

Aus dem Institut/der Klinik für Endokrinologie und Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Suche, Reinigung und Identifizierung eines Urotensin II
metabolisierenden Enzyms

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Shenge Ahmed

aus Arbil / Irak

Gutachter: 1. Prof. Dr. H. Schlüter
2. Prof. Dr. med. H. Scholz
3. Prof. Dr. F. J. Schweigert

Datum der Promotion: 16. 05. 2010

Widmung

***In Liebe und Dankbarkeit für meine Eltern
Amel Muhemed und Abdulmomin Ahmed, die mich entscheidend im Leben
unterstützten und die meine größten Vorbilder sind.***

***Sowie für meine lieben Geschwister
Kurdistan, Tavge, Lane und Lauin, die immer an meiner Seite mit gelitten
haben.***

 Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	1
1.1	18
2	19
2.1	19
2.1.1	19
2.1.2	20
2.1.3	22
2.2	24
2.2.1	24
2.2.1.1	24
2.2.1.2	24
2.2.1.3	24
2.2.1.4	25
2.2.1.5	25
2.2.1.6.	26
2.2.1.7	26
2.2.1.8	26
2.2.19	27
2.2.2	28
2.2.2.1	28
2.2.2.2	29
2.2.2.2.1	29
2.2.2.2.2	30
2.2.2.2.3	30
2.2.2.2.4	31
2.2.2.3	31
2.2.2.4	31
2.2.2.5	33
2.2.2.6	33
2.2.3	34
2.2.3.1	34
2.2.3.2	34
2.2.3.3	37

	Displacement- Chromatographie (Reinigungsschritt 1)	
2.2.3.4	Suche nach Parametern zur chromatographischen Reinigung des UME in der Fraktion A der Sample-Displacement-Chomatographie	38
2.2.3.5	Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie der aktiven Fraktion A der Sample-Displacement-Chromatographie	41
2.2.3.6	Suche nach chromatographischen Parametern zur Reinigung des UME in der aktiven Fraktion B der Hydrophoben-Interaktions-Chromatographie	41
2.2.3.7	Kationenaustausch-Chromatographie der aktiven Fraktion B der Hydrophoben-Interaktions-Chromatographie	43
2.2.3.8	Charakterisierung der UME-Aktivität mit der aktiven Fraktion C mittels Protease-Inhibitoren	43
2.2.3.9	Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Proteaseinhibitor der aktiven Fraktion C der Kationenaustausch-Chromatographie	44
2.2.3.10	Größenausschluss-Chromatographie der aktiven Fraktion D der Affinitätschromatographie	45
2.2.4	Identifizierung der aktiven Fraktion E der Größenausschluss Chromatographie	45
2.2.4.1	Tryptischer Verdau der aktiven Fraktion E der Größenausschluss Chromatographie	45
2.2.4.2	Identifizierung der tryptisch verdauten Peptide der UME Fraktionen der Größenausschluss-Chromatographie mittels LC-ESI MS/MS	46
2.2.5	Etablierung einer relativen Quantifizierung von des-Val-Ull mittels dem LC-ESI-IT-MS	46
2.2.6	Nachweis von Ull Metabolisierung durch Faktor IXa mittels LC-ESI-IT-MS	47
3	Ergebnisteil	47
3.1.	Übersicht	47
3.1.1	MES-Assays zum Nachweis der Ull metabolisierenden Aktivität	47
3.1.2	Reinigung von Ull für den Nachweis der UME Aktivität mittels MES-Assay	50
3.2	Überblick über den Reinigungsweg	51
3.2.1	Suche nach geeigneten Parametern zur	52

	chromatographischen Konzentrierung von UME mit einem Anionenaustauscher	
3.2.2	Konzentrierung und Reinigung des UME aus Schweinenierenrohextrakt mit der Sample-Displacement-Chromatographie	53
3.2.3	PPS-Experimente für die Suche nach geeigneten Parametern zur chromatographischen Reinigung von UME	54
3.2.4	Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC) zur Reinigung von UME	55
3.2.5	Suche nach chromatographischen Parametern für die Chromatographie der Fraktion B	56
3.2.6	Kationenaustausch-Chromatographie der Fraktion B	57
3.2.7	Charakterisierung der UME der Fraktion C mittels Protease-Inhibitoren	58
3.2.8	Affinitäts-Chromatographie der Fraktion C	59
3.2.9	Größenausschluss-Chromatographie der Fraktion D	60
3.3	Bestimmung des Molekulargewichts der UME mit der Größenausschluss Chromatographie	61
3.4	Versuche zur Identifizierung des UMEs	62
3.4.1	MS/MS-Spektren der Fragmentierung vom Faktor IXa	64
3.4.2	MS/MS-Spektren der Fragmentierung vom Xaa-Pro Aminopeptidase 1	69
3.5	ESI-MS basierter Assay zum Nachweis der UME-Aktivität	71
3.6	Nachweis einer des-Val-UII-generierenden Aktivität des Faktor IXa	74
4	Diskussion	75
5	Zusammenfassung	88
6	Summary	89
7	Literaturverzeichnis	90
8	Abbildungsverzeichnis	108
9	Tabellenverzeichnis	111
10	Abkürzungen	112
11	Anhang	116
11.1	Danksagungen	116
11.2	Erfolgte Publikation	117

11.3	Lebenslauf	118
11.4	Erklärung	122

1 Einleitung

1960 wurde aus der Urophysis, einem neurosekretorischen Schwanzorgan des Teleost-Fisches, Urotensin II (UII) als ein Neuropeptidhormon entdeckt [Person et al., 1980]. Das zyklische Undekapeptid [Schmidt et al., 2005; Douglas et al., 2000a], das zu den Hormonen des neurosekretorischen Systems zählt, gehört zur Somatostatin Familie. UII wird wie alle Peptidhormone als Prohormon synthetisiert und im weiteren Verlauf in der Zelle modifiziert und anschließend sekretorisch in die Blutbahn abgegeben. Peptidhormone fungieren so im Organismus als Botenstoffe und lösen über Rezeptorinteraktionen physiologische Reaktionen aus. Der genaue Hergang der UII-Generierung ist noch weitgehend unbekannt. Ebenso ist noch nichts zur Metabolisierung von UII und der daran beteiligten Enzyme bekannt.

UII ist später auch im Gehirn und Rückenmark anderer Wirbeltiere einschließlich kleiner Haie [Colon et al., 1992a], Forellen [Waugh et al., 1993], Fröschen [Colon et al., 1992b], Mäusen, Ratten [Coulouarn et al., 1999] und beim Schwein [Mori et al., 1999] gefunden worden. 1998 wurde erstmalig UII im Gewebe von Menschen gefunden [Coulouarn et al., 1998; Ames et al., 1999]. UII führt nicht nur im Fisch sondern auch im Säugetiergewebe zu einer Kontraktion der glatten Muskelzellen der Gefäße [Balment et al., 2005]. Soweit bekannt gehört UII zu den stärksten Vasokonstriktoren der Säugetiere [Ames et al., 1999]. Neben anderen Autakoiden, die stark vasokonstriktorisch wirken, wie Endothelin-1 (ET1), wird auch UII vom Endothel freigesetzt [Schmidt et al., 2005].

UII ist ein Peptid, das je nach Spezies eine unterschiedliche Anzahl an Aminosäuren (AS) aufweist. Menschliches UII (hUII) besteht aus 11 AS [Coulouarn et al., 1998; Chartrel et al., 2004; Ames et al., 1999] während UII von der Ratte und der Maus zwischen 14-17 AS lang sind [Coulouarn et al., 1999; Elshourbagy et al., 2002]. UII hat Strukturähnlichkeit mit dem Somatostatin/Cortikostatin Peptid [Person et al., 1980]. Ein Vergleich von UII zu Somatostatin ist in Abbildung 1 dargestellt.

