flight</i> )-Analysator-Massenspektrometrie
mANP	.....	<i>murine</i> ANP, ANP der Maus und der Ratte
MAPK	.....	mitogenassoziierte Proteinkinase
mBNP	.....	BNP der Maus, kurze Form mit 32 Aminosäuren

mBNP45	BNP der Maus, höhermolekulare Form mit 45 Aminosäuren
MKP-1	MAPK-Phosphatase-1
NEP	Neutrale Endopeptidase, auch Neprilysin
NPchimär	chimäres Natriuretisches Peptid, bestehend aus der Ringstruktur des humanen ANP und den C- und N-terminalen Enden des humanen BNP
NPR-A	Natriuretischer-Peptid-Rezeptor Typ A
NPR-B	Natriuretischer-Peptid-Rezeptor Typ B
NPR-C	Natriuretischer-Peptid-Rezeptor Typ C
NT-proBNP	N-terminaler Teil von proBNP; proBNP1–76
pBNP	<i>porcine</i> BNP, BNP des Schweins, Variante mit 32 Aminosäuren
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rBNP	<i>rat</i> BNP, BNP der Ratte, kurze Form mit 32 Aminosäuren
rBNP45	BNP der Ratte, höhermolekulare Form mit 45 Aminosäuren
RSA	Rinder-Serumalbumin
TAG	Tyr-D-Ala-Gly
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

# 1. Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind trotz intensiver Forschung und großer diagnostischer und therapeutischer Fortschritte in den letzten 20 Jahren immer noch die häufigste Todesursache in Deutschland [79]. Sie stellen damit nicht nur ein gesundheitliches, sondern auch ein erhebliches gesundheitsökonomisches Problem dar. Als ein Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen gilt ein erhöhter Blutdruck. Der Blutdruck wird über den Tonus der Blutgefäße sowie über das Blutvolumen durch verschiedene Hormonsysteme gesteuert. Die wichtigsten sind das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), das Endothelin-System, das sympathoadrenerge System und das Natriuretische Peptidsystem. Schon die Dysregulation eines dieser Systeme reicht aus, um den Blutdruck zu erhöhen. Meistens sind jedoch Störungen bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen nicht nur auf ein Hormonsystem beschränkt, wodurch potenzierende Effekte ausgelöst werden. Die Aktivierung neurohumoraler Systeme (RAAS, Endothelin-System, Sympathikus) dient z. B. bei beginnender Herzinsuffizienz regulatorisch einer besseren Durchblutung peripherer Organe, trägt aber auf Dauer zu weiteren pathophysiologischen Prozessen am Herzen bei und verschlechtert damit den kardialen Zustand. Das Natriuretische Peptidsystem, das im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht, kann hierbei durch die Senkung von Vor- und Nachlast in Verbindung mit der Inhibition des Sympathikus und des Renin-Angiotensin-Systems der neurohumoralen Aktivierung bei Herzinsuffizienz entgegenwirken und ist damit auch für pharmakologische Anwendungen interessant (siehe Kapitel 1.3).

## 1.1. Natriuretische Peptide

Seit der Entdeckung der Natriuretischen Peptide in den 80er Jahren [9, 94, 95] ist bekannt, dass das Herz nicht nur als Pumpe sondern auch als endokrines Organ wirkt. Durch die Freisetzung Natriuretischer Peptide nimmt es eine Kernfunktion in der Regulation des Blutdrucks und des Wasser-Salz-Haushalts ein. Die bekanntesten Natriuretischen Peptide sind ANP (Atriales Natriuretisches Peptid), BNP (B-Typ Natriuretisches Peptid) und CNP (C-Typ Natriuretisches Peptid). Allen Natriuretischen Peptiden gemeinsam ist eine aus 17 Aminosäuren bestehende Ringstruktur, die durch eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cystein-Molekülen verknüpft ist. Diese Ringstruktur ist essentiell für die Bindung an die Rezeptoren und damit für die biologische Funktion der Peptide [59]. ANP und vor allem CNP weisen eine hohe Spezieshomologie auf. CNP gilt allgemein als Ur-Form, aus der sich die anderen Natriuretischen Peptide phylogenetisch entwickelt haben [44]. Beim BNP gibt es größere strukturelle Unterschiede zwischen den Spezies.

### 1.1.1. Vorkommen und Regulation der Natriuretischen Peptide

Die kardialen Peptide ANP und BNP werden aus ihren hochmolekularen Vorstufen im Herzen bei atrialer (ANP, BNP) oder ventrikulärer (BNP) Volumen- bzw. Druckbelastung freigesetzt. ANP wird zunächst als proANP in sekretorischen Vesikeln atrialer Myozyten gespeichert und erst während der Freisetzung durch die Serin-Protease Corin (EC 3.4.21.-) [20, 113, 116] in das biologisch aktive ANP gespalten. Im distalen Tubulus der Niere wird aus dem proANP durch Abspalten eines anderen Signalpeptids in der posttranslationalen Proteinmodifikation das Urodilatin synthetisiert. Dieses ANP-Analogon ist im Vergleich zum ANP N-terminal verlängert [86].

BNP wird sowohl in atrialen als auch in ventrikulären Myozyten synthetisiert, wobei die ventrikuläre Produktion erst im pathologischen Zustand einsetzt [10]. Das zunächst entstehende proBNP wird vor und während der Freisetzung durch die Serin-Proteasen Furin (EC 3.4.21.75) [85] oder Corin [116] in BNP und den N-terminalen Abschnitt von proBNP (NT-proBNP) gespalten. Im Gegensatz zu



Ein weiteres Natriuretisches Peptid, das DNP (Dendroaspis Natriuretisches Peptid), wurde im Gift der Gewöhnlichen Mamba (*Dendroaspis angusticeps*) entdeckt [87]. DNP hat mit 15 Aminosäuren einen besonders langen C-terminalen Rest.

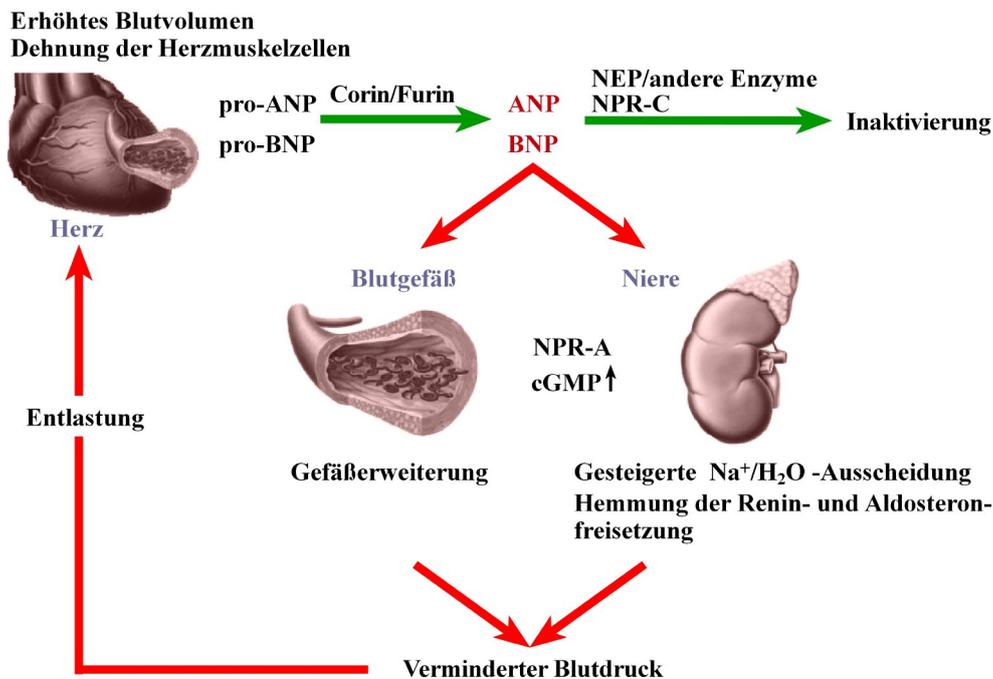


Abbildung 1.2.: *Regulation und Funktion von ANP und BNP*

Die vorliegende Arbeit thematisiert den Katabolismus der Natriuretischen Peptide. Die Natriuretischen Peptide werden schnell inaktiviert. Der enzymatische Abbau erfolgt hauptsächlich in der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus der Niere [2, 99]. Der Neutralen Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11) kommt hier die größte Bedeutung zu (siehe dazu ausführlicher Kapitel 1.2). Ein weiterer Abbauweg ist die Bindung an den Natriuretischen-Peptid-Rezeptor Typ C (NPR-C; siehe Kapitel 1.1.2). Nach Bindung an den NPR-C wird der Rezeptor-Peptid-Komplex internalisiert und das Natriuretische Peptid durch zytosolische Enzyme abgebaut.

### 1.1.2. Rezeptoren für Natriuretische Peptide

Es sind drei Rezeptorproteine für Natriuretische Peptide bekannt. Sie alle besitzen eine relativ große (etwa 450 Aminosäuren) extrazelluläre Bindungsdomäne und

jeweils eine transmembranäre Region mit etwa 20 Aminosäuren. Die Natriuretischen Peptid-Rezeptoren A und B (im Folgenden NPR-A und NPR-B ) besitzen zudem einen großen intrazellulären Teil mit einer intrinsischen Guanylatcyclase-Aktivität, die durch eine Kinase-homologe Domäne reguliert wird [75, 89]. ANP, BNP und DNP binden bevorzugt an den NPR-A, während CNP seine Wirkung über den NPR-B entfaltet. Die Rezeptoren liegen als Dimer und zum Teil als Oligomer vor. Die Bindung der Natriuretischen Peptide an die extrazelluläre Domäne führt zu einer Konformationsänderung, die die C-terminalen Guanylatcyclasen beider Rezeptoruntereinheiten dicht aneinander bringt, so dass deren Repression durch die Kinase-homologe Domäne aufgehoben wird. Dadurch werden die Guanylatcyclasen aktiviert und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) gebildet [54, 56] (Abb. 1.3). Eine ATP-Bindungsstelle in der Kinase-homologen Domäne ist essentiell für die Signaltransduktion. Die Bildung von cGMP aktiviert Proteinkinase G. Dies führt unter anderem zur Regulation von Ionenkanälen, zu Substrat-Phosphorylierungen und wachstumsregulatorischen Vorgängen. Über die Dephosphorylierung der Kinase-homologen Domäne wird der Rezeptor zudem desensitiviert.

Der NPR-C (siehe auch Kapitel 1.1.1) besitzt nur eine sehr kurze intrazelluläre Domäne ohne Guanylatcyclase-Aktivität. Er kontrolliert als Clearance-Rezeptor die lokalen Konzentrationen an Natriuretischen Peptiden. Das geschieht durch eine Rezeptor-vermittelte Internalisierung der Natriuretischen Peptide. NPR-C kann aber auch cGMP-unabhängig eine Signaltransduktionsfunktion ausüben. Hierbei wird ein  $G_i$ -Protein aktiviert, dessen  $\alpha$ -Untereinheit Adenylatcyclase inhibiert, und dessen  $\beta\gamma$ -Untereinheit Phospholipase C aktiviert [81].

### **1.1.3. Funktion der Natriuretischen Peptide**

Die wichtigsten Zielorgane für ANP und BNP sind die Nieren und Gefäßmuskelzellen. Die physiologische Funktion liegt dabei hauptsächlich in der Regulation des Volumen- und Wasserhaushaltes (Abb. 1.2). Das Natriuretische Peptidsystem stellt hier einen wichtigen funktionellen Gegenspieler zum RAAS dar. Natriuretische Peptide wirken durch die Steigerung der Salz- und Wasserausscheidung blutdrucksenkend. Dieser natriuretische Effekt ist das Ergebnis einer direkten Hemmung der Natrium-

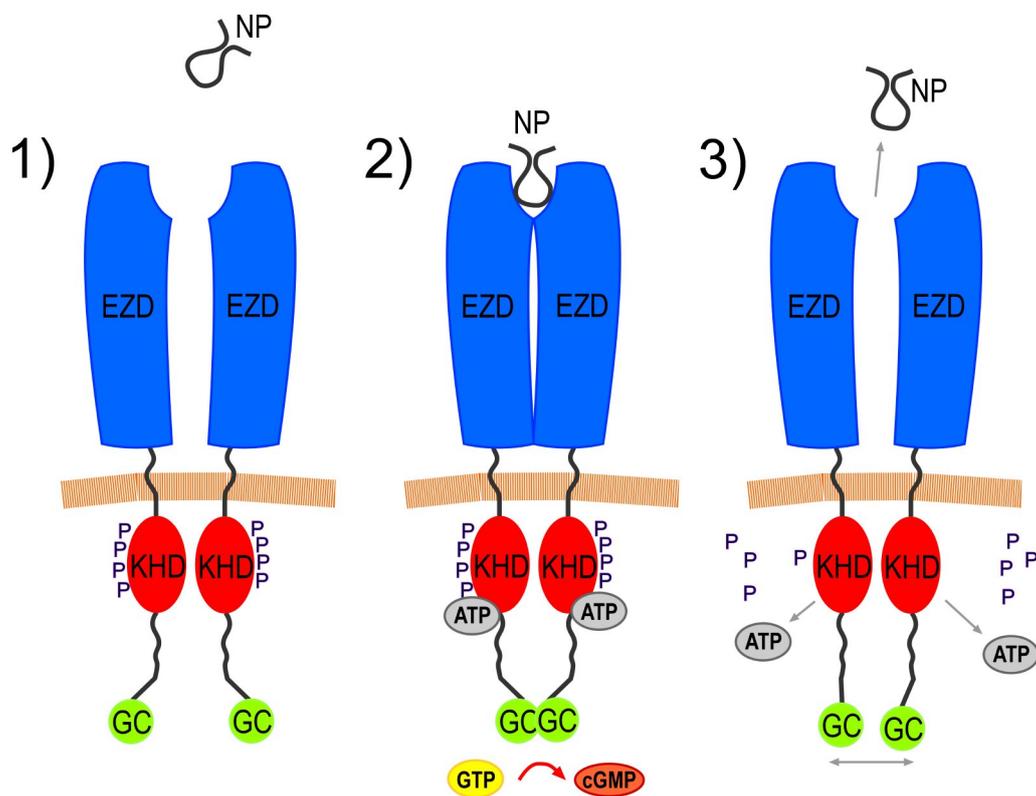


Abbildung 1.3.: Regulation eines NPR nach Silberbach und Roberts [89] – Im Ausgangsstadium (1) liegt der NPR als Dimer vor, die Kinase-homologe Domäne (KHD) unterdrückt die Guanylatcyclase-Aktivität (GC). Die Phosphorylierung (P) der KHD hält die extrazelluläre Bindungsdomäne (EZD) in einem hochaffinen Zustand für das Natriuretische Peptid (NP). Nach Bindung des NP (2) an das Dimer führt eine Konformationsänderung in der KHD zur Bindung von ATP, wodurch die beiden GCs assoziieren und damit aktiviert werden. Über die Dephosphorylierung der KHD wird der Rezeptor desensibilisiert und der Ligand wieder freigegeben (3).

rückresorption im Sammelrohr der Niere und der Hemmung der Aldosteronsekretion in der Nebennierenrinde. Außerdem steigt der glomeruläre Filtrationsdruck durch die Relaxation der afferenten renalen Arteriolen mit gleichzeitiger Vasokonstriktion der efferenten Arteriolen [58]. Zusätzlich blutdrucksenkend wirken sich die direkte Vasodilatation der glatten Gefäßmuskulatur, die erhöhte endotheliale Permeabilität und die Hemmung der Reninfreisetzung aus [75].

ANP und BNP regulieren zusätzlich Wachstum und Proliferation. Vor allem für ANP konnten antiproliferative Effekte auf glatte Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und Herzmuskelzellen nachgewiesen werden. So zeigt der Phänotyp von NPR-A-Knockout-Mäusen neben einer arteriellen Hypertonie eine deutliche kardiale Hypertrophie [41,49]. Der wachstumshemmende Effekt ergibt sich durch die ANP-induzierte Expression der mitogenassoziierten Proteinkinase (MAPK)-Phosphatase-1 (MKP-1) [37]. Die MKP-1 hemmt den durch z. B. Angiotensin II oder Endothelin-1 vermittelten MAPK-Signalweg und die damit verbundene Steigerung der Proteinexpression. BNP wirkt eher antifibrotisch, denn es hemmt die Kollagensynthese und erhöht die Aktivität von Matrixmetalloproteinasen (MMP) [98,101]. Neueste Untersuchungen zeigen zudem, dass ANP und BNP auch lipolytische Effekte ausüben [63–65].

Im Gegensatz zu den mit dem Blutfluss zirkulierenden kardialen Peptiden ANP und BNP wirkt CNP eher lokal als parakriner Faktor. Es wird vom Endothel freigesetzt und wirkt direkt relaxierend auf die Gefäßmuskelzellen. Da der Rezeptor für CNP (NPR-B) hauptsächlich in Venen exprimiert wird, ergibt sich für CNP vielmehr eine venodilatierende Wirkung. Im Gegensatz dazu wird der NPR-A für ANP und BNP sowohl in Arterien und Venen exprimiert. Daher ist die blutdrucksenkende Wirkung bei ANP und BNP ausgeprägter [55,108]. Der CNP/NPR-B-Signalweg ist aber auch essentiell für die Regulation des Knochenwachstums. CNP- bzw. NPR-B-Knockout-Mäuse entwickeln Zwergenwuchs; transgene Mäuse, die CNP überexprimieren, zeigen ein verstärktes Längenwachstum. CNP wirkt hier direkt auf Chondrozyten an der Wachstumsfuge. Auch beim Menschen sind Mutationen im CNP- bzw. NPR-B-Gen beobachtet worden, die zu Zwergenwuchs oder extremen Wachstum führten [7,30,72].

## 1.2. Neutrale Endopeptidase

Die Neutrale Endopeptidase (NEP; EC 3.4.24.11; auch Nephilysin, Enkephalinase, M13.001 nach MEROPS-Klassifikation) ist eine membrangebundene Metallopeptidase mit Zink im katalytischem Zentrum, die Peptide an der aminoterminalen Seite hydrophober Aminosäuren spaltet (z. B. Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, Leucin, Isoleucin, Valin, Alanin, Methionin). NEP ist im Körper von Säugetieren weit verbreitet und wird z. B. in der Niere, in der Lunge, im Gehirn, im Darm, im Endothel und im Herzen exprimiert. Besonders hohe Aktivitäten sind in der Bürstensaummembran von Niere (proximaler Tubulus) und Darm nachweisbar. In der Bürstensaummembran der Niere beträgt ihr Anteil an der Gesamtproteinmasse 4 % [1, 45]. Das Enzym hat ein sehr breites Substratspektrum. Zu den NEP-Substraten gehören z. B. Enkephalin, Neuropeptid Y, Cholecystokinin und  $\beta$ -Amyloid-Peptid. Bezogen auf den Blutdruck kann die NEP sowohl den Abbau von vasodilatatorischen Peptiden wie den Natriuretischen Peptiden, Bradykinin, Substanz P und Adrenomedullin sowie auch den Abbau von vasokonstriktorischen Peptiden wie z. B. Endothelin-1 und Angiotensin I und II katalysieren. Durch die Lokalisation in der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus und durch die breite Substratspezifität kommt der NEP eine bedeutende Rolle bei der Inaktivierung von glomerulär filtrierten Peptidhormonen während der Rückresorption zu [17, 47].

### 1.2.1. NEP und der Abbau Natriuretischer Peptide

Die NEP gilt als das wichtigste Enzym für die Inaktivierung der Natriuretischen Peptide. Olins et al. [71] untersuchten den Abbau von humanem ANP (hANP) durch Nierenbürstensaummembran (Kaninchen) und fanden als Hauptabbauprodukt ANP mit intakter Disulfidbrücke gespalten zwischen Cystein und Phenylalanin innerhalb der Ringstruktur. Diese Ringaufspaltung führte zum Verlust der biologischen Aktivität. Durch den Vergleich des Abbaus von hANP durch Nierenmembran (Schwein) und NEP, aufgereinigt aus Nierenmembran (Schwein), konnten Stephenson und Kenny [92] beweisen, dass die NEP hauptsächlich für den Abbau von ANP verantwortlich ist. Als Spaltstellen wurden Cystein(C7)-Phenylalanin(F8), Arginin(R14)-Isoleucin(I15),

Glycin(G16)-Alanin(A17) und Serin(S25)-Phenylalanin(F26) identifiziert. Vanneste et al. [103] wiederholten den Versuch mit humaner Nierenmembran und humaner NEP und fanden zusätzlich die Spaltstellen Arginin(R4)-Serin(S5), Arginin(R11)-Methionin(M12) und Glycin(G20)-Leucin(L21). Das N-terminal verlängerte Urodilatin wird im Vergleich zu ANP langsamer abgebaut [34, 46].

Der Abbau von CNP durch NEP wurde von Kenny et al. [46] und Watanabe et al. [107] untersucht. CNP wird schneller abgebaut als ANP. Die initiale Spaltung erfolgt auch hier zwischen Cystein und Phenylalanin im Ring. Als weitere Spaltstellen wurden Glycin(G8)-Leucin(L9), Lysin(K10)-Leucin(L11), Arginin(R13)-Isoleucin(I14), Serin(S16)-Methionin(M17) und Glycin(G19)-Leucin(L20) gefunden.

Da BNP zuerst aus Schweine-Hirn isoliert wurde [94], erfolgten die ersten Abbauprobe auch mit Schweine-BNP (pBNP, *porcine* BNP, hier die kurze Form pBNP26). Vogt-Schaden et al. [105] untersuchten den Abbau von pBNP durch Nierenmembran (Hund) und identifizierten die Spaltstellen Serin(S14)-Leucin(L15) und Arginin(R8)-Leucin(L9). Durch Zugabe des NEP-Inhibitors Phosphoramidon wurde der pBNP-Abbau unterdrückt. Da sich die Primärstrukturen der BNP-Formen verschiedener Spezies stärker unterscheiden, als es bei ANP und CNP der Fall ist, ist jedoch beim BNP jedes Peptid einzeln zu betrachten. Norman et al. [67] untersuchten daher parallel den Abbau von pBNP, BNP der Ratte (rBNP, hier rBNP32) und humanem BNP (hBNP) durch NEP aus Rattennieren. Für pBNP deckten sich die Ergebnisse mit denen von Vogt-Schaden et al.; für rBNP wurden die Spaltstellen Arginin(R23)-Leucin(L24) innerhalb des Rings und Arginin(R30)-Leucin(L31) im C-terminalen Rest identifiziert. Das hBNP wurde an den Positionen Prolin(P2)-Lysin(L3) und Methionin(M4)-Valin(V5) im N-terminalen Rest, sowie im Ring bei Arginin(R17)-Isoleucin(I18) gespalten.

Auffällig ist, dass in allen untersuchten BNPs nicht die Cystein-Phenylalanin-Bindung angegriffen wird. Das hBNP nimmt zusätzlich eine Sonderstellung ein, da der Abbau durch die NEP erstens sehr langsam erfolgt und zweitens die initiale Spaltung außerhalb der Ringstruktur zwischen Methionin und Valin stattfindet (Kenny et al. [46], Watanabe et al. [107], Smith et al. [91]). In dem Versuch von Watanabe et al. [107] wurde der Abbau der drei humanen Natriuretischen Peptide durch humane

NEP direkt verglichen. Die in dieser Arbeit ermittelten Spaltstellen sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

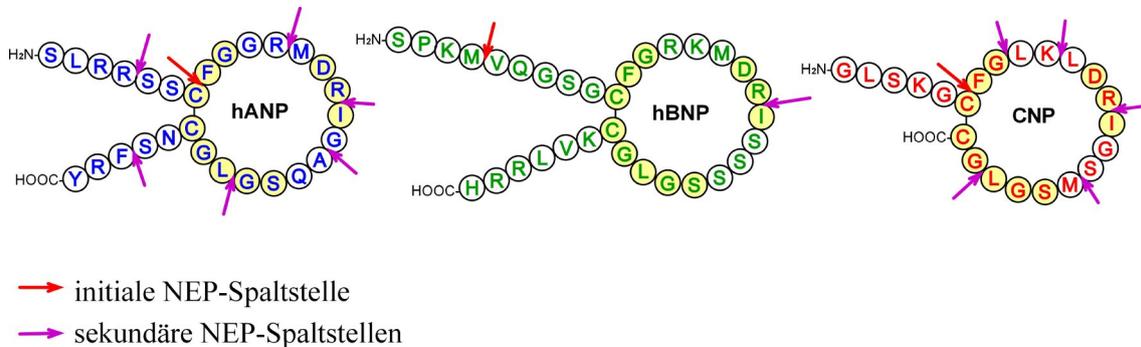


Abbildung 1.4.: *Spaltstellen der humanen Natriuretischen Peptide nach Inkubation mit humaner NEP nach Watanabe et al. [107]*

Die beobachtete Resistenz von hBNP gegenüber NEP wirkt sich auch *in vivo* aus. Im Vergleich zu ANP (Halbwertszeit 3–3,5 min) ist die Abbaurrate von hBNP 7-fach geringer (Halbwertszeit 20–22 min) [40, 91].

### 1.3. Das Natriuretische Peptidsystem in der Medizin

Das Natriuretische Peptidsystem dient als wichtiger Kompensationsmechanismus im Rahmen der neurohumoralen Aktivierung (z. B. durch Angiotensin II und Bradykinin) bei Patienten mit Herzinsuffizienz. Daraus ergeben sich vielversprechende Ansatzpunkte in Hinblick auf eine zukünftige pharmakologische Anwendung. Ein therapeutisches Potential der Natriuretischen Peptide ergibt sich vor allem durch die Blutdruck senkende Wirkung. Im Folgenden werden verschiedene Ansätze vorgestellt, die positiven Effekte der Natriuretischen Peptide nutzbar zu machen.

### 1.3.1. Intravenöse Gabe von Natriuretischen Peptiden

#### Rekombinante Natriuretische Peptide

Eine Strategie besteht in der intravenösen Gabe von Natriuretischen Peptiden. Bereits 1995 wurde in Japan humanes rekombinantes ANP (Carperitide, HANP<sup>®</sup>, Daiichi Pharmaceutical Co., Japan) für die Therapie der akuten Herzinsuffizienz zugelassen. Die Infusion von ANP bewirkt bei gesunden Menschen eine Blutdrucksenkung und eine erhöhte glomeruläre Filtrationsrate [23, 109]. Bei Herzinsuffizienz-Patienten ist dieser Effekt deutlich reduziert [22]. Dennoch verbessert sich durch die intravenöse Gabe von ANP laut einer 6-jährigen Prospektivstudie [97] bei 82 % der Patienten mit einer akuten Herzinsuffizienz der klinische Zustand.

Humanes rekombinantes BNP ist seit 2001 in den USA als Nesiritide (Natrecor<sup>®</sup>, Scios, USA) zur intravenösen Therapie bei Patienten mit akut dekompensierter Herzinsuffizienz, die bereits im Ruhezustand oder bei minimaler Tätigkeit unter Atemnot leiden, zugelassen. Therapieziel ist hier eine rasche Linderung der Symptome und eine Verbesserung und Stabilisierung des hämodynamischen Zustands des Patienten. Nachdem jedoch Sackner-Bernstein et al. in einer Meta-Analyse [83, 84] über ein erhöhtes Risiko für eine verschlechterte Nierenfunktion und über eine erhöhte Mortalität bei Nesiritide-Gabe berichteten, kamen Zweifel an der Sicherheit der Substanz auf. Nesiritide wird daher gegenwärtig kontrovers diskutiert, wobei besonders der weitläufige Einsatz auch in der ambulanten Therapie und die Verwendung außerhalb der zugelassenen Anwendungsgebiete kritisiert werden. Ein Experten-Gremium hat daher auf Initiative des Herstellers Empfehlungen für den Einsatz von Nesiritide veröffentlicht [15]. Darin heißt es, dass Nesiritide nur im Rahmen der Zulassung eingesetzt werden sollte und nicht, um die Nierenfunktion zu verbessern oder die Diurese zu erhöhen. Eine ambulante Anwendung sollte nicht erfolgen. Außerdem wurden weiterführende Studien empfohlen.

Als drittes Natriuretisches Peptid wird Urodilatin (Ularitide, CardioPep Pharma GmbH, Deutschland) klinisch getestet. Ularitide soll auch zur Behandlung der dekompensierten chronischen Herzinsuffizienz eingesetzt werden. In Phase-II-Studien (SIRIUS I und II) konnten deutliche hämodynamische Effekte nachgewiesen werden,

die mit einer Verbesserung von Herzleistung und Atemfunktion einhergingen [60, 61]. Gleichzeitig wird Ularitide gut toleriert. Phase-III-Studien sind noch nicht abgeschlossen.

### **Pegylierung**

Ein limitierender Faktor in der medizinischen Anwendung Natriuretischer Peptide ist ihre kurze biologische Halbwertszeit. Nesher et al. [66] haben daher ein „pegyliertes“ ANP-Molekül entwickelt. Eine Polyethylenglycol(PEG)-Kette fungiert hier als Schutzgruppe gegen den enzymatischen Abbau. Diese PEG-Kette ist über einen Spacer an das ANP gebunden, der bei physiologischem pH-Wert langsam hydrolysiert wird und dabei das ANP freisetzt. Durch diese Retardierung konnte in Tierversuchen die ANP-Wirkdauer verfünffacht werden.

### **Chimäre Natriuretische Peptide**

Da die Wirkungen der verschiedenen Natriuretischen Peptide unterschiedlich ausgeprägt sind, besteht darüber hinaus die Idee, chimäre Natriuretische Peptide zu entwickeln, um die pharmakologischen Eigenschaften ihrer „Mutter“-Peptide zu kombinieren. Eines dieser Chimäre ist Vasonatrin, eine Kombination von CNP mit dem C-terminalen Rest des ANP (siehe Abb. 1.5). Im Gegensatz zum CNP vermittelt Vasonatrin seine Wirkung über den NPR-A [111]. Vasonatrin wirkt natriuretisch wie ANP und zeigt venodilatierende Effekte wie CNP; die Erweiterung arterieller Gefäße ist sogar ausgeprägter als bei ANP und CNP [108].

Als weiteres chimäres Peptid wurde CD-NP von Lisy et al. [55] synthetisiert und beschrieben. CD-NP besteht aus CNP und dem C-terminalen Rest des DNP und aktiviert sowohl den NPR-A als auch den NPR-B. Ähnlich dem Vasonatrin vereint es venodilatierende und natriuretische Eigenschaften. Verglichen mit BNP senkt CD-NP den Blutdruck weniger stark, wodurch die negativen Effekte einer geringeren Nierendurchblutung mit folgender Verschlechterung der Nierenfunktion (wie beim Nesiritide) ausbleiben sollen.



