

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Urotensin-II-(UII)-generierende Proteine (UIIP) aufzuspüren, zu isolieren und zu identifizieren. Um UIIP reinigen zu können, musste zunächst ein Nachweissystem etabliert werden, mit dem die UII-generierende Aktivität nachgewiesen werden konnte. Hierzu wurde ein Massenspektrometrie-basiertes Enzym-Screening (MES) System gewählt. Gegenüber photometrischen oder Fluoreszenz-basierten Detektionssystemen (UV-Systeme) hat das MES-System den Vorteil, dass Substrate in ihrer authentischen Form eingesetzt werden können. Substrate, die für UV-photometrische Nachweis-Systeme genutzt werden, müssen in vielen Fällen mit Chromophoren derivatisiert werden, um die enzymatische Reaktion photometrisch messen zu können. Die veränderte chemische Struktur der Substrate kann bei Enzymen mit hoher Substratspezifität zur Folge haben, dass die Substrate nicht mehr erkannt und umgesetzt werden, was zu falsch negativen Ergebnissen führt. Durch eine massenspektrometrische Detektion der Reaktionsprodukte kann dieses Problem weitgehend vermieden werden, weil authentische Substrate eingesetzt werden können.

Der massenspektrometrische Nachweis von enzymatischen Reaktionsprodukten direkt aus komplexen Proteinfractionen gelingt aber in den meisten Fällen nicht, weil die Vielfalt der Biomoleküle und die Anwesenheit von Salzen die Signale der Analyten weitgehend vollständig unterdrücken. Aus diesem Grund wurde das MES-System entwickelt. Dabei werden die Proteine der zu untersuchenden Fraktionen kovalent an Gelpartikel immobilisiert. Biomoleküle, die nicht immobilisiert wurden, können anschließend durch Waschschrte von den Proteinen entfernt werden. Die gewaschenen, immobilisierten Proteine werden anschließend mit dem in Wasser gelösten authentischen Substrat inkubiert. Werden nach definierten Inkubationszeiten Aliquots aus der Reaktionslösung abgenommen, befinden sich in dieser wässrigen Lösung lediglich das Substrat und seine Reaktionsprodukte, vorausgesetzt das gesuchte Enzym befand sich in genügend hoher Konzentration in der Fraktion der immobilisierten Proteine. Im Massenspektrum der Reaktionslösung sind in diesem Fall deshalb lediglich die Signale des Substrats und der Reaktionsprodukte zu sehen. Die Aktivitäten können in Abwesenheit von Puffersalzen detektiert werden, weil die Strukturen der meisten Enzyme durch die



Das MES-System muss aber nicht nur in der Lage sein, eine Enzymaktivität qualitativ zu bestimmen, sondern es muss auch quantitative Aussagen über die Aktivitäten geben können, um entscheiden zu können, mit welcher Fraktion die Reinigung des Ull-generierenden Proteins fortgesetzt werden soll. Für die MALDI-MS musste also ein Weg gefunden werden, mit dem eine relative Quantifizierung der Analyten über die Signalintensitäten gelingt. Bei der MALDI-MS wird eine organische Säure, die Matrix, gelöst in einer wässrigen Lösung auf dem MALDI-Probenteller vorgelegt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels bleiben die Kristalle der Matrix auf dem Probenteller zurück. Auf diese Kristalle wird die Probe aufgetragen. Dadurch lösen sich die Kristalle in der Probenlösung auf. Während das Lösungsmittel der Probe verdunstet, bilden sich erneut Kristalle, in denen die Probenmoleküle inhomogen verteilt sind. In den Kristallen können auf diese Weise Bereiche mit besonders hoher Probenkonzentration (Hot-Spots) auftreten. Die Desorption und Ionisation der Probenmoleküle erfolgt durch den Beschuss des Kristalls mit einem Laser. Trifft der Laser einen Hot-Spot, so führt das zu hohen Signalintensitäten, die nicht repräsentativ für die Menge an Probe sind. Um den Effekt der Hot-Spots abzuschwächen, wurde das Massenspektrometer so programmiert, dass maximal 20 Spektren an einer Stelle summiert werden durften. Anschließend wurde eine andere Stelle des Kristalls gewählt. Insgesamt wurden auf diese Weise 100 Spektren pro Probe summiert.

Ein weiteres Problem für die Quantifizierung bilden die inhomogenen Oberflächen der Kristalle. Hierdurch trifft der Laser die Kristalloberflächen in unterschiedlichen Winkeln, was in einer inhomogenen Aufnahme der Energie des Lasers durch die Kristalle resultiert. Eine Veränderung der übertragenen Energie hat eine Veränderung der Signalintensitäten der Analyten zur Folge. Um den Effekt dieses Problems zu minimieren, wurde eine Laser-Kontrolle programmiert, die die Intensität des Lasers in Abhängigkeit der Güte des Signals automatisch variiert. War das Signal sehr schwach, so wurde die Intensität erhöht. War das Signal zu stark, so wurde die Intensität verringert. Als interner Standard wurde das Signal des Substrats genutzt. Für die relative Quantifizierung des Analyten wird dessen Signalintensität in Beziehung zur Signalintensität des Substrats gesetzt. Um das System noch zu verbessern, wurde jede Probe 3mal präpariert und massenspektrometrisch analysiert. Anschließend wurde der Mittelwert der relativen Signalintensitäten der 3

Messungen berechnet. Durch dieses Vorgehen konnte eine gute Korrelation zwischen relativer Signalintensität und Probenmenge erzielt werden.

Nachdem eine Methode zum Nachweis der UII-generierenden Aktivität etabliert war, musste nach einer Quelle zur Reinigung des UII-generierenden Proteins (UIIP) gesucht werden. UII wird mit der Blutdruckregulation in Verbindung gebracht. Daher ist zu vermuten, dass das UIIP in der Niere zu finden ist, da die Niere eine wichtige Bedeutung in der Blutdruckregulation hat. Zuerst wurde untersucht, ob in der Niere die Aktivität eines UIIP nachzuweisen ist. Dazu mussten die Proteine aus den Zellen heraus gelöst werden. Dies geschah durch eine Gefriertrocknung und anschließende Homogenisierung des Gewebepulvers in einem Extraktionspuffer. Nach Immobilisierung der Proteine des Extrakts wurden diese mit dem MES-System auf UII-generierende Aktivität untersucht. In Abbildung 4 sind die MALDI Spektren des MES-UIIP-Assays zu sehen. Nach 3 h ist das erwartete Signal von UII deutlich zu sehen. Im Extrakt aus Schweinenieren muss deshalb eine Protease mit einer UII-generierenden Aktivität existieren. Es ist aber nicht nur das Signal von UII zu sehen sondern auch ein Signal von UII-S12-20. Es muss also eine weitere Protease immobilisiert worden sein, die UII-S12-20 generiert.