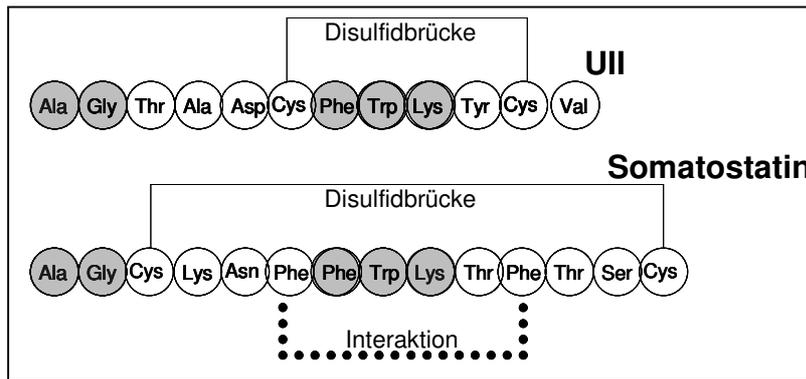


Abb. 1: Strukturvergleich von Ull und Somatostatin. Homologe Sequenzen sind grau. Beide weisen eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen auf.

Humanes Prä-Pro-Ull kommt in zwei unterschiedlichen Splicingvarianten, es wird mit Hilfe von Urotensin converting Enzym (UCE), dessen Aktivität im Schweinenierengewebe nachgewiesen wurde [Schlüter et al., 2003], proteolytisch zu Ull gespalten [Bern et al., 1985; Russel et al., 2004]. So entstehen zwei unterschiedliche Isoformen mit identischer Sequenz, Isoform A ist 139 Aminosäuren und Isoform B 124 Aminosäuren lang [Coulouarn et al., 1998, Ames et al., 1999]. Die Identifizierung des humanen Ull deckte eine zyklische Hexapeptidstruktur (Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys) auf [McMaster et al., 1986]. Diese carboxyterminale Cystein-überbrückte zyklische Hexapeptidringstruktur [Person et al., 1980] blieb über 550 Jahre hoch konserviert [Richards und Charles, 2004] und ist kennzeichnend für alle Ull Isoformen [Flohr et al., 2002; Labarre're et al., 2003] und über alle Spezies hinweg vorhanden [Person et al., 1980; McMaster et al., 1986]. Sie entspricht der biologisch aktiven Region des Peptids [Bern et al., 1985; McMaster et al., 1986; Flohr et al., 2002; Labarre're et al., 2003]. Das reduzierte, nicht-zyklische Peptid zeigt keine Wirkung [McMaster et al., 1986]. Für die Aktivität ist die Ringstruktur essentiell, da diese durch einen Lactam-Ring ersetzt werden kann, ohne dass die biologische Aktivität verloren geht [Grieco et al., 2002]. Weiterhin sind innerhalb der Ringstruktur für die biologische Aktivität besonders die AS Tryptophan, Lysin, Tyrosin und Phenylalanin wichtig [McMaster et al., 1986; Flohr et al., 2002; Kinney et al., 2002; Brkovic et al., 2003]. Ebenso ist bekannt, dass bei allen Ull Isoformen immer Aspartat oder Glutamat als Aminosäurerest dem N-Terminus der zyklischen Kernstruktur vorangehen [Conlon. 2000] und C-Terminal nach der Ringstruktur ein aliphatischer Aminosäurerest das Valin oder das Isoleuzin folgt. Für die biologische Aktivität scheint die AS Sequenz am N-Terminus irrelevant zu sein [Rossowski et al., 2002], da diese sich stark voneinander in Länge und AS Sequenz

unterscheiden [McMaster et al., 1986; Itoh et al., 1988]. Diese ist auch daran ersichtlich, dass der N-Terminus chemisch geändert werden kann, ohne einen Verlust der Ull Aktivität einzubüssen [Chatenet et al., 2004].

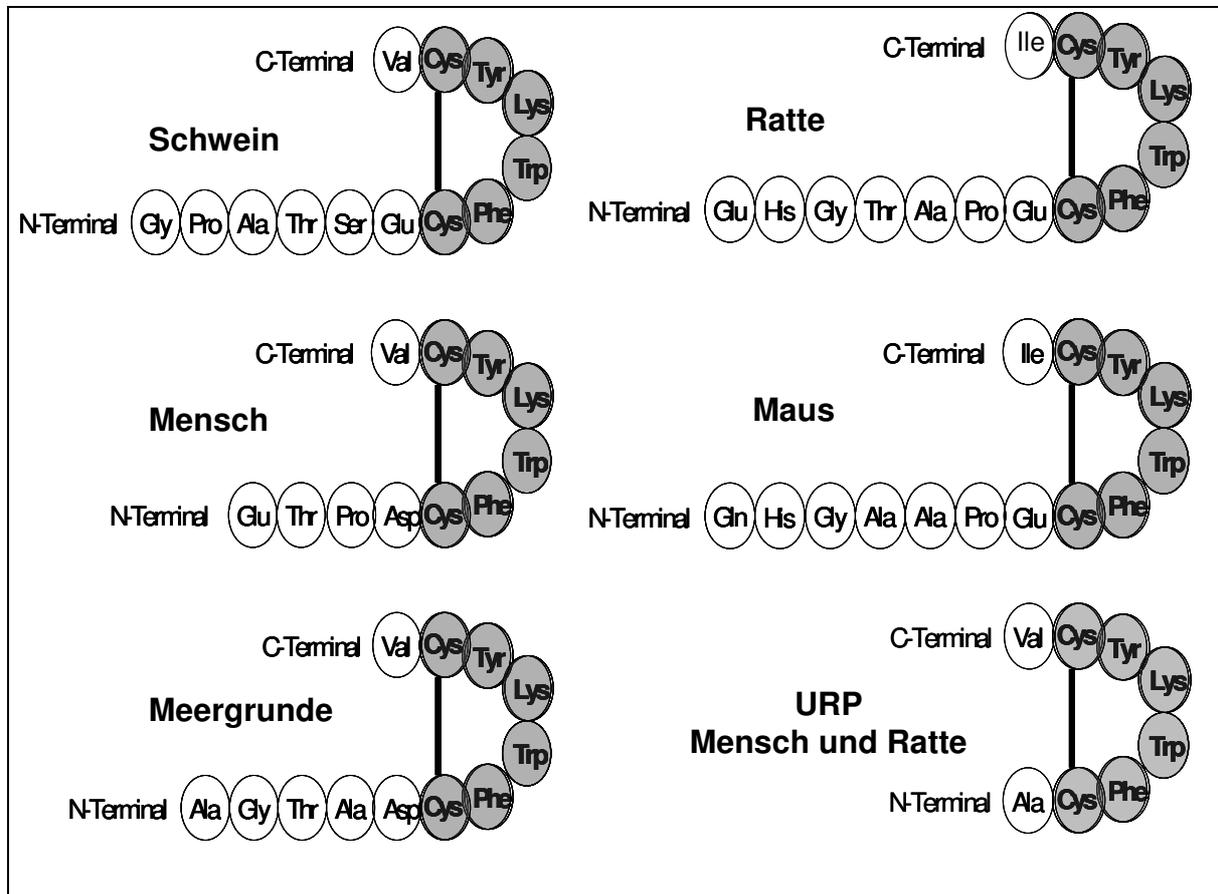


Abb. 2: Ull und URP (Urotensin-related peptide). AS Sequenzen von verschiedenen Spezies. In allen Isoformen des Ull einschließlich URP ist die zyklische Hexapeptidringstruktur vorhanden und identisch. Die Ringstruktur wird über eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen gebildet.