Abbildung 1.5.: *Chimäre Natriuretische Peptide: Vasonatrin und CD-NP bestehen aus CNP (rotes Grundgerüst) mit Ergänzung des C-Terminus von ANP (blau) bei Vasonatrin bzw. von DNP (violett) beim CD-NP. Diese Designer-Peptide zeigen gegenüber CNP modifizierte Eigenschaften.*

### 1.3.2. NEP- und Vasopeptidase-Inhibitoren

Ein weiterer Ansatz, die biologische Halbwertszeit der Natriuretischen Peptide zu erhöhen, besteht in der Hemmung ihrer Abbauwege, z. B. durch die Entwicklung von NEP-Inhibitoren und den sogenannten Vasopeptidase-Inhibitoren. Dies ist auch deshalb von Vorteil, weil es sich hier nicht um peptidische Wirkstoffe handelt und dadurch auch eine orale Gabe erfolgen kann.

#### NEP-Inhibitoren

Der am besten klinisch untersuchte NEP-Hemmer ist Candoxatril (UK-69578, Pfizer, USA). Die Gabe von Candoxatril führt zu einem Anstieg der ANP-Plasmaspiegel und auch zu einer vermehrten Diurese. Jedoch führt das nicht zu einer relevanten Blutdrucksenkung [5, 68]. Diese unzureichende Wirkung kann darauf zurückgeführt werden, dass durch die NEP-Hemmung das RAAS kompensatorisch hochreguliert wird. Eine andere Erklärung bietet das breite Substratspektrum der NEP. Zu den NEP-Substraten gehören nicht nur vasodilatorische Peptide wie ANP, CNP, Bradykinin oder auch Adrenomedullin, sondern auch vasokonstriktorische Peptide wie Angiotensin II und Endothelin-1 (siehe Abb. 1.6). Deren Plasmakonzentration kann durch eine NEP-Hemmung folglich ansteigen. Der Effekt auf den Blutkreislauf ist demnach abhängig vom Verhältnis der vasoaktiven NEP-Substrate [24, 78].

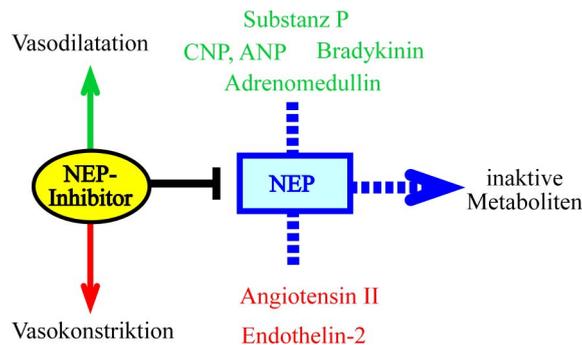


Abbildung 1.6.: NEP inaktiviert sowohl vasodilatierende (grün) als auch vasokonstriktorische (rot) Peptide. Die resultierende Wirkung eines NEP-Inhibitors auf den Gefäßtonus hängt vom Verhältnis der lokalen Konzentrationen dieser vasoaktiven NEP-Substrate ab.

### Vasopeptidase-Inhibitoren

Durch die strukturelle Ähnlichkeit der katalytischen Zentren von NEP und des *Angiotensin-Converting Enzyme* (ACE) bestand die Möglichkeit, Substanzen zu entwickeln, die sowohl NEP als auch ACE hemmen. Für diese dualen Inhibitoren wurde der Begriff „Vasopeptidase-Inhibitor“ eingeführt [80]. Durch den Eingriff in zwei vasoaktive Systeme (RAAS und Natriuretische Peptide) versprach man sich eine den ACE-Hemmern überlegene Wirkung. Zum einen wird durch die NEP-Hemmung die Wirkung des vasodilatierenden ANP potenziert, während gleichzeitig durch die ACE-Hemmung die Produktion des vasokonstriktorischen Angiotensin II und der Abbau des vasodilatatorischen Bradykinins unterbrochen wird. Zu den Vasopeptidase-Inhibitoren, die schon in Phase-II-Studien getestet wurden, gehören Omapatrilat (Vanlev<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb, USA), Fasidotrilat (BP1137, Lilly, UK) und Sampsatrilat (UK81252, Pfizer und Shire, UK). Zum Omapatrilat gibt es eine Reihe von klinischen Studien, deren Ergebnisse hinsichtlich einer Behandlung von Hypertonie (Studien OPERA [50] und OCTAVE [51]) und Herzinsuffizienz (Studien IMPRESS [82] und OVERTURE [73]) vielversprechend waren. In der OCTAVE-Studie mit 25000 Bluthochdruck-Patienten (**O**mapatrilat **C**ardiovascular **T**reatment **A**ssessment versus **E**nalapril) [51] konnte eine dem ACE-Hemmer Enalapril überlegene Blutdrucksenkung besonders im systolischen Bereich beobachtet werden. Diese Studie sollte jedoch auch die Verträglichkeit von Omapatrilat bewerten. Auffallend war hier eine höhere Inzidenz für das Auftreten von Angioödemem [16,74]. Dies stellte

die Sicherheit der Vasopeptidase-Hemmer in Frage, so dass bis heute keine Zulassung erfolgte. Die Entwicklung von Angioödemen ist als Nebenwirkung einer Therapie mit ACE-Hemmern bekannt. Es handelt sich hierbei um eine akute ödematöse Schwellung von Haut oder Schleimhaut. Diese Nebenwirkung tritt selten auf, kann aber durch eine mögliche Blockierung der Atemwege mitunter lebensbedrohlich sein [12]. Ursache eines ACE-Hemmer-induzierten Angioödems ist die Potenzierung von Bradykinin, welches die Gefäßpermeabilität erhöht, so dass Plasmaflüssigkeit ins umliegende Gewebe eintreten kann. Da auch NEP am Katabolismus des Bradykinins beteiligt ist, steigen bei einer gekoppelten Hemmung von ACE und NEP die Bradykinin-Spiegel noch mehr an als bei alleiniger ACE-Inhibition. Dadurch steigt auch das Angioödem-Risiko.

### **1.3.3. Einsatz in der Diagnostik**

Bei einer eingeschränkten linksventrikulären Pumpfunktion ist besonders BNP kompensatorisch hochreguliert. BNP dient deshalb als wertvoller Marker für die Diagnose einer Herzinsuffizienz. Bereits bei einer Herzinsuffizienz der Stufe I (keine Beschwerden bei normaler körperlicher Belastung, Klassifikation der New York Heart Association – NYHA) ist die BNP-Plasmakonzentration erhöht und steigt mit zunehmendem Schweregrad progressiv an. Dadurch wird BNP als Marker auch zur Prognose bei bereits diagnostizierter Herzinsuffizienz und zur Therapie-Überwachung eingesetzt [57]. Oft wird aufgrund der längeren Halbwertszeit das NT-proBNP (Halbwertszeit 60–120 min; zum Vergleich BNP: 20 min) gemessen. NT-proBNP ist auch *in vitro* stabiler. Für die Bestimmung der BNP- bzw. NT-proBNP-Konzentrationen im Plasma befinden sich eine Reihe von Immunoassays auf dem Markt.

## **1.4. Ziel der Arbeit**

Während in der Fachliteratur ein Einfluss der NEP auf den ANP-Abbau als sicher gilt, sind die Ergebnisse in Hinblick auf das BNP widersprüchlich. Die in der Literatur aufgefundenen Differenzen beim Katabolismus der Natriuretischen Peptide verwundern, da eine weitgehende Strukturverwandtschaft zwischen diesen Peptiden

besteht. Da aber gerade die Steigerung der BNP-Konzentration durch die zusätzliche antifibrotische Wirkung als vorteilhaft bei Herzinsuffizienz erscheint, lohnt es sich, die Bedeutung der NEP auf den BNP-Metabolismus näher zu untersuchen und weitere am Katabolismus des BNP und möglicherweise auch anderer Natriuretischer Peptide beteiligte Peptidasen nachzuweisen. Die Hemmung dieser Peptidasen könnte zudem neue Wege für die Therapie der chronischen Herzinsuffizienz eröffnen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Differenzen im Katabolismus der Natriuretischen Peptide zu erkennen und neben der NEP weitere Enzyme zu beschreiben, die in der Lage sind, Natriuretische Peptide, insbesondere BNP, abzubauen. Außerdem sollte herausgefunden werden, ob und inwieweit BNP beim Abbau durch die NEP eine Sonderstellung einnimmt und welche molekularen Voraussetzungen für den unterschiedlichen Abbau der Natriuretischen Peptide ursächlich sind. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich dabei auf die Hauptabbauorgane Niere und Lunge. Die meisten Experimente wurden mit murinen Membranen und Enzymen durchgeführt, da hier verschiedene geeignete Tiermodelle zur Verfügung standen und dadurch die Möglichkeit bestand, unter weitgehend standardisierten Bedingungen zu arbeiten.

## 2. Ergebnisse und Diskussion

### 2.1. ANP- und BNP-Abbau mit Maus-Membranpräparationen

Um die Bedeutung der Neutralen Peptidase (NEP) für den Abbau Natriuretischer Peptide zu charakterisieren, bot sich als geeignete Methode der vergleichende Abbau an Membranpräparationen von NEP-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen an. Entsprechende Tiere mit gleichem genetischen Hintergrund (C57BL/6) standen dem FMP durch eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe Saria/Zernig (Institut für Experimentelle Psychiatrie, Medizinische Universität Innsbruck, Österreich) zur Verfügung. Um innerhalb einer Spezies zu bleiben, wurden für diese initialen Versuche ANP und BNP der Maus (im Folgenden mANP und mBNP) verwendet. Die Inkubationen erfolgten in Gegenwart des Aminopeptidase-Inhibitors Bestatin und des ACE-Inhibitors Lisinopril mit Membranpräparationen von Niere, Lunge, Hirn und Herz. Die Wiederfindung der Natriuretischen Peptide wurde über 60 Minuten mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) verfolgt. Der NEP-unabhängige Abbau der Peptide wurde zusätzlich in Gegenwart des selektiven NEP-Inhibitors Candoxatrilat (UK-73967, Pfizer, USA) untersucht. Das Candoxatrilat ist die aktive Form des NEP-Hemmers Candoxatril (UK-69578, Pfizer, USA). Die Verbindung wurde durch Dr. Berghoff (Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Die Versuche mit murinen Wildtyp-Membranen ergaben einen gewebeabhängigen Abbau von mANP. Nach 60 min wurde mANP von der Nierenmembran vollständig inaktiviert. Auch von der Lungenmembran wurde mANP fast komplett abgebaut. Bei

## mANP-Abbau in Mausorganen

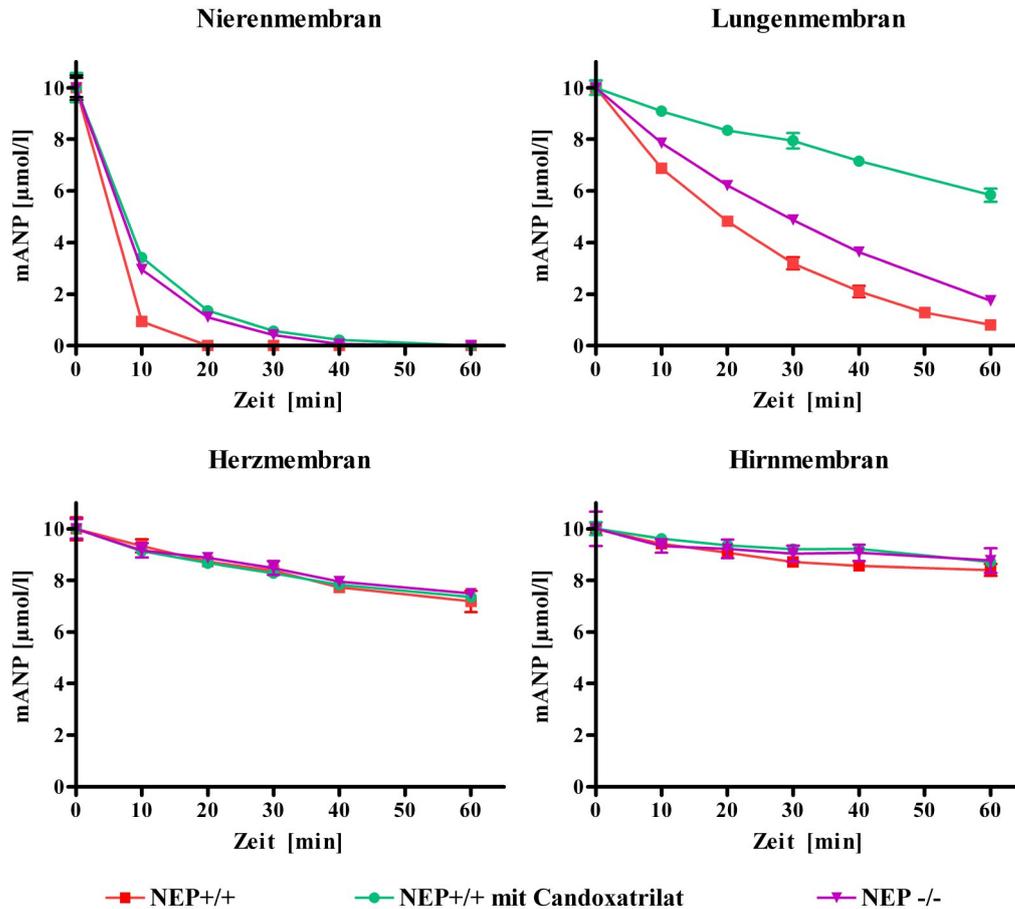


Abbildung 2.1.: zeitabhängiger Abbau von  $10 \mu\text{mol/l}$  mANP durch Mausorganpräparationen, Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=3$ , NEP+/+: wildtypisch, NEP-/-: NEP-defizient

der Herzmembran war der Abbau deutlich langsamer und in Hirnmembranen kaum noch messbar (siehe Abb. 2.1). Die Hemmung der NEP durch Candoxatrilat konnte den Abbau in den NEP-reichen (vergleiche Abb. 2.3) Nieren- und Lungenmembranen verzögern. Erwartungsgemäß sind die Abbau-Kurven der NEP-defizienten Gewebe von Niere, Herz und Hirn vergleichbar mit den NEP-inhibierten Wildtyp-Membranen. Von Lungenmembranen der NEP-Knockout-Tiere wurde mANP jedoch unerwartet schneller abgebaut als in den Candoxatrilat-behandelten Wildtyp-Membranen. Dies ist nur durch eine gegenregulatorische Aktivierung anderer mANP-abbauender Peptidasen im Lungengewebe der NEP-defizienten Mäuse erklärbar.

Die Abbaugeschwindigkeit von mBNP in den verschiedenen Geweben ist mit mANP

## mBNP-Abbau in Mausorganen

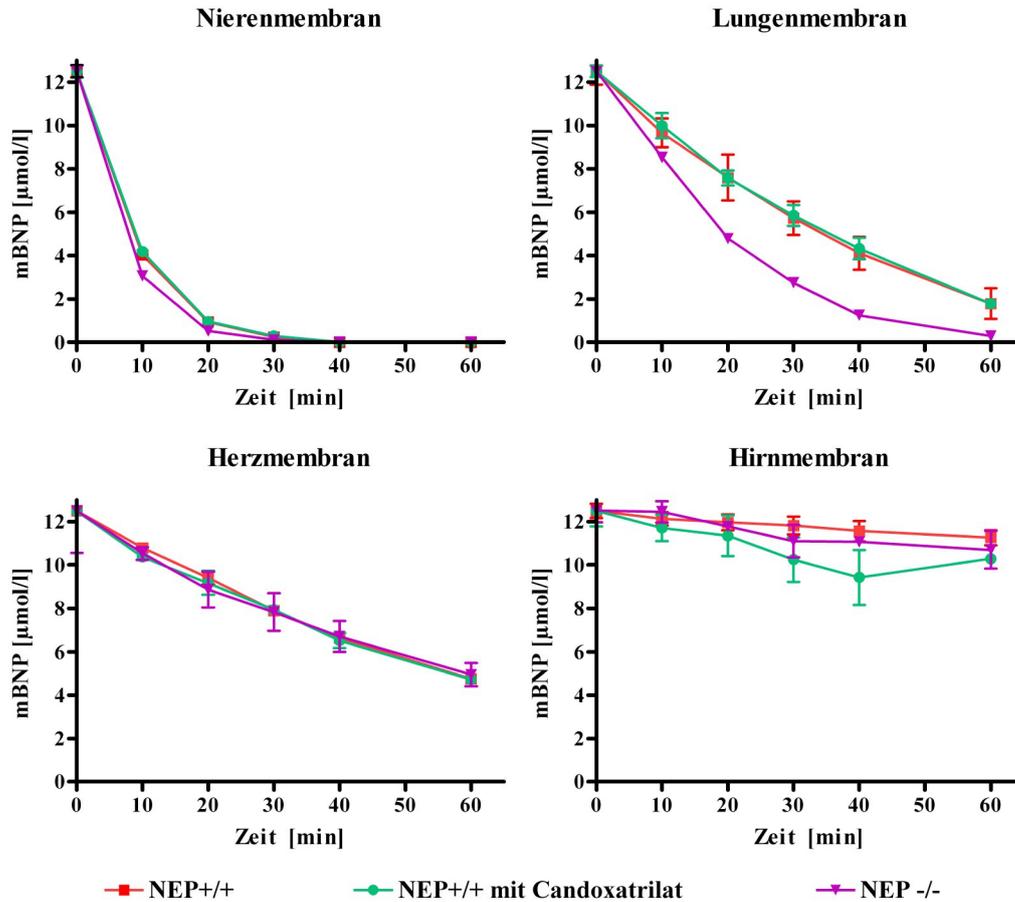


Abbildung 2.2.: zeitabhängiger Abbau von  $12,5 \mu\text{mol/l}$  mBNP durch Mausorganpräparationen, Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=3$ , NEP+/+: wildtypisch, NEP-/-: NEP-defizient

vergleichbar, doch weder Candoxatrilat noch die genetische NEP-Defizienz konnten diesen Katabolismus beeinflussen (siehe Abb. 2.2). Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse von Smith et al. [91], dass BNP primär nicht von der NEP gespalten wird.

Genauso wie beim mANP wurde mBNP in der NEP-defizienten Lungenmembran schneller abgebaut als in der Wildtyp-Membran. An der Inaktivierung dieser beiden Natriuretischen Peptide müssen also neben der NEP noch ein oder mehrere bisher unbekannte Enzyme beteiligt sein, die im Lungengewebe der NEP-defizienten Tiere kompensatorisch hochreguliert sind und so zu Abbaugeschwindigkeiten führen, die sogar über denen der wildtypischen Membranen liegen. Bei diesen Enzymen handelt es sich nicht um ACE und nicht um Aminopeptidasen, da Hemmversuche mit

Lisinopril und/oder Bestatin den Abbau beider Natriuretischen Peptide nicht merklich veränderten.

Eine zusätzliche Bestätigung für die Beteiligung weiterer Peptidasen am Abbau Natriuretischer Peptide ergab sich aus der Messung der NEP-Aktivität in den verschiedenen Membranpräparationen (Methode nach Winkler et al. [110] mit DALEK als Substrat, siehe Kapitel 3.5). Die Abbauraten der Natriuretischen Peptide und die NEP-Aktivität in den Membranpräparationen korrelieren nicht miteinander. Wie Abbildung 2.3 zeigt, war die NEP-Aktivität in der Lunge mehr als doppelt so hoch wie die der Niere; im Herz- und Hirngewebe war die Aktivität vergleichbar niedrig. Der schnellste Abbau erfolgte jedoch nicht in den Lungen- sondern in den Nierenmembranen, und der Abbau in Hirn- und Herzmembranen unterscheidet sich trotz vergleichbarer NEP-Aktivität. Die unterschiedlichen Abbauraten in den verschiedenen Geweben lassen sich also nicht allein auf die den Geweben zugrundeliegende NEP-Aktivität zurückführen.

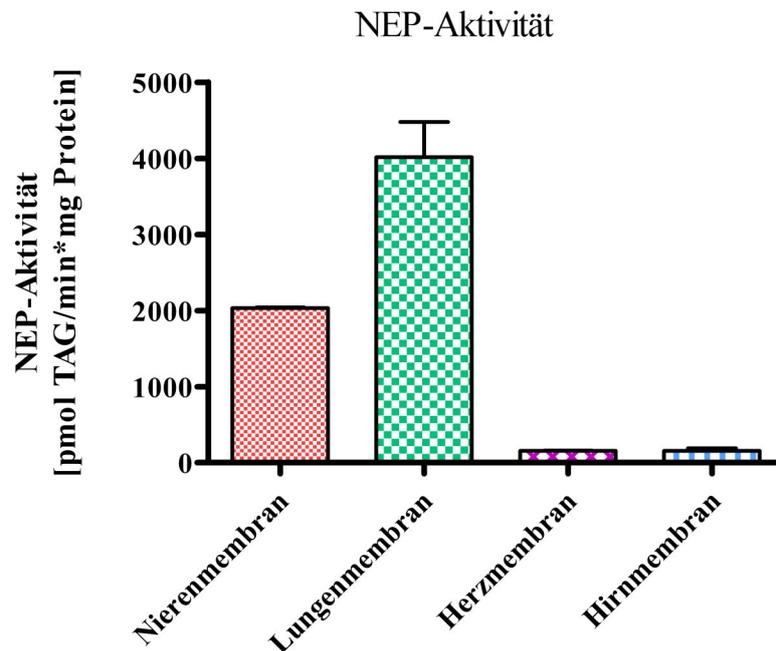


Abbildung 2.3.: NEP-Aktivität der für die Abbaustudien mit *mANP* und *mBNP* verwendeten Membranpräparationen (nur Wildtyp), Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=3$

Aus diesem initialen Abbau-Experiment ergaben sich zwei Fragestellungen:

1. Warum wird BNP nicht von der NEP abgebaut bzw. welche strukturellen Voraussetzungen bestimmen die Geschwindigkeit des Natriuretischen-Peptid-Abbaus durch die NEP?
2. Welche Peptidase(n) sind noch am Katabolismus Natriuretischer Peptide beteiligt?

## 2.2. Natriuretische Peptide und NEP

### 2.2.1. Abbau Natriuretischer Peptide durch rekombinante Maus-NEP

Um die Ursachen für den unterschiedlichen Abbau von mANP und mBNP durch die NEP zu finden, wurde zunächst eine größere Anzahl Natriuretischer Peptide strukturell und hinsichtlich ihres Abbaus durch rekombinante NEP der Maus verglichen. Wie in Abbildung 2.4 zu sehen ist, sind diese Natriuretischen Peptide innerhalb der durch die Disulfidbrücke geformten Ringstruktur sehr ähnlich. Dennoch gibt es in allen Teilen der Peptide Modifizierungen, wodurch es möglich schien, die strukturellen Voraussetzungen für einen schnellen bzw. langsamen Abbau einzugrenzen.

Die auffälligste Beobachtung beim Abbau dieser Peptide durch die NEP war, dass die Abbaugeschwindigkeit deutlich von der Länge der N- und C-terminalen Ketten außerhalb des Peptidrings abhängt (vergleiche Abb. 2.4 und Abb. 2.5). CNP ist das kürzeste endogene Natriuretische Peptid; es besitzt keinen C-terminalen Rest und ist mit nur 5 Aminosäuren im N-terminalen Rest das beste Substrat für die NEP. DNP mit einem kurzen N-Terminus aber sehr langen C-Terminus wurde unter den gewählten Bedingungen nicht abgebaut. Beim Vergleich von humanem ANP (hANP) mit seinem um 4 Aminosäuren am N-Terminus verlängerten Analogon Urodilatin wird die Bedeutung der Kettenlängen ebenfalls ersichtlich, denn das kürzere hANP wird deutlich schneller abgebaut als Urodilatin. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von Gagelmann et al. [34] und Kenny et al. [46] überein, die auch über einen verzögerten Abbau von Urodilatin berichteten.



Bemerkenswert ist, dass hBNP genauso wie DNP resistent gegenüber der NEP ist. Zwar hat hBNP verglichen mit hANP einen verlängerten N-Terminus, jedoch werden BNP anderer Spezies wie mBNP und pBNP bei gleicher Länge von der NEP abgebaut, wenn auch mit sehr geringer Geschwindigkeit. Die Länge der Peptidkette kann also nicht das einzige Kriterium für die Abbaubarkeit der Natriuretischen Peptide durch die NEP sein. Auch mANP wird langsamer als hANP abgebaut, obwohl beide Peptide die gleiche Kettenlänge haben und sich nur in einer Aminosäure an Position 6' im Ring unterscheiden.

### **2.2.2. Modell für die Interaktion von NEP und den Natriuretischen Peptiden**

Basierend auf der bekannten dreidimensionalen Röntgen-Struktur des Enzyms NEP [69, 70] und der ebenfalls bekannten 3D-Ringstruktur der Natriuretischen Peptide [18, 31, 38] sind in Kooperation mit Dr. Gerd Krause (Abt. Structural Bioinformatics, FMP, Berlin) Docking-Studien für diverse Natriuretische Peptide am katalytischen Zentrum des Enzyms NEP durchgeführt worden. Auf der Basis dieser Studien konnte schließlich ein Modell für die Peptid-Enzym-Interaktion erstellt werden (Abb. 2.7).

Nach diesem Modell windet sich das Natriuretische Peptid durch eine schmale Öffnung zwischen der katalytische Domäne und der kleineren N-terminalen Domäne in die katalytische Tasche von NEP (violett) (Abb. 2.7, Insert I). Komplementäre Erkennungsmotive (NEP: grün; Natriuretisches Peptid: orange) unterstützen die Orientierung der Ringstruktur innerhalb der NEP-Tasche. Beim NEP sind das die Aminosäuren Arginin an Position 222 (R222) und/oder Asparaginsäure an Position 372 (D372), die sich gegenüber des katalytischen Zentrums befinden (Abb. 2.6). Die komplementären Bindungspartner beim Natriuretischen Peptid sind die Aminosäuren Asparaginsäure an Position 7 im Ring (D7') und Arginin an Position 8 im Ring (R8'), ein Motiv, das in allen Natriuretischen Peptiden konserviert ist (siehe Abb. 2.4). Da sich die Hauptspaltstelle im Natriuretischen Peptid zwischen Cystein C1' und Phenylalanin F2' (rote Linie) direkt neben der Disulfidbrücke befindet, muss sich das Peptid folglich innerhalb der NEP-Tasche drehen, um das aktive Zentrum der

NEP (hellblaue, gestrichelte Linie) zu erreichen (Abb. 2.7, Insert II). Ein fehlender C-terminaler Rest wie beim CNP und/oder ein kurzer N-terminaler Rest (ANP, CNP) hinter bzw. vor der Ringstruktur begünstigen die Ausrichtung innerhalb der NEP-Tasche. Längere N- und/oder C-terminale Reste wie bei allen BNPs sowie beim DNP behindern die Drehung zum katalytischen Zentrum; es kommt zu sterischen Kollisionen an der Öffnung der katalytischen Tasche. Zudem können Sequenzunterschiede in kritischen Regionen innerhalb der Ringstruktur des Natriuretischen Peptids die Orientierung behindern und damit die Affinität des Peptids zu den komplementären Erkennungsmotiven verringern.

Die homologen Regionen innerhalb der Ringstruktur der Natriuretischen Peptide beeinflussen demnach sowohl die biologische Funktion als auch den enzymatischen Abbau der Peptide. Die wichtigste Region für die optimale Ausrichtung des Natriuretischen Peptids in der katalytischen Tasche der NEP ist nach unserem Modell das hoch konservierte Asparaginsäure-Arginin-Motiv an den Position 7' und 8' (D7'R8'). Als potentielle Interaktionspartner im NEP-Molekül kommen z. B. Arginin an Position 222 (R222) und Asparaginsäure an Position 372 (D372) in Frage. Diese Vermutung liegt nahe, da auch die konformative Bindung der Natriuretischen Peptide an die Natriuretischen-Peptid-Rezeptoren [Protein Data Bank (PDB): 1YKO, 1ANP, 1YK1, 1JDP] Arginin-Positionen am Rezeptor voraussetzt, welche mit dem gleichen D7'R8'-Motiv wechselwirken. Es ist also gut vorstellbar, dass Aminosäuren in Nachbarpositionen zum D7'R8'-Motiv diese Wechselwirkungen durch sterische Effekte beeinflussen.

Zwei Beispiele aus dem im Kapitel 2.2.1 beschriebenen Abbau-Experiment können das verdeutlichen: So unterscheiden sich z. B. hANP und mANP nur in einer Aminosäure, hANP wird jedoch deutlich schneller durch die NEP abgebaut. Anstelle des Methionins (M6') im hANP, ist beim mANP Isoleucin (I6') an Position 6' im Ring. Die Seitenkette an Position 6' orientiert sich zum hoch konservierten Isoleucin an Position 9' (I9') und bildet einen hydrophoben Kern im Zentrum der Ringstruktur. Die verzweigt-kettige Seitenkette im Isoleucin an Position 6' beim mANP ist weniger flexibel und noch hydrophober als beim Methionin und scheint die Ring-Konformation

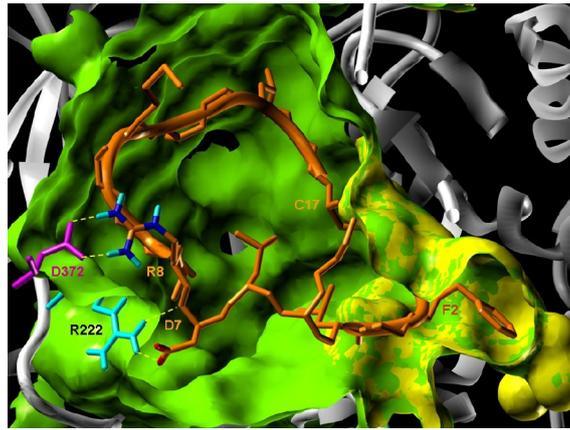


Abbildung 2.6.: Modell für die Interaktion zwischen Natriuretischem Peptid und der NEP: Vergrößerung der katalytischen Tasche; CNP (orange), NEP (weiß), Oberfläche des aktiven Zentrums (gelb); vermutete Bindungsstellen R222 und D372 bei der NEP als komplementäre Interaktionspartner für die Positionen D7' und R8' im Natriuretischen Peptid

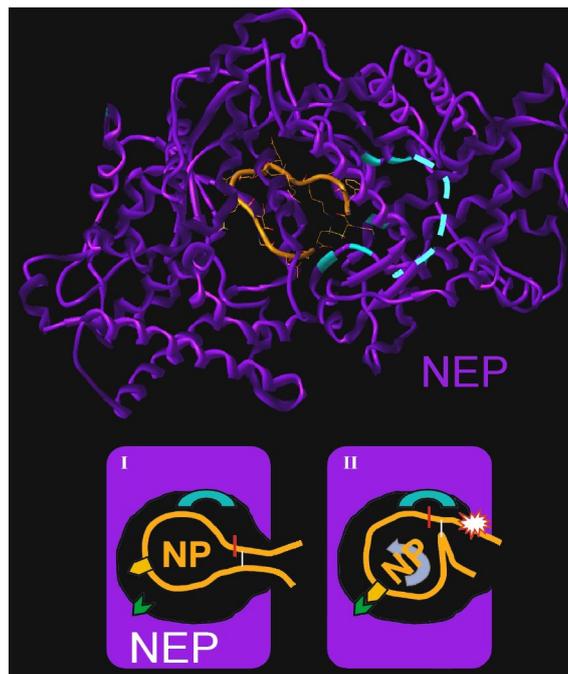


Abbildung 2.7.: Modell für die Interaktion zwischen Natriuretischem Peptid (NP, hier exemplarisch die Ringstruktur des CNP) und der NEP: Das NP (orange) gelangt durch eine schmale Öffnung in die katalytische Tasche der NEP (violett) und richtet die initiale Spaltstelle (rot) anhand komplementärer Erkennungsmotive (NEP – grün, NP – orange) zum aktiven Zentrum (hellblau) aus. Lange N- oder C-terminale Reste führen zu sterischen Kollisionen an der Öffnung. Sequenzänderungen am Erkennungsmotiv können die Ausrichtung des Peptids stören.

zu verändern und die Abbaubarkeit durch die NEP zu verringern.

