

# Suche, Reinigung und Identifizierung von Urotensin-II-generierenden Enzymen in humanem Plasma

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sandra I. Kurzawski  
aus Berlin

November 2007

# Freie Universität Berlin

Gutachter zur Dissertation von Sandra Kurzawski

## 1. Gutachter:

Hartmut Schlüter  
(Name)

Nephrologie CBF  
Abteilung: Proteinanalytik  
Postadresse:  
Institut für Physiologie CCM  
(Institut)

Tucholskystr. 2  
(Straße)

10117 Berlin  
(PLZ, Ort)

Hartmut.Schlueter@charite.de  
(E-Mail)

030 / 450 514 891  
(Telefon)

## 2. Gutachter:

Petra Knaus  
(Name)

Institut für Biochemie  
(Institut)

Thielallee 63  
(Straße)

14195 Berlin  
(PLZ, Ort)

knaus@chemie.fu-berlin.de  
(E-Mail)

8385 2935  
(Telefon)

Disputation am 27.02. 2008

Meiner Familie gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

- 1 Einleitung
- 2 Material und Methode
  - 2.1 Material und Geräte
  - 2.2 Methode
    - 2.2.1 Reinigungs-Strategie
    - 2.2.2 Entwicklung eines Massenspektrometrie-basierten Enzym-Screening Systems (MES-System) zur Detektion einer UCE-Aktivität
    - 2.2.3 Suche nach geeigneten chromatographischen Parametern zur Proteinreinigung (PPS)
    - 2.2.4 Gewinnung von Plasma aus humanem Blut
    - 2.2.5 Suche einer UCE-Aktivität in unterschiedlichen humanen Cohn-Fractionen mit dem MES-UCE-Assay
  - 2.3 Reinigung des UCE
    - 2.3.1 Suche nach geeigneten Parametern zur chromatographischen Reinigung des UCE mit dem PPS-System
    - 2.3.2 Erste chromatographische Reinigung mittels Anionenaustausch-Sample Displacement-Chromatographie zur Anreicherung des UCE
    - 2.3.3 Suche nach geeigneten Parametern für die zweite chromatographische Reinigung des UCE
    - 2.3.4 Zweite chromatographische Reinigung des UCE mittels Hydrophober Interaktions-Chromatographie
    - 2.3.5 Suche nach chromatographischen Parametern für die dritte chromatographische Reinigung des UCE
    - 2.3.6 Dritte chromatographische Reinigung des UCE mittels Kationenaustausch-Chromatographie
    - 2.3.7 Charakterisierungsversuche des UCE mittels Proteaseinhibitoren
    - 2.3.8 Vierte chromatographische Reinigung des UCE mittels Größenausschluss-Chromatographie
  - 2.4 Identifizierung der Fraktionen mit UCE-Aktivitäten
    - 2.4.1 Tryptischer Verdau der Fraktionen mit UCE-Aktivitäten aus der Größenausschluss-Chromatographie
    - 2.4.2 Tryptischer Verdau einer kommerziellen Komplement-Faktor-I-Präparation
    - 2.4.3 Identifizierung der tryptisch verdauten Peptide der Fraktionen 4, 5 und 6 aus der Größenausschluss-Chromatographie mittels LC-ESI MS/MS

- 2.5 Nachweis einer UCE-Aktivität der Fraktion 5 und des Komplement-Faktors-I mittels MES-System
  - 2.6 Nachweis der Hydrolyse eines Komplement-Faktor-I-Substrats durch die Fraktion 5 mittels eines Fluoreszenz-basierenden Enzymassays
  - 2.7 Charakterisierungsversuche O- bzw. N-glykosidisch gebundener Oligosaccharide der gereinigten Fraktion 5 im Vergleich mit der Komplement-Faktor-I-Präparation
  - 2.8 Charakterisierungsversuche der Fraktion 5 und der kommerziellen Komplement-Faktor-I-Präparation mit den Serinprotease-Inhibitoren Aprotinin und Pefabloc SC
- ### 3 Ergebnisteil
- 3.1 Übersicht
    - 3.1.1 Herstellung und Reinigung eines UCE-Substrats für den Nachweis der Ull-generierenden Aktivität mittels MES-UCE-Assay
    - 3.1.2 Etablierung eines Systems zum Nachweis einer UCE-Aktivität
    - 3.1.3 Suche nach UCE-Aktivität in humanem Plasma
    - 3.1.4 Bestimmung des Molekulargewichts von UCE aus humanem Plasma
    - 3.1.5 Suche einer UCE-Aktivität in einer humanen Plasma Cohn-Fraktion
  - 3.2 Reinigungsschema des UCE aus einer humanen Cohn-IV-Fraktion aus humanem Plasma
    - 3.2.1 Suche nach chromatographischen Parametern für die Anreicherung des UCE
    - 3.2.2 Anreicherung des UCE mittels Anionenaustausch-SDC
    - 3.2.3 Suche nach geeigneten Parametern für den zweiten chromatographischen Reinigungsschritt des UCE
    - 3.2.4 Chromatographische Reinigung des UCE mittels Hydrophober Interaktions-Chromatographie
    - 3.2.5 Suche nach chromatographischen Parametern für die dritte chromatographische Reinigung des UCE
    - 3.2.6 Chromatographische Reinigung des UCE mittels Kationenaustausch-Chromatographie
    - 3.2.7 Charakterisierung der Protease UCE mittels Proteaseinhibitoren
    - 3.2.8 Reinigung des UCE mit einer Größenausschluss-Chromatographie
  - 3.3 Identifizierung
    - 3.3.1 Identifizierung der tryptisch verdauten Peptide der Ull-generierenden Fraktionen der Größenausschluss-Chromatographie mittels LC-ESI MS/MS
    - 3.3.2 LC-ESI MS/MS Analyse der tryptisch verdauten Peptide der kommerziellen Präparation des humanen Komplement-Faktors-I
    - 3.3.3 Vergleich der AS-Sequenzen der tryptischen Peptide der kommerziellen Präparation des humanen Komplement-Faktors-I und der Fraktion 5

- 3.4 Nachweis einer UCE-Aktivität der Fraktion 5 und des Komplement Faktors-I mittels MES-UCE-Assay
- 3.5 Nachweis der Komplement-Faktor-I-typischen Aktivität der Fraktion 5 mittels eines Fluoreszenz-basierten Enzymassays
- 3.6 Charakterisierungsversuche O- bzw. N-glykosidisch gebundener Oligosaccharide der gereinigten Fraktion 5 im Vergleich mit der Komplement-Faktor-I-Präparation
- 3.7 Versuche zur Inhibition der gereinigten Fraktion 5 und der kommerziellen Komplement-Faktor-I-Präparation mit dem Serinproteaseinhibitor Aprotinin
- 3.8 Versuche zur Inhibition der gereinigten Fraktion 5 und der kommerziellen Komplement-Faktor-I-Präparation mit dem Serinproteaseinhibitor Pefabloc SC
- 4 Diskussion
- 5 Zusammenfassung
- 6 Summary
- 7 Literaturverzeichnis
- 8 Abkürzungen
- 9 Anhang
- 10 Erfolgte Publikationen
  - 10.1 Artikel
  - 10.2 Patent
- 11 Danksagung