

## 1 Einleitung

Urotensin-II (UII) wurde vor über 30 Jahren aus dem Rückenmark eines Teleost-Fisches isoliert (Pearson et al. 1980). Das Peptid wurde als Hormon des neurosekretorischen Systems klassifiziert. Bis heute wurde UII in etlichen Vertebraten nachgewiesen. 1998 wurde UII auch im menschlichem Gewebe entdeckt (Coulouarn et al. 1998). Humanes UII ist der stärkste bisher bekannte Vasokonstriktor.

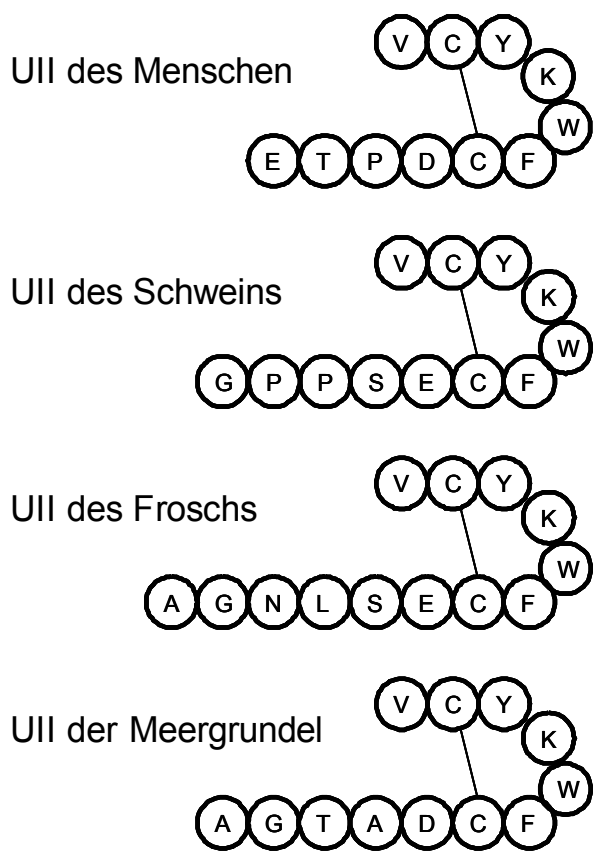


Abb.1: Aminosäuresequenzen von Urotensin-II verschiedener Spezies

UII ist, abhängig von der Spezies, zwischen 11 und 14 Aminosäuren lang. Es enthält Spezies übergreifend eine hoch konservierte Region der Sequenz (CFWKYC) am C-Terminus, welche über die Cysteine verbrückt ist (Bern et al. 1985). Diese Struktur blieb über 550 Millionen Jahren fast unverändert. Für die biologische Wirkung ist offensichtlich die Ringstruktur essentiell, denn die Disulfidbrücke kann durch einen Lactam-Ring ersetzt werden, ohne die biologische Aktivität einzubüßen (Grieco et al. 2002), während das reduzierte, nicht-zyklische Peptid keine Wirkung mehr zeigt (McMaster et al. 1986). Innerhalb des Rings sind die Aminosäuren WKY für die biologische Aktivität essentiell

(Flohr et al. 2002, Kinney et al. 2002, Brkovic et al. 2003). Im Gegensatz dazu unterscheidet sich die Aminosäuresequenz am N-Terminus des UII von Spezies zu Spezies stark. Dieser Bereich scheint für die biologische Aktivität unbedeutend zu sein (Rossowski et al. 2002).

Prepro-UII mRNA wurden im Herzen, Aorta, Gefäßendothelzellen, Leukozyten, Gehirn, Rückenmark, Niere, Lunge, Leber, Nebenniere, Hypophyse, Milz, Dünndarm,

Dickdarm, Plazenta und anderen Geweben nachgewiesen. (Totsune et al. 2003, Matsushita et al. 2001, Totsune et al. 2001, Sugo et al. 2003, Bousette et al. 2004).