Erstmals wurde in der Ratte Ull als Peptidligand des G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) identifiziert [Marchese et al., 1995; Tal et al., 1995]. Der Rezeptor hat Strukturähnlichkeiten mit dem Somatostatin Rezeptor der Subgruppe 4 und einigen Opiatrezeptoren [Marchese et al., 1995]. Der Rezeptor gehört zur Somatostatin/Opiat Rezeptorfamilie, genannt GPR14 oder SENR [Tal et al., 1995; Liu et al., 1999], und wird jetzt auch als UT Rezeptor (UTR) bezeichnet [Ames et al., 1999; Liu et al., 1999; Mori et al., 1999; Nothacker et al., 1999; Douglas et al., 2001]. Der Rezeptor teilt die größte Sequenzhomologie mit dem Somatostatin Rezeptor SSTR14 [Liu Q et al., 1999]. Im menschlichen Herzgewebe wurde 1999 der GPR14 das erste Mal identifiziert [Ames et al., 1999]. Er gehört zur Transmembranrezeptor-Familie 7 [Ames et al., 1999]. Das

humane UTR (hUTR) Gen, das auf dem Chromosom 17q 25.3 liegt [Marchese et al., 1995] kodiert ein 389 AS langes Protein [Ames et al., 1999]. Der hUTR zeigt, eine 75 %ige Sequenzübereinstimmung mit dem Ratten UTR (rUTR) [Marchese et al., 1995]. In den Astrozyten der Ratte besitzt der UTR zwei Bindungsseiten, eine mit hoher und eine mit niedriger Bindungsaffinität für das Ull [Castel et al., 2006]. Der menschliche UTR ist ein glykosiliertes Protein, die N-terminale Glykosilierungsseite befindet sich auf Position Asn29 und Asn33 [Boucard et al., 2003]. Es hat noch eine Phosphorylierungsseite für die Proteinkinase A/C und Caseinkinase 1 [Onan et al., 2004]. Die AS Trp7, Lys8 und Tyr9 des Ull sind für die Rezeptorerkennung und Aktivierung notwendig [Brkovic et al., 2003, Flohr et al., 2002]. Interaktionen zwischen dem Lys-Rest des Ull's und dem Asp 130-Rest des rUTR führen zur Bindung der Ull-AS Trp, Lys und Tyr mit dem rUTR [Kinney et al., 2002]. Ein weiterer UTR-Ligand ist das Urotensin-related peptide (URP) ein Octapeptid, das mit dem Ull Peptid verwandt ist und in Menschen, Mäusen und Ratten identifiziert wurde. URP bindet hUTR und rUTR mit einer viel größeren Affinität als Ull [Sugo et al., 2003]. Es ist ein zyklisches Peptid bestehend aus 8 AS, dass ebenfalls wie das Ull am C-terminalen Ende die hoch konservierte AS Sequenz Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys aufweist [Richards und Charles, 2004; Watson et al., 2004]. URP-mRNA wurde in unterschiedlichen Geweben von Nagetieren und Menschen detektiert und konnte mit Hilfe von in situ Hybridisierungen in Motoneuronen des Rückenmarks der Maus nachgewiesen werden [Pelletier et al, 2005]. Die Vorläuferpeptide beider Liganden (Ull und URP) sind jedoch unterschiedlich und werden von verschiedenen Genen kodiert [Nothacker und Clark, 2005]. Das Gen für den URP-Vorläufer liegt auf Chromosom 3q28 und das für den Ull-Vorläufer liegt auf Chromosom 1p36 [Pelletier et al, 2005].

Die Stimulation vom UTR glatter Muskelzellen vermittelt einen Phospholipase-C (PLC)-abhängigen zytosolischen Ca^{2+} anstieg und die Aktivierung von Rho-kinase [Liu et al 1999; Opgaard et al., 2000; Elshourbagy et al., 2002; Ziltener et al., 2002]. PLC leitet die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) ein. IP_3 wiederum verursacht eine intrazelluläre Ca^{2+} Freisetzung aus dem ER und SR. Der Intrazellulär erhöhte Ca^{2+} Spiegel löst eine Kontraktion der glatten Muskelzelle aus. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). So führt Ull zu einer Aktivierung der PKC und der Myosin Light Chain Kinases (MLCK) [Morano I. 2003; Somlyo & Somlyo. 2003], zusammen mit Ca^{2+} und Calmodulin führen

sie zu einer Phosphorylierung der Regulatory myosin light chain (MLC20), das ebenfalls eine Kontraktion der glatten Muskelzelle auslöst. PKC führt zudem durch Phosphorylierung von Proteinkinase C-potentiated inhibitor protein von 17 kDa (CPI-17) zu einer Inaktivierung von myosin light chain phosphatase (MLCP) [Li et al., 1998; Kitazawa et al., 2000; Tasaki et al., 2004]. Außerdem bewirkt Ull im Endothel die Aktivierung der NO Synthase (NOS), diese führt zusammen mit Ca^{2+} und Calmodulin zur Bildung und Freisetzung von NO. NO verursacht in den glatten Muskelzellen eine Relaxation über die Aktivierung der G- Cyklase und somit Bildung von cGMP. Ebenfalls aktiviert werden über die Anregung des UTR's die Tyrosinkinase, Mitogen-activated protein kinase (MAPK), p38 und die Extracellular signal regulated kinase (ERK)1/2 [Rossowski et al., 2002; Tasaki et al., 2004]. Ein Überblick über die Signaltransduktion ist in Abbildung 3 dargestellt.

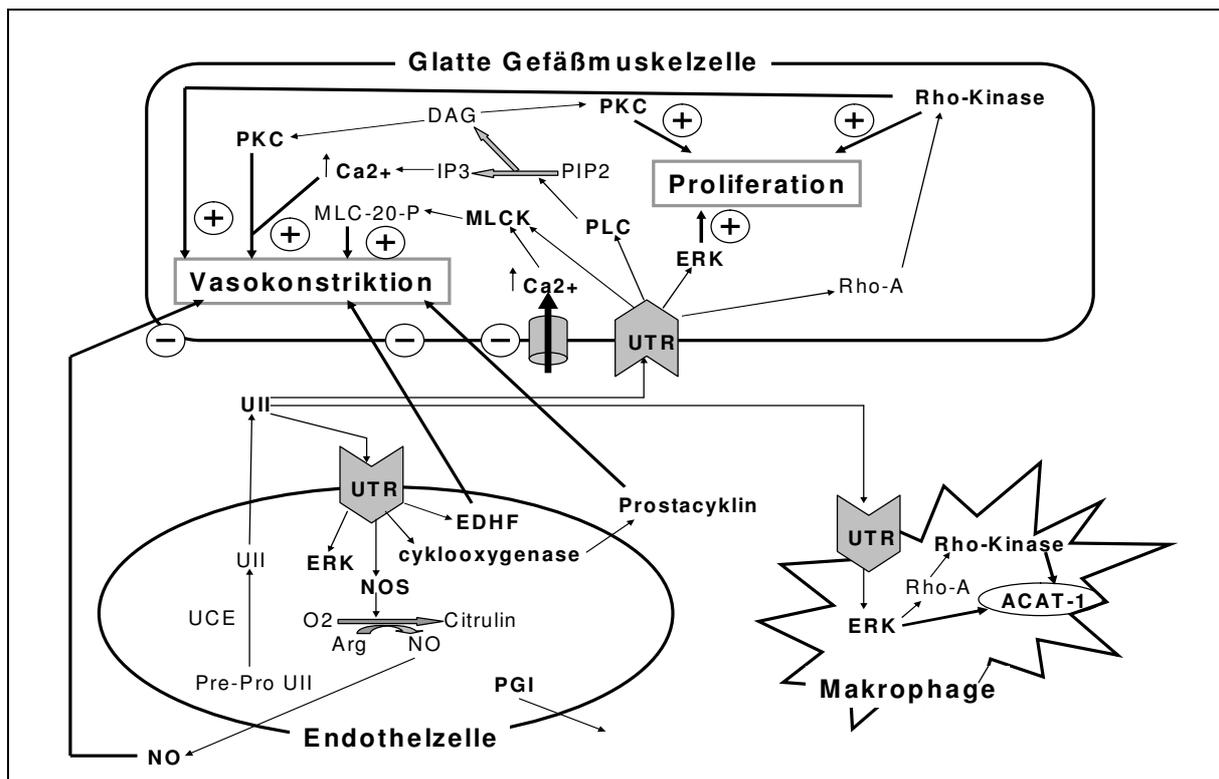


Abb. 3: Schematische Übersicht der intrazellulären Signalkaskade vom Ull an dem UTR.