Die Position 12' im Ring weist die höchste Variabilität unter allen untersuchten Peptiden auf. Die Seitenkette dieser Aminosäure orientiert sich in Richtung der katalytischen Tasche. Obwohl Aal-ANP (eANP) sogar kürzer ist als mANP und hANP, wird es vergleichsweise langsam durch die NEP abgebaut. Dies kann durch das Tyrosin an Position 12' (Y12') erklärt werden, welches nur beim eANP an dieser Stelle vorkommt. Die aromatische Seitenkette des Tyrosins nimmt im Vergleich zu Glutamin (Q) bei mANP und hANP mehr Raum ein und hindert eANP vermutlich an der korrekten Orientierung.

### **2.2.3. Überprüfung des Modells mit trunkierten Natriuretischen Peptiden**

Zur experimentellen Überprüfung des Modells wurde NEP mit weiteren nach eigenen Vorgaben synthetisierten Natriuretischen Peptiden inkubiert, die anhand des Modells ausgehend von hBNP entwickelt wurden (Abb. 2.8).

Zunächst wurde überprüft, ob kürzere N- oder C-terminalen Reste den Abbau des hBNP durch die NEP verändern. Dazu wurden gezielt hBNP-Varianten synthetisiert, bei denen entweder der N-Terminus (hBNP9–32), der C-Terminus (hBNP1–26) oder beide Enden (hBNP9–26) verkürzt sind (Peptidsynthese durch Dr. Rudolf Dölling, Biosyntan, Berlin). Untersucht wurde auch der Abbau von hBNP3–32, einem hBNP-Spaltprodukt, das durch Einwirkung der Dipeptidylpeptidase IV (DPP4) entsteht und im menschlichen Plasma nachgewiesen wurde [14, 88]. Wie in Abbildung 2.8 A zu sehen ist, wurden alle verkürzten hBNPs durch die NEP abgebaut. Je kürzer der N-terminale Rest war, desto besser wurde das Peptid abgebaut, wie im Vergleich von hBNP3–32 und hBNP9–32 deutlich wird. Jedoch veränderte die Verkürzung des N-terminalen Endes den Abbau nur geringfügig, während das Fehlen des C-terminalen Endes (hBNP1–26) die Abbaugeschwindigkeit verdoppelte. Das beste Substrat in diesem Experiment war hBNP9–26, bei dem beide Enden fehlten. Dieses Ergebnis korrespondiert mit den Voraussagen des in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Modells.

## Überprüfung des Modells mit modifizierten Peptiden

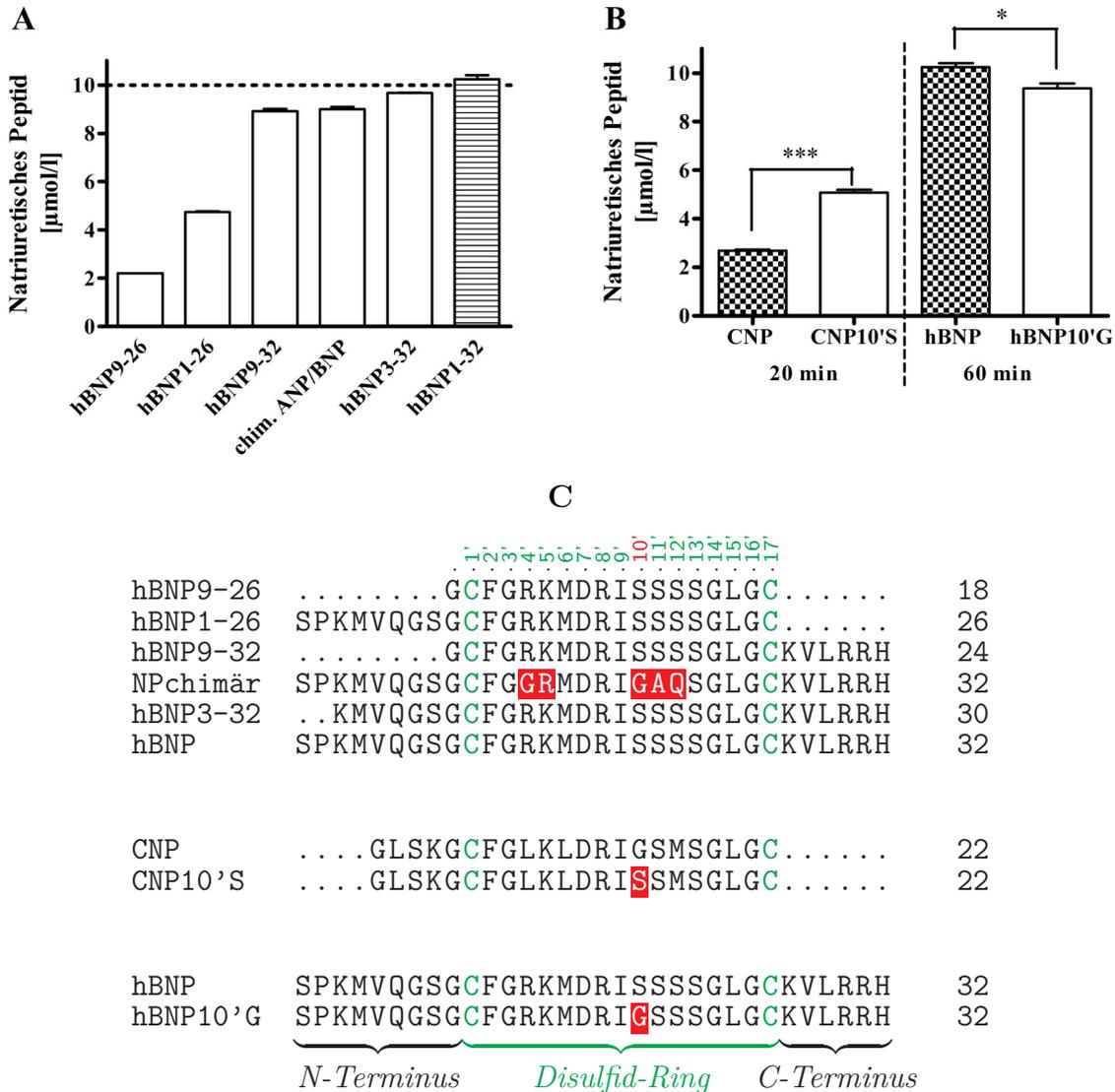


Abbildung 2.8.: **(A)** Vergleichender Abbau trunkierter/modifizierter hBNPs (weiße Säulen) mit hBNP (schraffierte Säule) durch die NEP; verbleibende Peptidkonzentration nach 20 min Inkubation von 10 µmol/l Peptid mit NEP ( $n=3$ , Mittelwert  $\pm$  SD). Die Verkürzung der Peptidketten außerhalb der Ringstruktur sowie eine Sequenzänderung innerhalb der Ringstruktur verbessern den Abbau durch die NEP. **(B)** Veränderte 10'-Position; verbleibende Peptidkonzentration nach 20 min (CNP) bzw. 60 min (hBNP) Inkubation von 10 µmol/l Peptid mit NEP ( $n=3$ , Mittelwert  $\pm$  SD). Der Austausch von Glycin gegen Serin im CNP verschlechtert den Abbau ( $p<0,001$ ), der Austausch von Serin gegen Glycin im hBNP verbessert den Abbau durch die NEP ( $p<0,02$ ) ( $n=3$ , Mittelwert  $\pm$  SD). **(C)** Sequenzen der untersuchten Peptide; Sequenzmodifizierungen sind rot unterlegt.

## 2.2.4. Überprüfung des Modells mit in der Ringstruktur modifizierten Natriuretischen Peptiden

Um auch den Einfluss der Ringstruktur zu ermitteln, wurde zudem ein chimäres Peptid (NPchimär) synthetisiert und getestet, welches die Ringstruktur des guten NEP-Substrats hANP hat, jedoch in den N- und C-terminalen Resten außerhalb des Rings die Sequenz von hBNP aufweist. Obwohl NPchimär in den N- und C-terminalen Enden mit dem NEP-resistenten hBNP identisch ist, konnte dieses Peptid von der NEP, wenn auch langsam, abgebaut werden. Das beweist, dass neben der Länge der Peptidketten außerhalb der Ringstruktur auch die Sequenz innerhalb des Rings für die Zugänglichkeit des Peptids zum katalytischen Zentrum der NEP und damit für die Abbaubarkeit durch die NEP entscheidend ist.

Die Ringstruktur von hANP und hBNP unterscheidet sich in 5 Aminosäuren. Serin an Position 10' im hBNP-Ring scheint dabei eine besondere Bedeutung zu haben, denn es kommt nur im hBNP an dieser Stelle vor. Alle untersuchten Natriuretische Peptide, die nicht NEP-resistent sind, haben an dieser Position das kleinere Glycin. Dieser Sequenzunterschied könnte eine Rolle für die konformative Orientierung spielen und damit eine Ursache für die NEP-Resistenz des hBNP sein. Um dies zu untersuchen, wurden daher für ein weiteres Experiment zwei Peptide synthetisiert (Biosyntan, Berlin), bei denen diese Position jeweils vertauscht wurde: zum einen ein CNP, bei dem das Glycin an 10'-Position durch Serin ersetzt wurde (CNP10'S) und zum anderen ein hBNP, das statt Serin an der 10'-Position Glycin aufweist. Diese Modifizierung an 10'-Position sollte den CNP-Abbau verlangsamen, aber den hBNP-Abbau beschleunigen.

Beim CNP bewirkte die Sequenzänderung eine deutliche Verschlechterung der Abbaubarkeit durch NEP (siehe Abb. 2.8 B). Jedoch ist auch das modifizierte CNP immer noch ein sehr gutes Substrat für die NEP. Zwischen hBNP und hBNP10'G fiel der Unterschied nicht ganz so deutlich aus. Das hBNP war wie erwartet NEP-resistent, doch auch das hBNP10'G wurde nur sehr langsam abgebaut. Auch nach 60 min Inkubation sind noch 90 % des Peptids hBNP10'G erhalten. Dennoch ist der Unterschied signifikant. Bemerkenswert ist, dass sich durch diese kleine Sequenzände-

rung die NEP-Resistenz des hBNPs aufheben ließ. Serin an Position 10' im Ring ist demnach ein wichtiges Merkmal im hBNP-Molekül, aber nicht allein ursächlich für die schlechte Abbaubarkeit durch NEP.

## **2.3. Experimente zur Ermittlung von weiteren BNP-abbauenden Peptidasen in muriner Nierenmembran**

Wie in Kap. 2.1 gezeigt wurde, wird in Membranpräparationen das mBNP rasch abgebaut. Dieser Abbau konnte jedoch nicht auf NEP zurückgeführt werden, da es keine Differenzen beim mBNP-Abbau in Membranen von Wildtyp- und NEP-Knockout-Mäusen gab. Und auch Candoxatrilat als NEP-Inhibitor konnte den mBNP-Abbau nicht hemmen. Folglich muss es weitere Peptidasen geben, die den Katabolismus von mBNP initiieren.

Da in den Nierenmembranen die höchste mBNP-degradierende Aktivität festgestellt wurde, wurden auch die folgenden Experimente zur Bestimmung mBNP-abbauender Peptidasen mit Nierenmembran durchgeführt. Es wurden Nierenmembranen von NEP-Knockout-Tieren verwendet, um etwaige minimale NEP-Einflüsse sicher ausschließen zu können.

### **2.3.1. Bestimmung der initialen Spaltstelle**

Für eine erste Eingrenzung der in Frage kommenden Peptidase(n), die für den initialen Abbau von mBNP verantwortlich sind, wurde zunächst die Spaltstelle im mBNP untersucht, um aus der katalytischen Aktivität Rückschlüsse auf das spaltende Enzym zu ziehen. Das initiale Abbauprodukt wird im HPLC-Chromatogramm nach 28,3 min eluiert. Es wurde manuell aufgefangen, über MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert und konnte so als mBNP7–32 (Masse 2785,37 mit intakter Disulfidbrücke) identifiziert werden (Abb. 2.9).

Die initiale Spaltung von mBNP erfolgt also zwischen Isoleucin an Position 6 und Histidin an Position 7 in der N-terminalen Peptidkette. Die Ringstruktur bleibt

intakt. Bei dem gesuchten Enzym handelt es sich demnach um eine Endopeptidase (EC 3.4.21. – EC 3.4.24.).

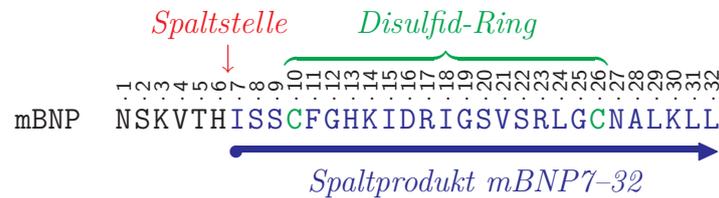


Abbildung 2.9.: *initiale Spaltstelle des mBNP nach Inkubation mit Nierenmembran*

Vorstellbar wäre auch ein sukzessiver Abbau durch Aminopeptidasen. Dieser konnte ausgeschlossen werden, da der Aminopeptidase-Inhibitor Bestatin, der dem Inkubationsansatz beigefügt wurde, keinen hemmenden Einfluss auf den mBNP-Abbau hatte. Auch konnten die möglichen Zwischenprodukte einer stufenweise Abspaltung, wie mBNP2–32 bis zu mBNP6–32 nicht detektiert werden.

Ein Abbau durch Carboxypeptidasen war auch auszuschließen, da die primäre Spaltung endopeptidolytisch in der N-terminalen Peptidkette der zyklischen mBNP-Struktur erfolgte.

### 2.3.2. Einsatz von gruppenspezifischen Enzym-Inhibitoren

Nach Einordnung der entscheidenden Peptidase-Aktivität beim Abbau des mBNP wurden verschiedene gruppenspezifische Enzyminhibitoren getestet, um die in Frage kommende(n) Peptidase(n) mehr eingrenzen zu können.

Diese Inhibitoren stammen aus einem Protease-Inhibitor-Set von Genotech, das 11 einzelne Inhibitorlösungen in hundertfacher Wirkkonzentration enthält (aus schriftlicher Kommunikation mit Genotech):

**Antipain-Dihydrochlorid**  
( $\approx 8\text{--}10\text{ mmol/l}$ )

Inhibitor für  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Endopeptidasen, z. B. Trypsin-ähnliche Proteasen (Trypsin, Papain, Cathepsin B), aber auch Cystinproteasen und die Carboxypeptidase Cathepsin A

<b>Aprotinin</b> ( $\approx$ 25–30 $\mu$ mol/l)	kompetitiver, reversibler Serinproteasen-Inhibitor mit breitem Spektrum, z. B. für Chymotrypsin, Plasmin, Trypsin und Kallikrein
<b>Bestatin</b> ( $\approx$ 12–15 mmol/l)	kompetitiver Aminopeptidase-Inhibitor
<b>Chymostatin</b> ( $\approx$ 8–10 mmol/l)	Inhibitor für Chymotrypsin-artige Serinproteasen und für die meisten Cysteinproteasen
<b>E-64</b> ( $\approx$ 3–5 mmol/l)	irreversibler Cysteinproteasen-Inhibitor
<b>EDTA-Na<sub>2</sub></b> ( $\approx$ 0,5 mol/l)	Chelatbildner, Metalloproteasen-Inhibitor
<b>Leupeptin</b> ( $\approx$ 0,8–1 mmol/l)	kompetitiver Inhibitor von Serin- (Trypsin, Plasmin), Cystein- (Papain, Cathepsin B) und Threoninproteasen
<b>Pepstatin</b> ( $\approx$ 0,1–0,15 mmol/l)	reversibler Aspartatproteasen-Inhibitor, z. B. für Cathepsin D, Renin und Pepsin
<b>AEBSF</b> ( $\approx$ 100 mmol/l)	spezifischer irreversibler Serinproteasen-Inhibitor, z. B. für Chymotrypsin, Kallikrein, Trypsin.
<b>Phosphoramidon</b> ( $\approx$ 0,8–1 mg/ml)	spezifischer, kompetitiver Metalloproteasen-Inhibitor, z. B. für ECE, NEP und Thermolysin
<b>PMSF</b> ( $\approx$ 100–150 mmol/l)	irreversibler Inhibitor der Serinproteasen Trypsin und Chymotrypsin, reversibler Inhibitor der Cysteinprotease Papain

Die mBNP-abbauende Aktivität in der Nierenmembran wurde komplett gehemmt durch den Metallopeptidase-Inhibitor EDTA. Die anderen Inhibitoren übten geringfügige unspezifische Effekte aus. Hervorzuheben ist Chymostatin, das unter diesen übrigen Inhibitoren noch den deutlichsten Effekt erzielte. Auf diese Weise konnte die in Frage kommende Peptidase weiter in die Gruppe der Metalloendopeptidasen (E.C. 3.4.24.) eingegrenzt werden. Beachtenswert hierbei war, dass Phosphoramidon, ein wichtiger Metalloendopeptidase-Inhibitor, z. B. für NEP, das NEP-homologe NEP2 und auch für das *Endothelin-Converting Enzyme* (ECE), keine deutliche Hemmung erzielte.

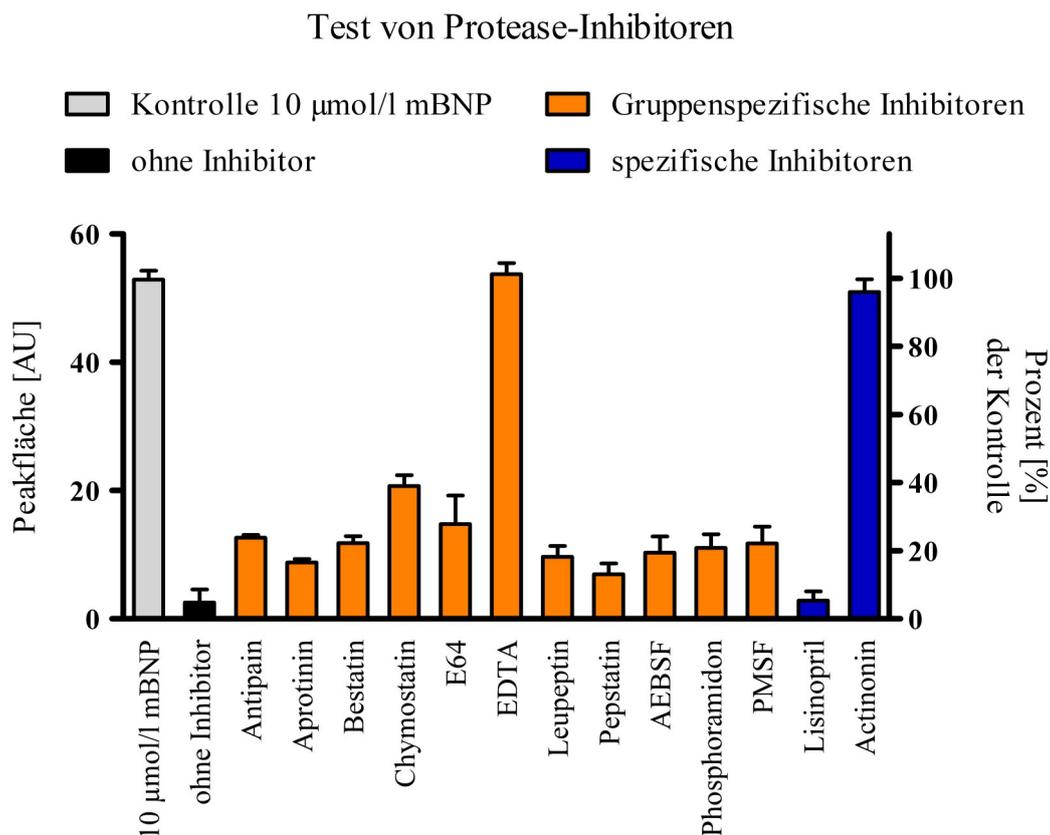


Abbildung 2.10.: Abbau von mBNP durch Nierenmembran von NEP-Knockout-Mäusen in Gegenwart von Peptidase-Inhibitoren; 30 min Inkubation (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=5$ )

### 2.3.3. Einsatz von spezifischen Enzym-Inhibitoren und Identifizierung von Meprin als mBNP-spaltende Peptidase

Im nächsten Schritt wurden nun spezifische Metallopeptidase-Inhibitoren überprüft. Ein Teil der metallopeptidolytischen Aktivität in der Niere ist auf Amino- und Carboxypeptidasen zurückzuführen. Ein sukzessiver Abbau durch Amino- oder Carboxypeptidasen konnte jedoch ausgeschlossen werden, da die initiale Spaltung zwischen Isoleucin(I6) und Histidin(H7) endopeptidolytisch erfolgt (siehe Kapitel 2.3.1). Aufgrund der Phosphoramidon-Insensitivität des mBNP-Abbaus konnten auch die Metallopeptidasen NEP, NEP2 und ECE ausgeschlossen werden. Weitere in der Nierenmembran lokalisierte Metallopeptidasen sind das ACE, eine Dipeptidyl-

carboxypeptidase, die unter bestimmten Bedingungen auch als Endopeptidase wirkt (z. B. bei Substanz P [90] und Amyloid  $\beta$  [42]) und die Enzyme der Meprin-Gruppe. Der hoch spezifische ACE-Inhibitor Lisinopril hatte keinen Effekt auf den mBNP-Abbau (Abb. 2.10). Der Meprin-Inhibitor Actinonin [52] konnte jedoch den Abbau komplett hemmen (Abb. 2.10). So konnte das für den mBNP-Abbau in der Niere verantwortliche Enzym schrittweise als 1. Endopeptidase, 2. eine Phosphoramidon-insensitive Metalloendopeptidase und schließlich 3. als Meprin beschrieben werden. Hinzu kommt, dass das in Abbildung 2.10 gezeigte Hemmprofil Meprin-Eigenschaften widerspiegelt: Kenny et al. [48] berichteten in ihrer Beschreibung der Endopeptidase-2, ein älterer Name für Meprin, dass das Enzym von Phosphoramidon nicht gehemmt wird. Diese Eigenschaft führte prinzipiell zur Entdeckung dieser Peptidase durch Kenny et al., da diese Rest-Aktivität nach Phosphoramidon-Hemmung ein Artefakt bei der NEP-Aktivitätsbestimmung war. Yamaguchi et al. [114] beschrieben, dass die Meprin-Aktivität durch EDTA hemmbar ist, aber auch Chymostatin einen gewissen Hemmeffekt ausübt. Beide Entdeckungen korrespondieren mit den Resultaten aus den mBNP-Abbaustudien mit den gruppenspezifischen Inhibitoren (Kap. 2.3.2).

### Meprin-Proteasen

Die Meprin-Proteasen bestehen aus den evolutionär verwandten Untereinheiten Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  [3] (Abb. 2.11). Jeweils zwei Untereinheiten sind durch eine Disulfidbrücke kovalent verbunden. Meprin- $\alpha$ -Untereinheiten können untereinander auch nicht-kovalente Bindungen eingehen und dadurch große Komplexe bilden. Meprine, die Meprin- $\alpha$ -Untereinheiten enthalten, werden Meprin A (EC 3.4.24.18) genannt. Meprin A kann entweder als Homooligomer (nur  $\alpha$ -Untereinheiten) oder als Heterooligomer (bestehend aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten) vorliegen [3]. Da die Meprin- $\alpha$ -Untereinheit während der Reifung von der Membran gespalten wird, muss membrangebundenes Meprin A auch die Meprin- $\beta$ -Untereinheit enthalten. Meprine, die nur aus Meprin- $\beta$ -Untereinheiten bestehen, werden als Meprin B (EC 3.4.24.63) bezeichnet. Meprine haben ein breites Substratspektrum, das u. a. Peptide des Gastrointestinaltrakts (Cholecystokinin, Gastrin Releasing Peptide), der extrazellulären Matrix (Gelatin, Fibronectin, Kollagen Typ IV) und des Immunsystems (Zytokine)

umfasst. Meprin A und Meprin B unterscheiden sich aber in Hinblick auf ihre bevorzugten Substrateigenschaften. Meprin A spaltet an der C-terminalen Seite von kleinen, ungeladenen oder hydrophoben Aminosäuren. Meprin B bevorzugt saure Aminosäuren an der C-terminalen Seite der Spaltstelle [4, 104].

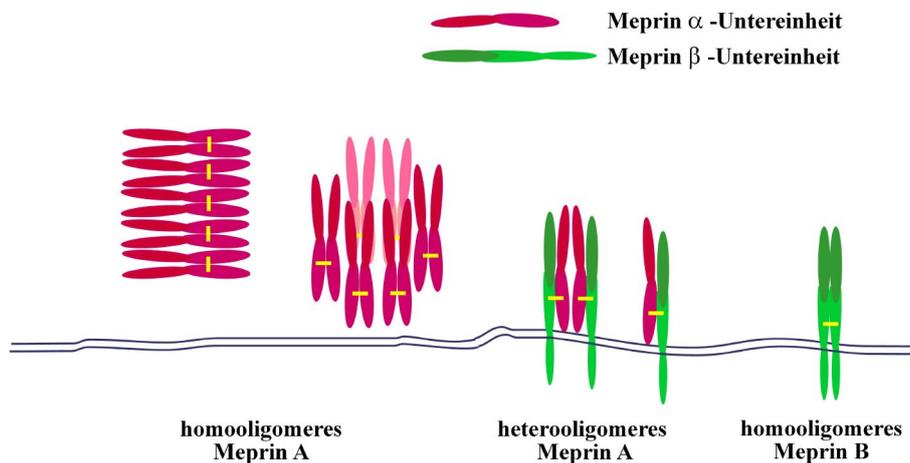


Abbildung 2.11.: Unterteilung der Meprin-Proteasen nach Bertenshaw et al. [3]: Je zwei Meprin-Untereinheiten bilden über eine Disulfidbrücke ein Dimer. Meprin- $\alpha$ -Dimere können untereinander auch nicht-kovalente Bindungen eingehen und dadurch große Komplexe in Form von Ketten, Ringen, Spiralen oder Röhren bilden (homooligomeres Meprin A). Heterooligomeres Meprin A kann als Dimer oder Tetramer vorliegen und ist durch die Meprin- $\beta$ -Untereinheit membranständig. Die nicht-kovalente Bindung im Tetramer erfolgt auch über die Meprin- $\alpha$ -Untereinheit. Meprin B liegt membranständig als Dimer zweier Meprin- $\beta$ -Untereinheiten vor.

### 2.3.4. Verminderter mBNP-Abbau in Nieren von Mausstämmen mit fehlender Meprin- $\alpha$ -Expression

Beynon und Bond [6] und Bond et al. [11] berichteten, dass die Mausstämme C3H/HeN und CBA/J nicht in der Lage sind, Meprin  $\alpha$  zu exprimieren und deshalb keine Meprin-A-Aktivität besitzen. Die Stämme Balb/c und C57BL/6 sind hingegen durch eine normale Meprin- $\alpha$ -Expression charakterisiert [100].

In einem Kontrollexperiment wurde daher der mBNP-Abbau durch Nierenmembranen der Meprin-A-defizienten Mausstämme (C3H/HeN und CBA/J) mit dem Abbau durch Nierenmembranen von Balb/c-Mäusen und C57BL/6 Wildtyp- und NEP-

Knockout-Mäusen verglichen (Abb. 2.12). Der Abbau in den Stämmen C3H/HeN und CBA/J war signifikant verzögert verglichen mit Balb/c and C57BL/6 ( $p < 0,001$ ). Dieses Experiment beweist direkt, dass Meprin A die Peptidase ist, die mBNP in den Nierenmembranen initial abbaut.