1999 wurde ein Rezeptor im menschlichen Herzgewebe entdeckt, der eine sehr hohe Affinität zu Ull hat. Der G-Protein gekoppelte Rezeptor 14 (GPR14) wurde als der gesuchte Ull Rezeptor identifiziert. (Ames et al. 1999). Der UT-Rezeptor lässt sich in Gehirn, Rückenmark, Leukozyten, Herzmuskelkammer, Gefäßendothelium, glatten Gefäßmuskelzellen, Nierenrinde, Nebennieren, Hypophyse sowie der Schilddrüse nachweisen (Ames et al. 1999, Totsune et al. 2001, Totsune et al. 2003, Bousette et al. 2004, Maguire et al. 2000).

Nach der physiologischen Bedeutung des Ull in unterschiedlichen Organismen wird intensiv gesucht. Ames et al. konnte nachweisen, dass die vasokonstringierende Wirkung von humanem Ull in der isolierten Brustorta von Ratten größer ist als die von Endothelin-1. Ull kann auch vasodilatorische Wirkungen haben, abhängig von Gefäßart und Spezies (Richards und Charles 2004).

In humanen isolierten, vom Endothel befreiten Brust-, Koronar- und Radialarterien als auch in der Saphenus- und Nabelvene verursachte Ull eine Kontraktion. Dabei war Ull 50mal potenter in den Arterien und <10mal potenter in den Venen als Endothelin-1. Allerdings ist die maximale Wirkung kleiner als die von Endothelin-1 (Maguire et al. 2000). Endothelin-1 und Ull haben im Vergleich zu anderen vasoaktiven Agenzien, wie zum Beispiel Noradrenalin und Angiotensin-II, eine lang anhaltende Wirkung, die nur langsam einsetzt (Camarda et al. 2002, Gibson 1987, Itoh et al. 1987). Hillier et al. berichtet von keinem gefäßverengendem Effekt von Ull an humanen endothelhaltigen Subkutanarterien, inneren Brustarterien, Subkutanvenen und Saphenusvenen (Hillier et al. 2001). In den kleinen Lungen- und in den Unterleibarterien wirkt Ull als starker Vasodilatator (Stirrat et al. 2001). Vasokontraktion konnte in der Pulmonalarterie von Ratten durch h-Ull induziert werden, allerdings nicht in den kleinen Pulmonalarterien. Der Effekt konnte durch die Entfernung des Endothels verstärkt werden (MacLean et al. 2000). In isolierten humanen perfundierten Lungen und in humanen Pulmonalarterien konnte kein vasokonstringierender Effekt von Ull nachgewiesen werden (Bennett et al. 2004).

Die Rezeptordichte, das Endothelium und Ull-abbauende Enzyme müssen vermutlich als Ursache für die unterschiedlichen Wirkungen von Ull in den verschiedenen Gefäßen verantwortlich gemacht werden. Ungefähr 30% der Brustarterien und Koronararterien reagieren auf Endothelin-1 aber nicht auf Ull.

Vermutlich ist das auf die Rezeptordichte in diesen Gefäßen zurückzuführen. (Maguire et al. 2000). Ein direkter Zusammenhang zwischen Rezeptordichte und UII induziertem Effekt ist durch den Vergleich der Kontraktionsstärke in der Brustaorta und der Unterleibs-aorta von Ratten gegeben. Die Brust-aorta zeigt eine höhere Rezeptordichte als die Unterleibs-aorta und wird dementsprechend stärker kontrahiert (Douglas et al. 2000, Itoh et al. 1987, Bottrill et al. 2000). Ein Zusammenhang zwischen Rezeptordichte und Wirkung ist auch Spezies übergreifend gegeben. So wird die humane Koronararterie mit geringerer Rezeptordichte weniger stark kontrahiert als die Aorta von Ratten mit höherer Rezeptordichte (Maguire et al. 2000). Der Einfluss des Endothels auf UII induzierte vasokonstringierende oder vasodilatierende Wirkungen wurde diskutiert. H-UII löste in Versuchen zweiphasige Reaktionen aus. In perfundierten Herzen von Ratten löste h-UII eine kurzlebige Verringerung des Koronarflusses durch eine lang anhaltende Vasodilation aus. Die Vasodilation konnte durch einen Zykllooxygenase-Inhibitor und einen NO-Synthetase-Inhibitor aufgehoben bzw. verringert werden (Katano et al. 2000). An Ratten konnte nach einer initialen Reaktion auf hUII, eine zweite Reaktion nach 30-60 Minuten festgestellt werden. Dabei kam es zu Herzrasen und zu einer NO abhängigen Vasodilation mit einem leichten Anstieg des Blutdrucks (Gardiner et al. 2001, Gardiner et al. 2004). NO spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Herzfunktion und des Gefäßtonus (Kelly et al. 1996). UII reguliert die Endothel NO-Synthetase (eNOS) nach oben (Li et al. 2004). Im intakten Endothel der Nierenarterie von Ratten wird durch h-UII die NO Synthese gesteigert und führt dort zu einer Vasodilation (Zhang et al. 2003).