Abbildung 5 zeigt Massenspektren des MES-UIIP-Assays einer Fraktion größer 10 kDa. Neben dem Signal von UII sind eine Vielzahl weiterer Signale zu erkennen. Fast allen Signalen konnten UII-S-Metaboliten zugeordnet werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Peptide durch das Zusammenwirken mehrerer Proteasen entstanden sind. Ob UII direkt oder über andere Zwischenprodukte generiert wurde lässt sich hier nicht eindeutig beantworten. Man könnte einen Weg postulieren, der UII über 2 Zwischenprodukte generiert (Abbildung 30). An diesem Weg wären die Enzyme 1 bis 3 beteiligt.

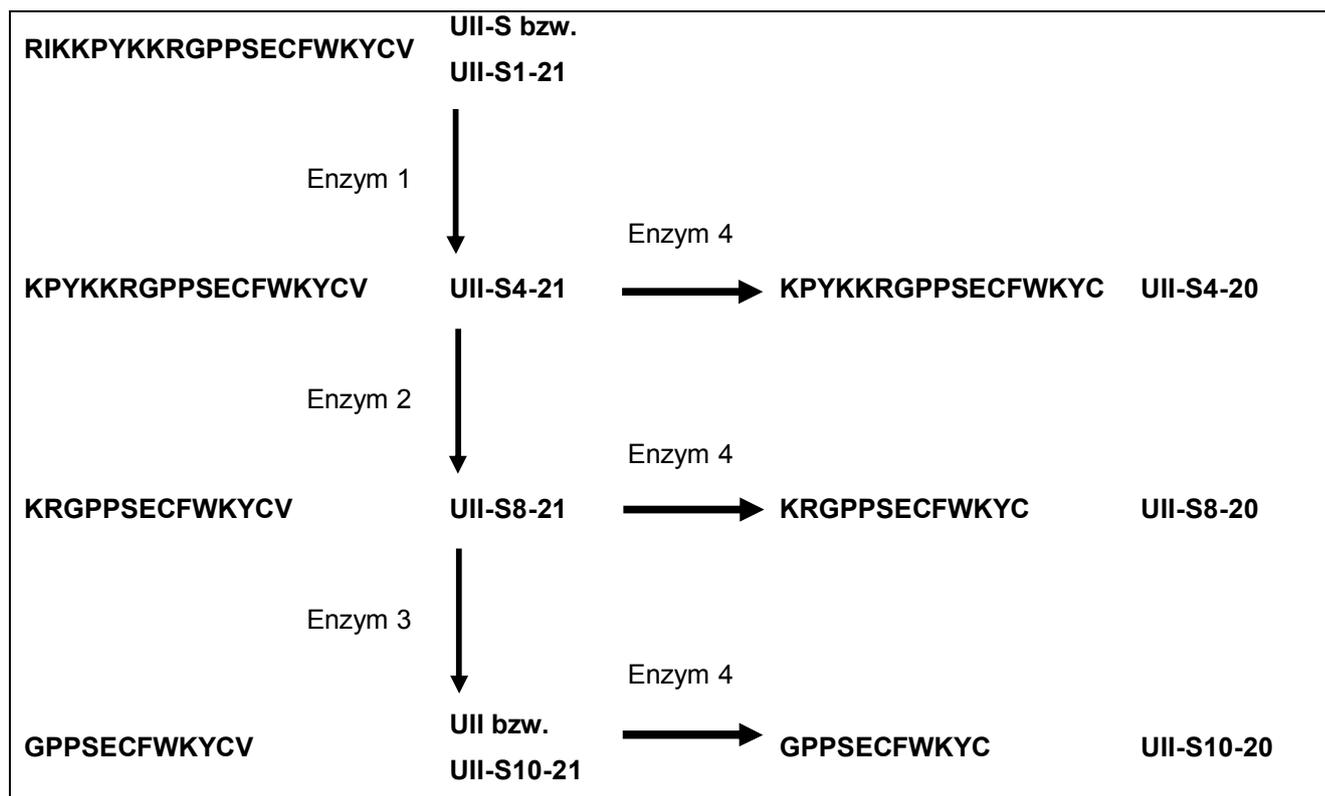


Abb. 30: Aminosäuresequenzen von Peptiden, deren Signale in Abbildung 5 im Massenspektrum zu sehen sind, die als Zwischenprodukte ausgehend von UII-S zu UII generiert werden, sowie Zuordnung möglicher Enzyme, die an der Generierung der Peptide beteiligt sind.

Eine Prozessierung eines Peptidhormons, das auch über Zwischenstufen generiert wird, ist bereits aus dem Renin-Angiotensin System bekannt. Dort wird Angiotensin-II vorrangig über Angiotensin-I aus Angiotensinogen gebildet (Skeggs et al. 1976). Vorstellbar wäre auch, dass die Zwischenprodukte UII-S4-21, UII-S8-21 durch den sukzessiven Abbau vom N-Terminus einer Exopeptidase aus UII-S, generiert wurden. Die im Spektrum in Abbildung 5 nicht zu sehenden Signale müssten in diesem Fall über sehr unterschiedliche Kinetiken der Exopeptidase erklärt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Exopeptidase für die Reaktionsprodukte verantwortlich ist, wird jedoch als gering eingeschätzt, da sich das Muster der Reaktionsprodukte mit zunehmender Reinigung der aktiven UII-generierenden Fraktion nicht wiederholte.

Es fällt auf, dass Massen detektiert worden sind, die sich nur um die Masse von Valin unterscheiden. So sind neben den Signalen der Peptide UII-S1-21, UII-S4-21, UII-S8-21, und UII auch Signale der Peptide UII-S1-20, UII-S4-20 UII-S8-20 und UII-S10-20 zu finden. Es hat den Anschein, dass in dieser Fraktion eine Protease

anwesend ist, die jeweils das C-terminale Valin von den erst genannten Peptiden abspaltet (Abbildung 30).

Nach 4 Stunden Inkubation (Abbildung 5) sind fast nur noch Signale von UII-S10-20 und von UII-S13-20 zu sehen. Alle Peptide mit höheren Massen wurden abgebaut. Es ist anzunehmen, dass an der Generierung dieser Produkte weitere Proteasen beteiligt waren.