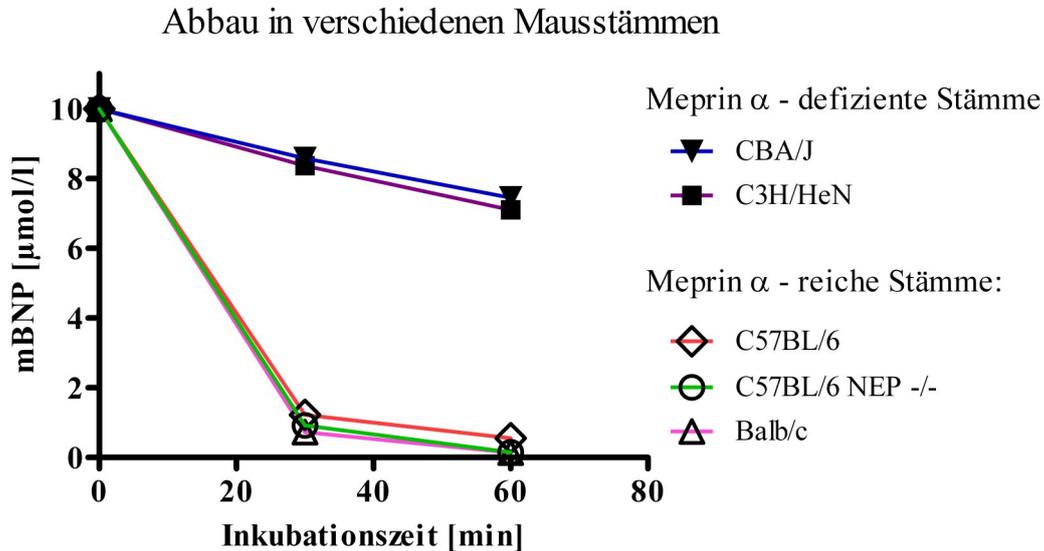


Abbildung 2.12.: Vergleich des mBNP-Abbaus durch Nierenmembranen von Mausstämmen mit hoher (C57BL/6, Balb/c) und defizienter Meprin- $\alpha$ -Expression (C3H/HeN, CBA/J)

### 2.3.5. Abbau von humanen BNP durch Maus-Nierenmembran

Wegen der Bedeutung des humanen BNP (hBNP) insbesondere für spätere klinische Anwendungen wurde auch der Abbau von hBNP durch Nierenmembranen von NEP-defizienten Mäusen untersucht.

Dazu wurde hBNP für 20 min mit den Nierenmembranpräparationen inkubiert. Wie in Abbildung 2.13 (U) zusehen ist, wird hBNP innerhalb der 20 min fast vollständig abgebaut. Im HPLC-Chromatogramm erscheinen parallel zwei Abbauprodukte, die nach manuellem Auffangen und anschließender Massenspektrometrie als hBNP8–32 und hBNP8–30 identifiziert wurden. Das initiale Abbauprodukt ist dabei das hBNP8–32, das aber unmittelbar zu hBNP8–30 umgesetzt wird. Die Spaltung

erfolgt demnach wie beim mBNP im N-terminalen Rest des Peptids (Abb. 2.14).

In Gegenwart des Meprin-Inhibitors Actinonin wurde der hBNP-Abbau unerwartet nicht gehemmt, jedoch erscheint als neues Abbauprodukt hBNP3–32 (Abb. 2.14). Dieses hBNP3–32 wurde bereits von Brandt et al. [14] als ein hBNP-Metabolit im Blutplasma beschrieben und ist auf die enzymatische Einwirkung der Dipeptidylpeptidase IV (DPP4) zurückzuführen.

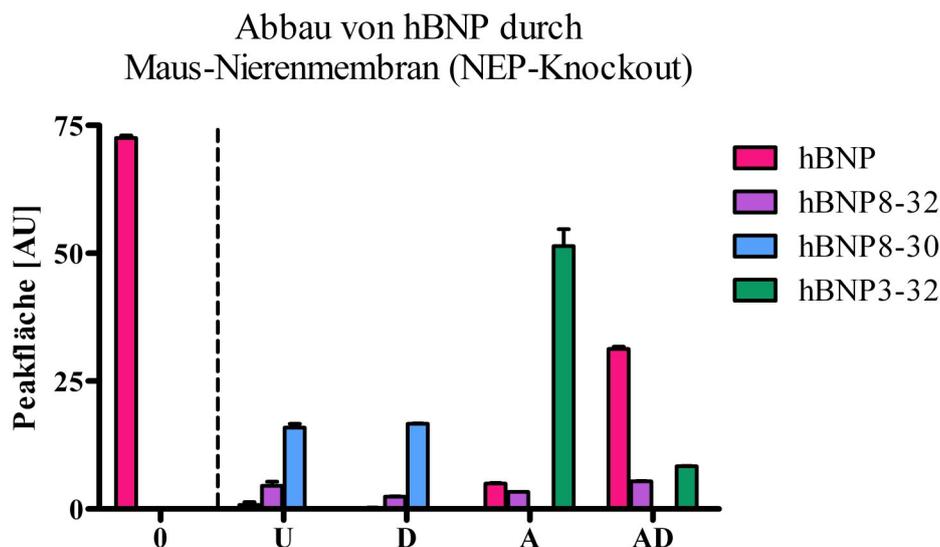
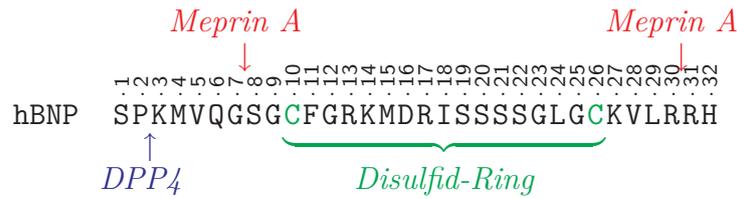


Abbildung 2.13.: Edukte (hBNP) und Spaltprodukte (hBNP3–32, hBNP8–32, hBNP8–30) beim Abbau von hBNP durch Nierenmembran von NEP-Knockout-Mäusen: (0) Startwert hBNP bei 0 min, (U) „ungehemmter“ Abbau (nur Bestatin), Abbau in Gegenwart von Actinonin (A), Diprotin A (D) oder beiden Inhibitoren (AD), Inkubationszeit 20 min (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=3$ )

Meprin ist also in muriner Nierenmembran das vorrangig wirkende Enzym für den hBNP-Abbau, jedoch reicht die Meprin-Hemmung für eine Potenzierung des hBNP nicht aus, weil auch DPP4 hBNP abbauen kann. Erst die Hemmung beider Enzyme durch Actinonin und zusätzlich Diprotin A (als DPP4-Inhibitor) konnte den hBNP-Abbau verzögern. Eine vollständige Hemmung des hBNP-Abbaus ist nicht gelungen, da das als DPP4-Inhibitor eingesetzte Peptid Diprotin A eigentlich auch ein Substrat der DPP4 ist. Es bindet mit hoher Affinität an DPP4, wird aber nur sehr langsam umgesetzt, so dass es eine inhibitorische Wirkung hat [77]. Bei längerer Inkubationszeit verliert es jedoch seine Wirkung, da es selbst abgebaut wird. Diesen Diprotin-A-Abbau konnte man parallel auch via HPLC verfolgen.



Retentionszeit	Gefundene Masse	Berechnete Masse	$\Delta$	Peptid
14,9 min	3462,142	3461,743	0,399	hBNP1–32
13,9 min	3277,716	3277,658	0,058	hBNP3–32
13,3 min	2734,789	2734,374	0,415	hBNP8–32
15,4 min	2441,566	2441,214	0,352	hBNP8–30

Abbildung 2.14.: *hBNP-Spaltstellen durch Meprin A und DPP<sub>4</sub>, ermittelte Massen der Abbauprodukte nach HPLC-Auftrennung (Cysteine in oxidierte Form; [M+H]<sup>+</sup>)*

## 2.4. Abbau Natriuretischer Peptide durch Meprin

Ein direkter Beweis für die Beteiligung von Meprinen am Abbau Natriuretischer Peptide erfolgte durch den Einsatz aufgereinigter Enzyme. Dazu stand zunächst eine Präparation von Meprin A aus Rattennieren zur Verfügung (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland). Spätere Experimente wurden mit rekombinanten humanen und murinen Meprin-Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt.

### 2.4.1. Abbau Natriuretischer Peptide durch Meprin A aus Rattenniere

Für die ersten Versuche zum Abbau Natriuretischer Peptide durch reines Meprin wurde eine Präparation von Meprin A, aufgereinigt aus Rattennieren, verwendet (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland). Das Meprin A in dieser Präparation ist heterooligomer. Das heißt, es besteht sowohl aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten (siehe dazu Abb. 2.11). Neben mBNP wurden auch humanes ANP (hANP) und BNP (hBNP) sowie CNP mit Meprin A inkubiert und der Abbau über 60 min verfolgt (Abb. 2.15 A). Das beste Substrat in diesem Versuch war hBNP, gefolgt von mBNP. Auch hANP

wird von Meprin A abgebaut. CNP hingegen, welches unter den drei Natriuretischen Peptiden das beste Substrat für die NEP ist (siehe Abb. 2.5), ist Meprin-resistent. In Gegenwart des Meprin-Inhibitors Actinonin wurden die Peptide nicht abgebaut.

#### **2.4.2. Abbau von mBNP und verwandten Peptiden durch humanes rekombinantes Meprin $\alpha$ und $\beta$**

Die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Untereinheiten des Meprins weisen trotz der strukturellen Ähnlichkeiten ein unterschiedliches Substratspektrum auf [4]. Um zu ermitteln, auf welche der beiden Meprin-Untereinheiten die BNP-spaltende Aktivität zurückzuführen ist, standen rekombinant hergestellte Untereinheiten von humanen Meprinen zur Verfügung und der Abbau Natriuretischer Peptide konnte für jede Untereinheit getrennt untersucht werden.

Die humane Meprin- $\alpha$ -Untereinheit zeigte ähnliche Eigenschaften wie das Meprin A aus Rattenniere (Kap. 2.4.1). Sowohl mBNP als auch die zusätzlich untersuchten BNPs von Ratte (rBNP) und Schwein (pBNP) wurden durch Meprin  $\alpha$  mit derselben Rate abgebaut (Abb. 2.15 B). Interessant ist, dass auch die beiden höhermolekularen murinen BNP-Formen mBNP45 und rBNP45, die einen um 13 Aminosäuren längeren N-Terminus aufweisen, genauso schnell abgebaut wurden wie die kürzeren Varianten mBNP und rBNP. Anders als bei NEP ist demnach für Meprin  $\alpha$  die Peptidlänge für die Abbaugeschwindigkeit nicht entscheidend. CNP wurde von Meprin  $\alpha$  nicht abgebaut.

Neu ist jedoch, dass das hBNP nur sehr langsam abgebaut wird. Dieses Ergebnis unterscheidet sich deutlich von den vorherigen Ergebnissen. So wurde hBNP von Meprin A der Ratte sehr schnell abgebaut (Kap. 2.4.1) und auch der Abbau von hBNP in den Maus-Nierenmembranpräparationen konnte auf Meprin zurückgeführt werden (Kap. 2.3.5).

Die humane Meprin- $\beta$ -Untereinheit zeigte wenig bis keine Aktivität gegenüber mBNP und hBNP. Nach 2 h Inkubation war für beide BNPs kein merklicher Abbau nachweisbar (Abb. 2.15 C). Die Meprin-Aktivität gegenüber Natriuretischen Peptiden stammt also ausschließlich von der Meprin- $\alpha$ -Untereinheit. Da in den Versuchen zur

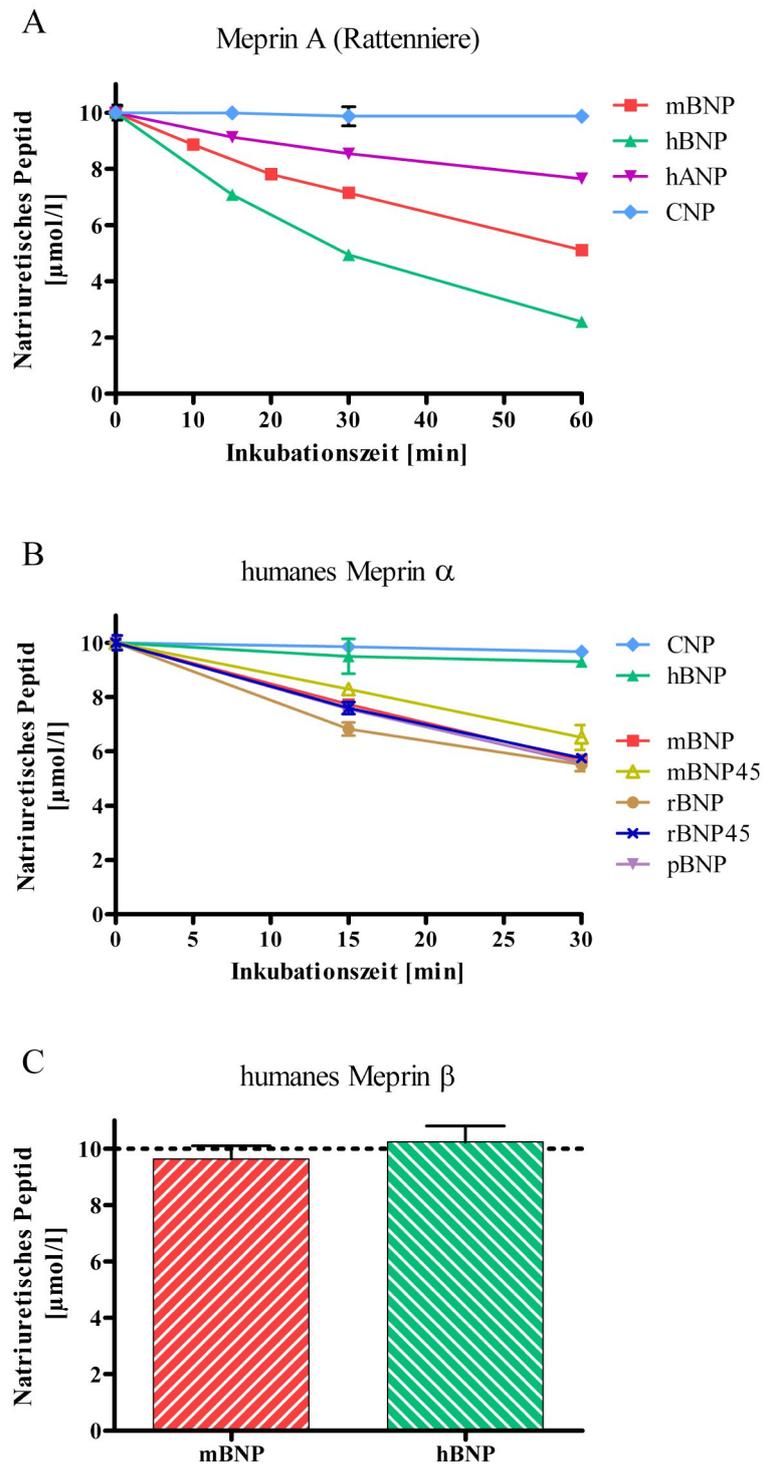


Abbildung 2.15.: Abbau Natriuretischer Peptide ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) durch (A) Meprin A aus Rattenniere und durch (B) rekombinantes humanes Meprin  $\alpha$ ; (C) Wiederfindung von  $10 \mu\text{mol/l}$  mBNP und hBNP nach 120 min Inkubation mit rekombinanten humanen Meprin  $\beta$  (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=3$ )

Ermittlung weiterer BNP-abbauender Peptidasen (Kap. 2.3) mit Membranpräparationen gearbeitet wurde, muss es sich um heterooligomeres Meprin A handeln, da die  $\alpha$ -Untereinheit für die peptidolytische Aktivität und die  $\beta$ -Untereinheit für die Lokalisation in der Membran erforderlich ist (siehe Abb. 2.11).

Dass Meprin A bzw. die  $\alpha$ -Untereinheit am mBNP-Abbau beteiligt ist, wird auch deutlich, wenn man die HPLC-Chromatogramme der mBNP-Metaboliten nach Behandlung mit entweder Meprin  $\alpha$  oder Nierenmembran vergleicht (Abb. 2.16). In beiden Experimenten erscheint ein Hauptabbauprodukt (Peak 2 bei 28,3 min) – das mBNP7–32. Der Meprin-Inhibitor Actinonin hemmte in beiden Versuchen die Bildung dieses Produktes.

In den Versuchen mit pBNP wurde auch ein N-terminal trunkiertes Produkt – pBNP7–32 – als Metabolit entdeckt. Das wurde durch ein Kontrollpeptid mit Hilfe der HPLC bestätigt. Dieses pBNP7–32 ist identisch mit dem sogenannten pBNP26, das von Sudoh et al. im Gehirn vom Schwein entdeckt wurde [94]. Die Hauptabbauprodukte von rBNP und rBNP45 durch Meprin  $\alpha$ , die massenspektrometrisch ermittelt wurden, sind rBNP8–32 (Masse 2783 mit intakter Disulfidbrücke) und rBNP7–32 (Masse 2696 mit intakter Disulfidbrücke). Alle BNP-Spaltstellen sind in Abbildung 2.17 zusammengefasst.

### **2.4.3. Vergleich des hBNP-Abbaus durch humanes und murines Meprin $\alpha$**

Da der in den Kapiteln 2.4.1 und 2.4.2 beschriebene Abbau von hBNP durch Meprin A der Ratte und Meprin  $\alpha$  vom Menschen große Unterschiede aufzeigte, wurde in einem separaten Versuch der hBNP-Abbau durch die  $\alpha$ -Untereinheiten von sowohl humanen als auch murinem Meprin verglichen. Das Maus-Meprin  $\alpha$  war genauso wie das Ratten-Meprin A aus Kapitel 2.4.1 in der Lage, hBNP schnell umzusetzen (Abb. 2.18). Das entstehende Produkt hBNP8–32 reicherte sich ebenso schnell an, wurde aber im weiteren Verlauf weiter umgesetzt. Die finalen Abbauprodukte konnten nicht ermittelt werden.

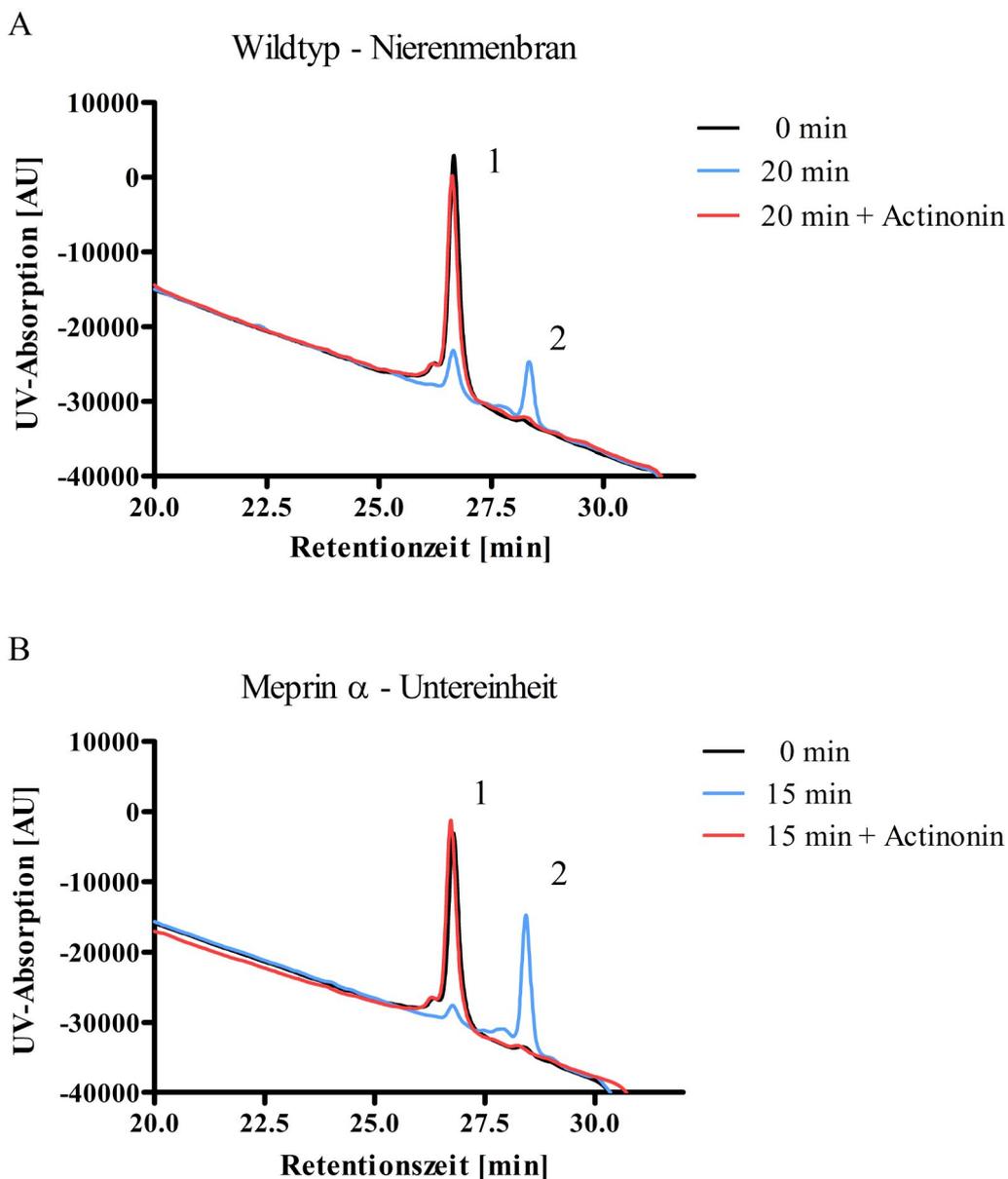


Abbildung 2.16.: Vergleich des *m*BNP-Abbaus durch eine Nierenmembranpräparation wildtypischer Mäuse (A) bzw. durch Meprin  $\alpha$  (B): *m*BNP (Peak 1) wird zu *m*BNP7–32 (Peak 2) abgebaut; der Meprin-Inhibitor Actinonin hemmt diesen Abbau.

Das humane Meprin  $\alpha$  baut hBNP hingegen nur sehr langsam ab. Auch hier entsteht hBNP8–32 (Abb. 2.18). Eine Rolle *in vivo* erscheint durch diese langsame Umsetzung fraglich. Das Überraschende an diesem Ergebnis ist, dass sich hier das gleiche Enzym von zwei unterschiedlichen Spezies funktionell unterscheidet. Sequenzmodifikationen

## Meprin A - Spaltstellen

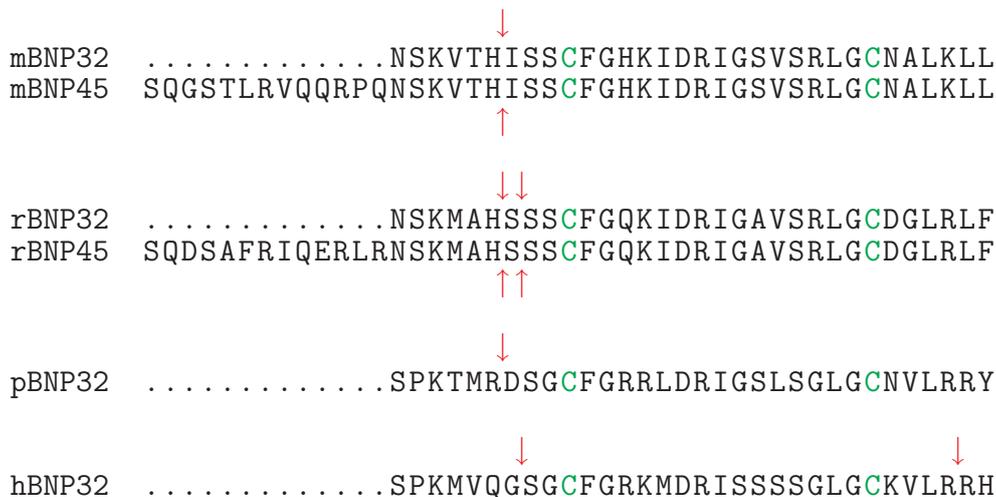


Abbildung 2.17.: Die roten Pfeile kennzeichnen die durch Massenspektrometrie oder HPLC-Elution von Vergleichspeptiden ermittelten Spaltstellen bei BNPs verschiedener Spezies durch Meprin A (m - Maus, r - Ratte, p - Schwein, h - human, 32 bzw. 45 - Anzahl der Aminosäuren im Peptid). Die höhermolekularen murinen BNPs mit 45 Aminosäuren werden an den gleichen Stellen gespalten wie die kürzeren 32-Varianten. Zwischen den grün gekennzeichneten Cysteinen besteht jeweils eine intramolekulare Disulfidbrücke.

in kleineren Peptiden können bekanntlich Peptideigenschaften deutlich verändern. Deshalb gab es erwartungsgemäß auch Unterschiede in der Abbaugeschwindigkeit zwischen den verschiedenen BNP-Sorten von Maus, Ratte, Schwein und Mensch. In größeren Proteinen wie Enzymen wirken sich solche Sequenzänderungen normalerweise weniger stark aus. Gerade Modifizierungen am katalytischen Zentrum sollten nur möglich sein, wenn die eigentliche Enzymfunktion erhalten bleibt. Dass dies hier trotzdem der Fall ist, kann damit erklärt werden, dass die Natriuretischen Peptide nicht zu den Hauptsubstraten für Meprine zu zählen sind und ein Verlust der BNP-degradierenden Funktion im humanen Meprin  $\alpha$  physiologisch von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint.

Die hier beschriebene Substrat- und Speziesselektivität ist in der Natur kein Sonderfall. Eine ähnlich ausgeprägte Selektivität der Enzymfunktionen wurde beispielsweise für verschiedene Peptidasen des Renin-Angiotensin-Systems beschrieben [35, 39].

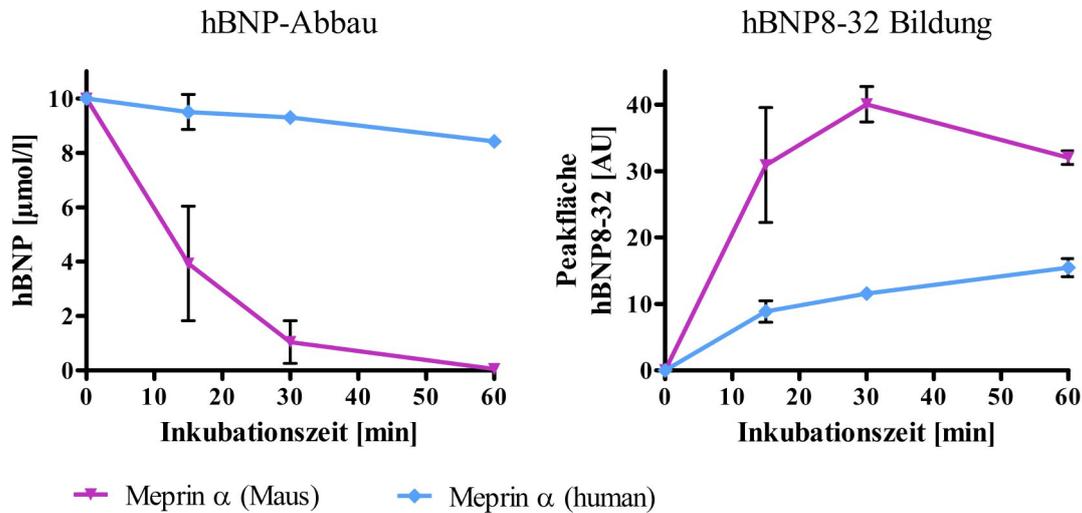
Vergleich des hBNP-Abbaus durch murines bzw. humanes Meprin  $\alpha$ 

Abbildung 2.18.: Abbau von  $10 \mu\text{mol/l}$  hBNP (A) und parallel die Bildung von hBNP8-32 (B) durch humanes bzw. murines Meprin  $\alpha$ ; (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=3$ )

So gibt es bei der Chymase beträchtliche Spezies-Differenzen. Das Enzym bewirkt beim Menschen, ähnlich wie das ACE, die rasche Umsetzung von Angiotensin I zu Angiotensin II. Bei Ratten ist die Chymase dagegen nicht an der Bildung sondern am Abbau von Angiotensin II beteiligt [39].

Auch die Umsetzung von Angiotensinogen durch Renin ist ausgesprochen spezies-selektiv. Während die Spaltstelle im Angiotensinogen hoch konserviert ist, unterscheiden sich die Renine verschiedener Spezies im katalytischen Zentrum, so dass sehr selektiv immer nur das spezieeigene Substrat bzw. das Angiotensinogen sehr eng verwandter Tierarten umgesetzt wird. So kann beispielsweise humanes Renin Ratten-Angiotensinogen nicht umsetzen und umgekehrt [76]. Für experimentelle Studien zum humanen Renin-Angiotensin-System musste daher früher immer mit Primaten gearbeitet werden. In neueren Studien werden transgene Tiermodelle genutzt, die humanes Renin bzw. Angiotensinogen bilden können [33, 35].

## **2.5. Biologische Aktivität von mBNP und mBNP7–32 im Vergleich mit anderen Natriuretischen Peptiden**

In Zusammenhang mit diesem Projekt wurde eng mit der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas Walther am Klinikum Benjamin Franklin der Charité (später Erasmus Universität Rotterdam, NL und University Hull, UK) zusammengearbeitet. Aus dieser Kooperation stammen die folgenden Versuche zur biologischen Aktivität von mBNP und seinem Meprin-Metaboliten mBNP7–32. Die Experimente wurden hauptsächlich von Dr. Wang Yong aus der Arbeitsgruppe um Thomas Walther durchgeführt.

### **2.5.1. Glatte Muskelzellen**

Das initiale Abbauprodukt von mBNP in muriner Nierenmembran, das mBNP7–32, ist am N-Terminus verkürzt, besitzt aber noch die intakte Ringstruktur und kann damit noch biologisch aktiv sein. Um das zu testen, wurden murine glatte Muskelzellen der Aorta kultiviert, welche sowohl den NPR-A als auch den NPR-B [96] endogen exprimieren. An diesen Zellen wurde die Aktivität gleicher Konzentrationen mANP, mBNP, mBNP7–32 und CNP verglichen, indem die Bildung des sekundären Botenstoffs cGMP gemessen wurde (siehe Abbildung 2.19 A).

Wie schon bei Suga et al. [96] gezeigt, war mANP potenter als mBNP bei der cGMP-Produktion, weil mANP eine höhere Affinität zum NPR-A hat. Weiterhin führte CNP zum höchsten Anstieg der cGMP-Konzentration aufgrund der höheren NPR-B-Rezeptordichte in glatten Muskelzellen der Aorta. Auch mBNP7–32 konnte die cGMP-Produktion in den Zellen stimulieren; mBNP7–32 als Intermediärprodukt ist demnach noch biologisch aktiv. Die Aktivität von mBNP7–32 war nur unwesentlich (nicht signifikant) geringer als die von mBNP.