In Ratten führt humanes UII in Dosen von 300 – 3000 pmol/kg zu systemischen Gefäßerweiterung mit erweiternden Effekten vor allem in der Mesenterialarterie und im hinteren Viertel des Gefäßsystems und zu Herzrasen (Gardiner et al. 2001). Intravenöse Bolusinjektionen bewirken eine Reduktion des durchschnittlichen arteriellen Blutdrucks mit verringerter Herzkontraktion (Hassan et al. 2003). Verabreicht man humanes UII in Dosen <30pmol/kg Affen, so erhöht sich leicht das Herzzeitvolumen bei gleichzeitiger Abnahme des Gefäßwiderstandes, unter leichten oder ohne Veränderungen des Blutdruckes. Bei höheren Dosen (100 - 3000 pmol/kg) erhöht sich der Gefäßwiderstand bei gleichzeitiger Abnahme des Herzzeitvolumens bis zum Kreislaufkollaps (Ames et al. 1999, Zhu et al. 2004). Versuche bei denen UII bei Menschen infundiert wurde, fielen unterschiedlich aus. Wilkinson et al. und

Affolter et al. haben keinen Zusammenhang zwischen Blutdruck, Herzfrequenz, Herzzeitvolumen und infundiertem Ull gefunden (Wilkinson et al. 2002, Affolter et al. 2002). Im Gegensatz hierzu haben Böhm und Pernow eine Erhöhung der Durchblutung des Unterarms nach Infusion von Ull festgestellt (Bohm und Pernow 2002). Vermutlich lassen sich die beobachteten Wirkungen auf die direkte vasokonstringierende Wirkung von Ull, und durch die indirekte vasodilatierende Wirkung von Ull über die Stimulation der eNOS erklären. Die resultierende Wirkung ist durch ein Zusammenspiel beider Wirkungen gegeben.

Die Beteiligung von Ull an verschiedenen Herz-Kreislaufkrankungen wurde diskutiert und unterstützt die These an einer Beteiligung des Peptids an dessen Regulation. Mögliche Zusammenhänge zwischen Ull und kongestiver Herzinsuffizienz, Kranzgefäßerkrankung, Arteriosklerose, chronische Niereninsuffizienz, Diabetes, Hypertonie und Nierentumoren wurden gefunden.