Abbildung 7 zeigt Massenspektren des MES-UIIP-Assays einer Fraktion der nativen, gelfreien isoelektrischen Fokussierung mit einem pH-Wert von 5,9. Die Massenspektren zeigen 3 Signale von UII-S, UII-S8-20 und UII. Die Signale von UII-S und UII-S8-20 büßen nach 2 weiteren Stunden Inkubationszeit an Signalintensität ein, während das Signal von UII die höchste Signalintensität aufweist. Abbauprodukte von UII sind in dem Massenspektrum nicht zu erkennen. Durch die isoelektrische Fokussierung sind deshalb sehr wahrscheinlich im Vergleich zur 10 kDa-Filtration eine Reihe von Proteasen entfernt worden, die für die Generierung der in Abbildung 5 zu sehenden Peptide verantwortlich waren.

Nachdem der Nachweis einer UII-generierenden Aktivität in einem Extrakt aus Nierengewebe gelungen ist, wurden Versuche zur Charakterisierung des UIIP1 durchgeführt. Um zu verhindern, dass ein ganzer Pool an unterschiedlichen Proteasen charakterisiert wird, die möglicherweise an der Generierung von UII beteiligt sind, wurde die Komplexität der Probe mit Hilfe einer Batch-Kationenaustausch-Chromatographie verringert. Bei einem pH-Wert von 7 in Anwesenheit von 500 mM NaCl war es möglich, ein Kationenaustauscher-Eluat mit sehr hoher spezifischer UII-generierender Aktivität zu gewinnen (Abbildung 9C).

Um das ungefähre Molekulargewicht von UIIP1 zu ermitteln, wurde das Eluat der Kationenaustauscher-Chromatographie mit Filtern mit den Ausschlussgrenzen 10, 30, 50 und 100 kDa filtriert. Die UII-generierende Aktivität der Retentate wurde mit dem MES-UIIP-Assay bestimmt. Da die UII-generierende Aktivität in einer Fraktion mit Molekülen größer 30 kDa noch deutlich zusehen (Abbildung 6), in einer Fraktion größer 50 kDa aber fast nicht mehr zu erkennen ist, hat das UIIP1 vermutlich ein Molekulargewicht zwischen 30 kDa und 50 kDa.

Aus den Charakterisierungsversuchen lässt sich folgendes zusammenfassen:

1. UIIP1 hat einen isoelektrischen Punkt von etwa 5,9.
2. UIIP1 hat ein Molekulargewicht zwischen 30 kDa und 50 kDa.

Proteine haben individuelle Eigenschaften, deren Kenntnis eine wichtige Voraussetzung für eine effektive chromatographische Reinigung ist. Aufgrund ihrer komplexen chemischen Struktur sind diese Eigenschaften nur durch eine Vielzahl von Experimenten zu ermitteln, deren Durchführung bisher sehr zeitaufwendig war. Eine effektive Chromatographie muss dafür sorgen, dass möglichst viele begleitende Biomoleküle entfernt werden und dabei gleichzeitig die biologische Aktivität des Zielproteins erhalten bleibt. Dazu muss man die Bindungseigenschaften des Zielproteins und der begleitenden Biomoleküle für definierte Bedingungen kennen. Um möglichst schnell diese Informationen zu erhalten, wurde das PPS-System (Protein-Purification-Parameter-Scouting-System) entwickelt, mit dem systematisch bis zu 96 unterschiedliche Parameter auf ihre Eignung zur optimalen chromatographischen Reinigung eines Zielproteins in kurzer Zeit getestet werden können (Thiemann et al. 2004). Für die Konzentrierung von UIIPs aus dem Rohextrakt bieten sich Fractogele als Kationen- bzw. Anionenaustauscher der Firma Merck an, da diese im Vergleich zu den Gelen anderer Anbieter hohe Bindungskapazitäten haben. Für die PPS-Experimente mit einem Kationenaustauscher wurden pH-Wert zwischen 3 und 8 und die Ionenstärke durch die Zugabe an NaCl im Probenauftragspuffer zwischen 0 und 500 mM variiert. In Abbildung 9 ist die Ergebnismatrix der PPS-Experimente dargestellt. Die UII-generierende Aktivität der Eluate ist nur auf einen kleinen pH-Wert Bereich zwischen 6,5 und 7 beschränkt. Interessanterweise bindet UIIP1 in Anwesenheit von 500 mM NaCl. Hierfür sind offensichtlich sekundäre Wechselwirkungen wie hydrophobe Interaktionen verantwortlich, denn in Gegenwart von 500 mM werden elektrostatische Wechselwirkungen weitgehend unterdrückt. Abbildung 9B zeigt die Proteinkonzentration der Eluate. Das Ergebnis entspricht der Erwartung, dass bei extremen pH-Werten und hohen NaCl-Konzentrationen weniger Gesamtproteinmenge in den Eluaten zu finden ist. Abbildung 9C zeigt die spezifischen Aktivitäten in den Eluaten. Demnach ist eine Chromatographie bei einem pH-Wert von 7 in Anwesenheit von 500 mM NaCl sinnvoll, da hier die höchste spezifische Aktivität erzielt wird. Deshalb wurde dieser Parametersatz für eine Konzentrierung von UIIP1 für die Charakterisierung benutzt.

Für weitere PPS-Experimente wurde ein Anionenaustauschergel gewählt. Abbildung 10 zeigt die Ergebnismatrix der PPS-Experimente mit einem UII-generierenden Rohextrakt. Das Ergebnis zeigt, dass UIIP bei einem pH-Bereich von 6-8 stabil ist

(siehe Abbildung 10A). Ein Vergleich beider PPS-Experimente führt zu dem Ergebnis, dass eine Reinigung mit Kationenaustauschergel bei einem pH-Wert von 7 in Anwesenheit von 500 mM NaCl die Effektivste ist.