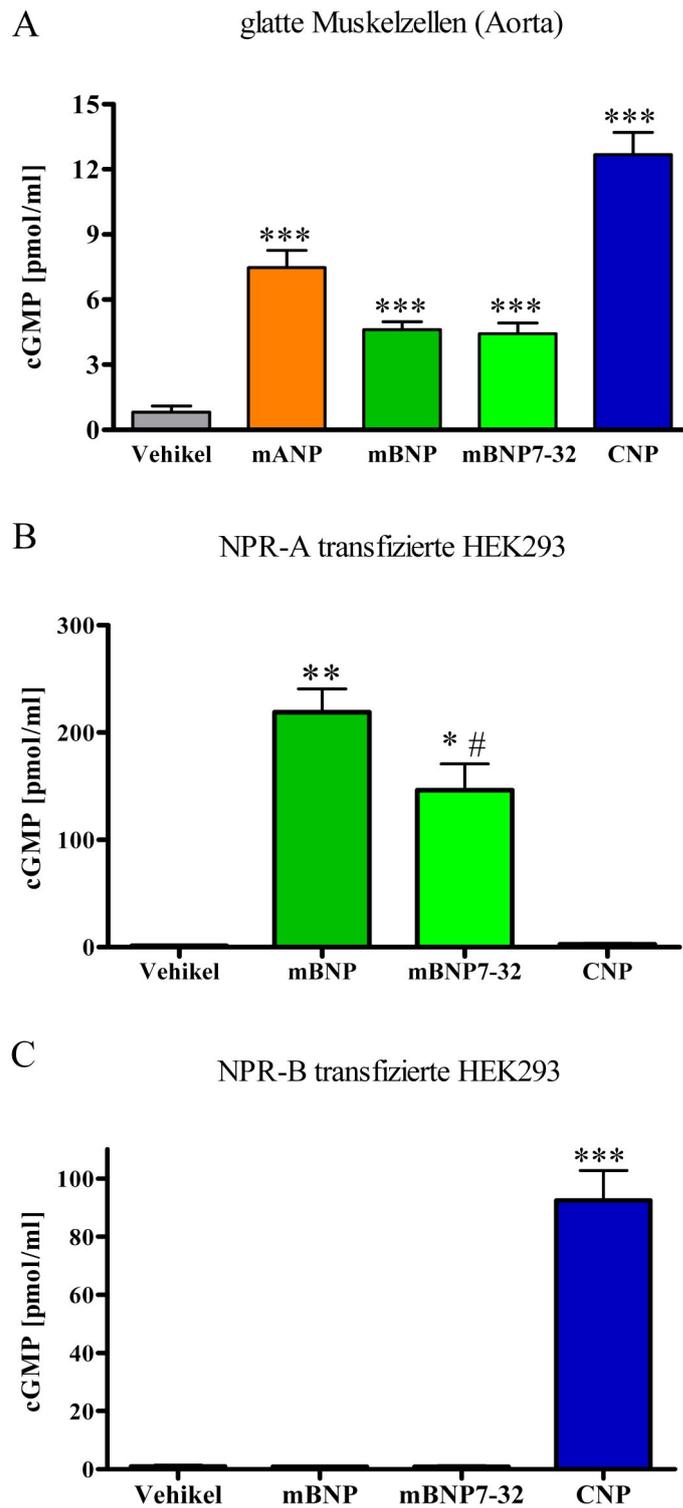


Abbildung 2.19.: *Biologische Aktivität von mBNP7-32. Messung der cGMP-Produktion durch Natriuretische Peptide in aortalen glatten Muskelzellen (A) und in HEK293-Zellen transfiziert mit NPR-A (B) oder NPR-B (C); \*p<0,05, \*\*p<0,005, \*\*\*p<0,0005 vs Vehikel; #p<0,05 vs mBNP; Mittelwert ± SD, n=8*

### 2.5.2. NPR-A- bzw. NPR-B-transfizierte HEK-Zellen

In einem weiteren Experiment wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen) selektiv mit NPR-A oder NPR-B transfiziert und die cGMP-Produktion nach Zugabe gleicher Konzentrationen mBNP oder mBNP7–32 gemessen (siehe Abb. 2.19 B und C).

Beide Peptide konnten die cGMP-Bildung in den NPR-A-transfizierten Zellen anregen; mBNP war dabei potenter als mBNP7–32. Die N-terminale Verkürzung durch Meprin A führte hier also ähnlich wie in den glatten Muskelzellen zu einer Reduktion, aber nicht zum Verlust der biologischen Aktivität. Der NPR-B-Ligand CNP diente hier als Negativkontrolle und hatte wie erwartet keinen Einfluss auf die cGMP-Bildung in den NPR-A-transfizierten Zellen.

In den NPR-B-transfizierten Zellen konnten weder mBNP noch mBNP7–32 die cGMP-Produktion stimulieren. Die Verkürzung des N-Terminus verändert demnach nicht die in Kapitel 1.1.2 beschriebene Rezeptorselektivität von BNP, so dass das kürzere mBNP7–32 ähnlich wie CNP nun auch an den NPR-B binden könnte. Da CNP der C-terminale Rest fehlt, mBNP7–32 jedoch am N-terminalen Rest verkürzt ist, scheint eher ein kurzer bzw. fehlender C-Terminus entscheidend für die Bindung an den NPR-B zu sein. Neuere Untersuchungen von Lisy et al. [55] und Dickey et al. [25] mit einem chimären CNP/DNP-Peptid (CD-NP) gehen in eine ähnliche Richtung: Hier wurde durch die Verbindung von CNP mit dem C-Terminus von DNP ein bifunktionales Peptid geschaffen, dass nicht nur an den NPR-B, sondern durch den verlängerten C-Terminus auch an den NPR-A bindet (siehe dazu auch Kap. 1.3.1).

## 2.6. Weiterer Abbau von mBNP7–32 durch NEP

Das mBNP7–32 ist biologisch aktiv, aber durch den kürzeren N-Terminus wird es strukturell dem ANP ähnlicher. Deshalb wurde untersucht, ob mBNP7–32 ein besseres Substrat für NEP ist als das originale (*full-length*) mBNP. Dafür wurde der Abbau von mANP, mBNP und mBNP7–32 durch rekombinante murine NEP verglichen (Abb. 2.20). Während mBNP sehr langsam abgebaut wurde, war der

Abbau von mBNP7–32 vergleichbar mit dem schnellen Abbau von mANP. Daraus lässt sich ableiten, dass NEP mBNP zwar nicht initial spaltet, aber für die finale Inaktivierung von Bedeutung sein könnte.

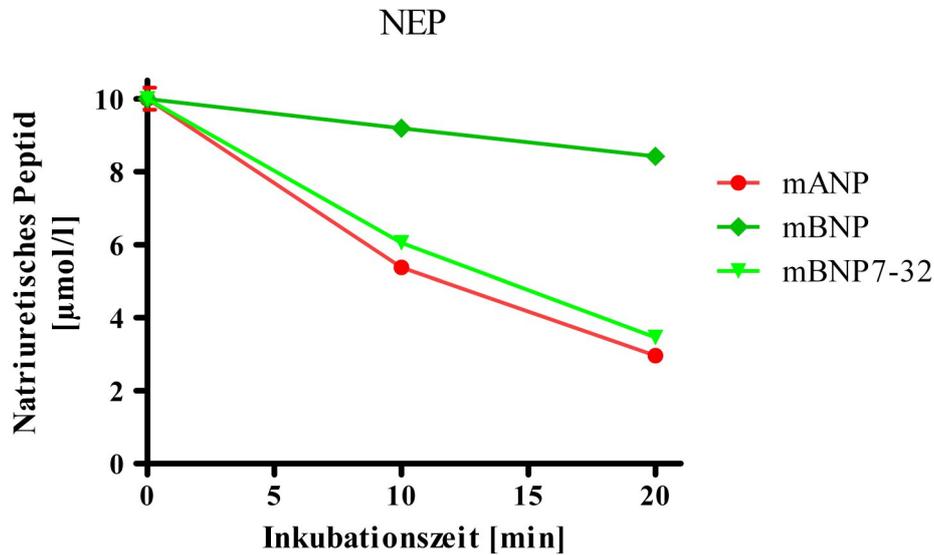


Abbildung 2.20.: Abbau von 10  $\mu\text{mol/l}$  mBNP7–32 durch NEP im Vergleich zu mBNP und mANP; 20 min Inkubation ( $n=3$ ; SD innerhalb der Punkte)

Um das weiter zu verdeutlichen, wurden Abbaustudien mit muriner Wildtyp-Nierenmembran in Gegenwart des NEP-Inhibitors Candoxatrilat oder des Meprin-Inhibitors Actinonin oder beider Inhibitoren zusammen durchgeführt. Dabei wurde über HPLC parallel der mBNP-Abbau und die mBNP7–32-Bildung beobachtet (Abb. 2.21).

Actinonin war der effizienteste Inhibitor für den mBNP-Abbau. Candoxatrilat hingegen erzielte keinen signifikanten Hemmeffekt verglichen mit den ungehemmten Proben. Das bestätigt Meprin A als die initial katabolisierende Peptidase. Beachtenswert war, dass in den Actinonin-behandelten Membranen die mBNP7–32-Bildung fast vollständig verhindert wurde. Es ist daher anzunehmen, dass Meprin A die einzige Peptidase ist, die in Nierenmembranen mBNP zu mBNP7–32 umwandelt. Andererseits war mBNP7–32 signifikant angereichert in den Candoxatrilat-behandelten Membranen ( $p<0,01$ ), was wiederum demonstriert, dass NEP am nachfolgenden Abbau beteiligt ist und letztendlich den Metaboliten mBNP7–32 inaktiviert.

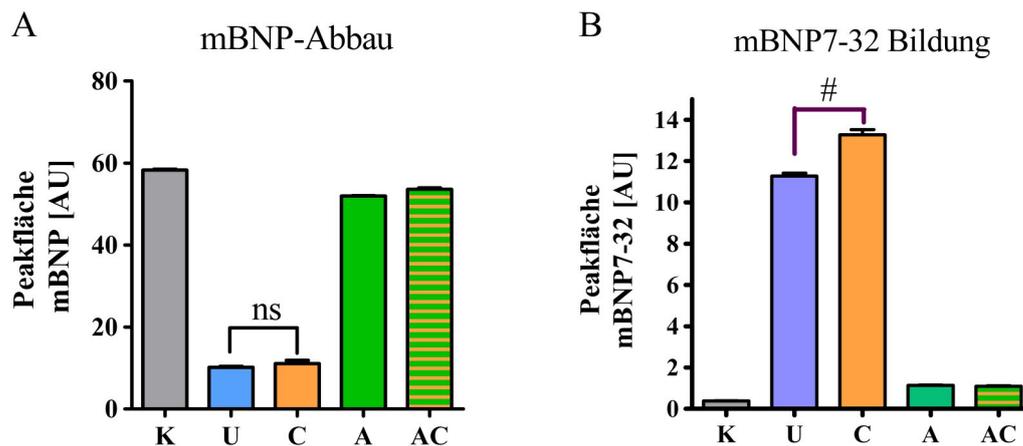


Abbildung 2.21.: Vergleich von mBNP-Abbau und mBNP7-32-Bildung ungehemmt (U) und in Gegenwart von Candoxatrilat (C), Actinonin (A) oder beiden Inhibitoren (AC) nach 20 min; Kontrolle ist Startwert bei 0 min (K) (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=3$ , ns - nicht signifikant, #  $P<0,01$ )

Daraus wird deutlich, dass in der Niere ein schrittweiser Abbau des mBNP durch zwei kolokalisierte membranständige Peptidasen erfolgt: Meprin A verkürzt den N-Terminus von mBNP unter Bildung von mBNP7-32. Dieser Metabolit ist immer noch biologisch aktiv, kann also die Bildung von cGMP in Zellen anregen, ist aber gleichzeitig auch zugänglich für eine finale Inaktivierung durch die NEP. Die Spaltung durch Meprin A ist folglich die Voraussetzung für eine schnelle mBNP-Inaktivierung (siehe Abb. 2.22).

## 2.7. Wirkung des Meprin-Inhibitors Actinonin *in vivo*

Wenn der initiale BNP-Abbau in der Maus durch Meprin A erfolgt, sollte eine Hemmung von Meprin A zur Anreicherung von BNP im Organismus führen. Und da die Verkürzung des N-Terminus durch Meprin A die Bindung des BNP an das Enzym NEP verbessert, verzögert eine Meprin-Hemmung gleichzeitig die schnelle Inaktivierung durch die NEP.

In einem *In-vivo*-Experiment wurde Ratten der Meprin-Inhibitor Actinonin

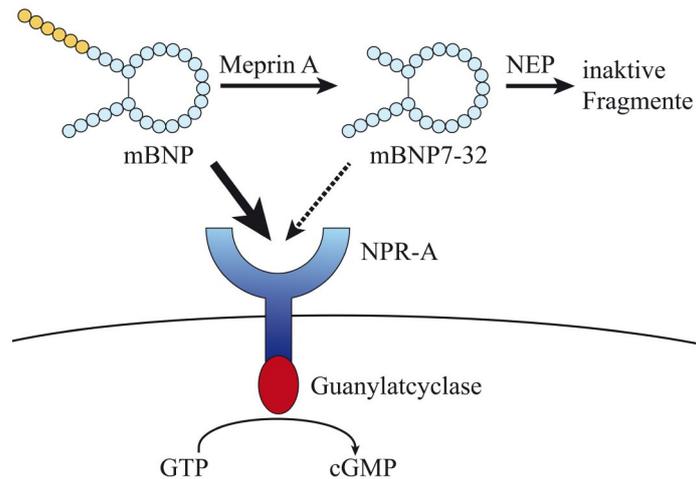


Abbildung 2.22.: Schema für den Abbau des mBNP in der Mausniere: die schnelle Inaktivierung wird ermöglicht durch die kooperative Wirkung von Meprin A und NEP. Das Meprin-Produkt mBNP7-32 ist noch biologisch aktiv.

(100 mg/kg Körpergewicht) oder das entsprechende Volumen an Lösungsmittel (Kontrolle) intraperitoneal appliziert. Nach 24 und 36 Stunden wurde die BNP-Konzentration im Serum bestimmt. Dieser Versuch wurde zusammen mit Florian Gemhardt (AG Prof. Thomas Walther, Abt. Kardiologie und Pulmologie) am Campus Benjamin Franklin, Charité (Berlin, Deutschland) durchgeführt.

In der Actinonin-Gruppe waren die Serum-BNP-Werte signifikant höher als in der entsprechenden Kontrollgruppe (Lösungsmittel) (siehe Abbildung 2.23).

Die Meprin-Hemmung mit Actinonin führt demnach auch *in vivo* zu einer Anreicherung von BNP im murinen Organismus.

## 2.8. Erste Versuche zur Auffindung der BNP-abbauenden Peptidase in muriner Lungenmembran

Analog zu den Experimenten mit Nierenmembran sollte(n) auch für Lungenmembran die BNP-katabolisierende(n) Peptidase(n) bestimmt werden, da auch in den Lungenmembranen, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, ein deutlicher NEP-unabhängiger Abbau von mBNP zu beobachten war.

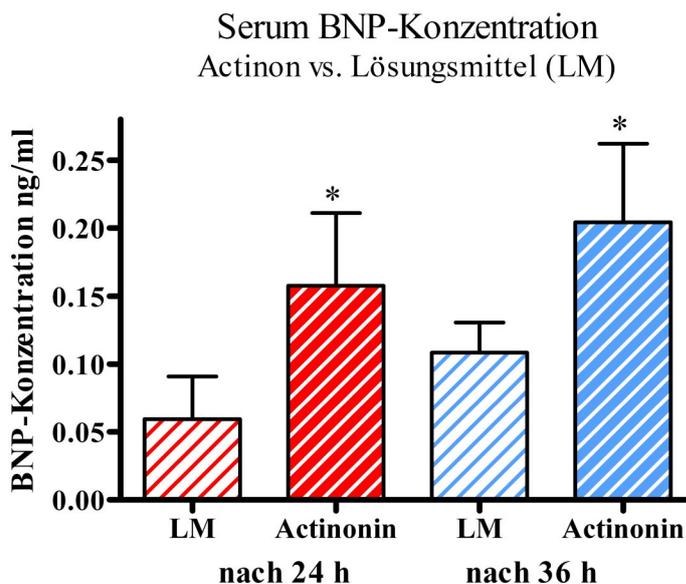


Abbildung 2.23.: Serum rBNP-Konzentrationen 24 h und 36 h nach intraperitonealer Injektion von Actinonin (100 mg/kg Körpergewicht) oder Lösungsmittel (LM) in Ratten; Mittelwert  $\pm$  SD ( $n=4$ ). \* $p<0,05$  vs LM

### 2.8.1. Einsatz verschiedener Metallopeptidase-Inhibitoren

In einem orientierenden Versuch wurde zunächst überprüft, ob auch hier Meprin A von Bedeutung ist. Dazu wurden sowohl mBNP als auch hBNP mit Lungenmembran von NEP-defizienten Mäusen inkubiert und der Einfluss des Metallopeptidase-Inhibitors EDTA und des Meprin-Inhibitors Actinonin untersucht.

Wie in Abbildung 2.24 zu sehen ist, wurden beide BNPs schnell durch die Lungenmembran abgebaut (U). Der Meprin-Inhibitor Actinonin hatte jedoch in beiden Fällen keinen hemmenden Effekt. EDTA hingegen verlangsamt den Abbau deutlich. Nach 30 min Inkubation sind immer noch 85 % des mBNPs bzw. 60 % des hBNPs erhalten. Es handelt sich demnach wiederum um eine Metallopeptidase, aber anders als bei Nierenmembran nicht um Meprin A.

Für mBNP konnte ein initiales Abbauprodukt ermittelt werden, dass in der HPLC nach 17,5 min eluiert wird. Die massenspektrometrische Analyse identifizierte dieses Spaltprodukts als mBNP1–30 (Masse 3225,78 mit intakter Disulfidbrücke). Die Spaltung erfolgt demzufolge im C-terminalen Rest außerhalb des Disulfid-Rings (Abb. 2.25).

Abbau von mBNP und hBNP durch Lungenmembran  
Hemmung mit EDTA und Actinonin

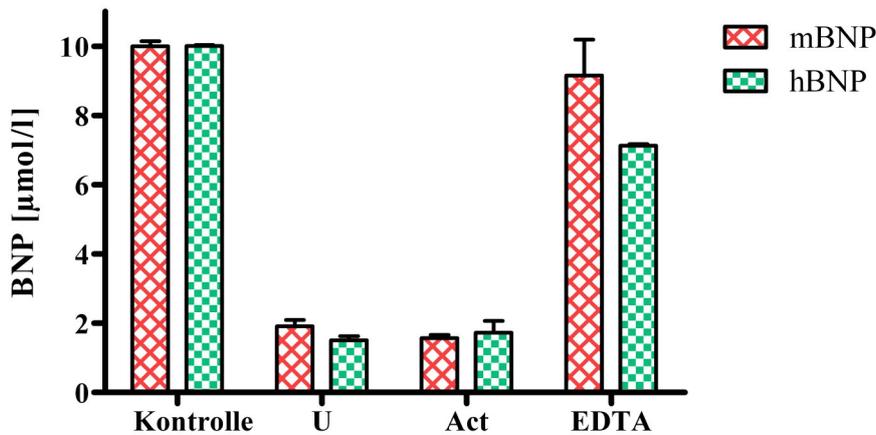


Abbildung 2.24.: *mBNP*- und *hBNP*-Abbau durch Lungenmembran von NEP-defizienten Mäusen: Kontrolle 10 μmol/l BNP, (U) „ungehemmter“ Abbau, Abbau in Gegenwart von Actinonin (Act) bzw. EDTA (EDTA), Inkubationszeit 30 min (Mittelwert ± SD, n=3)

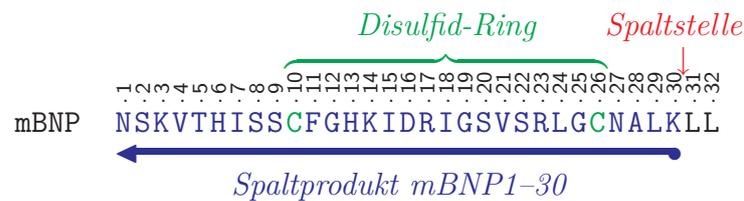


Abbildung 2.25.: *initiale Spaltstelle des mBNP nach Inkubation mit Lungenmembran*

Die aufgefundene BNP-Spaltung durch murine Lungenmembranen kann zweifelsfrei nicht auf NEP zurückgeführt werden, da Membranen von NEP-Knockout-Tieren verwendet wurden. Aufgrund der Spaltstelle wäre ein Einfluss von ACE als Dipeptidyl-Carboxypeptidase denkbar. Allerdings wurde der ACE-Hemmer Lisinopril (in Kombination mit Bestatin) allen Proben standardmäßig zugefügt, so dass auch ACE als wirksame Peptidase hier ausgeschlossen werden konnte. Auch ein schrittweiser Abbau durch andere Carboxypeptidasen wäre möglich; das bei einer solchen Spaltung entstehende Intermediärprodukt mBNP1-31 konnte jedoch bei sorgfältiger Analytik auch nicht in Spuren nachgewiesen werden. Mit hohen Aktivitäten in der Lunge vorkom-

mende Peptidasen sind die Isoformen des *Endothelin-Converting Enzyme* (ECE) [53]. In einem weiteren Experiment wurde daher der Einfluss von ECE ermittelt. Hierfür wurde der Abbau von mBNP durch Lungenmembran von NEP-Knockout-Mäusen mit und ohne den selektiven ECE-Hemmer SM-19712 [102] untersucht. Wie in Abbildung 2.26 zu sehen ist, wurde mBNP nach 30 min Inkubation zu  $\approx 50\%$  abgebaut (ungehemmter Abbau). In Gegenwart des ECE-Inhibitors SM-19712 war der Abbau deutlich verlangsamt. Es waren bei ECE-Hemmung noch  $\approx 80\%$  des Peptids nachweisbar. Demzufolge bewirkte der ECE-Inhibitor keine vollständige Hemmung. Es können demnach noch andere Peptidasen am Abbau beteiligt sein. Jedoch wurde das Produkt mBNP1–30 in diesem Versuch fast vollständig unterdrückt. Folglich katalysiert ECE diesen Abbau. Das Produkt 3, das nicht eindeutig charakterisiert werden konnte, wird in Gegenwart von SM-19712 auch unterdrückt, so dass es nahe liegt, dass es sich um ein sekundäres Abbauprodukt durch ECE-Einwirkung handelt. Das Produkt 2 hingegen entsteht auch bei ECE-Hemmung, so dass es sich hier um ein Produkt handelt, das nach Einwirkung anderer Peptidasen entsteht.

### **2.8.2. Abbau Natriuretischer Peptide durch rekombinantes ECE**

Um direkt zu untersuchen, ob ECE (EC 3.4.24.71) BNP abbauen kann, wurden die verfügbaren rekombinanten humanen Enzyme ECE-1 und ECE-2 sowohl mit mBNP als auch mit hBNP inkubiert (Abb. 2.27). Auch hier gibt es eine Substratspezifität. ECE-1 baut mBNP ab, hBNP jedoch nicht. Zusätzlich wurden hANP und CNP untersucht, die beide nicht durch ECE-1 abgebaut werden. Auch ECE-2 zeigte Aktivität gegenüber mBNP, der Abbau erfolgt jedoch langsamer als bei ECE-1. Allerdings liegt das pH-Optimum des Isoenzym ECE-2 im sauren Bereich [29], so dass nicht auszuschließen ist, dass unter sauren Bedingungen der Abbau von mBNP schneller erfolgt. Solche sauren Bedingungen können z. B. innerhalb des Golgi-Apparats auftreten, spielen aber beim Katabolismus durch Lungenmembran keine Rolle. Das hBNP wird wiederum nicht durch ECE-2 abgebaut.

Über MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde das Spaltprodukt vom mBNP

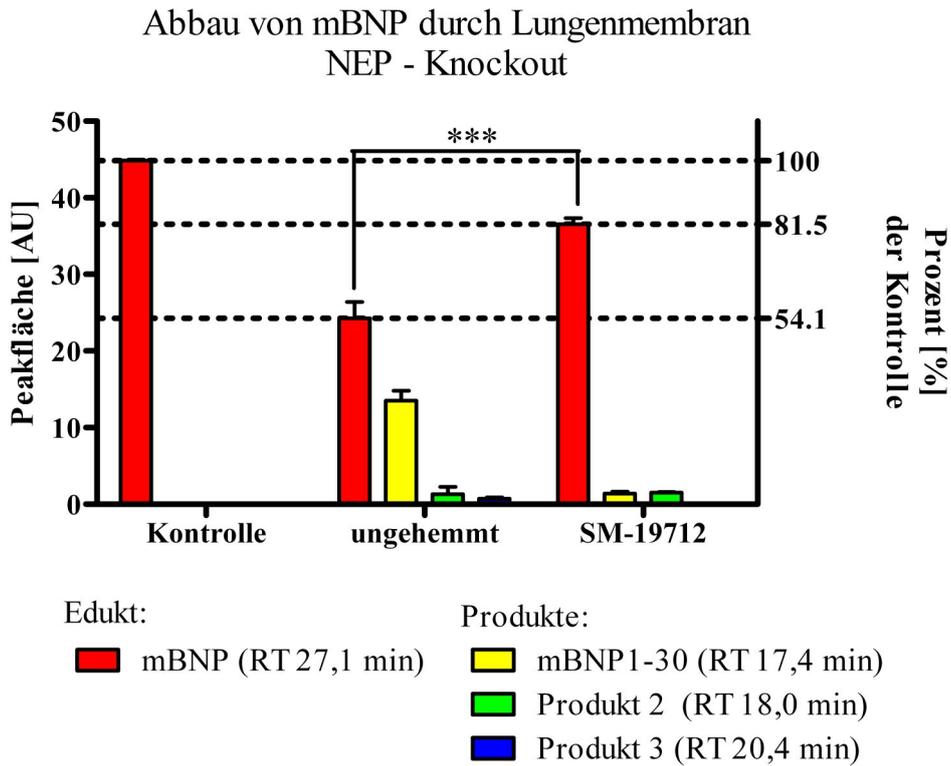


Abbildung 2.26.: mBNP-Abbau und durch Lungenmembran ungehemmt und in Gegenwart von SM-19712 (ECE-Inhibitor) nach 30 min (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=3$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ), RT - Retentionszeit in der HPLC

durch ECE-1 bestimmt. Wie bei Inkubation mit Lungenmembran erscheint auch hier als initiales Abbauprodukt mBNP1-30 (Masse 3225,46 mit intakter Disulfidbrücke). Als weiteres Abbauprodukt konnte mBNP7-30 (Masse 2559,41 mit intakter Disulfidbrücke) detektiert werden.

Durch den Einsatz des spezifischen ECE-Inhibitors SM-19712 sowie durch Inkubation mit rekombinantem ECE-1 konnte somit eindeutig nachgewiesen werden, dass beim initialen Abbau von mBNP in der Lunge ECE-1 eine Rolle spielt.

Ähnlich wie in der Nierenmembran gibt es jedoch auch hier eine deutliche Spezies-Selektivität der Substrate. So werden alle drei humanen Natriuretischen Peptide hANP, hBNP und CNP nicht durch humanes ECE-1 abgebaut. Sofern nicht auch hier wiederum murines und humanes ECE unterschiedlich katalysieren, sollte der in Abbildung 2.24 beobachtete Abbau des hBNP durch murine Lungenmembran demnach auf weitere Metallopeptidasen zurückzuführen sein, die noch nicht charak-

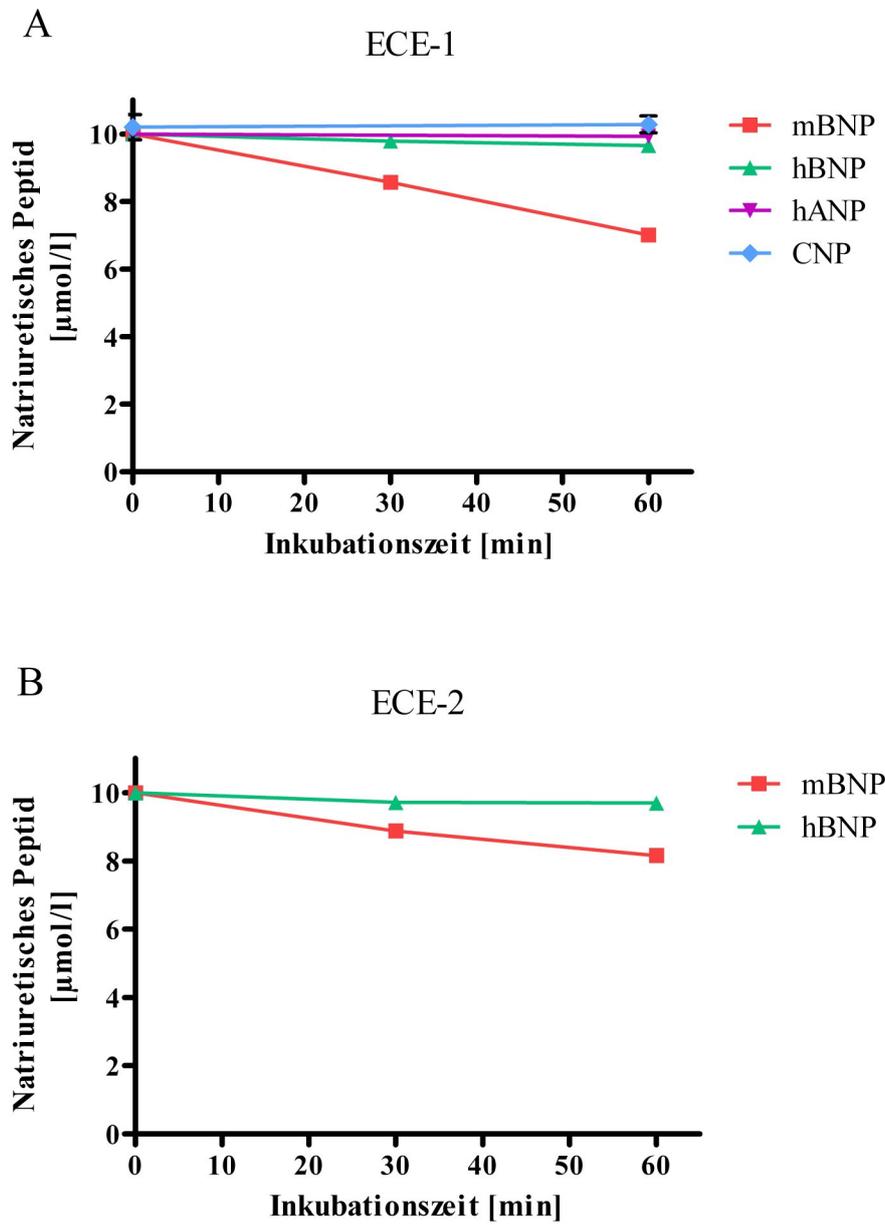


Abbildung 2.27.: Abbau von mBNP und hBNP ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) durch (A) ECE-1 und (B) ECE-2 (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=3$ )

terisiert werden konnten. Hierfür sind weitere Experimente notwendig, die jedoch mit humaner Lungenmembran durchgeführt werden sollten, um speziesspezifische Effekte, wie sie in muriner Nierenmembran zu beobachten waren, zu vermeiden. Entsprechende Experimente wurden inzwischen in der Arbeitsgruppe von Thomas Walther (Hull/Gießen) begonnen, die eng mit der AG Biochemische Neurobiologie am FMP zusammenarbeitet.