In Ratten war die Ull vermittelte Phosphorylierung und Internalisierung des UTR's sehr viel schwächer als die Phosphorylierung und Absonderung des AT_1 Rezeptors durch Angiotensin II. Es wurde auch berichtet, dass eine Überexpression der G-Proteingekoppelten Rezeptorkinase bei Ratten nicht zu einer Erhöhung der UTR Phosphorylierung führte, jedoch eine vermehrte UTR Internalisierung auslöste. Bei der

Ratte verursachte eine Überexpression von Arrestin-3 eine Zunahme der UTR Absonderung [Onan & Thomas. 2003]. Die kontraktile Wirkung von Noadrenalin und Angiotensin II auf die Rattenaorta war nach Auswaschung schnell reversibel (~10 - 20 min), jedoch bestand die Wirkung von UII und ET1 noch einige Stunden mit einer geringen Verringerung der Antwort fort [Camarda et al., 2002]. Die Zeit die erforderlich ist für eine Gleichgewichtsherstellung der maximalen Antwort von UII (~30 min) ist länger als die für Angiotensin II (~10 min) oder Noadrenalin (~20 min) und gleich mit der von ET1 [Camarda et al., 2002]. Für die lang anhaltende UII induzierte Vasokonstriktion ist die Arrestin unabhängige GPR14 Internalisierung verantwortlich [Giebing et al., 2005]. Der potenteste Rezeptorantagonist das bekannt ist am rUTR's ist Urantide [Patacchini et al., 2003]. Urantide wirkt an hUTR exprimierenden CHO Zellen Ca^{2+} abhängig als Agonist [Camarda et al., 2004].

Eine starke Präpro-UII mRNA Expression wurde im menschlichen Rückenmark [Coulouarn et al., 1998; Ames et al., 1999; Nothacker et al., 1999; Sugo et al., 2003], in der Niere [Coulouarn et al., 1998; Totsune et al., 2001; Matsushita et al., 2001], in der Nebenniere, in der Plazenta, im Herz und in der Mukosa des Kolons [Totsune et al., 2001] gefunden. Auch bei Primaten und in der Maus wurde Präpro-UII mRNA Expression in der Niere gefunden [Elshourbagy et al., 2002]. In menschlichen Gefäßen wurde die UII mRNA Expression ebenfalls nachgewiesen. So zum Beispiel in der menschlichen Aorta, A. thoracica interna und in der V. saphena magna [Matsushita et al., 2001], Dabei fand man die Präpro-UII mRNA Expression in den glatten Gefäßmuskelzellen [Coulouarn et al., 1998; Douglas et al., 2002] und in den Endothelzellen [Coulouarn et al., 1998; Douglas et al., 2002; Totsune et al., 2003]. Es gibt auch eine starke intrahepatische UII Expression in Sinusoidalzellen und vor allem in Kupfferschen Sternzellen und auf venösen und arteriellen Portalgefäßen [Leifeld et al., 2005]. In der Niere konnte die UII mRNA Expression im Endothel der Tubuli und Duktuli, in den Kapillaren und in den Glomeruli nachgewiesen werden [Shenouda et al., 2002]. Die UII Expression war in der Medulla der Rattenniere stärker als im Kortex der Niere [Song et al 2006]. Im Herzen konnte eine starke UII mRNA Expression im rechten Atrium und im intraventrikulären Septum und eine leichte Expression im rechten Auricula und im endokardialen Endothel [Douglas et al., 2002] sowie in den kardialen Myozyten und kardialen Fibroblasten [Douglas et al., 2002] gezeigt werden. In den Kardiofibroblasten der Ratte konnte ebenfalls eine Expression von UII nachgewiesen

werden [Tzanidis et al., 2003]. Im ZNS der Säugetiere gibt es eine Ull Expression neben dem Rückenmark auch in der Medulla oblongata, im Hypothalamus [Coulouarn et al., 1998; Chartrel et al., 2004] sowie bei der Ratte im laterodorsale tegmentalen und pedunculo-pontine tegmentalen Nuclei [Clark et al., 2001]. Bei der Ratte wird zudem Ull in den Vasa vasora und den Nervenendigungen der Adventitia, im Endothel der Karotiden und in der Skelettmuskulatur gebildet [Rakowski et al., 2005]. Ull wird neben dem Endothel auch im Makrophagen, motorischen Neuronen und endokrinen Organen gebildet [Schmidt et al., 2005]. UTR mRNA Expression wurde in der Gehirnrinde [Totsune et al., 2001; Matsushita et al., 2001], im Gyrus occipitale superior sowie in der Substantia nigra und Thalamus des Menschen und der Ratten [Ames et al., 1999; Je'gou et al 2006], weiterhin im menschlichen Hypothalamus, in der Medulla oblongata [Totsune et al., 2001; Matsushita et al., 2001], in den Motoneuronen des Rückenmarks der Maus [Liu et al., 1999], in der menschlichen Niere vor allem im Endothel der Tubuli und Duktuli, in den Kapillaren und in den Glomeruli [Shenouda et al., 2002], in der Nebenniere, in der Plazenta, in der Mucosa des Kolons, im Atrium und Ventrikel des Herzens, in der Aorta und der A. Thoracica internen, aber nicht in der V. Saphena gefunden [Totsune et al., 2001; Matsushita et al., 2001]. Im Weiteren wurde im Menschen eine UTR mRNA Expression in den Endothelzellen der Arterien und Venen und in den glatten Muskelzellen der Arterien [Ames et al., 1999; Liu et al., 1999; Douglas et al., 2002], jedoch nicht in denen der Venen gefunden [Ames et al., 1999; Liu et al., 1999]. Auch in den menschlichen Kardiomyozyten wurde eine UTR mRNA Expression [Douglas et al., 2002; Maguire et al., 2000] entdeckt. In der Affenniere und Mausnieren [Elshourbagy et al., 2002] sowie im distalen Nephron der Ratte [Song et al 2006] wurde ebenfalls eine UTR mRNA Expression nachgewiesen. Das UTR Gen wird beim Menschen und bei der Ratte hauptsächlich in der Nierenrinde, im Herzen und in den Blutgefäßen exprimiert [Maguire et al., 2000]. Lymphozyten könnten die stärksten Ull Produzenten sein, dem gegenüber sind Monozyten und Makrophagen vermutlich die stärksten Produzenten des UTR's [Bousette et al., 2004].