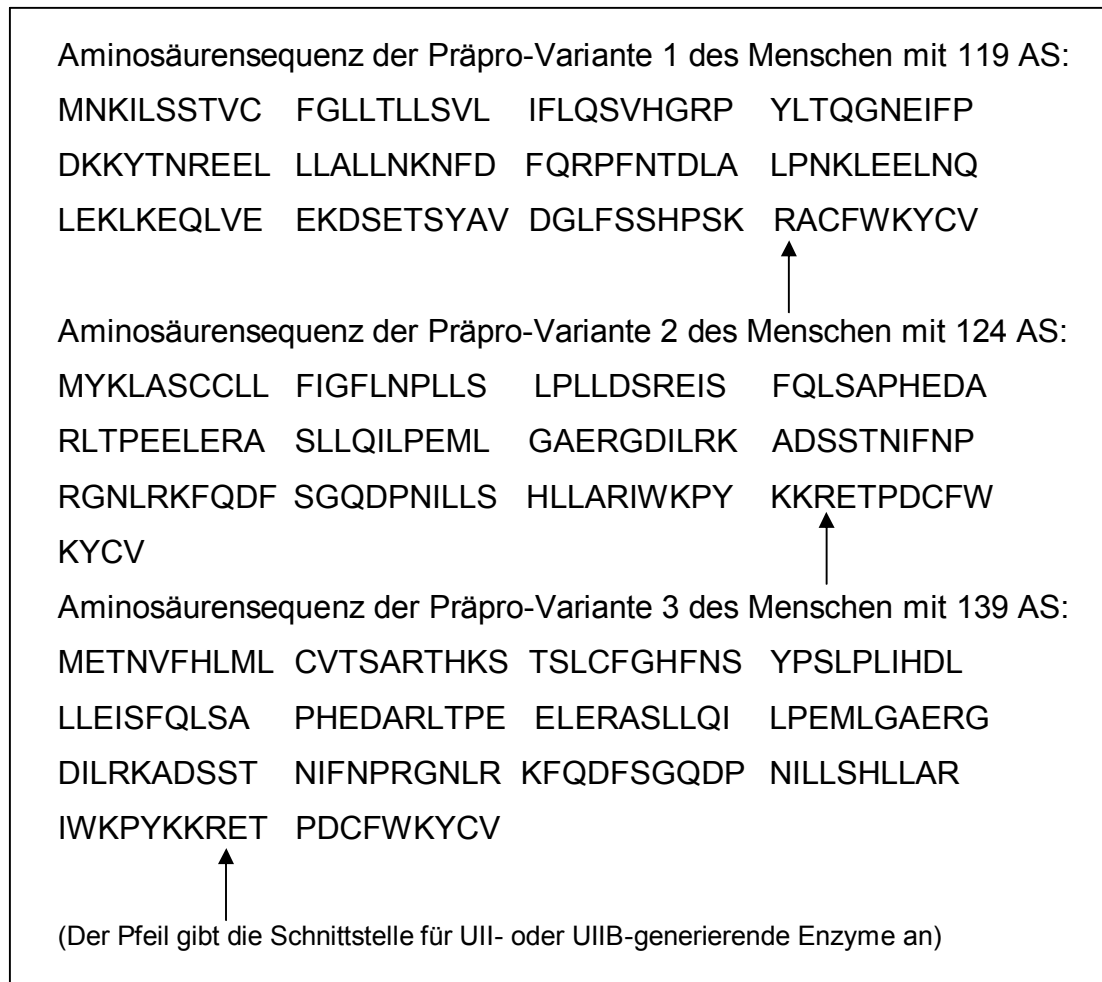
So konnte Ull in signifikant höheren Mengen in Herzen von Patienten mit Herzinsuffizienz im Endstadium beobachtet werden (Douglas et al. 2002). In Koronararterien konnten erhöhte Konzentrationen an Ull und UT-Rezeptor in Atheromen nachgewiesen werden (Ames et al. 1999). Ull fördert die Mitose in glatten Gefäßmuskelzellen. Erhöhte Zellteilungsrate an Gefäßmuskelzellen werden als Hauptursache der Arteriosklerose angesehen (Sauzeau et al. 2001). Im Plasma von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, sowie bei Diabetes-Typ-2-Patienten, wurden erhöhte Ull-Konzentrationen im Plasma nachgewiesen (Totsune et al. 2003). Cheung et al. wies erhöhte Konzentrationen an Ull in Plasma von Patienten mit systemischer Hypertonie nach (Cheung et al. 2004). Eine ähnliche Untersuchung widerspricht diesem Ergebnis und konnte keine erhöhten Ull-Konzentrationen im Plasma messen. Allerdings wurde eine Korrelation zwischen durchschnittlichem arteriellen Blutdruck und Ull-Konzentration in der Zerebrospinalflüssigkeit gefunden, und vom gleichen Autor diskutiert (Thompson et al. 2003). Bei Patienten mit essentieller Hypertonie wurden im Urin höhere Mengen an Ull in Vergleich zu Normotonikern beobachtet (Matsushita et al. 2001). Möglicherweise spielt Ull auch eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren. So wurde in Nierentumoren eine erhöhte Konzentration von Ull festgestellt (Shenouda et al. 2002). Zudem wurde entdeckt, dass Ull das Zellwachstum von Zelllinien stimuliert (Takahashi et al. 2003, Takahashi et al. 2001).