Durch den initialen Schritt zur Konzentrierung von UIIP1 erhielt man ein Eluat mit hoher NaCl-Konzentration. Eine effektive chromatographische Aufreinigung eines Zielproteins sollte so wenige Schritte wie möglich enthalten, da mit jeder Manipulation der Probe ein Teilverlust an Zielprotein einhergeht. Um die Zahl der Manipulationen der Probe möglichst klein zu halten, wurde für den 2. Reinigungsschritt eine Chromatographie gesucht, die eine direkte Applikation ohne vorherige Umpufferung erlaubt. Infrage kommen deshalb die Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC), die Hydroxyapatit-Chromatographie (HAC) und Affinitäts-Chromatographien. Die Bindungseigenschaften von Proteinen an HIC-Gele werden vor allen durch die funktionellen Gruppen und die Matrix der Gele bestimmt. Der pH-Wert der mobilen Phase spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Aufgrund der geringen Probenmenge konnte nur eine kleine Zahl von Parametern variiert werden. Daher wurden nur verschiedene HIC-Gele, ein HAC-Gel und die Metallaffinitäts-Chromatographie mit verschiedenen Metallionen auf ihre Eignung zur Bindung von UIIP1 getestet. Abbildung 11 zeigt die Ergebnismatrix. Nur ein einziger Parametersatz führte zu einem Eluat mit hoher Ull-generierender Aktivität. UIIP1 ließ sich reversibel an einen Co-Chelat-Gel binden. Zudem konnte durch diesen Versuch gezeigt werden, dass ein pH-Wert von 4 im Elutionspuffer, der für die IMAC-Gele verwendet wurde, zu keiner irreversiblen Degeneration von UIIP1 führte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Cobalt-Affinitäts-Chromatographie konzipiert, die durch einen pH Gradienten die retendierten Moleküle zum Eluieren bringt. Abbildung 12 zeigt das Chromatogramm der Co-Affinitäts-Chromatographie. Die meisten Proteine eluierten zwischen einem pH-Wert von 6,5 und 5,8. Es gibt drei Bereiche, in denen Ull-generierende Aktivitäten nachgewiesen werden konnten. Die Fraktion mit der Bezeichnung 1 wurde für eine weitere Aufreinigung verwendet. Da 3 Bereiche mit Ull-generierender Aktivität zu finden waren, kann man von 3 verschiedenen Proteinen ausgehen, die in der Lage sind, Ull zu generieren. Aufgrund der PPS-Experimente mit dem Rohextrakt war bekannt, dass sich UIIP1 an einen Anionenaustauscher reversibel binden lässt. Um Probe zu sparen, wurden in den nächsten PPS-Experimenten nur zwei Anionenaustauscher mit 2 verschiedenen pH-

Werten des Auftragspuffers getestet. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis des Versuchs. Wie die PPS-Experimente mit dem Rohextrakt vermuten ließen, eignet sich ein pH-Wert bei 7,5 wesentlich besser als ein pH-Wert bei 9 für die Chromatographie. In Abbildung 14 ist das Chromatogramm der Anionenaustausch-Chromatographie zu sehen. Die meisten Komponenten der Probe ließen sich durch die Chromatographie von den Ull-generierenden Fraktionen abtrennen.

Folgendes lässt sich über die Reinigungsschritte zusammenfassen:

- 1) UIIP1 lässt sich in Anwesenheit von 500 mM NaCl bei einem pH-Wert von 7 an einen Kationenaustauscher reversibel binden. Durch die Anwesenheit des NaCl und durch den untypischen pH-Wert für eine Kationenaustausch-Chromatographie kommt es zu einer starken Abreicherung der begleitenden Biomoleküle (Abbildung 9C).
- 2) UIIP1 lässt sich an eine Co-Chelat reversibel binden. Durch die hohe Spezifität von Affinitätsgelen wurde eine deutliche Abreicherung begleitender Biomoleküle erreicht. Der Hauptbestandteil der Probe wurde durch den pH-Gradienten von UIIP1 getrennt (Abbildung 12).
- 3) UIIP1 lässt sich an einen Anionenaustauscher bei einem pH-Wert von 7,5 reversibel binden. Der Hauptbestandteil der Probe konnte durch den NaCl-Gradienten von UIIP1 getrennt werden (Abbildung 14).
- 4) Vermutlich gibt es mehrere Ull-generierende Proteine, oder das UIIP1 liegt in vielen Isoformen vor, denn durch die Cobalt-Affinitäts-Chromatographie konnten 3 Fraktionen mit Ull-generierender Aktivität von einander getrennt werden (Fraktion 1,2 und 3; Abbildung 12), und durch die Anionenaustausch-Chromatographie konnten weitere 3 Fraktionen mit Ull-generierender Aktivität von einander getrennt werden (Fraktion 4,5 und 6; Abbildung 14).

Trotz der effektiven chromatographischen Reinigungsschritte war davon auszugehen, dass UIIP1 noch nicht homogen vorlag. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden die Proteine der Fraktion 4 mit einer 2D-Gelelektrophorese (Abbildung 16) getrennt. Das Ergebnis der 2D-Gelelektrophorese bestätigte die Vermutung, dass UIIP1 noch nicht homogen vorlag. Durch die Charakterisierungsversuche war bekannt, dass UIIP1 zwischen 30 und 50 kDa groß ist, und einen isoelektrischen Punkt in einem Bereich von 3,8-6,7 besitzt. Da die Trennung von Proteinen mit einer 2D-Gelelektrophorese nach dem Prinzip der isoelektrischen Fokussierung mit anschließender Trennung nach dem Molekulargewicht basiert, konnte auf dem Gel der Bereich definiert werden, in dem UIIP1 zu finden sein sollte. Eine einfache

Übertragung der Daten, gewonnen durch die Charakterisierungsversuche, auf das Ergebnis des 2D-Gels birgt jedoch die Gefahr, im falschen Bereich zu suchen. Die Probenvorbereitung einer Probe für die 2D-Gelelektrophorese manipuliert die Struktur von Proteinen mehr oder weniger stark. Vor allem die Denaturierung durch Fällung kann den isoelektrischen Punkt eines Proteins beeinflussen. Setzt sich ein Protein aus mehreren Untereinheiten zusammen, besteht die Gefahr, dass der Proteinkomplex durch den Einfluss von SDS dissoziiert und infolgedessen die Untereinheiten in einem kleineren Molekulargewichtsbereich zu finden sind, als durch die Vorversuche bestimmt.

Abbildung 17 zeigt ein typisches MALDI Spektrum eines tryptisch-verdauten Proteinspots, hier des Spots 9. Es konnte kein einziges Protein der Proteinspots 5-17 eindeutig identifiziert werden. Allerdings wies eine Mascot-Datenbankvergleich der MALDI Spektren aus den Proteinspots 9, 10, 11 und 14 mehrfach auf ein "Pregnancy-Associated-Glycoprotein" (PAG2) hin, so dass hier eine gewisse Wahrscheinlichkeit besteht, dass sich Isoformen des Proteins tatsächlich auf dem Gel befand.