Ull gehört zu den endothelialen Faktoren die an der Aufrechterhaltung der vaskulären Hämostase beteiligt sind. Ein Hinweis darauf, dass die Aktivität des Ull's von endothelialen Faktoren moduliert werden kann und somit zu Variationen in der Kontraktion führt, liegt in der Anwesenheit von Ull und UTR in den humanen Endothelzellen [Totsune et al., 2003; Douglas et al., 2000b]. Es ist ein vasoaktiver

Faktor und ein Wachstumsmodulator [Schmidt et al., 2005]. Ull hat ein ähnliches Wirkungsprofil wie ET1 in Bezug auf Vasoaktivität, Proliferation der Glatten Muskelzellen und kardiales Remodelling [Schmidt et al., 2005]. Es ist aktuell der stärkste Vasokonstriktor mit einer durchschnittlich 10 -, 100 - bzw. 300 - Fach größeren Wirksamkeit als Endothelin-1, Serotonin und Noadrenalin in den menschlichen glatten Muskelzellen [Russell et al., 2001]. Ull hat in den verschiedensten Spezies eine stark vasokonstriktorische Wirkung [Ames et al., 1999; Douglas et al., 2000b; MacLean et al., 2000; Bohm und Pernow. 2002]. Eine Ull vermittelte Relaxation kann über NO und PGI₂ in Koronararterien [Itoh et al., 1987; Itoh et al., 1988; Bottrill et al., 2000; Douglas et al., 2000c], Pulmonalarterien [Maguire et al., 2000; MacLean et al., 2000] und in der Karotis von Ratten ausgelöst werden [Itoh et al., 1988; Douglas et al., 2000c]. Jedoch sind die Ull vermittelten vasoaktiven Effekte variabel und von der Spezies, vom Stamm, vom Gefäßbett und von der Region desselben Gefäßbettes [Douglas et al., 2000c; Camarda et al., 2002; Russell & Molenaar. 2004] sowie von der Ull Konzentration abhängig. Bottrill et al., konnte eine Kontraktion und auch eine Dilatation in Rattenkoronararterien zeigen. Diese Effekte waren von der Ull Dosis sowie vom Vorhandensein des Endothels abhängig [Bottrill et al., 2000]. Es konnte gezeigt werden, dass Ull den Gefäßtonus der Arterien erhöhte, jedoch nicht den der Venen [Ames et al., 1999; Douglas et al., 2000c; Paysant et al., 2001]. Einige Studien konnten bei den menschlichen Vv. Saphenae, V. Umbilicalis, Vv. Epigastricae und in den Facialis Venen eine Erhöhung des Gefäßtonus durch Ull zeigen [Maguire et al., 2000; Camarda et al., 2002]. Ull kann auch als potenter Vasodilatator in menschlichen Pulmonalarterien und Abdominalarterien wirken [Stirrat et al., 2001]. Ull führte In Ratten zur Relaxation peripherer Gefäße wie Mesenterialarterien [Bottrill et al., 2000; Gardiner et al., 2001] und der Nierenarterien [Zhang et al., 2003]. Bei isolierten Altweltaffen Arterien, wie in der Brustaorta, der Karotis, die Koronararterien, den Pulmonalarterien, den Nierenarterien, den Oberschenkelarterien und der Basilararterien hat Ull eine 6 - 28 Fach stärkere vasokonstriktorische Wirkung als ET1.

Tab 1: UII vermittelte Gefäßreaktionen bei Säugetieren.

Blutgefäß	Reaktion	Spezies	Referenzen
In vitro			
Aorta thoracica	Kontraktion	Ratte, Schwein, Kaninchen, Cynomolgus Affe	Itoh et al., 1987; Itoh et al., 1988; Ames et al., 1999; Bottrill et al., 2000; Douglas et al., 2000c; Camarda et al 2002
Carotiden	Kontraktion	Ratte, Cynomolgus Affe	Itoh et al., 1988; Douglas et al., 2000c
Aa. coronariae	Kontraktion	Cynomolgus Affe, Mensch	Ames et al., 1999; Maguire et al., 2000; 2004
Aa. coronariae	Kontraktion	Ratte, Schwein	Itoh et al., 1987; Itoh et al., 1988; Bottrill et al., 2000; Douglas et al., 2000c
A. renalis	Relaxation	Ratte	Zhang et al., 2003
A. renalis	Kontraktion	Cynomolgus Affe	Ames et al., 1999
A. mesenterica	Kontraktion	Cynomolgus Affe	Ames et al., 1999
A. mesenterica	Relaxation	Mensch, Ratte	Stirrat et al., 2001; Bottrill et al., 2000; Gardiner et al., 2001
A. pulmonalis	Relaxation	Mensch	Stirrat et al., 2001
A. pulmonalis	Kontraktion	Ratte, Kaninchen Cynomolgus Affe	Maguire et al., 2000; MacLean et al., 2000; Douglas et al., 2000c; Camarda et al 2002
A. mammaria	Kontraktion	Mensch	Maguire et al., 2000
A. radialis	Kontraktion	Mensch	Maguire et al., 2000
A. femoralis	Kontraktion	Cynomolgus Affe	Ames et al., 1999
A. basilaris	Kontraktion	Cynomolgus Affe	Ames et al., 1999
Kapillargefäße der Haut	Kontraktion	Mensch mit Herzinsuffizienz, Mensch mit Bluthochdruck	Sondermeijer et al., 2005; Lim et al., 2004
Kapillargefäße der Haut	Relaxation	Normotensive Menschen	Sondermeijer et al., 2005
Vv. saphenae	Kontraktion	Mensch	Maguire et al., 2000; Camarda et al., 2002
V. umbilicalis	Kontraktion	Mensch	Maguire et al., 2000; Camarda et al., 2002
Vv. epigastricae	Kontraktion	Mensch	Maguire et al., 2000; Camarda et al., 2002
Vv. facialis	Kontraktion	Mensch	Maguire et al., 2000; Camarda et al., 2002
In vivo			
Carotiden	Kontraktion	Cynomolgus Affe	Douglas et al., 2000c; Camarda et al 2002
A. pulmonalis	Kontraktion	Affe	Zhu et al., 2004
A. mesenterica	Kontraktion	Cynomolgus Affe	Douglas et al., 2000c; Camarda et al 2002
A. mesenterica	Relaxation	Ratte	Bottrill et al., 2000; Gardiner et al., 2001

Einige Wirkungen von Ull in den Gefäßsystemen von Säugetieren sind in Tabelle 1 dargestellt.

Ull wirkt trotz Verdreifachung des Gefäßwiderstandes im Versuchstier nicht hypertensiv. Es verursacht eine kontraktile Dysfunktion am Herzmuskel und führt somit nicht zum Anstieg des systemischen Blutdrucks. Das Herzschlagvolumen nimmt um 80 % ab und die Herzfrequenz sinkt ebenfalls [Ames et al., 1999]. Ull zeigt bei Schweinen, Kaninchen, Meerschweinen, Neuweltaffen und Mäusen ein schwächeres vasoaktives Profil [Douglas et al., 2000c; Camarda et al. 2002] als bei Altweltaffen.

Ull hat als Neuropeptid auch neurophysiologische Wirkungen. Die Colokalisation von UT mRNA mit der Acetylcholintransferase in der mesopontinen tegmentalen Region des Rattenhirns, lässt vermuten, dass Ull an der Sensomotorik beteiligt sein könnte [Clark et al., 2001]. In Forellen führt eine intrazerebroventrikuläre Ull Injektion zur Erhöhung der motorischen Aktivität [Lancien et al., 2004]. Bei Nagetieren stimuliert eine intrazerebroventrikuläre Verabreichung den Fortpflanzungstrieb, das Putzverhalten und die Bewegung [Gartlon et al., 2001; Matsumoto et al., 2004; Do-Re'go et al., 2005]. Zudem wird bei Mäusen ein Angstreaktion ausgelöst [Matsumoto et al., 2004]. Überdies verursacht eine zentrale Ull Injektion bei Ratten eine Zunahme des arteriellen Blutdrucks, Tachykardie [Le Me'vel et al., 1996; Lu et al., 2002; Lin et al., 2003] und triggert die Sekretion von Prolaktin und Thyroid stimulierendem Hormon [Gartlon et al., 2001]. Jedoch löst eine Ull Injektion in die A1 Region des Rückenmarks eine Hypotonie und Bradykardie aus [Lu et al., 2002]. Dies zeigt, dass die Ull Wirkung im ZNS der Ratte regionenabhängig ist. Zerebroventrikuläre Ull Injektion führt beim Mutterschaf zu einem Anstieg der ACTH- und Adrenalin-Plasmakonzentration und verursacht eine kardiovaskuläre Antwort wie Hypertonie, Tachykardie und positive Inotropie, in der Niere erhöht es den Blutfluss [Watson et al., 2003]. Bei Schafen löst eine zentrale Ull Injektion eine Erhöhung des kortikalen Blutflusses aus. Aus neuen Daten geht hervor, dass Ull auch als Modulator des REM Schlafes dient [Huitron-Resendiz et al., 2005]. Im Allgemeinen bewirkt eine zentrale Ull Applikation bei Ratten eine hypertensive und tachykarde kardiovaskuläre Antwort [Lin et al., 2003; Lin et al., 2004].