## 2.9. Schlussbetrachtung

Zum Zeitpunkt der Aufgabenstellung und dem Beginn der Experimente war gesichert, dass die Neutrale Endopeptidase (NEP) eine wesentliche Rolle beim Katabolismus Natriuretischer Peptide spielt. Besonders der ANP-Katabolismus war umfangreich untersucht. BNP stand weniger im Fokus der Untersuchungen, jedoch gab es in der Literatur einige Hinweise, dass der Abbau von BNP durch die NEP im Gegensatz zum ANP und CNP deutlich langsamer erfolgt [46, 91, 107].

Die Ergebnisse aus dem Initialexperiment dieser Arbeit mit Mausorganpräparationen (siehe Kap. 2.1) zeigten hingegen, dass auch BNP schnell umgesetzt wird, dieser Abbau jedoch nicht auf die NEP, sondern auf ein anderes bisher in diesem Zusammenhang nicht beschriebenes Enzym zurückzuführen ist.

Der Wissensstand zum Katabolismus der Natriuretischen Peptide war jedoch insgesamt unbefriedigend und eine rationale Erklärung für die beobachteten Differenzen beim Katabolismus der eng verwandten Peptide gab es nicht. Dies ist umso erstaunlicher, als die Natriuretischen Peptide eine zentrale Rolle bei der Herz-Kreislauf-Regulation spielen und die Natriuretischen Peptide wichtige therapeutische Targets sind.

Damit ergaben sich die Aufgaben, herauszufinden, 1) welche strukturellen Voraussetzungen den Katabolismus Natriuretischer Peptide durch die NEP begünstigen und 2) welche weiteren Enzyme BNP abbauen können.

Für die Beantwortung der ersten Frage wurde im Rahmen dieser Arbeit der Abbau diverser Natriuretischer Peptide durch die NEP verglichen und ein Modell für die Bindung Natriuretischer Peptide an das katalytische Zentrum der NEP entwickelt,

das von den bekannten 3D-Strukturen des katalytischen Zentrums der NEP und der Natriuretischen Peptide, sowie den typischen katalytischen Mechanismen der Metalloendopeptidasen ausging (Kap. 2.2.1).

Als das Hauptkriterium für die Abbaubarkeit wurde dabei die Länge der N- und C-terminalen Reste außerhalb der typischen Ringstruktur der Natriuretischen Peptide erkannt. Lange Aminosäure-Ketten außerhalb des Rings behindern die Drehung des Natriuretischen Peptids im katalytischen Zentrum der NEP. Daraus resultiert eine Verlangsamung des Abbaus der Peptide durch die NEP oder im Falle von DNP und humanem BNP (hBNP) sogar eine NEP-Resistenz.

Während der Projektbearbeitung wurde auch von anderen Gruppen beobachtet, dass eine Peptid-Verlängerung zu einem verzögerten Abbau der Natriuretischen Peptide führt. So berichteten Dickey et al. [28] z. B. über eine familiäre Frameshift-Mutation im kodierenden Abschnitt des hANP-Gens, die zu einer Erweiterung von ANP um 12 Aminosäuren am C-Terminus führt. Diese ANP-Verlängerung verändert kaum die biologische Aktivität des Peptids, führt jedoch zur Resistenz des Peptids gegenüber NEP und damit zu einer längeren biologischen Verfügbarkeit. Außerdem untersuchten Dickey et al. [27] den proteolytischen Abbau von DNP und CD-NP, einem Designer-Peptid bestehend aus CNP mit dem C-terminalen Rest von DNP (siehe Kap. 1.3.1, chimäre NP). Dabei stellten sie fest, dass die langen C-terminalen Reste beider Peptide den Abbau durch die NEP verhindern. Die Entwicklung solcher Designer-Peptide wie CD-NP verfolgt zwar vor allem das Ziel, bifunktionale Natriuretische Peptide zu entwickeln, die sowohl an den NPR-A als auch an den NPR-B binden können. Durch die Erweiterung des C-Terminus erreicht man jedoch außerdem eine NEP-Resistenz, welche von zusätzlichem Nutzen ist. Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit zur Interaktion von NEP mit Natriuretischen Peptiden ermöglichen demnach die Entwicklung von längererkettigen synthetischen Natriuretischen Peptiden, die durch eine größere Stabilität gegenüber der NEP länger pharmakologisch verfügbar sind.

Auch ein einfacher Aminosäure-Austausch an 10'-Position im Ring vom Glycin zum Serin, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, stellt eine Möglichkeit dar, länger verfügbare Peptide zu entwickeln. Jedoch könnte dieser Aminosäure-Austausch in einer hoch

konservierten Region im Ring auch die Bindung zum Rezeptor beeinflussen und zum völligen Funktionsverlust führen. Daher ist die Modifizierung der Ringstruktur eher kritisch zu betrachten. Die einfache Verlängerung der Peptide ist aber eine geeignete Methode, länger verfügbare Peptide zu entwickeln. Zusätzlich kann über die Länge des C-terminalen Restes die Rezeptorpräferenz zum NPR-A bzw. NPR-B beeinflusst werden. Andererseits wäre genauso zu überlegen, ob in bestimmten Fällen der Einsatz kürzerer Natriuretischer Peptide therapeutisch von Vorteil sein könnte. Eine schnellere Eliminierung könnte die Nebenwirkungen einer Therapie mit Natriuretischen Peptiden gerade im Hinblick auf die Nephrotoxizität reduzieren und die Anwendung eventuell sicherer machen.

Neben dem direkten intravenösen Einsatz der Natriuretischen Peptide lässt sich die Wirkung dieser Peptide auch durch die Hemmung ihrer Abbauwege potenzieren. Die Hemmung von Peptidasen mit dem Ziel, die biologische Verfügbarkeit ihrer Substrate zu erhöhen, ist aufgrund des zumeist breiten Substratspektrums bzw. der geringen Selektivität vieler Peptidasen allerdings immer mit dem Risiko verbunden, neben dem gewünschten Substrat (in diesem Fall dem Natriuretischen Peptid) auch andere Peptide hochzuregulieren. Dies kann einerseits erwünscht sein und die Wirkung unterstützen, aber auch zu Nebenwirkungen führen, die einen breiten klinischen Einsatz erschweren. Im Falle der NEP sollte hier vor allem die Fähigkeit der NEP, Amyloid  $\beta$  zu spalten, beachtet werden [106]. Eine NEP-Hemmung könnte die Konzentration an Amyloid  $\beta$  im Gehirn erhöhen, was mit einem höheren Risiko, an Morbus Alzheimer zu erkranken, verbunden sein könnte. Für eine pharmakologische Intervention muss daher sichergestellt werden, dass die NEP-Inhibitoren nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte deshalb geklärt werden, welche weiteren Enzyme am Abbau der Natriuretischen Peptide in der Niere beteiligt sind. Dabei lag der Fokus besonders auf dem Katabolismus des schwachen NEP-Substrats BNP (hier mBNP). Der initiale Abbau von mBNP durch murine Nierenmembranen konnte durch den systematischen Einsatz von Peptidase-Inhibitoren, die das wirksame Spektrum der Peptidasen schrittweise einengten, letztendlich auf Meprin A eingegrenzt werden (Kap.

2.3). Dieses Ergebnis wurde durch den Einsatz rekombinanter Enzyme bestätigt. Die initiale Spaltung durch Meprin A führt zu dem N-terminal verkürzten mBNP7–32, dessen biologische Aktivität schwächer ist als von mBNP. Diese Verkürzung reicht jedoch aus, um das resultierende Peptid in einem anschließenden Schritt durch die auf der Membran kolokalisierte NEP vollständig zu inaktivieren. Die rasche Inaktivierung des BNP im Organ bzw. im Homogenat ist somit das Ergebnis einer kooperativen Interaktion von Peptidasen (siehe dazu Abb. 2.22).

Schon Stephenson und Kenny [93] und auch Yamaguchi et al. [115] entdeckten, dass Meprin A ANP abbauen kann, jedoch war Meprin A (damals Endopeptidase 2 genannt) hier verglichen mit der dominierenden NEP-Wirkung beim ANP-Katabolismus von untergeordneter Bedeutung.

Dass BNP durch Meprin A abgebaut wird, ist ein neues Ergebnis dieser Arbeit. Verglichen mit ANP spielt Meprin A beim BNP-Katabolismus der Maus eine wichtigere Rolle, denn erst durch die Meprin-Einwirkung wird die schnelle finale Inaktivierung durch die NEP möglich. Das Gleiche gilt für pBNP, das durch Meprin A zu pBNP7–32 verkürzt wird. Und auch rBNP wird durch Meprin A zu rBNP7–32 und rBNP8–32 gespalten, was auch von Dickey et al. [26] später bestätigt wurde. Meprin A schien durch diese Resultate ein vielversprechendes Target für eine pharmakologische Intervention. So führte der Einsatz des Meprin-Hemmers Actinonin in einem *In-vivo*-Versuch in Ratten (siehe Kap. 2.7) zu einer signifikanten Erhöhung der Plasma-BNP-Konzentrationen.

Diese Ergebnisse sind jedoch auf hBNP nicht übertragbar. Zwar wird hBNP durch Meprin A von Ratte und Maus schnell zu hBNP8–32 umgesetzt. Jedoch erfolgte der Abbau durch *humanes* Meprin nur sehr langsam, so dass es fraglich ist, ob diese langsame Spaltung biologisch eine Rolle spielt. Bezugnehmend auf unsere Ergebnisse untersuchten Boerrigter et al. [8] dennoch das Produkt hBNP8–32 auf biologische Aktivität. Im *In-vitro*-Zellversuch an humanen aortalen Endothelzellen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen hBNP und hBNP8–32 bei der cGMP-Bildung. Genauso wie beim mBNP und seinem Metaboliten mBNP7–32 (Kap. 2.5) gibt es demnach keinen Funktionsverlust durch die Verkürzung des N-Terminus. Auch die intravenöse Gabe von hBNP8–32 bei Hunden zeigte verglichen mit hBNP ähnliche

Wirkungen auf den Blutdruck, jedoch war die natriuretische Wirkung vermindert. Das könnte an der hohen NEP-Konzentration in der Niere liegen, so dass das verkürzte hBNP8–32 schneller inaktiviert wird als das originale hBNP.

Das Prinzip der kooperativen Aktivität von Meprin A und NEP beim BNP-Abbau, das in der vorliegenden Arbeit (bzw. unseren bereits erschienenen Publikationen) erstmals beschrieben wurde, wurde inzwischen von Dickey et al. [26] aufgegriffen, die diesen Ansatz für andere Spezies (Mensch und Ratte) weiter untersuchten. In ihrem Versuch mit *humaner* Nierenmembran konnte die Zugabe des Meprin-Hemmers Actinonin und des NEP-Hemmers Phosphoramidon den hBNP-Abbau nicht hemmen.

Damit bestätigen sie die Ergebnisse aus dieser Arbeit, dass humanes Meprin A beim hBNP-Abbau nur eine untergeordnete Rolle spielt und auch die angedachte kombinierte Inaktivierung durch Meprin A und anschließend NEP, wie sie bei Maus-Nierenmembranen zu beobachten war, auf das menschliche System nicht zutrifft. Meprin A fällt dadurch bezogen auf eine BNP-Potenzierung beim Menschen als Arzneimittel-Target aus. Interessanterweise wurde in der gleichen Arbeit auch der Abbau von rBNP durch Ratten-Nierenmembran untersucht. Hier konnte durch die duale Hemmung von Meprin A und NEP der rBNP-Abbau blockiert werden. Ob aus diesen Ergebnissen bereits auf eine Sonderstellung des hBNP-Abbaus geschlossen werden kann, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Auch für die murine Lungenmembran konnte eine initial spaltende Peptidase ermittelt werden. Hier setzt das *Endothelin-Converting Enzyme* (ECE) mBNP zu mBNP1–30 um (Kap. 2.8.1). Da jedoch in den Experimenten mit humanem rekombinanten ECE-1 (Kap. 2.8.2) deutlich wurde, dass alle drei humanen Natriuretischen Peptide (hANP, hBNP, CNP) keine ECE-Substrate sind, stand fest, dass auch der in murinen Lungenmembranen beobachtete BNP-Abbau speziesspezifisch ist. Die hier vorgestellten noch preliminären Ergebnisse zum mBNP-Katabolismus an Lungenmembranen weisen aber wie bei den Nierenmembranen auf eine enge kooperative Interaktion von NEP mit anderen kolokalisierten Peptidasen hin. Neben ECE-1 können offensichtlich noch weitere bisher nicht bekannte Peptidasen eine der Inaktivierung vorangehende trunkierende Funktion übernehmen. Die hohe Spezies- und Substratspezifität des BNP-Katabolismus erfordert zukünftig gezielt speziesbe-

zogene Untersuchungen. Die Sequenz-Variabilität der BNPs verschiedener Spezies beeinflusst ihre Abbaubarkeit durch Proteasen. Doch auch dem unterschiedlichen Verhalten der Proteasen verschiedener Spezies kommt eine entscheidende Bedeutung zu. Für therapeutische Zielstellungen ist letztendlich nur der Katabolismus des hBNP interessant. Entsprechende Studien erfordern zunächst die Nutzung voll intakter Membranen von menschlichen Lungen und Nieren. Pathologisches Material sollte dabei weitgehend gemieden werden. Die in den bisherigen Untersuchungen zum BNP-Abbau aufgefundenen Ergebnisse zur hohen Substrat- und Speziesspezifität erschweren spätere *In-vivo*-Studien/Tierexperimente. Vermutlich werden derartige Studien nicht ohne den gezielten Einsatz aufwendiger transgener Tiere möglich sein. Als ersten Anhaltspunkt für den hBNP-Abbau durch humane Nierenmembran haben Dickey et al. [26] in vorläufigen Studien eine Leupeptin-empfindliche Cysteinprotease ausgemacht. Die genaue Identität der Protease ist noch nicht geklärt.

## 3. Methoden

### 3.1. Materialien

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Chemikalien von der Firma Sigma-Aldrich GmbH (Taufenkirchen, Deutschland) bezogen.

#### **Puffer, Lösungsmittel:**

- Wasser: 3-fach destilliert
- Tris/HCl-Puffer: 50 mmol/l Tris(hydroxymethyl)-aminomethan in Wasser, eingestellt auf pH 7,4 mit 2 N HCl.
- Tris/RSA-Puffer: Tris/HCl-Puffer mit 0,1 % Rinder-Serum-Albumin (RSA)
- TCNB-Puffer: wässrige Lösung von 50 mmol/l Tris, 10 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 0,15 mol/l NaCl, 0,05 % Brij 35, pH 7,5
- saurer Phosphat-/Perchloratpuffer für HPLC: 0,15 mol/l Natriumperchlorat und 0,01 mol/l Natriumdihydrogenphosphat werden in Wasser gelöst, mit 2 mol/l Phosphorsäure auf pH 2,2 eingestellt und über einen Membran-Filter (0,2 µm Porengröße) filtriert. Vor Verwendung wird der Puffer 1:2 mit Wasser verdünnt.

#### **Peptidaseinhibitoren:**

- Lisinopril: ACE-Inhibitor
- Candoxatrilat: NEP-Inhibitor, Schenkung von Pfizer (Dr. Berghoff, Karlsruhe, Deutschland)

- Bestatin: Aminopeptidase-Inhibitor
- Actinonin: Meprin-Inhibitor
- Diprotin A: DPP4-Inhibitor, Phoenix Peptides (Karlsruhe, Deutschland)
- SM-19712: ECE-Inhibitor
- Protease-Inhibitor-Set, Geno Technology, Inc. (Genotech, St. Louis, USA), enthält AEBSF, Antipain-Dihydrochlorid, Aprotinin, Bestatin, Chymostatin, E-64, EDTA-Na<sub>2</sub>, Leupeptin, Pepstatin, Phosphoramidon, PMSF

### **Peptidasen:**

- NEP (rekombinant, Maus): R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland), Lot Nr. GPE01, 0,081 mg/ml in 12,5 mmol/l Tris, 75 mmol/l NaCl, 50 % Glycerol, pH 7,5
- Meprin A aus Rattenniere: Calbiochem (Darmstadt, Deutschland), Lot Nr. B54215, 5 µg, 0,06 mg/ml
- Meprin- $\alpha$ -Untereinheit (rekombinant, Maus): R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland), Lot Nr. PVX0207011, 0,567 mg/ml in 12,5 mmol/l Tris, 75 mmol/l NaCl, 50 % Glycerol, pH 7,5
- Meprin- $\alpha$ -Untereinheit (rekombinant, human): R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland), Lot Nr. OQG02, 0,2 mg/ml in 12,5 mmol/l Tris, 75 mmol/l NaCl, 50 % Glycerol, pH 7,5
- Meprin- $\beta$ -Untereinheit (rekombinant, human): R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland), Lot Nr. O EZ02, 0,941 mg/ml in 25 mmol/l Tris, 0,15 mol/l NaCl, 50 % Glycerol, pH 7,5
- DPP4 (rekombinant, Maus): R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland), Lot Nr. FCA024011, 0,771 mg/ml in 25 mmol/l Tris, 100 mmol/l NaCl, pH 8
- ECE-1 (rekombinant, human): R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland), Lot Nr. MLD01, 0,1 mg/ml in 12,5 mmol/l Tris, 75 mmol/l NaCl, 50 % Glycerol, pH 7,5

- ECE-2 (rekombinant, human): R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland), Lot Nr. IXE014021, IXE014111, 0,173 mg/ml in 25 mmol/l Tris, 0,1 mol/l NaCl, 10  $\mu$ mol/l ZnCl<sub>2</sub>, pH 7,5

### Natriuretische Peptide:

- *human* BNP (hBNP), *mouse/rat* ANP (mANP), Urodilatin, *rat* BNP45 (rBNP45): Bachem (Weil am Rhein, Deutschland)
- CNP, *porcine* BNP (pBNP), pBNP7–32, *chicken* ANP (chANP), *eel* ANP (eANP), *mouse* BNP45 (mBNP45), DNP: Phoenix Peptides (Karlsruhe, Deutschland)
- *mouse* BNP (mBNP), mBNP7–32, hBNP1–26, hBNP9–26, hBNP9–32, CNP10'S, hBNP10'G, NPchimär: Synthese nach Vorgaben der AG Biochemische Neurobiologie (FMP) durch Biosyntan (Berlin, Deutschland)
- *rat* BNP (rBNP), *human* ANP (hANP): AnaSpec, Inc., Vertrieb über MoBiTec GmbH (Göttingen, Deutschland)

### Tiere

- Wildtyp-Kontrollen und NEP-Knockout-Mäuse (Background: C57BL/6): Ursprung A. Saria und G. Zernig (Universität Innsbruck, Österreich), gezüchtet am FMP in der AG Biochemische Neurobiologie (Berlin, Deutschland)
- Balb/c, C3H/HeJ, CBA/J, CD-Ratten: aus Kooperation mit der AG Thomas Walther, Abt. Kardiologie und Pulmologie am Campus Benjamin Franklin, Charité (Berlin, Deutschland)

Alle Tierversuche und Organentnahmen wurden vom Berliner Landesamt für Gesundheit und technische Sicherheit (LaGetSi) genehmigt.

### Zellkultur

- Hanks' balancierte Salzlösung, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetales Kälberserum (FKS): Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

- cGMP-Assay-Kit: R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland)
- PolyFect<sup>®</sup> Transfektionsreagenz: Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
- NPR-A-Plasmid: Origene Technologies (Rockville, USA)
- NPR-B-Plasmid: Schenkung von Michael Bader (MDC, Berlin, Deutschland)

## 3.2. Membrangewinnung

Die Hirn-, Herz-, Lungen- und Nierenmembranen von NEP-defizienten bzw. Wildtyp-Mäusen (C57BL/6) sowie die Nierenmembranen anderer Mausstämmen (Balb/c, C3H/HeJ, CBA/J) wurden nach einer Methode von Hulme und Buckley [43] präpariert. Dazu wurden die Organe bei 4 °C in vorgekühltem 50 mmol/l Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) mit einem Potter-S-Homogenisator (B.Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland) homogenisiert, durch Nylon-Gaze filtriert und in einer Sorvall<sup>®</sup>-Ultrazentrifuge (Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland) mit dem Rotor SS34 bei 18000 Umdrehungen pro Minute (40000-g) 22 min zentrifugiert. Der Überstand (Zytosol) wurde verworfen. Das entstandene Pellet wurde gewaschen, nochmals zentrifugiert und letztendlich im 5-fachen Pelletvolumen 50 mmol/l Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) resuspendiert. Für die Experimente mit solubilisierter Membran wurde dem Tris/HCl-Puffer zusätzlich 8 mmol/l 3-[3-(Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan sulfonat (CHAPS) zugesetzt. Die Membranpräparationen wurden portioniert bei -80 °C gelagert.

## 3.3. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Präparationen wurde mit Hilfe einer modifizierten Methode nach Bradford [13] bestimmt. Dazu wurden die Proben 1:20 mit Tris/HCl-Puffer verdünnt und 20 µl der Verdünnung mit 1 ml einer 1:5 mit Wasser verdünnten Rotiquant<sup>®</sup>-Lösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in Halbmikroküvetten (Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland) vermischt. Nach 5 min wurde die Absorption der Lösung bei 595 nm in einem UV-Vis-Spektrophotometer UV mini 1240

(Shimadzu, Duisburg, Deutschland) vermessen. Zu jeder Messreihe wurde parallel eine Kalibriergerade von 0,1 bis 0,8 mg/ml Rinder-Serum-Albumin gelöst in Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) erstellt, um den gemessenen Absorptionswerten Proteinkonzentrationen zuordnen zu können. Enthielten die Proben CHAPS (zur Solubilisierung) so wurde auch bei der Kalibrierung entsprechend CHAPS zugesetzt, da CHAPS bei 595 nm ebenfalls absorbiert. Für die Experimente wurde der Proteingehalt der Proben einheitlich eingestellt.

### 3.4. Inkubationen

Alle Inkubationen wurden in einem Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 37 °C unter ständigem Schütteln wie in den Unterkapiteln beschrieben durchgeführt. Um eine Peptidbindung an das Plastikmaterial der Reaktionsgefäße zu minimieren, wurde RSA-haltiger Trispuffer zur Absättigung eingesetzt. Der Einsatz von Bestatin bzw. Bestatin und Lisinopril in Kombination diente dem Ausschluss aminopeptidolytischer Aktivität und möglicher ACE-Einflüsse. Gestoppt wurden die Reaktionen durch Zusatz des halben Inkubationsvolumens an 0,35 mol/l HClO<sub>4</sub>, was zur sofortigen Denaturierung der Peptidasen führt. Danach wurden die Proben bei 12000·g zentrifugiert (Sigma 2K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, Deutschland) und die überstehende Lösung der HPLC (Kap. 3.8) zur Analyse zugeführt.

#### **Abbau von murinem ANP bzw. BNP durch Maus-Membranpräparationen (Kap. 2.1)**

Je 2 Proben 10 µmol/l mANP bzw. 12,5 µmol/l mBNP wurden mit 100 µl Membran (Herz, Lunge, Hirn, Niere; eingestellt auf 0,4 mg/ml Protein) von Wildtyp- bzw. NEP-defizienten C57BL/6-Mäusen bei 37 °C in Gegenwart von 100 µmol/l Bestatin und 1 µmol/l Lisinopril in Tris/RSA-Puffer (Endvolumen 400 µl) inkubiert. Nach jeweils 0, 10, 20, 30, 40 und 60 min wurden 60 µl aus dem Inkubationsansatz entnommen und in vorbereitete Tubes mit 30 µl 0,35 mol/l HClO<sub>4</sub> überführt (Reaktionsstopp). Für die Erfassung des NEP-unabhängigen Abbaus wurde dem Inkubationsansatz

zusätzlich 10  $\mu\text{mol/l}$  Candoxatrilat zugefügt. Zusätzlich wurden Kontrollexperimente mit Hitze-inaktivierter Membran (5 min bei 95 °C) durchgeführt, bei denen kein Abbau von mANP bzw. mBNP auftrat. Die Gegenwart des NPR-C-Antagonisten H-3048 (Bachem, Weil am Rhein, Deutschland) verringerte den Abbau nicht (weiteres Kontrollexperiment).

### **Abbau Natriuretischer Peptide durch rekombinante Maus-NEP (Kap. 2.2.1, 2.2.3, 2.2.4 und 2.6)**

10  $\mu\text{mol/l}$  eines Natriuretischen Peptids wurden mit 0,24  $\mu\text{g}$  rekombinanter Maus-NEP (0,27 ng/ $\mu\text{l}$  Endkonzentration) bei 37 °C in 900  $\mu\text{l}$  Tris/HCl-Puffer inkubiert. Nach 0, 10 und 20 min wurden je 3 Proben (100  $\mu\text{l}$ ) dem Inkubationsansatz entnommen und in 50  $\mu\text{l}$  0,35 mol/l  $\text{HClO}_4$  überführt (Reaktionsstopp). In der Grafik sind nur die Werte für 20 min ausgewertet. In Gegenwart des NEP-Inhibitors Candoxatrilat (0,1 mmol/l) wurden die Peptide nicht abgebaut.

### **Inkubation von mBNP mit Nierenmembran in Gegenwart von Peptidase-Inhibitoren (Kap. 2.3.2 und 2.3.3)**

Je 5 Proben 10  $\mu\text{mol/l}$  mBNP wurden mit 5  $\mu\text{l}$  solubilisierter Nierenmembran von NEP-defizienten Mäusen (5,3 mg/ml Protein) in Gegenwart von effektiven Konzentrationen verschiedener Peptidase-Inhibitoren in Tris/RSA-Puffer (Endvolumen 100  $\mu\text{l}$ ) bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min wurden die Reaktionen mit 50  $\mu\text{l}$  0,35 mol/l  $\text{HClO}_4$  gestoppt. Die meisten Peptidase-Inhibitoren waren Teil eines Protease-Inhibitor-Sets der Firma Geno Technology Inc. (St. Louis, USA), das bereits fertig gelöste Protease-Inhibitoren in hundertfacher Wirkkonzentration enthielt. Die dort enthaltenen Inhibitoren und ihre Konzentration sind in Kapitel 2.3.2 aufgeführt. Für den Test spezifischer Peptidase-Inhibitoren wurden Lisinopril in der Endkonzentration 20  $\mu\text{mol/l}$  oder Actinonin in der Endkonzentration 1  $\mu\text{mol/l}$  der Inkubationslösung zugesetzt.

---

### **mBNP-Abbau in Nierenmembranen verschiedener Mausstämme (Kap. 2.3.4)**

10 µmol/l mBNP wurden mit 12 µl Nierenmembran (eingestellt auf 0,4 mg/ml Protein) in Gegenwart von 100 µmol/l Bestatin, 0,01 mmol/l Candoxatrilat und 1 µmol/l Lisinopril in Tris/RSA-Puffer bei 37 °C inkubiert (Endvolumen 90 µl). Nach 30 bzw. 60 min wurde die Reaktion durch den Zusatz von 45 µl 0,35 mol/l HClO<sub>4</sub> gestoppt. Die Nierenmembranen stammten von je 2 Tieren der Meprin-reichen Mausstämme C57BL/6 (wildtypisch und NEP-defizient) und Balb/c, sowie der Meprin-defizienten Mausstämme CBA/J und C3H/HeJ. Pro Tier wurden je 3 Proben für jede Zeit untersucht.

### **hBNP-Abbau in Nierenmembranen (Kap. 2.3.5)**

Je 3 Proben 10 µmol/l hBNP wurden mit 5 µl solubilisierter Nierenmembran von Wildtyp-Mäusen (4,8 mg/ml Protein) in Tris/RSA-Puffer in Gegenwart von 100 µmol/l Bestatin (diese Proben gelten als ungehemmt) oder zusätzlich mit 1 mmol/l Diprotin A und/oder 10 µmol/l Actinonin bei 37 °C inkubiert (Endvolumen 100 µl). Nach 20 min wurde die Reaktion im Inkubationsansatz mit 50 µl 0,35 mol/l HClO<sub>4</sub> gestoppt. Der Abbau von hBNP sowie die Bildung von hBNP8–32, hBNP8–30 und hBNP3–32 wurden durch HPLC analysiert.

### **Abbau Natriuretischer Peptide durch Meprin A aus Rattenniere (Kap. 2.4.1)**

10 µmol/l eines Natriuretischen Peptids wurden mit 2 µl Meprin A aus Rattenniere (Proteingehalt der Präparation 45 µg/ml) bei 37 °C in 600 µl Tris/RSA-Puffer inkubiert. Je 100 µl wurden dem Inkubationsansatz zu bestimmten Zeiten entnommen und in 50 µl 0,35 mol/l HClO<sub>4</sub> überführt (Reaktionsstopp). Der Abbau wurde durch HPLC analysiert.

### **Abbau Natriuretischer Peptide durch rekombinantes Meprin $\alpha$ bzw. $\beta$ von Mensch und Maus (Kap. 2.4.2 und 2.4.3)**

Die Meprin-Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  wurden nach Herstellerangaben aktiviert. Dazu wurden für 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Meprin in TCNB-Puffer 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Trypsin zugesetzt und bei 37 °C für 45 min ( $\alpha$ , Maus;  $\beta$ , human) oder 3 h ( $\alpha$ , human) inkubiert. Die Aktivierung wurde mit 2 mmol/l des Trypsin-Inhibitors AEBSF gestoppt.

Je 3 Proben eines Natriuretischen Peptids (10  $\mu\text{mol}/\text{l}$ ) wurden mit 0,01  $\mu\text{g}$  der aktivierten Meprin-Untereinheiten bei 37 °C in 300  $\mu\text{l}$  Tris/RSA-Puffer inkubiert. Nach 0, 15 und 30 min wurden je 80  $\mu\text{l}$  dem Inkubationsansatz entnommen und in 40  $\mu\text{l}$  0,35 mol/l  $\text{HClO}_4$  überführt (Reaktionsstopp). Der Abbau der Natriuretischen Peptide sowie die Bildung der Spaltprodukte wurden durch HPLC analysiert. Für CNP und hBNP wurden 0,1  $\mu\text{g}$  Meprin  $\alpha$  auf 300  $\mu\text{l}$  Tris/HCl-Puffer eingesetzt.