Eine mögliche Ursache dafür, dass sich PAG2 aufgrund der MALDI Massenfingerprint-Analyse nicht eindeutig zuordnen lässt, könnte in der Glykosylierung des PAG2 zu suchen sein. Die MALDI Fingerprint Methode ist zur Identifizierung von Glykoproteinen ungeeignet, da die tryptischen Peptide von Glykoproteinen schlecht ionisierbar sind. Signale geringer Intensität oder fehlende Signale sind die Folge (Lochnit und Geyer 2004). Zuckerreste verändern zudem die Masse der tryptischen Peptide. Beide Effekte machen eine Zuordnung der gemessenen Massen der Peptide zu den Massen der "in-silico"-tryptischen Peptide von Proteindatenbanken schwierig bis unmöglich (Kuster et al. 1998).

Hinweise auf PAG2 fand man in 4 Spots der 2D Gelelektrophorese. Da PAG2 ein Glykoprotein ist, variieren möglicherweise die Zuckerreste von PAG2 zu PAG2. Dadurch ändert sich sowohl das Molekulargewicht als auch der Ip der PAGs. Dementsprechend werden die PAGs mit unterschiedlichen Zuckerresten durch die 2D Gelelektrophorese getrennt, da bei der 2D-Gelelektrophorese die Trennung auf unterschiedlichen Ips und Molekulargewichten basiert (Packer et al. 1996).

PAG wurde in Rindern und Schafen als Plazenta spezifische Antigene im mütterlichen Blut nachgewiesen (Butler et al. 1982, Zoli et al. 1991). Im Schwein

wurde es in Trophoblasten 1995 entdeckt (Szafranska et al. 1995). Das Molekulargewicht variiert zwischen 70 kDa in der glykosylierten und 43 kDa in der nicht-glykosylierten Form (Szafranska et al. 2004). Der isoelektrische Punkt des deglykosylierten PAGs liegt bei 9,02. Obwohl die Molekulargewichtsbereiche von PAG2 und UIIP1 übereinstimmen, spricht der isoelektrische Punkt von UIIP1 bei pH 5,9 eher gegen eine Übereinstimmung der Identität von UIIP1 und PAG2. Es wurde dennoch die Frage gestellt, ob PAG2 in der Lage wäre, UII zu generieren. PAG2 hat eine Aminosäuresequenz, die mit dem katalytischen Zentrum der Protease Pepsin A übereinstimmt (Szafranska et al. 1995). Sollte Pepsin A in der Lage sein UII-S zu konvertieren, so bestünde eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass PAG2 für die UII-generierende Aktivität verantwortlich ist. Deshalb wurde Pepsin A immobilisiert und mit UII-S inkubiert. Die Aktivität wurde mit Hilfe des MES-Systems bestimmt. Abbildung 18 zeigt das MALDI Spektrum von UII-S inkubiert mit immobilisiertem Pepsin A nach 16h Inkubationszeit. Interessanterweise wurde UII-S tatsächlich von der Pepsin-Präparation konvertiert, obwohl Pepsin A die Spaltstelle KKR -||- GPP (Spaltstelle durch -||- gekennzeichnet) nicht spalten dürfte ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)). Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass die Pepsin-Präparation neben Pepsin A eine weitere Protease enthält, die die oben angegebene Schnittstelle hydrolysiert. In dem Massenspektrum findet man Signale, die den Peptiden UII(des-Val), R-UII(desVal) und KR-UII(desVal) entsprechen. Die Abspaltung von Valin könnte von einer dritten Protease vollzogen worden sein, die weder mit Pepsin A noch mit der KKR-GPP spaltenden Protease identisch ist.

Daher wurde versucht, die Valin abspaltende Aktivität aus der Pepsin-Präparation mit Hilfe einer Cobalt-Affinitäts-Chromatographie zu entfernen. Die Cobalt-Affinitäts-Chromatographie wurde gewählt, da mit dieser Chromatographie bereits die PAG2 gereinigt werden konnte und Pepsin A viele homologe Bereiche mit der PAG2 hat. Daher lag die Vermutung nahe, dass auch Pepsin A an ein Co-Chelat binden würde. Abbildung 19 zeigt ein MES-MALDI Spektrum von UII-S nach Inkubation mit dem gereinigten Pepsin A. Das Spektrum zeigt, wie das Spektrum in Abbildung 15 oben, Signale von UII, R-UII und KR-UII. Sämtliche Signale sind um die Masse von Valin auf der m/z Achse nach rechts verschoben. Eine Protease mit Valin abspaltender Aktivität konnte also tatsächlich durch die Cobalt-Affinitäts-Chromatographie entfernt werden.

Der oben skizzierten Schnittstelle gehen die Aminosäuren KKR voraus. Es gibt eine Reihe bekannter Enzyme (Trypsin, Chymotrypsin), die in der Lage sind, nach jeder dieser AS zu schneiden. Durch das zufällige Auswählen einer der drei möglichen Schnittstellen können bis zu 3 Peptide von einem einzigen Enzym wie Trypsin generiert werden, die um das Molekulargewicht von R oder KR größer sind.

In dem Spektrum aus Abbildung 15 oben sind außer dem Substratsignal (Ull-S) die drei Signale von Ull, R-Ull und KR-Ull zu sehen. Die Signale von R-Ull und KR-Ull sind ebenfalls um das Molekulargewicht von R oder KR größer. Auch hier besteht eine nicht geringe Wahrscheinlichkeit, dass nur ein Protein in der Lage war, das Substrat zu erkennen und diese 3 Peptide zu generieren. Nach 24h ist nur noch das Signal von Ull zu erkennen. Die Peptide R-Ull und KR-Ull sind vollständig zu Ull abgebaut. R-Ull und KR-Ull sind ebenfalls für eine Protease, die nach K oder R schneidet, ein Substrat. Dementsprechend werden von diesen Peptiden mit zunehmender Inkubationsdauer R und K abgespalten. In der Literatur sind Proteine bekannt, die ebenfalls in der Lage sind, mehrere Peptide zu generieren. Cathepsin A generiert aus Angiotensin-I über eine Zwischenstufe Angiotensin-II (Changaris et al. 1986).

Da sowohl die Pepsin-Präparation als auch die Proteinfraction 4 in der PAG2 indentifiziert worden ist, die identischen Generierungsmuster von Ull aufweisen, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass PAG2 tatsächlich UIIP1 ist (Abbildung 15 und 19). Eine proteolytische Funktion von PAG2 ist bis heute unbekannt (El Amiri et al. 2003). Mit dieser Arbeit kann der PAG2 erstmals eine mögliche Funktion, nämlich der Generierung von Ull, zugeordnet werden.