Ull scheint bei einer Anzahl von Krankheiten eine pathophysiologische und pathobiochemische Rolle zu spielen. Dabei könnte Ull einen protektiven Effekt bei der jeweiligen Erkrankung haben oder aber gar eine Ursache sein. Bei vielen Erkrankungen

kommt es zu einer Veränderung in der UTR Expression und Ull Konzentration. Der UTR ist z.B. bei der kongestiven Herzinsuffizienz, der pulmonalen Hypertension und chronischen Nierenerkrankungen hoch reguliert, [Russell et. 2004].

Bei hypertensiven Patienten war die Ull Urinkonzentrationen im Vergleich zur normotensiven Kontrollgruppe höher. Ebenso war bei Patienten mit Hypertension und Nierenerkrankungen die Ull Urinkonzentrationen im Vergleich zu Patienten mit Nierenerkrankung aber ohne Hypertension wesentlich erhöht [Matsushita et al., 2001]. In einer weiteren Studie wurden Ull Plasmakonzentrationen von hypertensiven Patienten mit einer altersmäßig angepassten normotensiven Kontrollgruppe verglichen, dabei waren die Ull Plasmaspiegel bei den hypertensiven Patienten [Cheung et al., 2004] ebenfalls erhöht. Veränderungen in der Ull Expression und Aktivität wurden bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) beobachtet. Bei SHR waren die Ull Plasmakonzentration immer um das zweifache höher als bei den Kontroll-Wistar-Kyoto Ratten (WKY). Ull mRNA Expression war bei SHR im Vergleich zu WKY reduziert [Song et al., 2006]. I.v. Bolusinjektion von Ull in Ratten verursachten Vasodilatation, Hypotension und Tachykardie [Gardiner et al., 2001; Lin et al., 2003]. Die Tachykardie wurde durch die indirekte sympathische Aktivierung über den Baro-Reflex vermittelt, welches wiederum durch die Hypotension ausgelöst wurde [Lin et al., 2003]. Bei SHR verursacht eine Bolusinjektion von hUll im Gegensatz zu WKY einen größeren Blutdruckabfall [Gendron et al., 2005]. Behm et al. beschrieb nach i.v. Infusion von Ull bei Katzen eine Zunahme des mittleren Blutdrucks und des systemischen Gefäßwiderstandes bei unveränderter Herzfrequenz und Schlagvolumen als „klassisch systemische hypertensive Antwort“ [Behm et al., 2004].

Ull könnte eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Arteriosklerose spielen [Bousette et al., 2004]. In arteriosklerotischen Gefäßen konnte Ull nachgewiesen werden [Ames et al., 1999; Maguire et al., 2004; Bousette et al., 2004]. Es wurden erhöhte Ull Werte in endothelialen, myointimalen und medialen Glattenmuskelzellen arteriosklerotischer Koronararterien gefunden werden [Hassan et al., 2005]. Auch ein Herabsetzen der endothelialen Barriere und eine in vivo Erhöhung der Plasma-Extravasation der Brustaorta der Ratte durch Ull konnte gezeigt werden [Gendron et al., 2005]. Eine Ursache in der Pathogenese der Arteriosklerose kann die endotheliale Hyperpermeabilität in den Gefäßen sein. Als Risikofaktor für die Arteriosklerose sind

oxidierte Formen von Low-density-lipoprotein (LDL) bekannt. Sie können über eine Interaktion mit einem oxidierten LDL Rezeptor (LOX-1), das an menschlichen Endothelzellen exprimiert wird, direkt zu einer endothelialen Dysfunktion führen [Moriwaki et al., 1998]. Oxidierte LDL's führen zu Arteriogenese über multiple Mechanismen wie Chemotaxis, Apoptose und mitogene Effekte auf glatten Gefäßmuskelzellen [Witztum & Steinberg 2001]. Ull regt ebenfalls die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in vitro an, dieser Effekt wird über die Aktivierung von RhoA-Rhokinase und der Extracellulär signal-regulated kinase (ERK) vermittelt [Sauzeau et al., 2001; Tamura et al., 2003]. Ull und oxidierte LDL's zusammen beschleunigen die Arteriogenese aufgrund ihrer proliferativen Wirkung.

Einige tierexperimentelle Studien zeigen, dass Ull eine wichtige Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen spielen könnte. So konnte in isolierten, perfundierten Rattenherzen ein dosisabhängiges Ansteigen des koronaren Perfusionsdrucks beobachtet werden [Gray et al., 2002]. Ebenso verringerte Ull an isolierten Rattenherzen den Blutfluss in den Koronarien [Zhou et al., 2003]. Ull verursacht eine gesteigerte Prokollagen-I und -III Genexpression sowie die Synthese von Kollagen-I, -III und von Fibronectin $\alpha_1(I)$ und $\alpha_1(III)$ in den Herzfibroblasten neugeborener Ratten, es führt auf kultivierten Herzmuskelzellen neugeborener Ratten zu einer Hypertrophie [Tzanidis et al., 2003]. Die Aktivierung diverser Signalkaskaden dazu gehören ERK $_{1/2}$, JNK, p38, MAPK, Phosphatidylinositol 3-kinase und Calcineurin können die Transkription oder /und Translation, die zu einer myokardialen Hypertrophie führen reguliert werden [Lim et al., 1999; Ritter et al., 2002]. Eine hoch-Regulation des UTR System wurde vorzugsweise im rechten Ventrikel von Ratten mit Rechtsherzinsuffizienz und sekundärer pulmonare Hypertension beobachtet [Zhang et al., 2002]. Bei Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz [Douglas et al., 2002], CHF, pulmonaler Hypertonie und auch in artherotischen Plaques wurde eine starke Ull und UTR Expression beobachtet. Ein Zusammenhang zwischen kardialen Füllungsdruck und Ull Plasmakonzentration konnte bei Patienten mit KHK nachgewiesen werden [Heringlake et al., 2004]. Auch die myokardiale Ull Expression war umgekehrt mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion korreliert und positiv mit der enddiastolischen Füllung des linken Ventrikels korreliert [Douglas et al 2002]. Eine hUll (100 - 3000 pmol/kg) Injektion bei Cynomolgus Affen führte zu einer Zunahme des Gefäßwiderstandes und eine Abnahme des HZV's bis hin zum Tod [Ames et al., 1999]. Zhu et al., beobachtete bereits bei einer geringen Ull (<