### **Weiterer Abbau des mBNP7–32 (Kap. 2.6)**

Je 3 Proben 10  $\mu\text{mol}/\text{l}$  mBNP wurden mit 5  $\mu\text{l}$  solubilisierter Nierenmembran von Wildtyp-Mäusen (eingestellt auf 5,3 mg/ml Protein) in Tris/RSA-Puffer in Gegenwart von 100  $\mu\text{mol}/\text{l}$  Bestatin oder zusätzlich mit 100  $\mu\text{mol}/\text{l}$  Candoxatrilat und/oder 1  $\mu\text{mol}/\text{l}$  Actinonin bei 37 °C inkubiert (Endvolumen 100  $\mu\text{l}$ ). Nach 20 min wurde die Reaktion im Inkubationsansatz mit 50  $\mu\text{l}$  0,35 mol/l  $\text{HClO}_4$  gestoppt. Der Abbau von mBNP sowie die Bildung von mBNP7–32 wurden durch HPLC analysiert.

### **BNP-Abbau in Lungenmembranen (Kap. 2.8.1)**

Je 3 Proben 10  $\mu\text{mol}/\text{l}$  mBNP bzw. hBNP wurden mit 5  $\mu\text{l}$  Lungenmembran von NEP-defizienten Mäusen (6,3 mg/ml Protein) in Tris/RSA-Puffer in Gegenwart von 100  $\mu\text{mol}/\text{l}$  Bestatin und 1  $\mu\text{mol}/\text{l}$  Lisinopril (diese Proben gelten als ungehemmt) oder zusätzlich mit 1  $\mu\text{mol}/\text{l}$  Actinonin oder 0,05 mol/l EDTA bei 37 °C inkubiert (Endvolumen 100  $\mu\text{l}$ ). Nach 30 min wurde die Reaktion im Inkubationsansatz mit 50  $\mu\text{l}$  0,35 mol/l  $\text{HClO}_4$  gestoppt. Der Abbau von mBNP bzw. hBNP wurde durch HPLC analysiert.

Für den Test des ECE-Inhibitors SM-19712 wurden je 3 Proben 10  $\mu\text{mol}/\text{l}$  mBNP

mit 5  $\mu\text{l}$  solubilisierter Lungenmembran von NEP-defizienten Mäusen (5,4 mg/ml Protein) in Tris/RSA-Puffer mit und ohne 1 mmol/l SM-19712 (Endvolumen 100  $\mu\text{l}$ ) bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min wurde die Reaktion im Inkubationsansatz mit 50  $\mu\text{l}$  0,35 mol/l  $\text{HClO}_4$  gestoppt. Der Abbau von mBNP sowie die Bildung der Spaltprodukte wurde durch HPLC analysiert.

### **Abbau Natriuretischer Peptide durch rekombinantes humanes ECE-1 und ECE-2 (Kap. 2.8.2)**

Je 3 Proben eines Natriuretischen Peptids (10  $\mu\text{mol/l}$ ) wurden mit 0,5  $\mu\text{g}$  ECE-1 oder ECE-2 (rekombinant, human) bei 37 °C in 1000  $\mu\text{l}$  Tris/RSA-Puffer inkubiert. Nach 0, 30 oder 60 min wurden je 3 Proben (100  $\mu\text{l}$ ) dem Inkubationsansatz entnommen und in 50  $\mu\text{l}$  0,35 mol/l  $\text{HClO}_4$  überführt (Reaktionsstopp). Der Abbau der Natriuretischen Peptide wurde durch HPLC analysiert.

## **3.5. Messung der NEP-Aktivität**

Die NEP-Aktivität wurde mit einer von Winkler et al. [110] entwickelten Methode gemessen: 5–50  $\mu\text{l}$  der Probe (z. B. für Nierenmembran 5  $\mu\text{l}$ , für Herzmembran 20  $\mu\text{l}$ , entsprechend der zu erwartenden Aktivität) wurden in 50  $\mu\text{mol/l}$  Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) in Gegenwart von 0,1 mmol/l Bestatin und 1  $\mu\text{mol/l}$  Lisinopril mit 100  $\mu\text{l}$  einer 200  $\mu\text{mol/l}$  [D-Ala<sup>2</sup>]-Leucin-Enkephalinamid-Lösung (DALEK) als Substrat in einem Endvolumen von 200  $\mu\text{l}$  bei 37 °C inkubiert. Nach 30 bis 60 min wurde die Reaktion durch Denaturierung mit 100  $\mu\text{l}$  0,35 mol/l  $\text{HClO}_4$  gestoppt. Die Proben wurden zentrifugiert. Im Überstand wurde das resultierende Abbauprodukt Tyr-D-Ala-Gly (TAG) mittels HPLC (siehe Kapitel 3.8) isokratisch mit 6 % Acetonitril in saurem Phosphat-/Perchloratpuffer innerhalb von 20 min eluiert und bei 216 nm detektiert. Ein TAG-Standard mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$ , dem entsprechend der zu vermessenden Proben auch 100  $\mu\text{l}$   $\text{HClO}_4$  zugesetzt wurden, wurde bei jeder Messreihe mit analysiert.

Die Spezifität der Reaktion wurde durch den NEP-Inhibitor Candoxatrilat in der Endkonzentration 10  $\mu\text{mol/l}$  bestätigt.

Die NEP-Aktivität wurde wie folgt berechnet:

$$NEP_{Aktivität} [pMol TAG \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}] = \frac{A \cdot c_{St} \cdot V_{Gesamt}}{A_{St} \cdot V_{Probe} \cdot t \cdot p}$$

$A$	Peakfläche TAG der Probe
$A_{St}$	Peakfläche TAG des Standards
$c_{St}$	Konzentration des Standards (100 000 pmol TAG/ml)
$V_{Gesamt}$	Volumen des Inkubationsansatzes (z. B. 200 $\mu$ l)
$V_{Probe}$	Proben-Volumen ( z. B. 10–50 $\mu$ l)
$t$	Inkubationszeit in min
$p$	Proteinkonzentration in mg/ml

### 3.6. Zellkultur und cGMP-Messungen zur biologischen Aktivität der Natriuretischen Peptide (Kap. 2.5)

Humane embryonale Nierenzellen (HEK293) wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 100 IU/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin bei 37 °C in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden in 24-Well-Zellkulturplatten übertragen und am folgenden Tag bei 80 % Konfluenz mit 500 ng DNA (NPR-A oder NPR-B) pro Well mit Hilfe von PolyFect® transient transfiziert. Die Transfektion wurde in DMEM mit 0,5 % FKS ohne antibiotische Zusätze durchgeführt. Nicht-transfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 24 h wurden die Zellen für 5 min mit Vehikel, 1  $\mu$ mol/l mBNP, CNP oder mBNP7–32 behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit kalter Hanks' balancierter Salzlösung, wurden die Zellen in 150  $\mu$ l Zell-Lysepuffer aus einem cGMP-Kit (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) resuspendiert. Die cGMP-Konzentrationen wurden anhand der Hersteller-Anweisung des cGMP-Kits ermittelt.

Das gleiche Protokoll mit Ausnahme der Transfektion wurde für die murinen glatten Muskelzellen der Aorta angewendet, die von 4- bis 6-Wochen-alten männlichen

C57BL/6-Mäusen gewonnen wurden. Für den Versuch wurden Zellen aus der 4.–5. Passage genutzt.

Diese Versuche wurden von Wang Yong (Abt. Kardiologie und Pulmologie) am Campus Benjamin Franklin, Charité (Berlin, Deutschland), durchgeführt.

### **3.7. Meprin-Inhibition *in vivo* durch Actinonin**

#### **(Kap. 2.7)**

Männliche CD-Ratten mit 200–250 g Körpergewicht erhielten durch intraperitoneale Applikation entweder Actinonin (100 mg/kg Körpergewicht) oder das entsprechende Volumen Lösungsmittel als Kontrolle zweimal innerhalb von 24 h. Unmittelbar vor der zweiten Injektion und 12 h später wurde den Tieren Blut aus dem retrobulbären Venengeflecht entnommen (entsprechend 24 und 36 h nach der ersten Actinonin-Injektion). Die Proben wurden zur Blutgerinnung 30 min auf Eis gelagert und dann 10 min bei 4 °C zentrifugiert (3000 U/min). Der Überstand (Serum) wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Die rBNP-Konzentration im Serum wurde mittels eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (EIA) von Bachem (Weil am Rhein, Deutschland) gemessen. Dieses Experiment wurde zusammen mit Florian Gembardt (Abt. Kardiologie und Pulmologie) am Campus Benjamin Franklin, Charité (Berlin, Deutschland), durchgeführt.

### **3.8. HPLC-Analytik**

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) gekoppelt mit UV-Detektion eignet sich hervorragend für die Analyse von Peptid-Abbau-Reaktionen, weil vor der eigentlichen Detektion die Probenbestandteile voneinander getrennt werden. Dies vermindert nicht nur UV-Absorption durch fremde Proteine, sondern ermöglicht zudem, parallel Edukte und Produkte getrennt zu erfassen. Für die HPLC wurde ein LC10-System der Firma Shimadzu GmbH (Duisburg, Deutschland) verwendet mit dem UV-Vis-Detektor UV-2075 von

Jasco (Jasco Germany, Gross-Umstadt, Deutschland) und dem Waters-Autosampler 717plus (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland). Die UV-Absorption wurde bei der Wellenlänge 216 nm (Absorption der Peptidbindung 190–230 nm) gemessen. Die Trennung erfolgte über die Reversed-Phase-Säule Nucleosil 100 C18, Länge  $\times$  Innendurchmesser 250 $\times$ 4,6 mm, Partikelgröße 5  $\mu$ m, Porengröße 100 Å der Firma VDS Optilab Chromatographie Technik GmbH (Berlin, Deutschland). Die Säule wurde auf 25 °C temperiert. Das Injektionsvolumen betrug 50  $\mu$ l. Als mobile Phase diente soweit nicht anders beschrieben ein Gemisch aus 0,1%iger Trifluoressigsäure-Lösung als Laufmittel A (LM A) und Acetonitril als Laufmittel B (LM B). Zur Auswertung der Peakflächen oder -höhen und der Retentionszeiten wurde die Shimadzu-Software CLASS-LC 10 verwendet.

Die folgende Tabelle gibt die Chromatographie-Bedingungen für die einzelnen Natriuretischen Peptide an. Falls nicht anders angegeben, wurden die Spaltprodukte der Peptide mit der gleichen Methode eluiert wie die Ausgangspeptide.

Peptid	Anteil Laufmittel B am Gesamtgemisch
hANP	Gradient 20–27 % Acetonitril in 15 min + 10 min 20 % Acetonitril
mANP	Gradient 21–28 % Acetonitril in 15 min + 10 min 21 % Acetonitril
eANP	Gradient 20–27 % Acetonitril in 15 min + 10 min 20 % Acetonitril
chANP	Gradient 20–27 % Acetonitril in 15 min + 10 min 20 % Acetonitril
Urodilatin	Gradient 20–32 % Acetonitril in 25 min + 10 min 20 % Acetonitril
hBNP	Gradient 20–27 % Acetonitril in 15 min + 10 min 20 % Acetonitril
hBNP10'G	Gradient 20–35 % Acetonitril in 25 min + 10 min 20 % Acetonitril
hBNP1–26	Gradient 18–25 % Acetonitril in 15 min + 10 min 18 % Acetonitril
hBNP9–26	Gradient 18–25 % Acetonitril in 15 min + 10 min 18 % Acetonitril
hBNP9–32	Gradient 18–25 % Acetonitril in 15 min + 10 min 18 % Acetonitril
mBNP	Gradient 20–35 % Acetonitril in 25 min + 10 min 20 % Acetonitril
rBNP	Gradient 25–40 % Acetonitril in 15 min + 10 min 25 % Acetonitril
pBNP	Gradient 25–32 % Acetonitril in 25 min + 10 min 25 % Acetonitril
CNP	Gradient 25–32 % Acetonitril in 25 min + 10 min 25 % Acetonitril

CNP10'S	Gradient 20–35 % Acetonitril in 25 min + 10 min 20 % Acetonitril
DNP	Gradient 20–27 % Acetonitril in 15 min + 10 min 20 % Acetonitril
NPchimär	Gradient 20–27 % Acetonitril in 15 min + 10 min 20 % Acetonitril

### 3.9. Massenspektrometrie

Nach der HPLC-Trennung mit UV-Detektion wurden die Abbauprodukte manuell in Glas-Röhrchen aufgefangen und anschließend mittels MALDI-TOF-MS (**M**atrix-assistierte **L**aser-**D**esorption/**I**onisation-**F**lugzeit (*time of flight*)-**A**nalysator-**M**assenspektrometrie) analysiert. Die Messungen wurden freundlicherweise von Heidi Lerch und Heike Stephanowitz (Arbeitsgruppe Massenspektrometrie, FMP) an einem Voyager-DE STR Massenspektrometer (Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Als Matrix wurde eine Lösung von 10 mg  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure in 1 ml 0,3 % Trifluoressigsäure in Acetonitril/Wasser (1:1; Vol/Vol) benutzt. 1  $\mu$ l Matrix und 1  $\mu$ l Probe wurden auf der Probenplatte kokristallisiert und durch Laserpulse angeregt. Dabei gehen die Peptide als Ionen zusammen mit der Matrixsubstanz in die Gasphase über, werden dann unter Vakuum im elektrischen Feld beschleunigt und nach dem Verhältnis Masse/Ladung ( $m/z$ ) getrennt. Mit einem Time-of-flight-Analysator wurde die Flugzeit der Ionen gemessen. Die Zuordnung der Spaltprodukte zu den ermittelten Massen erfolgte über das FindPept-Tool des ExpASy-Portals (<http://web.expasy.org/findpept/>) oder über den Peptide Mass Calculator von Peptide Synthetics (<http://www.peptidesynthetics.co.uk/tools/>). Die gefundenen Massen wurden als monoisotopisch und einfach protoniert ( $[M+H]^+$ ) interpretiert.

### 3.10. Modelling

Grundlage für die molekulardynamischen Simulationen waren die bekannten Röntgen-Strukturen von NEP komplexiert mit Phosphoramidon und weiteren Inhibitoren (PDB-Eintrag: 1DTM, 1R1I, 2QPJ) [69,70] und für die Natriuretischen Peptide ANP

(1YK0, 1ANP), BNP (1YK1) und CNP (1JDP) [18, 31, 38] gebunden an den NPR-C. Diese Strukturen ermöglichten das initiale manuelle Docking der Konformation des Natriuretischen Peptids im Zentrum der NEP. Die Ringstruktur des CNP (ohne den N-terminalen Rest) diente als Modell-Sequenz. Die hydrophobe Spaltstelle zwischen Cystein (C1') und Phenylalanin (F2') im Ring wurde an die hydrophobe Tasche der bekannten katalytischen Domäne von NEP analog zum NEP-Inhibitor Phosphoramidon gedockt. Mit den so ermittelten Bindungsstellen als Randbedingung wurden weitere homologe Modelle von Natriuretischen Peptiden mit unterschiedlich langen C- und N-terminalen Enden während molekulardynamischer Simulationen (Kraftfeld Amber 7 [19]) analog ans aktive Zentrum gedockt. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation von Dr. Gerd Krause (Abt. Structural Bioinformatics, FMP, Berlin) durchgeführt.

### **3.11. Statistik**

Statistische Auswertungen erfolgten mittels t-Test mit der Software Graphpad Prism (Version 4.03 für Windows, Graphpad Software, San Diego, Kalifornien, USA). Bei einem p-Wert  $p < 0,05$  wurden Unterschiede als signifikant angesehen. Falls nicht anders angegeben, wurden die Abweichungen vom Mittelwert als Standardabweichung (SD) angegeben.

## 4. Zusammenfassung

Die Natriuretischen Peptide sind wichtige Regulatoren des Herz-Kreislauf-Systems; ihre Erforschung dient somit auch künftigen therapeutischen Anwendungen. Ein möglicher pharmakologischer Ansatzpunkt, die Wirkung der Natriuretischen Peptide zu potenzieren, stellt die Hemmung ihrer Abbauwege dar. Die Neutrale Endopeptidase (NEP) gilt dabei als das wichtigste katabolisierende Enzym, jedoch ist die NEP-Wirkung bezogen auf das B-Typ Natriuretische Peptid (BNP) nur schwach ausgeprägt.

Das erste Ziel dieser Arbeit war eine Beschreibung der molekularen Voraussetzungen für den Abbau Natriuretischer Peptide durch die NEP. Im Ergebnis von Abbaustudien wurde ein Modell entwickelt, dass die Bindung der Natriuretischen Peptide an die NEP und die Peptid-Enzym-Interaktion im katalytischen Zentrum verifizierbar erklärt. Entscheidendes Kriterium für den unterschiedlichen Abbau der Peptide ist danach die Länge der N- und C-terminalen Aminosäureketten außerhalb der Disulfid-verknüpften Ringstruktur. Lange Ketten erschweren die Bindung des Natriuretischen Peptids an die NEP und können so den Abbau verzögern bzw. verhindern. Modifizierungen innerhalb der Ringstruktur haben dagegen marginale Auswirkungen auf den Abbau.

Die Aufklärung des raschen NEP-unabhängigen Abbaus des BNP in Membranpräparationen von Niere und Lunge war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Die Untersuchungen wurden am murinen System durchgeführt, da hier alle Voraussetzungen für zielführende Studien gegeben waren. Als entscheidendes Prinzip für diesen Abbau erwies sich eine neuartige kooperative Interaktion von zwei auf der Membran kollokalisierten Peptidasen. So erfolgt in der Nierenmembran zunächst eine Trunkierung des murinen BNP durch Meprin A, welche eine schnelle nachfolgende Inaktivierung durch die NEP ermöglicht. In der Lungenmembran ist das *Endothelin-Converting Enzyme 1* am initialen Abbau beteiligt.

Das neue Modell für die Interaktion der Natriuretischen Peptide mit der NEP und die zusätzlich aufgefundenen essentiellen Peptidasen für den BNP-Katabolismus stärken die wissenschaftliche Basis bei der Suche nach neuen Interventionsmöglichkeiten bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

## 5. Summary

Natriuretic peptides are important regulators of the circulatory system. Consequently, the investigation of these peptides is important for future therapeutic applications. One pharmacological approach for the potentiation of natriuretic peptide activity is the inhibition of enzymatic natriuretic peptide degradation. The Neutral Endopeptidase (NEP) has been generally regarded as the main catabolic enzyme for natriuretic peptides, however, the NEP effect on B-type natriuretic peptide (BNP) is less pronounced.

The first aim of this work was a description of the molecular background for the degradation of natriuretic peptides by NEP. As a result of degradation experiments, a verifiable model for the binding of natriuretic peptides to NEP and for the peptide-enzyme interaction within the catalytic centre was established. According to this model, the most critical criterion for degradation is the length of the N- and C-terminal peptide tails outside the disulfid-linked ring structure. Long tails hinder the orientation of the peptide inside the catalytic cage and lead to slow degradation or even NEP resistance. Modifications within the ring structure only marginally influence the natriuretic peptide catabolism by NEP.

The unexpected rapid degradation of BNP in membrane preparations of kidney and lung was a further subject of this study. The experiments have been performed in the murine system, as this offered all experimental requirements for the intended in-vitro and in-vivo studies. As decisive criterion for BNP degradation a novel cooperative interaction of two membrane-bound co-localised peptidases has been found. In kidney membrane murine BNP is initially truncated by meprin A; this truncation enables in a second step NEP to finally inactivate the peptide. In lung membrane endothelin-converting enzyme 1 is involved in the initial degradation.

The new model describing the interaction between NEP and natriuretic peptides as well as the additional enzymes which are essentially involved in BNP degradation improve the scientific basis for new tools in circulatory diseases.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] BECKER, M.: Einfluss der neutralen Endopeptidase auf Alzheimersche Erkrankung, Alkoholkonsum und Adipositas, Humboldt-Universität zu Berlin, Dissertation, 2006
- [2] BERG, J. A.; HAYASHI, M.; FUJII, Y.; KATZ, A. I.: Renal metabolism of atrial natriuretic peptide in the rat. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 255 (1988), Nr. 3, S. F466–F473
- [3] BERTENSHAW, G. P.; NORCUM, M. T.; BOND, J. S.: Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Nr. 4, S. 2522–2532
- [4] BERTENSHAW, G. P.; TURK, B. E.; HUBBARD, S. J.; MATTERS, G. L.; BYLANDER, J. E.; CRISMAN, J. M.; CANTLEY, L. C.; BOND, J. S.: Marked differences between metalloproteases meprin A and B in substrate and peptide bond specificity. *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), Nr. 16, S. 13248–13255
- [5] BEVAN, E. G.; CONNELL, J. M. C.; DOYLE, J.; CARMICHAEL, H. A.; DAVIES, D. L.; LORIMER, A. R.; MCINNES, G. T.: Candoxatril, a neutral endopeptidase inhibitor: efficacy and tolerability in essential hypertension. *Journal of Hypertension* 10 (1992), Nr. 7, S. 607–613
- [6] BEYNON, R. J.; BOND, J. S.: Deficiency of a kidney metalloproteinase activity in inbred mouse strains. *Science* 219 (1983), Nr. 4590, S. 1351–1353
- [7] BOCCIARDI, R.; GIORDA, R.; BUTTGEREIT, J.; GIMELLI, S.; DIVIZIA, M. T.; BERI, S.; GAROFALO, S.; TAVELLA, S.; LERONE, M.; ZUFFARDI, O.; BADER, M.; RAVAZZOLO, R.; GIMELLI, G.: Overexpression of the C-type natriuretic peptide (CNP) is associated with overgrowth and bone anomalies in an individual with balanced t(2;7) translocation. *Human Mutation* 28 (2007), Nr. 7, S. 724–731
- [8] BOERRIGTER, G.; COSTELLO-BOERRIGTER, L. C.; HARTY, G. J.; HUNTLEY, B. K.; CATALIOTTI, A.; LAPP, H.; BURNETT, J. C., Jr.: B-type natriuretic peptide 8-32, which is produced from mature BNP 1-32 by the metalloprotease meprin A, has reduced bioactivity. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 296 (2009), Nr. 6, S. R1744–R1750

- [9] DE BOLD, A. J.; BORENSTEIN, H. B.; VERESS, A. T.; SONNENBERG, H.: A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sciences* 28 (1981), Nr. 1, S. 89–94
- [10] DE BOLD, A. J.; MA, K. K.; ZHANG, Y.; DE BOLD, M. L.; BENSIMON, M.; KHOSHBATEN, A.: The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 79 (2001), Nr. 8, S. 705–714
- [11] BOND, J. S.; SHANNON, J. D.; BEYNON, R. J.: Certain mouse strains are deficient in a kidney brush-border metallo-endopeptidase activity. *Biochemical Journal* 209 (1983), Nr. 1, S. 251–255
- [12] BOTH, C.; BAS, M.; WENDLAND, R.; KOJDA, G.: Nichtallergisches Angioödem: Nebenwirkung von ACE-Hemmern. *Pharmazeutische Zeitung* 156 (2011), Nr. 34, S. 14–19
- [13] BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1976), S. 248–254
- [14] BRANDT, I.; LAMBEIR, A. M.; KETELSLEGERS, J. M.; VANDERHEYDEN, M.; SCHARPE, S.; DE MEESTER, I.: Dipeptidyl-peptidase IV converts intact B-type natriuretic peptide into its des-SerPro form. *Clinical Chemistry* 52 (2006), Nr. 1, S. 82–87
- [15] BRAUNWALD, E.; BURNETT, J. C., Jr.; COLUCCI, W. S.; MASSIE, B. M.; MCMURRAY, J. J. V.; O’CONNOR, C. M.; PACKER, M.; PIÑA, I.; PITT, B.; YOUNG, J.: *Panel of Cardiology Experts Provides Recommendations to Scios Regarding NATRECOR®*. 13. Juni 2005
- [16] CAMPBELL, D. J.: Vasopeptidase inhibition - A double-edged sword? *Hypertension* 41 (2003), Nr. 3, S. 383–389
- [17] CARONE, F. A.; PETERSON, D. R.; FLOURET, G.: Renal tubular processing of small peptide hormones. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 100 (1982), Nr. 1, S. 1–14
- [18] CARPENTER, K. A.; WILKES, B. C.; DE LÉAN, A.; FOURNIER, A.; SCHILLER, P. W.: Hydrophobic forces are responsible for the folding of a highly potent natriuretic peptide analogue at a membrane mimetic surface: An NMR study. *Biopolymers* 42 (1997), Nr. 1, S. 37–48
- [19] CASE, D. A.; PEARLMAN, D. A.; CALDWELL, J. W.; CHEATHAM III, T. E.; WANG, J.; ROSS, W. S.; SIMMERLING, C. L.; DARDEN, T. A.; MERZ, K. M.; STANTON, R. V.; CHENG, A. L.; VINCENT, J. J.; CROWLEY, M.; TSUI, V.; GOHLKE, H.; RADMER, R. J.; DUAN, Y.; PITERA, J.; MASSOVA, I.; SEIBEL, G. L.; SINGH, U. C.; WEINER, P. K.; KOLLMAN, P. A.: *AMBER 7*. San Francisco : University of California, 2002

- [20] CHAN, J. C. Y.; KNUDSON, O.; WU, F.; MORSER, J.; DOLE, W. P.; WU, Q.: Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005), Nr. 3, S. 785–790
- [21] CLERICO, A.; RECCHIA, F. A.; PASSINO, C.; EMDIN, M.: Cardiac endocrine function is an essential component of the homeostatic regulation network: physiological and clinical implications. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 290 (2006), Nr. 1, S. H17–H29
- [22] CODY, R. J.; ATLAS, S. A.; LARAGH, J. H.: Renal responses to atrial natriuretic factor in patients with congestive heart failure. *European Heart Journal* 9 Suppl H (1988), S. 29–33
- [23] CODY, R. J.; ATLAS, S. A.; LARAGH, J. H.; KUBO, S. H.; COVIT, A. B.; RYMAN, K. S.; SHAKNOVICH, A.; PONDOLFINO, K.; CLARK, M.; CAMARGO, M. J.: Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. *Journal of Clinical Investigation* 78 (1986), Nr. 5, S. 1362–1374
- [24] CORTI, R.; BURNETT, J. C., Jr.; ROULEAU, J. L.; RUSCHITZKA, F.; LÜSCHER, T. F.: Vasopeptidase inhibitors: a new therapeutic concept in cardiovascular disease? *Circulation* 104 (2001), Nr. 15, S. 1856–1862
- [25] DICKEY, D. M.; BURNETT, J. C., Jr.; POTTER, L. R.: Novel bifunctional natriuretic peptides as potential therapeutics. *Journal of Biological Chemistry* 283 (2008), Nr. 50, S. 35003–35009
- [26] DICKEY, D. M.; POTTER, L. R.: Human B-type natriuretic peptide is not degraded by meprin A. *Biochemical Pharmacology* 80 (2010), Nr. 7, S. 1007–1011
- [27] DICKEY, D. M.; POTTER, L. R.: Dendroaspis natriuretic peptide and the designer natriuretic peptide, CD-NP, are resistant to proteolytic inactivation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 51 (2011), Nr. 1, S. 67–71
- [28] DICKEY, D. M.; YODER, A. R.; POTTER, L. R.: A familial mutation renders atrial natriuretic peptide resistant to proteolytic degradation. *Journal of Biological Chemistry* 284 (2009), Nr. 29, S. 19196–19202
- [29] EMOTO, N.; YANAGISAWA, M.: Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *Journal of Biological Chemistry* 270 (1995), Nr. 25, S. 15262–15268
- [30] ESPINER, E. A.; PRICKETT, T. C.; YANDLE, T. G.; BARRELL, G. K.; WELLBY, M.; SULLIVAN, M. J.; DARLOW, B. A.: ABCs of Natriuretic Peptides: Growth. *Hormone Research* 67 Suppl 1 (2007), S. 81–90

- [31] FAIRBROTHER, W. J.; MCDOWELL, R. S.; CUNNINGHAM, B. C.: Solution conformation of an atrial natriuretic peptide variant selective for the type A receptor. *Biochemistry* 33 (1994), Nr. 30, S. 8897–8904
- [32] FELKER, G. M.; PETERSEN, J. W.; MARK, D. B.: Natriuretic peptides in the diagnosis and management of heart failure. *Canadian Medical Association Journal* 175 (2006), Nr. 6, S. 611–617
- [33] FUKAMIZU, A.; SEO, M. S.; HATAE, T.; YOKOYAMA, M.; NOMURA, T.; KATSUKI, M.; MURAKAMI, K.: Tissue-specific expression of the human renin gene in transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 165 (1989), Nr. 2, S. 826–832
- [34] GAGELMANN, M.; HOCK, D.; FORSSMANN, W. G.: Urodilatin (CDD/ANP-95-126) is not biologically inactivated by a peptidase from dog kidney cortex membranes in contrast to atrial natriuretic peptide/cardiodylatin ([alpha]-hANP/CDD-99-126). *FEBS Letters* 233 (1988), Nr. 2, S. 249–254
- [35] GANTEN, D.; WAGNER, J.; ZEH, K.; BADER, M.; MICHEL, J. B.; ZIMMERMANN, F.; RUF, P.; HILGENFELDT, U.; GANTEN, U.; KALING, M.; BACHMANN, S.; FUKAMIZU, A.; MULLINS, J. J.; MURAKAMI, K.: Species specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (1992), Nr. 16, S. 7806–7810
- [36] GUTKOWSKA, J.; JANKOWSKI, M.; LAMBERT, C.; MUKADDAM-DAHER, S.; ZINGG, H. H.; MCCANN, S. M.: Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (1997), Nr. 21, S. 11704–11709
- [37] HAYASHI, D.; KUDOH, S.; SHIOJIMA, I.; ZOU, Y.; HARADA, K.; SHIMOYAMA, M.; IMAI, Y.; MONZEN, K.; YAMAZAKI, T.; YAZAKI, Y.; NAGAI, R.; KOMURO, I.: Atrial natriuretic peptide inhibits cardiomyocyte hypertrophy through mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322 (2004), Nr. 1, S. 310–319
- [38] HE, X. L.; DUKKIPATI, A.; GARCIA, K. C.: Structural determinants of natriuretic peptide receptor specificity and degeneracy. *Journal of Molecular Biology* 361 (2006), Nr. 4, S. 698–714
- [39] HOLLENBERG, N. K.: Implications of species difference for clinical investigation: studies on the renin-angiotensin system. *Hypertension* 35 (2000), Nr. 1 Pt 2, S. 150–154
- [40] HOLMES, S. J.; ESPINER, E. A.; RICHARDS, A. M.; YANDLE, T. G.; FRAMPTON, C.: Renal, endocrine, and hemodynamic effects of human brain natriuretic peptide in normal man. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 76 (1993), Nr. 1, S. 91–96

- [41] HOLTWICK, R.; VAN EICKELS, M.; SKRYABIN, B. V.; BABA, H. A.; BUBIKAT, A.; BEGROW, F.; SCHNEIDER, M. D.; GARBERS, D. L.; KUHN, M.: Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *Journal of Clinical Investigation* 111 (2003), Nr. 9, S. 1399–1407
- [42] HU, J.; IGARASHI, A.; KAMATA, M.; NAKAGAWA, H.: Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta ); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), Nr. 51, S. 47863–47868
- [43] HULME, E. C.; BUCKLEY, N. J.: Receptor preparation for binding studies. HULME, E. C. (Hrsg.): *Receptor-Ligand Interactions; A Practical Approach* Bd. 92. Oxford : Oxford University Press, 1992, S. 177–212
- [44] INOUE, K.; NARUSE, K.; YAMAGAMI, S.; MITANI, H.; SUZUKI, N.; TAKEI, Y.: Four functionally distinct C-type natriuretic peptides found in fish reveal evolutionary history of the natriuretic peptide system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (2003), Nr. 17, S. 10079–10084
- [45] JALAL, F.; LEMAY, G.; ZOLLINGER, M.; BERTELOOT, A.; BOILEAU, G.; CRINE, P.: Neutral endopeptidase, a major brush border protein of the kidney proximal nephron, is directly targeted to the apical domain when expressed in Madin-Darby canine kidney cells. *Journal of Biological Chemistry* 266 (1991), Nr. 29, S. 19826–19832
- [46] KENNY, A. J.; BOURNE, A.; INGRAM, J.: Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilation, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11. *Biochemical Journal* 291 (1993), S. 83–88
- [47] KENNY, A. J.; FULCHER, I. S.; RIDGWELL, K.; INGRAM, J.: Microvillar membrane neutral endopeptidases. *Acta Biologica et Medica Germanica* 40 (1981), Nr. 10-11, S. 1465–1471
- [48] KENNY, A. J.; INGRAM, J.: Proteins of the kidney microvillar membrane. Purification and properties of the phosphoramidon-insensitive endopeptidase ('endopeptidase-2') from rat kidney. *Biochemical Journal* 245 (1987), Nr. 2, S. 515–524
- [49] KNOWLES, J. W.; ESPOSITO, G.; MAO, L.; HAGAMAN, J. R.; FOX, J. E.; SMITHIES, O.; ROCKMAN, H. A.; MAEDA, N.: Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation* 107 (2001), Nr. 8, S. 975–984
- [50] KOSTIS, J. B.; COBBE, S.; JOHNSTON, C.; FORD, I.; MURPHY, M.; WEBER, M. A.; BLACK, H. R.; PLOUIN, P. F.; LEVY, D.; MANCIA, G.