Homologiestudien, basierend auf der Nukleotidsequenz und der Aminosäuresequenz zeigen, dass die PAG2 vom Schwein einen homologen Anteil mit humanen Pepsin A, Cathepsin E und D hat (Azuma et al. 1989, Faust et al. 1985, Sogawa et al. 1983). Von Cathepsin D ist bereits bekannt, dass es Peptidprecursor schneidet, und in der Niere exprimiert wird. (Krieger und Hook 1992, Dorer et al. 1978, Strausberg et al. 2002). Humanes Pepsin wird ebenfalls in der Niere exprimiert (Strausberg et al. 2002), es wurden aber bisher keine Hinweise gesammelt, dass es an der Generierung von Hormonpeptiden beteiligt ist. Da es zu 82% mit dem Pepsin A des Schweins homolog ist ([www.ebi.ac.uk/fasta33](http://www.ebi.ac.uk/fasta33)), kann man vermuten, dass es ebenfalls Ull generieren kann. Bei Patienten mit Nierenfunktionsstörung konnten erhöhte Pepsinogen-Konzentrationen im Blutplasma festgestellt werden (Aydemir et

al. 2005). Diese erhöhten Konzentrationen könnten auch aus einer Freisetzung von geschädigten Nierenzellen stammen. Parallel hierzu findet man in Patienten mit Nierenfunktionsstörungen erhöhte UII-Konzentrationen (Totsune et al. 2003), was aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit zumindest zum Teil auf die erhöhten Pepsin-Konzentrationen im Blut zurückzuführen sein könnte. Da die Niere auch Funktionen als endokrines Organ hat, ist vorstellbar, dass Cathepsin D und Pepsin im Nierengewebe an der Generierung von Urotensin-II beteiligt sind.

Die vielen Proteinspots der 2D-Gelelektrophorese (Abbildung 16) zeigen, dass die chromatographische Reinigung der UII-generierenden Aktivität über 3 Stufen noch nicht ausreichten, um UIIP1 zur nahen Homogenität zu reinigen. Deshalb wurde ein alternativer Reinigungsversuch des UIIP1 unternommen.

Ein Blick auf Abbildung 9A macht deutlich, dass die maximale Aktivität bei pH 7 in Anwesenheit von 100 mM NaCl an das Kationenaustauschergel bindet. Dieser Parametersatz hat gegenüber dem in Reinigungsweg-1 genutzten Parametern den Nachteil, dass weniger begleitende Biomoleküle entfernt werden. Um diesen Nachteil zu kompensieren, wurde eine Sample-Displacement-Chromatographie (SDC) als Konzentrierungs- und Reinigungsschritt von UIIP eingesetzt. Diese Chromatographieart hat den Vorteil, dass Sie mit Rohextrakten, die meist noch viele Partikel enthalten, durchgeführt werden kann. Das direkte Aufbringen eines Rohextraktes auf eine Chromatographiesäule verbietet sich aufgrund der im Rohextrakt vorhandenen Partikel, da diese schnell zu einer Verstopfung der Säule führen. Durch die SDC konnten 4 Fraktionen mit UII-generierender Aktivität voneinander getrennt werden (Fraktion 7, 8, 9 und 10; Abbildung 20). Fraktion 7 enthält die SD-Fraktionen 1-3. Für die weitere Aufreinigung von UIIP wurde nur die SD-Fraktion 3 verwendet.

Aufgrund der PPS-Experimente aus dem Reinigungsweg-1 war bekannt, dass sich UIIP1 an einen Co-Chelat binden ließ. Der Versuch, das UIIP der aktiven SD-Fraktion an ein Co-Chelat Chromatographiegel zu binden, misslang jedoch, was darauf hinweist, dass hier ein anderes Protein (UIIP2) für die UII-generierende Aktivität verantwortlich ist als im ersten Reinigungsweg. Über PPS-Experimente wurde festgestellt, dass sich das UIIP2 an ein Octyl-Sepharose-HIC-Gel bei einem pH-Wert des Auftragspuffers von 8 reversibel binden ließ (Abbildung 21). Dieser Parametersatz wurde für eine HIC genutzt. Abbildung 22 zeigt das Chromatogramm

der HIC der SD-Fraktion 3. Innerhalb des Gradienten war keine UV-Absorption bei 280 nm zu erkennen. Kurz bevor die Leitfähigkeit von Wasser erreicht wurde, steigt die UV-Absorption an. An dieser Stelle wurde die Ull-generierende Aktivität gefunden. Da innerhalb des Gradienten keine UV-Absorption detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass alle Proteine, die an das HIC-Material reversibel gebunden wurden mit UIIP2 koeluierten. Das HIC-Material war nach Elution gefärbt, was darauf schließen lässt, dass Fraktionskomponenten der SD-Fraktion 3 irreversibel an das HIC-Material gebunden und somit von UIIP2 abgetrennt werden konnten. Mit der Ull-generierenden Fraktion 11 (Abbildung 22) wurde erneut ein PPS-Experiment durchgeführt (Abbildung 23). Es sind 3 Anionenaustauschergele mit kleiner Partikelgröße unter Variation der pH-Werte des Auftragspuffers auf ihre Bindungseigenschaften von UIIP2 getestet worden. Nur ein Parametersatz führte zu einem Eluat mit relativ hoher Ull-generierender Aktivität. Mit diesen Parametern wurde die Fraktion 11 mit einer Anionenaustausch-Chromatographie fraktioniert (Abbildung 24). Es konnten 3 Fraktionen (Fraktion 12, 13 und 14) mit Ull-generierender Aktivität voneinander getrennt werden. Die Fraktion 13 wurde mit einer Gelfiltration weiter gereinigt. Abbildung 25 zeigt das Chromatogramm der Gelfiltration. Die Fraktion 15 der Gelfiltration hatte die höchste Ull-generierende Aktivität und wurde zur Charakterisierung und Identifizierung von UIIP2 genutzt. Zunächst wurde geprüft, zu welcher Proteasenklasse die Ull-generierende Aktivität gehört. Dazu wurden Inhibitionsexperimente mit Inhibitoren von Serin-Proteasen (PEFABLOC / Aprotinin / Antipain), Aspartat-Proteasen (Pepstatin A) und Cystein-Proteasen (Cathepsin-Inhibitor / Antipain) durchgeführt. PEFABLOC inhibiert eine große Anzahl an Serin-Proteasen wie zum Beispiel Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin und Plasmin. Pepstatin A inhibiert Aspartat-Proteasen wie zum Beispiel Pepsin, Cathepsin D und Renin. Antipain ist ein starker Inhibitor von Papain, Trypsin, Cathepsin A und B. Aprotinin inhibiert vor allem Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein. Der Cathepsin-Inhibitor hemmt Cystein-Proteasen wie Cathepsin B, L und S. Abbildung 26 zeigt das Aktivitätsprofil der Ull-generierenden Fraktion 13 (Abbildung 24) in Anwesenheit der Inhibitoren. In Anwesenheit von PEFABLOC, Antipain und Cathepsin nimmt die Ull-generierende Aktivität scheinbar zu. Die Zunahme der Aktivität in Anwesenheit der Inhibitoren lässt eine Inhibition von Ull-abbauenden Proteasen vermuten. Interessanterweise lässt sich die Aktivität durch Aprotinin aber nicht durch PEFABLOC hemmen, obwohl beide Inhibitoren eine große