30 pmol/kg) Injektion bei anästhesierten Cynomolgus Affen eine negative Inotropie und eine Reduktion des HZV's bis hin zum Tod [Zhu et al., 2003]. Ull und UTR sind bei Ratten mit Myokardinfarkt hoch-reguliert [Tzanidis et al., 2003]. Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom war der Ull Plasmaspiegel niedriger als bei Patienten mit stabiler Koronararterienerkrankung [Huynh et al., 2003]. Ull Plasmawerte sind bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt signifikant höher als bei Kontrollgruppen. Die Ull Konzentrationserhöhung während des akuten Myokardinfarkts verursacht eine bessere Herzleistung und somit eine besser Prognose. Zu einer Zeit, in der das Gefäßsystem am vulnerabelsten ist, könnte Ull kardioprotektiv wirken. Es könnte post akutem Myokardinfarkt peripher einen vasodilatatorischen Effekt haben und so das Infarktmyokard entlasten [Sohail et al., 2006]. Neben der vasokonstriktorisches Rolle spielt Ull eine physiologische Rolle in myokardialen Remodelling-Prozessen [Schmidt et al., 2005]. Im menschlichen Herzen hat Ull in isolierten Trabekelzellen des Atriums einen positiv inotropen Effekt. Die Wirksamkeit von Ull im rechten Ventrikel und in der rechten Kammer ist trotz seiner starken Potenz gering. Ull zeigte im linken Ventrikel keine Effekte bei Patienten mit CHF [Russell et al.,2001]. Bei Patienten mit ischämischen Herzerkrankungen war die myokardiale Ull Expression im linken Ventrikel und Artrium höher als im rechten, wohingegen die Expression bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie im linken und rechten Herzen gleichmäßig erhöht war [Douglas et al., 2002]. Ebenso zeigten Patinten mit ischämischer Kardiomyopathie höhere Plasmakonzentrationen an Ull im Aorta stamm verglichen mit der Pulmonalarterie, wohingegen Patienten mit nicht-ischämischer Kardiomyopathie keine signifikante Ull Erhöhung im Aortastamm zeigten [Russell et al.,2003]. Ull Serumkonzentrationen korrelieren positiv mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz, nach NYHA-Klasse gemessen [Lapp et 2004] und den beiden Markern für Linksherzhypertrophie. BNP und big ET1 [Gruson et al., 2005]. Beim akuten Myokardinfarkt ist neben anderen Parametern der Ull wert im Plasma erhöht und fällt drei Tage nach PTCA [Lapp et 2004].

Einige Autoren bringen Ull in Zusammenhang mit dem Wasserhaushalt.[Bond et al., 2002]. Im Teleost Fisch trägt Ull zur Osmoregulation bei [Ashton et. 2006]. Ull steuert die Wasserretention in hypertonem Medium bei Fischen [Balment et al., 2005]. In verschiedenen Fisch Spezies steuert es den Na und Cl Haushalt, indem es den aktiven epithelialen Na/Cl Transporter inhibiert [Loretz et al., 1985].

I.v. Ull Injektion verursacht bei Ratten eine leichte Abnahme des Nierenblutflusses [Gardiner et al., 2001; Song et al., 2003]. In Ratten verursacht eine geringe Ull Injektion (pmol/100g) eine Reduktion der GFR und eine Abnahme der Ausscheidung für Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} [Song et al., 2006]. Bei einer Anzahl von Nierenerkrankungen scheint Ull eine pathophysiologische Rolle zu haben, es ist jedoch noch unklar ob Ull eine Ursache ist oder ob es einen schützenden Einfluss hat. So hatten Patienten mit einer Glomerulonephritis eine Ull Konzentration, die Zwei- bis das Dreifache höher waren als die der Kontrollgruppen. Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und ohne Dialyse hatten zweifach und Patienten mit Hämodialyse hatten dreifach erhöhte Ull Plasmakonzentrationen im Vergleich zu Gesunden [Totsune et al., 2001]. Bei diabetischer Nephropathie hatten die Patienten höhere Ull Plasma- und Urinkonzentrationen [Totsune et al., 2004], verbunden mit einer 64 Fach höheren Ull Expression und eine 2000 Fach höheren UTR Expression [Langham et al., 2004]. Matsushita et al., sieht die erhöhte Ull Konzentration im Urin als ein Hinweis auf eine Verletzung des Nierentubulus und ist der Meinung, dass Ull als potentieller Marker eingesetzt werden könnte [Matsushita et al., 2001]. Im Endstadium von Nierenerkrankungen ist die Ull Plasmakonzentration stark erhöht [Mallamaci et al., 2005].

Eine pathophysiologische Rolle könnte Ull auch in der Pathogenese des Diabetes zukommen. Es konnte an perfundierter Rattenpankreas gezeigt werden, dass Ull (10 und 100 nM) die Insulinsekretion durch Glucose inhibierte [Silvestre et al., 2001]. Ull scheint direkt auf die β -Zellen des Pankreas zu wirken. Es wird von Silvestre et al., vermutet, dass Schädigungen am Gefäßendothel zur Ull Konzentrationserhöhung führen und diese wiederum die Insulinsekretion inhibiert und als ein Faktor in der Pathogenese des Diabetes wirken könnte [Silvestre et al., 2001]. Es konnte eine Erhöhung des zirkulierenden Ull Plasmaspiegels bei Patienten mit NIDDM gezeigt werden [Totsune et al., 2003]. Weiterhin verursacht eine zentrale Ull Applikation bei Schafen eine Hyperglykämie, dies könnte durch die Ull stimulierende Eigenschaft auf die Konzentration des zirkulierenden Adrenalins und Kortisols verursacht worden sein [Watson et al., 2003]. In der japanischen und chinesischen Bevölkerung ist die Lokalisation des Ull Gens UTS2 auf Chromosom 1p36 mit Diabetes Typ 2 assoziiert. Hanchinesen mit einem Single-Nukleotid Polymorphismus (SNP) im Ull Gen (143G > A (rs228648)) sind für Diabetes Typ 2 prädisponiert [Sun et al., 2002; Zhu et al., 2002]. In

der japanischen Bevölkerung ist ebenfalls ein SNP im UTS2-Gen (3836C > T (rs2890565) mit einer Insulinresistenz und einer Prädisposition für Diabetes Typ 2 verbunden [Suzuki et al., 2004; Wenyi et al., 2003].

Es scheint, dass es einen Zusammenhang zwischen Ull und dem metabolischen Syndrom gibt. Auf der Abbildung 4 sind einige Verknüpfungen im Überblick dargestellt.

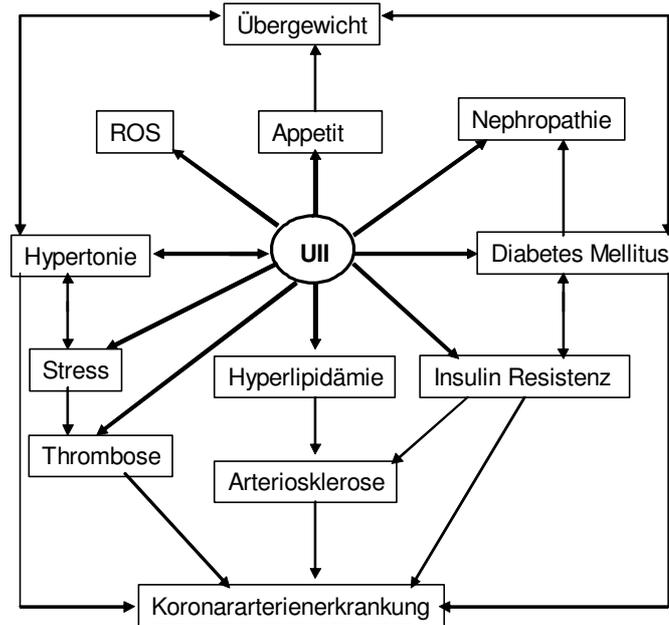


Abb. 4: Mögliche Rolle des Ull im metabolischen Syndrom [Watanabe et al., 2006].