- G.; LAROCHELLE, P.; KOLLOCH, R. E.; ALDERMAN, M.; RUILOPE, L. M.; DAHLOF, B.; FLACK, J. M.; WOLF, R.: Design of the Omapatrilat in Persons with Enhanced Risk of Atherosclerotic events (OPERA) trial. *American Journal of Hypertension* 15 (2002), Nr. 2 Pt 1, S. 193–198
- [51] KOSTIS, J. B.; PACKER, M.; BLACK, H. R.; SCHMIEDER, R.; HENRY, D.; LEVY, E.: Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the Omapatrilat Cardiovascular Treatment vs. Enalapril (OCTAVE) trial. *American Journal of Hypertension* 17 (2004), Nr. 2, S. 103–111
- [52] KRUSE, M. N.; BECKER, C.; LOTTAZ, D.; KÖHLER, D.; YIALLOUROS, I.; KRELL, H. W.; STERCHI, E. E.; STÖCKER, W.: Human meprin alpha and beta homo-oligomers: cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloprotease inhibitors. *Biochemical Journal* 378 (2004), S. 383–389
- [53] KUNDU, G. C.; WILSON, I. B.: Identification of endothelin converting enzyme in bovine lung membranes using a new fluorogenic substrate. *Life Sciences* 50 (1992), Nr. 13, S. 965–970
- [54] LABRECQUE, J.; MC NICOLL, N.; MARQUIS, M.; DE LÉAN, A.: A disulfide-bridged mutant of natriuretic peptide receptor-A displays constitutive activity. Role of receptor dimerization in signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), Nr. 14, S. 9752–9759
- [55] LISY, O.; HUNTLEY, B. K.; MCCORMICK, D. J.; KURLANSKY, P. A.; BURNETT, J. C., Jr.: Design, synthesis, and actions of a novel chimeric natriuretic peptide: CD-NP. *Journal of the American College of Cardiology* 52 (2008), Nr. 1, S. 60–68
- [56] LUCAS, K. A.; PITARI, G. M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S.; CHEPENIK, K. P.; WALDMAN, S. A.: Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological Reviews* 52 (2000), Nr. 3, S. 375–414
- [57] LUCHNER, A.; HOLMER, S.; SCHUNKERT, H.; RIEGGER, G. A.: Bedeutung der Herzinsuffizienzmarker BNP und NT-proBNP für die Klinik. *Deutsches Ärzteblatt* 100 (2003), Nr. 50, S. A3314–A3321
- [58] MARIN-GREZ, M.; FLEMING, J. T.; STEINHAUSEN, M.: Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* 324 (1986), Nr. 6096, S. 473–476
- [59] MISONO, K. S.; FUKUMI, H.; GRAMMER, R. T.; INAGAMI, T.: Rat atrial natriuretic factor: complete amino acid sequence and disulfide linkage essential for biological activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 119 (1984), Nr. 2, S. 524–529

- [60] MITROVIC, V.; LÜSS, H.; NITSCHKE, K.; FORSSMANN, K.; MARONDE, E.; FRICKE, K.; FORSSMANN, W. G.; MEYER, M.: Effects of the renal natriuretic peptide urodilatin (ularitide) in patients with decompensated chronic heart failure: a double-blind, placebo-controlled, ascending-dose trial. *American Heart Journal* 150 (2005), Nr. 6, S. 1239.e1–1239.e8
- [61] MITROVIC, V.; SEFEROVIC, P. M.; SIMEUNOVIC, D.; RISTIC, A. D.; MIRIC, M.; MOISEYEV, V. S.; KOBALAVA, Z.; NITSCHKE, K.; FORSSMANN, W. G.; LUSS, H.; MEYER, M.: Haemodynamic and clinical effects of ularitide in decompensated heart failure. *European Heart Journal* 27 (2006), Nr. 23, S. 2823–2832
- [62] MÄNTYMAA, P.; VUOLTEENAHO, O.; MARTTILA, M.; RUSKOAHO, H.: Atrial stretch induces rapid increase in brain natriuretic peptide but not in atrial natriuretic peptide gene expression in vitro. *Endocrinology* 133 (1993), Nr. 3, S. 1470–1473
- [63] MORO, C.; BERLAN, M.: Cardiovascular and metabolic effects of natriuretic peptides. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 20 (2006), Nr. 1, S. 41–49
- [64] MORO, C.; CRAMPES, F.; SENGENES, C.; DE GLISEZINSKI, I.; GALITZKY, J.; THALAMAS, C.; LAFONTAN, M.; BERLAN, M.: Atrial natriuretic peptide contributes to the physiological control of lipid mobilization in humans. *FASEB Journal* 18 (2004), Nr. 3, S. 908–910
- [65] MORO, C.; GALITZKY, J.; SENGENES, C.; CRAMPES, F.; LAFONTAN, M.; BERLAN, M.: Functional and pharmacological characterization of the natriuretic peptide-dependent lipolytic pathway in human fat cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308 (2004), Nr. 3, S. 984–992
- [66] NESHER, M.; VACHUTINSKY, Y.; FRIDKIN, G.; SCHWARZ, Y.; SASSON, K.; FRIDKIN, M.; SHECHTER, Y.; LICHTSTEIN, D.: Reversible pegylation prolongs the hypotensive effect of atrial natriuretic peptide. *Bioconjugate Chemistry* 19 (2008), Nr. 1, S. 342–348
- [67] NORMAN, J. A.; LITTLE, D.; BOLGAR, M.; DI DONATO, G.: Degradation of brain natriuretic peptide by neutral endopeptidase: species specific sites of proteolysis determined by mass spectrometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175 (1991), Nr. 1, S. 22–30
- [68] O'CONNELL, J. E.; JARDINE, A. G.; DAVIDSON, G.; CONNELL, J. M. C.: Candoxatril, an orally active neutral endopeptidase inhibitor, raises plasma atrial natriuretic factor and is natriuretic in essential hypertension. *Journal of Hypertension* 10 (1992), Nr. 3, S. 271–277
- [69] OEFNER, C.; D'ARCY, A.; HENNIG, M.; WINKLER, F. K.; DALE, G. E.: Structure of human neutral endopeptidase (nepilysin) complexed with phosphoramidon. *Journal of Molecular Biology* 296 (2000), Nr. 2, S. 341–349

- [70] OEFNER, C.; ROQUES, B. P.; FOURNIE-ZALUSKI, M. C.; DALE, G. E.: Structural analysis of neprilysin with various specific and potent inhibitors. *Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography* 60 (2004), S. 392–396
- [71] OLINS, G. M.; SPEAR, K. L.; SIEGEL, N. R.; ZURCHER-NEELY, H. A.: Inactivation of atrial natriuretic factor by the renal brush border. *Biochimica et Biophysica Acta* 901 (1987), Nr. 1, S. 97–100
- [72] OLNEY, R. C.: C-type natriuretic peptide in growth: a new paradigm. *Growth Hormone and IGF Research* 16 Suppl A (2006), S. S6–S14
- [73] PACKER, M.; CALIFF, R. M.; KONSTAM, M. A.; KRUM, H.; MCMURRAY, J. J.; ROULEAU, J. L.; SWEDBERG, K.: Comparison of omapatrilat and enalapril in patients with chronic heart failure: the Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events (OVERTURE). *Circulation* 106 (2002), Nr. 8, S. 920–926
- [74] PHILIPP, S.; DIETZ, R.; WILLENBROCK, R.: OCTAVE und OPERA: Missklänge der Hypertonietherapie? *Herz* 29 (2004), Nr. 3, S. 266–270
- [75] POTTER, L. R.; YODER, A. R.; FLORA, D. R.; ANTOS, L. K.; DICKEY, D. M.: Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. SCHMIDT, H. H. H. W. (Hrsg.); HOFMANN, F. (Hrsg.); STASCH, J. P. (Hrsg.): *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications; Handbook of Experimental Pharmacology* Bd. 191. Berlin, Heidelberg : Springer, 2009, S. 341–366
- [76] POULSEN, K.; HABER, E.; BURTON, J.: On the specificity of human renin. Studies with peptide inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta* 452 (1976), Nr. 2, S. 533–537
- [77] RAHFELD, J.; SCHIERHORN, M.; HARTRODT, B.; NEUBERT, K.; HEINS, J.: Are diprotin A (Ile-Pro-Ile) and diprotin B (Val-Pro-Leu) inhibitors or substrates of dipeptidyl peptidase IV? *Biochimica et Biophysica Acta* 1076 (1991), Nr. 2, S. 314–316
- [78] RICHARDS, A. M.; WITTEG, G. A.; ESPINER, E. A.; YANDLE, T. G.; IKRAM, H.; FRAMPTON, C.: Effect of inhibition of endopeptidase 24.11 on responses to angiotensin II in human volunteers. *Circulation Research* 71 (1992), Nr. 6, S. 1501–1507
- [79] ROBERT-KOCH-INSTITUT (Hrsg.): *Gesundheit in Deutschland, Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Berlin : Robert-Koch-Institut, www.gbe-bund.de, 2006
- [80] ROBL, J. A.; SULSKY, R.; SIEBER-MCMMASTER, E.; RYONO, D. E.; CIMARUSTI, M. P.; SIMPKINS, L. M.; KARANEWSKY, D. S.; CHAO, S.; ASAAD, M. M.; SEYMOUR, A. A.; FOX, M.; SMITH, P. L.; TRIPPODO, N. C.: Vasopeptidase inhibitors: incorporation of geminal and spirocyclic

- substituted azepinones in mercaptoacyl dipeptides. *Journal of Medicinal Chemistry* 42 (1999), Nr. 2, S. 305–311
- [81] ROSE, R. A.; GILES, W. R.: Natriuretic peptide C receptor signalling in the heart and vasculature. *Journal of Physiology* 586 (2008), Nr. 2, S. 353–366
- [82] ROULEAU, J. L.; PFEFFER, M. A.; STEWART, D. J.; ISAAC, D.; SESTIER, F.; KERUT, E. K.; PORTER, C. B.; PROULX, G.; QIAN, C.; BLOCK, A. J.: Comparison of vasopeptidase inhibitor, omapatrilat, and lisinopril on exercise tolerance and morbidity in patients with heart failure: IMPRESS randomised trial. *Lancet* 356 (2000), Nr. 9230, S. 615–620
- [83] SACKNER-BERNSTEIN, J. D.; KOWALSKI, M.; FOX, M.; AARONSON, K.: Short-term risk of death after treatment with nesiritide for decompensated heart failure: a pooled analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 293 (2005), Nr. 15, S. 1900–1905
- [84] SACKNER-BERNSTEIN, J. D.; SKOPICKI, H. A.; AARONSON, K. D.: Risk of worsening renal function with nesiritide in patients with acutely decompensated heart failure. *Circulation* 111 (2005), Nr. 12, S. 1487–1491
- [85] SAWADA, Y.; SUDA, M.; YOKOYAMA, H.; KANDA, T.; SAKAMAKI, T.; TANAKA, S.; NAGAI, R.; ABE, S.; TAKEUCHI, T.: Stretch-induced hypertrophic growth of cardiocytes and processing of brain-type natriuretic peptide are controlled by proprotein-processing endoprotease furin. *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), Nr. 33, S. 20545–20554
- [86] SCHULZ-KNAPPE, P.; FORSSMANN, K.; HERBST, F.; HOCK, D.; PIPKORN, R.; FORSSMANN, W. G.: Isolation and structural analysis of urodlatin, a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klinische Wochenschrift* 66 (1988), Nr. 17, S. 752–759
- [87] SCHWEITZ, H.; VIGNE, P.; MOINIER, D.; FRELIN, C.; LAZDUNSKI, M.: A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*dendroaspis-angusticeps*). *Journal of Biological Chemistry* 267 (1992), Nr. 20, S. 13928–13932
- [88] SHIMIZU, H.; MASUTA, K.; AONO, K.; ASADA, H.; SASAKURA, K.; TAMAKI, M.; SUGITA, K.; YAMADA, K.: Molecular forms of human brain natriuretic peptide in plasma. *Clinica Chimica Acta* 316 (2002), Nr. 1-2, S. 129–135
- [89] SILBERBACH, M.; ROBERTS, C. T., Jr.: Natriuretic peptide signalling - Molecular and cellular pathways to growth regulation. *Cellular Signalling* 13 (2001), Nr. 4, S. 221–231
- [90] SKIDGEL, R. A.; ERDOS, E. G.: The broad substrate specificity of human angiotensin I converting enzyme. *Clinical and Experimental Hypertension. Part A, Theory and Practice* 9 (1987), Nr. 2-3, S. 243–259

- [91] SMITH, M. W.; ESPINER, E. A.; YANDLE, T. G.; CHARLES, C. J.; RICHARDS, A. M.: Delayed metabolism of human brain natriuretic peptide reflects resistance to neutral endopeptidase. *Journal of Endocrinology* 167 (2000), Nr. 2, S. 239–246
- [92] STEPHENSON, S. L.; KENNY, A. J.: The hydrolysis of alpha-human atrial-natriuretic-peptide by pig-kidney microvillar membranes is initiated by endopeptidase-24.11. *Biochemical Journal* 243 (1987), Nr. 1, S. 183–187
- [93] STEPHENSON, S. L.; KENNY, A. J.: The metabolism of neuropeptides. Hydrolysis of peptides by the phosphoramidon-insensitive rat kidney enzyme 'endopeptidase-2' and by rat microvillar membranes. *Biochemical Journal* 255 (1988), Nr. 1, S. 45–51
- [94] SUDOH, T.; KANGAWA, K.; MINAMINO, N.; MATSUO, H.: A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332 (1988), Nr. 6159, S. 78–81
- [95] SUDOH, T.; MINAMINO, N.; KANGAWA, K.; MATSUO, H.: C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 168 (1990), Nr. 2, S. 863–870
- [96] SUGA, S. I.; NAKAO, K.; HOSODA, K.; MUKOYAMA, M.; OGAWA, Y.; SHIRAKAMI, G.; ARAI, H.; SAITO, Y.; KAMBAYASHI, Y.; INOUE, K.; IMURA, H.: Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 130 (1992), Nr. 1, S. 229–239
- [97] SUWA, M.; SEINO, Y.; NOMACHI, Y.; MATSUKI, S.; FUNAHASHI, K.: Multicenter prospective investigation on efficacy and safety of carperitide for acute heart failure in the 'real world' of therapy. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society* 69 (2005), Nr. 3, S. 283–290
- [98] TAMURA, N.; OGAWA, Y.; CHUSHO, H.; NAKAMURA, K.; NAKAO, K.; SUDA, M.; KASAHARA, M.; HASHIMOTO, R.; KATSUURA, G.; MUKOYAMA, M.; ITOH, H.; SAITO, Y.; TANAKA, I.; OTANI, H.; KATSUKI, M.; NAKAO, K.: Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (2000), Nr. 8, S. 4239–4244
- [99] TANG, J.; WEBBER, R. J.; CHANG, D.; CHANG, J. K.; KIANG, J.; WEI, E. T.: Depressor and natriuretic activities of several atrial peptides. *Regulatory Peptides* 9 (1984), Nr. 1-2, S. 53–59
- [100] TRACHTMAN, H.; VALDERRAMA, E.; DIETRICH, J. M.; BOND, J. S.: The role of meprin A in the pathogenesis of acute renal failure. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 208 (1995), Nr. 2, S. 498

- [101] TSURUDA, T.; BOERRIGTER, G.; HUNTLEY, B. K.; NOSER, J. A.; CATALIOTTI, A.; COSTELLO-BOERRIGTER, L. C.; CHEN, H. H.; BURNETT, J. C., Jr.: Brain natriuretic peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. *Circulation Research* 91 (2002), Nr. 12, S. 1127–1134
- [102] UMEKAWA, K.; HASEGAWA, H.; TSUTSUMI, Y.; SATO, K.; MATSUMURA, Y.; OHASHI, N.: Pharmacological characterization of a novel sulfonylureid-pyrazole derivative, SM-19712, a potent nonpeptidic inhibitor of endothelin converting enzyme. *Japanese Journal of Pharmacology* 84 (2000), Nr. 1, S. 7–15
- [103] VANNESTE, Y.; MICHEL, A.; DIMALINE, R.; NAJDOVSKI, T.; DESCHODT-LANCKMAN, M.: Hydrolysis of alpha-human atrial natriuretic peptide in vitro by human kidney membranes and purified endopeptidase-24.11. Evidence for a novel cleavage site. *Biochemical Journal* 254 (1988), Nr. 2, S. 531–537
- [104] VILLA, J. P.; BERTENSHAW, G. P.; BOND, J. S.: Critical amino acids in the active site of meprin metalloproteinases for substrate and peptide bond specificity. *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Nr. 43, S. 42545–42550
- [105] VOGT-SCHADEN, M.; GAGELMANN, M.; HOCK, D.; HERBST, F.; FORSSMANN, W. G.: Degradation of porcine brain natriuretic peptide (pBNP-26) by endoprotease-24.11 from kidney cortical membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 161 (1989), Nr. 3, S. 1177–1183
- [106] WALTHER, T.; ALBRECHT, D.; BECKER, M.; SCHUBERT, M.; KOUZNETSOVA, E.; WIESNER, B.; MAUL, B.; SCHLIEBS, R.; GRECKSCH, G.; FURKERT, J.; STERNER-KOCK, A.; SCHULTHEISS, H. P.; BECKER, A.; SIEMS, W. E.: Improved learning and memory in aged mice deficient in amyloid beta-degrading neutral endopeptidase. *PloS one* 4 (2009), Nr. 2, S. e4590
- [107] WATANABE, Y.; NAKAJIMA, K.; SHIMAMORI, Y.; FUJIMOTO, Y.: Comparison of the hydrolysis of the three types of natriuretic peptides by human kidney neutral endopeptidase 24.11. *Biochemical and Molecular Medicine* 61 (1997), Nr. 1, S. 47–51
- [108] WEI, C. M.; KIM, C. H.; MILLER, V. M.; BURNETT, J. C., Jr.: Vasopressin peptide: a unique synthetic natriuretic and vasorelaxing peptide. *Journal of Clinical Investigation* 92 (1993), Nr. 4, S. 2048–2052
- [109] WEIDMANN, P.; HASLER, L.; GNÄDINGER, M. P.; LANG, R. E.; UEHLINGER, D. E.; SHAW, S.; RASCHER, W.; REUBI, F. C.: Blood levels and renal effects of atrial natriuretic peptide in normal man. *Journal of Clinical Investigation* 77 (1986), Nr. 3, S. 734–742

- [110] WINKLER, A.; ROTTMANN, M.; HEDER, G.; HYYTIA, P.; SIEMS, W. E.; MELZIG, M. F.: Gene expression and activity of specific opioid-degrading enzymes in different brain regions of the AA and ANA lines of rats. *Biochimica et Biophysica Acta* 1406 (1998), Nr. 3, S. 219–227
- [111] WOODARD, G. E.; LI, X.; BROWN, J.; ROSADO, J. A.: Receptor subtypes for vasopressin peptide in renal glomeruli and arteries. *Regulatory Peptides* 129 (2005), Nr. 1-3, S. 183–189
- [112] WU, C.; WU, F.; PAN, J.; MORSER, J.; WU, Q.: Furin-mediated processing of pro-C-type natriuretic peptide. *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Nr. 28, S. 25847–25852
- [113] WU, F.; YAN, W.; PAN, J.; MORSER, J.; WU, Q.: Processing of pro-atrial natriuretic peptide by corin in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), Nr. 19, S. 16900–16905
- [114] YAMAGUCHI, T.; KIDO, H.; FUKASE, M.; FUJITA, T.; KATUNUMA, N.: A membrane-bound metallo-endopeptidase from rat kidney hydrolyzing parathyroid hormone. Purification and characterization. *European Journal of Biochemistry* 200 (1991), Nr. 2, S. 563–571
- [115] YAMAGUCHI, T.; KIDO, H.; KATUNUMA, N.: A membrane-bound metallo-endopeptidase from rat-kidney. Characteristics of its hydrolysis of peptide-hormones and neuropeptides. *European Journal of Biochemistry* 204 (1992), Nr. 2, S. 547–552
- [116] YAN, W.; WU, F.; MORSER, J.; WU, Q.: Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (2000), Nr. 15, S. 8525–8529

# A. Anhang

## A.1. Publikationen

WALTHER, T.; STEPAN, H.; PANKOW, K.; GEMBARDT, F.; FABER, R.; SCHULTHEISS, H. P.; SIEMS, W. E.: Relation of ANP and BNP to their N-terminal fragments in fetal circulation: evidence for enhanced neutral endopeptidase activity and resistance of BNP to neutral endopeptidase in the fetus. *BJOG : an International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 111 (2004), Nr. 5, S. 452–455

(<http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0528.2004.00123.x>)

WALTHER, T.; STEPAN, H.; PANKOW, K.; BECKER, M.; SCHULTHEISS, H. P.; SIEMS, W. E.: Biochemical analysis of neutral endopeptidase activity reveals independent catabolism of atrial and brain natriuretic peptide. *Biological Chemistry* 385 (2004), Nr. 2, S. 179–184

(<http://dx.doi.org/10.1515/BC.2004.036>)

MAUL, B.; KRAUSE, W.; PANKOW, K.; BECKER, M.; GEMBARDT, F.; ALENINA, N.; WALTHER, T.; BADER, M.; SIEMS, W. E.: Central angiotensin II controls alcohol consumption via its AT1 receptor. *The FASEB Journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (2005), Nr. 11, S. 1474–1481

(<http://dx.doi.org/10.1096/fj.05-3742com>)

PANKOW, K.; WANG, Y.; GEMBARDT, F.; KRAUSE, E.; SUN, X.; KRAUSE, G.; SCHULTHEISS, H. P.; SIEMS, W. E.; WALTHER, T.: Successive action of meprin A and neprilysin catabolizes B-type natriuretic peptide. *Circulation Research* 101 (2007), Nr. 9, S. 875–882

(<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.153585>)

SUN, X.; WIESNER, B.; LORENZ, D.; PAPSDORF, G.; PANKOW, K.; WANG, P.; DIETRICH, N.; SIEMS, W. E.; MAUL, B.: Interaction of angiotensin-converting enzyme (ACE) with membrane-bound carboxypeptidase M (CPM) - a new function of ACE. *Biological Chemistry* 389 (2008), Nr. 12, S. 1477–1485

(<http://dx.doi.org/10.1515/BC.2008.168>)

SUN, X.; BECKER, M.; PANKOW, K.; KRAUSE, E.; RINGLING, M.; BEYERMANN, M.; MAUL, B.; WALTHER, T.; SIEMS, W. E.: Catabolic attacks of membrane-bound angiotensin-converting enzyme on the N-terminal part of species-specific amyloid-beta peptides. *European Journal of Pharmacology* 588

(2008), Nr. 1, S. 18–25  
(<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.058>)

PANKOW, K.; SCHWIEBS, A.; BECKER, M.; SIEMS, W. E.; KRAUSE, G.; WALTHER, T.: Structural substrate conditions required for neutral endopeptidase-mediated natriuretic peptide degradation. *Journal of Molecular Biology* 393 (2009), Nr. 2, S. 496–503  
(<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.08.025>)

SUN, X.; RENTZSCH, B.; GONG, M.; EICHHORST, J.; PANKOW, K.; PAPSDORF, G.; MAUL, B.; BADER, M.; SIEMS, W. E.: Signal transduction in CHO cells stably transfected with domain-selective forms of murine ACE. *Biological Chemistry* 391 (2010), Nr. 2-3, S. 235–244  
(<http://dx.doi.org/10.1515/BC.2010.020>)

## A.2. Ausgewählte Tagungsbeiträge

PANKOW, K.; BECKER, M.; DIEHL, A.; KRAUSE, W.; MAUL, B.; WALTHER, T.; SIEMS, W. E.: Importance of neutral endopeptidase (NEP) on the catabolism of natriuretic peptides - In-vitro experiments with NEP-deficient mice.

44. *Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie* in Mainz, Deutschland, 17.–20. März 2003

PANKOW, K.; BECKER, M.; KRAUSE, G.; DIEHL, A.; WALTHER, T.; SIEMS, W. E.: Sequence differences in the natriuretic peptides influence their catabolism by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11).

45. *Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie* in Mainz, Deutschland, 9.–11. März 2004

PANKOW, K.; SUN, X.; KRAUSE, G.; DIEHL, A.; WALTHER, T.; SIEMS, W. E.: New natriuretic peptide-degrading enzymes?

46. *Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie* in Mainz, Deutschland, 15.–17. März 2005

PANKOW, K.; SUN, X.; KRAUSE, G.; WALTHER, T.; SIEMS, W. E.: Meprin A is involved in the degradation of brain natriuretic peptide (BNP) in mice *Hypertonie 2005* in Berlin, Deutschland, 23.–25. November 2005

PANKOW, K.; SUN, X.; KRAUSE, G.; WALTHER, T.; SIEMS, W. E.: Meprin A truncates the N-terminus of B-type natriuretic peptide in kidney.

47. *Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie* in Mainz, Deutschland, 4.–6. April 2006

PANKOW, K.; KRAUSE, G.; WANG, Y.; GEMBARDT, F.; SIEMS, W. E.; WALTHER, T.: Natriuretic Peptide Catabolism – A Closer Look. *Pharmaceutical Sciences World Congress* in Amsterdam, Niederlande, 22.–25. April 2007

PANKOW, K.; KRAUSE, G.; BECKER, M.; WALTHER, T.; SIEMS, W. E.: Structural features for natriuretic peptide degradation by neutral endopeptidase. *49. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie* in Mainz, Deutschland, 11.–13. März 2008

### A.3. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Wolf-Eberhard Siems, weil er mir die Möglichkeit gab, wissenschaftlich zu arbeiten. Meine Tätigkeit in Deinem Team war für mich eine schöne und lehrreiche Zeit. Vielen Dank für Dein Vertrauen und für die vielen guten Diskussionen und Gespräche.

Bei Prof. Dr. Matthias F. Melzig möchte ich mich ganz herzlich für die externe Betreuung meiner Arbeit bedanken. Vielen Dank für Ihre Unterstützung.

Prof. Dr. Thomas Walther möchte ich für die wegweisenden Anregungen, die dem Projekt stets neue Impulse gaben, danken. Seinen Mitarbeitern Florian Gembardt und Wang Yong danke ich für die erfolgreiche Kooperation.

Ebenso möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Leibniz-Instituts für Molekulare Pharmakologie (FMP) bedanken, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben, ganz besonders bei Dr. Gerd Krause für die Kooperation bei der Erstellung des Strukturmodells, bei Heidi Lerch und Heike Stephanowitz für die Hilfe bei der Massenspektrometrie und natürlich bei allen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Biochemische Neurobiologie für die stets gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Atmosphäre. Bei Matthias möchte ich mich besonders für die Unterstützung in der Anfangsphase meines Projektes bedanken.

Dass ich an meine Zeit am FMP so gern zurückdenke, verdanke ich auch den gemeinsamen Unternehmungen mit anderen Doktoranden. Ich danke besonders Johanna, Vivien und Janina für die vielen schönen Gespräche und für die Entdeckung meines Lauftalents. Johanna danke ich auch für die Starthilfe mit dem Textsatzprogramm LaTeX.

Ein großer Dank gilt meiner Familie und besonders Thomas für die moralische Unterstützung sowie dem Apotheken-Team für die Ermöglichung von Freiräumen für die Fertigstellung der Dissertationsschrift.

## **A.4. Lebenslauf**

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

## **A.5. Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.