Anzahl an Serin-Proteasen hemmen. Das gesuchte Enzym ist demnach möglicherweise eine Serin-Protease, die sich aber nicht von PEFABLOC inhibieren lässt. Trypsin und Chymotrypsin können mit UIIP2 nicht identisch sein, da beide Enzyme durch Aprotinin und PEFABLOC inhibiert werden.

Russel et al. berichtet über eine UII-generierende Aktivität im menschlichen Blut, die sich ebenfalls mit Aprotinin hemmen ließ. Möglicherweise ist UIIP2 des Schweins das Pendant dieser im Menschen gefundenen Aktivität. Darüber hinaus wurde eine Furin ähnliche UII-generierende Aktivität in kultivierten, humanen Fibroblasten und in Mesothelial- und Endothelzellen gefunden (Russell et al. 2004). Das humane und das Mäuse-Furin lassen sich durch Antipain inhibieren ([www.brenda.uni-koeln.de](http://www.brenda.uni-koeln.de)). Sollte auch das Furin des Schweins durch Antipain inhibierbar sein, so kann UIIP2 auch nicht identisch mit Furin sein, da die UII-generierende Aktivität der Fraktion 13 nicht durch Antipain inhibierbar war.

Abbildung 27 zeigt eine SDS-Page der Proteinfraction 15. Es sind 7 Proteinbanden zu erkennen. Alle Proteinbanden wurden tryptisch verdaut und für eine massenspektrometrische Untersuchung mittels LC-ESI MS/MS vorbereitet. Abbildung 28 zeigt ein typisches RP-Chromatogramm der tryptisch verdauten Bande 1 aus der SDS-Page. Von jedem Peptidsignal wurden MS/MS Spektren erzeugt, die Rückschlüsse über die Aminosäuresequenz des analysierten Peptids zulassen. Mit den Aminosäuresequenzen ist eine Abfrage der Mascot-Datenbank durchgeführt worden. Über die Mascot-Datenbank Recherche konnten 17 Peptide identifiziert werden, die alle Teilsequenzen einer humanen Disulfid-Isomerase-A3 repräsentieren. Damit konnte eine Sequenzübereinstimmung von 26% erreicht werden.

Die Identifizierung eines menschlichen Proteins aus Schweinegewebe erscheint auf den ersten Blick fragwürdig. Allerdings sind viele Proteine unterschiedlicher Organismen in vielen Aminosäurebereichen identisch. Beispielsweise ist humanes Renin mit dem Renin des Schimpansen zu 100% identisch. Das Renin des Langschwanzmakak ist zu 99% mit dem des Humanen identisch. 69% Übereinstimmung ist zwischen dem Renin des Menschen und der Maus zu finden ([www.pir.uniprot.org/cgi-bin/blast](http://www.pir.uniprot.org/cgi-bin/blast)). Da es keine Daten zu der Aminosäuresequenz der vergleichbaren Disulfid-Isomerase des Schweins gibt, verwundert es nicht, dass als Identität des analysierten Proteins die humane Disulfid-Isomerase-A3 vorgeschlagen wurde.

Von der Disulfid-Isomerase-A3 ist bekannt, dass sie durch eine Punktmutation von einer Isomerase in eine Serin-Protease mutieren kann (Urade et al. 1997). Da Serin-Proteasen durch Aprotinin gehemmt werden, passt dieses Ergebnis zu der durch Aprotinin hemmbaren Ull-generierenden Proteinfraction 13. Ein Blick in die SwissProt Datenbank lässt erkennen, dass die Disulfid-Isomerase-A3 schon mit vielen Funktionen in Verbindung gebracht wurde. So konnte ihr schon eine Cystein-ähnliche Endopeptidase-Aktivität und eine Phospholipase-C-Aktivität zugeordnet werden. Möglicherweise gibt es im menschlichen Organismus eine Disulfid-Isomerase Isoform, die als Serin-Protease fungiert (Urade et al. 1997) und an der Ull Generierung beteiligt ist.

In dieser Arbeit konnten 2 unterschiedliche Ull-generierende Enzyme gereinigt und identifiziert werden. Nachstehende Tabelle zeigt einen kurzen Steckbrief von UIIP1 und UIIP2.

Protein:	UIIP1	UIIP2
Reinigungsweg	1	2
Reinigungsschritt 1:	Batch-Kationenaustauscher-Chromatographie in Anwesenheit von 500 mM NaCl; pH 7,0	Sample-Displacement – Chromatographie mit einem Kationenaustauscher in Anwesenheit von 100 mM NaCl; pH 7,0
Reinigungsschritt 2:	Cobalt-Affinitäts-Chromatographie; pH 7,2	Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie; pH 8,0
Reinigungsschritt 3:	Anionenaustausch-Chromatographie; pH 7,5	Anionenaustausch-Chromatographie; pH 7,5
Reinigungsschritt 4:		Größenausschluss-Chromatographie; pH 7,0
Inhibition:		Aprotinin
Experimentell bestimmter isoelektrischer Punkt:	3,8-6,7	
Experimentell bestimmtes Molekulargewicht:	30-50 kDa (aus Ultrazentrifugationsexperimenten)	ca. 66 kDa (aus SDS-Page)
Identifiziert als:	Pregnancy-Associated-Glycoprotein (PAG 2) MW: 43 kDa- 70 kDa Ip: 9,02 (theoretisch)	Humane Disulfid-Isomerase-A3 MW: 57 kDa Ip: 5,98 (theoretisch)
Homologes humanes Protein:	Pepsin, Cathepsin D, Cathepsin E	

Abgesehen von den Fraktionen mit UIIP1 und UIIP2 konnten noch eine Reihe weiterer Ull-generierender Fraktionen gewonnen werden.