Die Untersuchungen zeigen, dass UII an der Blutdruckregulation beteiligt ist. Allerdings steht noch nicht genau fest, wie und in welchem Ausmaß UII den Blutdruck reguliert. Gegen eine kurzzeitige Wirkung des UII zur Regulation sprechen die Daten zur Infusion von UII an gesunden Probanden. Erhöhte UII-Konzentrationen in Plasma und im Gewebe könnten Ausdruck der oben diskutierten chronischen Erkrankungen sein. Weiterhin muss geklärt werden, ob im Plasma zirkulierendes UII eine signifikante physiologische Rolle hat, oder ob die parakrine oder autokrine Funktionsweise des Peptids im Vordergrund steht. Für die letztgenannten Funktionsweisen spricht, dass sowohl der UT-Rezeptor als auch UII oft in gleichen Geweben vorkommen.

Aufgrund der Ähnlichkeit der Sequenzen von Somatostatin und UII wurden Somatostatin Analoga genutzt, um mögliche Antagonisten für den UT-Rezeptor zu finden. Hierzu zählen PRL-2882, PRL-2903 und PRL-2915, die in Ratten als UT-Rezeptor-Antagonisten wirken (Rossowski et al. 2002). SB-710411 ist ebenfalls ein Ratten-UT-Rezeptor-Antagonist, der allerdings beim Affen- und Menschen-UT-Rezeptor als Agonist wirkt. BIM-23127 ist ein kompetitiver Antagonist des menschlichen und des Ratten-UT-Rezeptors (Behm et al. 2004, Herold et al. 2003, Behm et al. 2002).

Im Menschen wurden 3 prepro-UII Varianten identifiziert. Eine Variante mit einem 119 AS langen Precursor führt zu UII-B (ACFWKYCV). Dieses Peptid ist bekannt als URP (Urotensin-related-peptide) (Nothacker und Civelli 2003), dessen physiologische und pathogene Rolle unklar ist. Die Affinität des URP zu dem UT-Rezeptor ist etwas stärker, die vasokonstringierende Wirkung auf Endothel-befreite Aortaringe etwas schwächer als die von UII. Es wird diskutiert, ob URP der endogene Ligand des UT-Rezeptors des Hirns der Ratte ist (Sugo et al. 2003, Mori und Fujino 2004). Möglicherweise wurden durch polyklonale Antikörper nicht nur UII in verschiedenen Geweben nachgewiesen sondern auch URP, da es die gleiche zyklische Struktur besitzt (Russell et al. 2003, Aiyar et al. 2004). Durch Reversed-Phase HPLC und Radioimmunoassays wurden weitere UII immunoreaktive Peptide entdeckt. Möglicherweise gehören diese Peptide zu Abbauprodukten von UII oder zu anderen größeren UII Peptiden (Chartrel et al. 2004). Die zwei weiteren prepro-UII Varianten ergeben sich aus alternativen Splicings und sind 124 und 139 Aminosäuren lang (Coulouarn et al. 1998).

Ull gehört wie Angiotensin-II oder Endothelin zu den Peptidhormonen. Die Biosynthese beinhaltet die Expression des physiologisch inaktiven Prärohormons. Das aktive Ull oder Ull-B entsteht durch Proteolyse aus dem Präpro-Ull.



Es gibt mehrere Enzyme, die an diesen Stellen schneiden können. So konnten Russel et al. in kultivierten Humanzellen eine Ull-generierende Aktivität nachweisen, die möglicherweise durch Furin hervorgerufen wurde. Trypsin spaltet aus dem Precursor Ull ab. (Russell et al. 2004).

Bis heute wurde dennoch kein Enzym identifiziert, welches spezifisch aus dem Ull-Precursor Ull konvertiert.

Ziel dieser Arbeit war es daher, Ull-generierende Enzyme aus Gewebe des Schweins aufzuspüren, zu reinigen und zu identifizieren.