Im Reinigungsweg-1 konnten die Fraktionen 2 und 3 (Abbildung 12) sowie die Fraktion 5 und 6 (Abbildung 14) mit Ull-generierender Aktivität gewonnen werden. Im Reinigungsweg-2 sind die Fraktionen 8, 9, 10 (Abbildung 20), 12 und 14 (Abbildung 24) mit Ull-generierender Aktivität von einander getrennt worden. Insgesamt konnten in Reinigungsweg-1 5 verschiedene und in Reinigungsweg-2 6 verschiedene Fraktionen mit Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 31).

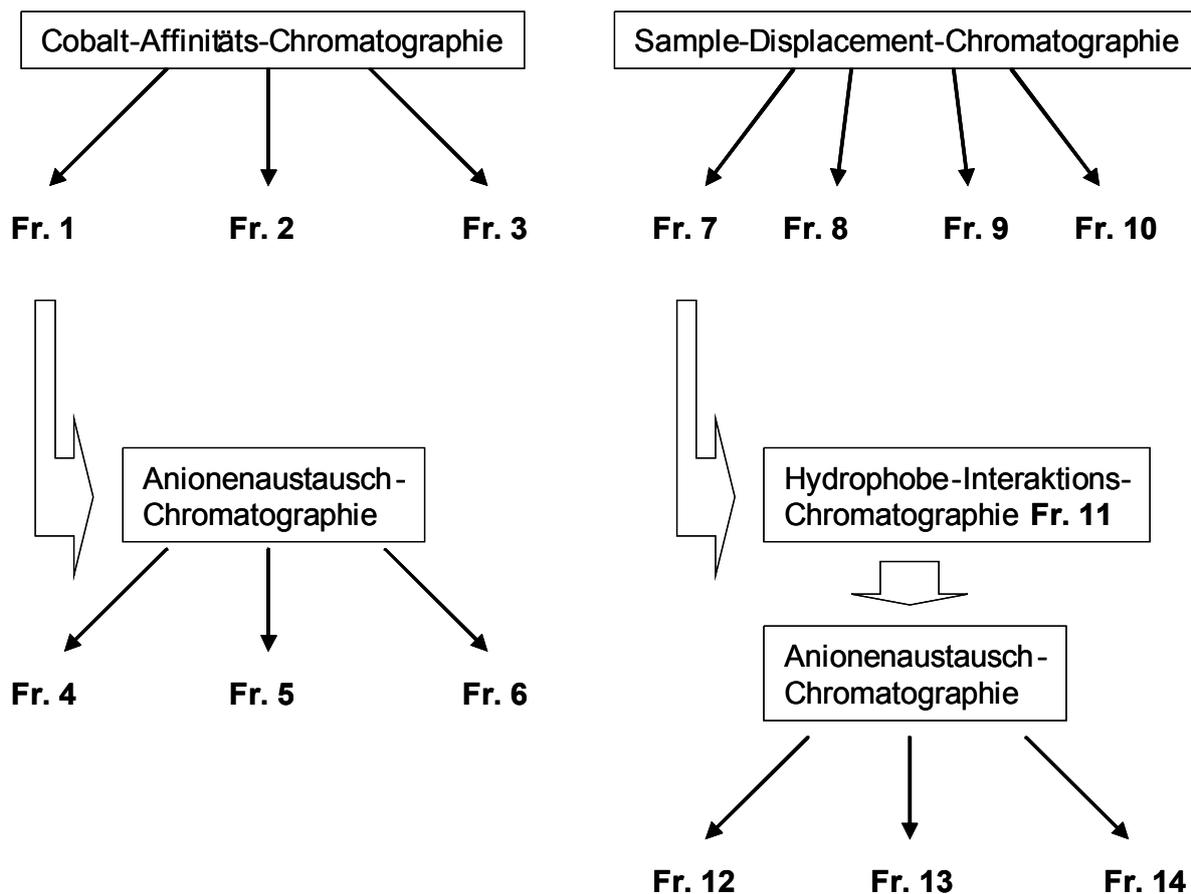


Abb. 31: Schema der getrennten Ull-generierenden Fraktionen

Aufgrund der hohen Selektivität der HIC und der Affinitäts-Chromatographie sind vermutlich Isoformen voneinander getrennt worden. Legt man diese Annahme zu Grunde, so erhält man zwischen 2 und 7 Proteine (je nachdem ob die Ull-generierenden Proteine der Fraktionen 8, 9 und 10 mit den Ull-generierenden Proteinen der Fraktionen 1, 2 und 3 identisch sind oder nicht), die in der Lage sind, aus Ull-S Ull zu generieren.

Das Renin-Angiotensin-System generiert, ähnlich wie das Urotensin-System, aus einem Precursor Peptid über Zwischenstufen ein Peptidhormon. Im Renin-Angiotensin-System sind bis heute 8 Proteine bekannt, die in der Lage sind, aus

Angiotensin-I Angiotensin-II zu generieren. ACE, Cathepsin-B, Cathepsin-G, Chymase, Enzym-III, Kallikrein, KLP-S3 und Tonin wurden bisher beschrieben (Berg et al. 1992, Arakawa und Maruta 1980, Ideishi et al. 1990, Haas et al. 1989, Urata et al. 1990, Klickstein et al. 1982, Azaryan et al. 1985, Skeggs et al. 1954, Genest et al. 1975). Dementsprechend ist die hohe Anzahl an Proteinen mit UII-generierender Aktivität im Urotensin-System nicht überraschend.

Durch das MES-System war es möglich, die genaue Umsetzung des Substrats (UII-S) zu verfolgen. In Abbildung 30 ist bereits gezeigt worden, dass UII möglicherweise über Zwischenstufen durch das Einwirken unterschiedlicher Enzyme generiert werden kann. In einigen Fraktionen der Reinigungswege zeigten die durch das MES-System generierten Massenspektren neben dem Signal des Substrats nur noch ein Signal von R-UII, welches mit zunehmender Inkubationszeit an Intensität zunahm. Diese Spektren könnten ein weiteres Indiz dafür sein, dass UII auch über Zwischenstufen durch unterschiedliche Enzyme generiert werden kann. Es musste in diesen Fraktionen ein Enzym vorhanden gewesen sein, das ausschließlich aus UII-S R-UII generiert wurde. Durch Abspaltung des verbleibenden Arginins (R) entsteht UII. Diese Hydrolyse wird vermutlich nicht durch das R-UII-generierende Enzym sondern durch ein anderes Enzym katalysiert.