In verschiedenen kultivierten Zellen wurden mitogene Eigenschaften von Ull gefunden, wie in den glatten Muskelzellen der Atemwege [Chen et al., 2001], in den glatten Gefäßmuskelzellen [Tamura et al., 2003] und in Nierenepithelzelllinien (LLCPK1) [Matsushita et al., 2003]. In einigen Tumorzellenlinien waren sowohl Ull als auch der UTR exprimiert, so z.B. in Nierenzellkarzinom Zelllinien (VMRC-RCW), in adrenokortikalen Karzinomzelllinien (SW13), in Glioblastomzelllinien (T98G), Neuroblastomzelllinien (IMR32), in kolorektalen Karzinomzelllinien (DLD-1), Chorionkarzinom-Zelllinien (BeWo) und in Zervikal-Karzinom-Zelllinien (HeLa) [Takahashi et al., 2003]. Einige Studien haben diesen mitogenen Effekt von Ull mit der Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase (ERK)1/2 in Zusammenhang gebracht [Tamura et al., 2003],

Auch Entzündungsmediatoren scheinen einen Einfluss auf die Ull und UTR Expression zu haben. Interleukin-6 β und Interleukin-1 β [Johns et al., 2004] induzieren eine hoch-Regulierung der Ull und UTR Expression. In den Skelettmuskelzellen wird durch Interferon γ ebenfalls eine Ull und UTR Expression induziert [Birker-Robaczewska et al., 2003].

Bei Leberzirrhose Patienten gibt es weniger Ull exprimierende Zellen als bei Gesunden. Der Ull Serumspiegel ist erhöht, jedoch ist das Ull extrahepatischen Ursprungs [Leifeld et al., 2005]. Es besteht eine negative Korrelation des Ull Serumspiegels zu dem mittleren arteriellen Druck und eine positive Korrelation zum portalen Druck [Cheung et al., 2004].

Einen Überblick über UII und die dazu in Verbindung stehenden Erkrankungen, kann der Tabelle 2 entnommen werden.

Tab. 2: Signifikante Veränderungen UII und UTR bei Erkrankungen. + Erhöhung.

Spezies	Krankheiten	Veränderungen im UII und UTR System		Referenzen
		UII	UTR Expression	
Mensch	Herzinsuffizienz	+ Plasma	+ Kardiomyozyten	Douglas et al., 2002; Russell et al., 2003; Lapp et 2004
Ratte	Herzinsuffizienz		+	Tzanidis et al., 2003
Mensch	Kardiomyopathie	+ Plasma	+ Kardiomyozyten	Douglas et al., 2002; Russell et al., 2003
Mensch	Koronarsyndrom	+ Plasma		Huynh et al., 2003
Mensch	Myokardinfarkt	+ Plasma		Sohail et al., 2006
Ratte	Myokardinfarkt		+ Kardiomyozyten	Tzanidis et al., 2003
Mensch	Arteriosklerose	+ in endothelilen, myointimalen und medilen glatten Gefäßmuskelnzellen		Bousette et al., 2004; Hassan et al., 2005
Mensch	Hypertonie	+ Plasma		Matsushita et al., 2001; Cheung et al., 2004
		+ Urin		
Ratte	Hypertonie	+ Plasma		Song et al., 2006
Ratte	Chronische Hypoxie		+ rechten Ventrikel	Zhang et al., 2002
Mensch	Niereninsuffizienz	+ Plasma		Totsune et al., 2001; Totsune et al., 2004
		+ Urin		
Mensch	Diabetes Mellitus	+ Plasma		Totsune et al., 2003; Totsune et al., 2004
Mensch	Leberzirrose	+ Plasma		Leifeld et al., 2005
Mensch	In einigen Tumoren	+ Expression	+	Takahashi et al., 2003

1.1 Problemstellung und Zielsetzung

UII kann mit zahlreichen Erkrankungen des menschlichen und tierischen Organismus in Zusammenhang gebracht werden. Es ist jedoch noch nicht geklärt ob UII Ursache von Erkrankungen ist oder ob es eine protektive Eigenschaft bezüglich der Erkrankung oder der Organschädigung besitzt. Weitgehend unbekannt ist der genaue Hergang der UII Generierung und die Beteiligung der einzelnen Proteine. Ebenso ist noch nichts zur Metabolisierung von UII und der daran beteiligten Enzyme bekannt. Um die pathophysiologischen und pathobiochemischen Zusammenhänge besser zu verstehen, muss das UII-System genauer erforscht und verstanden werden. Dies ist wichtig, um bei den jeweiligen Erkrankungen therapeutische Konsequenzen ziehen zu können.

In dieser Dissertation wird der Frage gefolgt, ob es im Schweinenierengewebe ein UII-metabolisierendes Enzym gibt und welche Identität dieses Enzym hat.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Instrumente und Geräte

Für die Chromatographien wurden die HPLC Anlagen Purifier und Explorer der Firma GE Healthcare genutzt. Das Massenspektrometer Reflex III MALDI-TOF der Firma Bruker Daltonics wurde für den MES Assay verwendet. In den 96Well-Mikrotiterplatten und in Eppendorfgefäßen beide von der Firma Sarstedt fanden Immobilisierungen und Inkubation der Reaktionsgemische statt. Auf dem Horizontalschüttler Typ KL 2 von Fisher Biblock Scientific der Firma SIGMA wurden die Inkubation durchgeführt. Mit dem Multidrop Ilex der Firma Perkin Elmer wurden Aliquots aus Reaktionsgemischen für den Reinigungsschritt 1 und 2 abgenommen und auf den MTP AnchorChip 384/400 von Bruker Daltonics aufgetragen. Ab dem Reinigungsschritt 3 erfolgte die Verwendung des Pipettierroboters Genesis Freedom 200 von Tecan mit dem TeMo 96 Kopf. Der MTP AnchorChip 384/400 von Bruker Daltonics wurde mit dem Ultraschallbad Sonorex von der Firma Bandelin gereinigt. Mit den Pipettierrobotern Multiprobe Ilex und Genesis Freedom 200 wurden alle Pipettierschritte der PPS-Experimente durchgeführt. In 1,2 ml DeepWell Platten von der Firma ABGene wurden die dazu benötigten Chromatographiegele und Puffer dem Multidrop Ilex bereitgestellt. 96-DeepWell-Platten wurden mit dem Dispenser Multidrop DW der Firma Thermo Electron vorbereitet und dem Genesis Freedom 200 bereitgestellt. Die Aktivierung der CNBr-aktivierten Sepharose fand in 15 ml Falcon Tubes der Firma Becton Dickson statt. Für die Immobilisierungen von Proben wurde der Überschlagrotor ROTOR DRIVE ST R4 von Stuart Scientific genutzt. Zur Versiegelung der PPS-Platten wurde der Heatsealer von ABGene verwendet. Mit Hilfe des Photometers iEMS Reader MF von Thermo Labsystems wurden in Mikrotiterplatten 96Well F von Sarstedt Proteinkonzentrationen der Eluate und Überstände von den PPS Experimenten der Reinigungs-Schritte 1 und 2 bestimmt. Für alle weiteren PPS Experimente erfolgte die Proteinbestimmung der Eluate und Überstände mit dem UV-Reader Genios der Firma Tecan. Die Proteinfractionen wurden mit den 10 kDa Amicon Ultra Zentrifugenfiltern von der Firma Millipore eingengt, dazu wurde die Zentrifuge Multifuge 3 S-R von Heraeus benutzt.

Die Extrakte wurden mit der Sorvall Zentrifuge RC50 mit dem Rotor SS-34 zentrifugiert. Bei größeren Volumina wurde der GSA Rotor der Firma Sorvall benutzt. Für alle anderen Zentrifugationen wurde die MULTIFUGE 3 S-R und die Tischzentrifuge Fisher Biblock Scientific 1-15 der Firma Sigma verwendet. Zur pH-Wert Einstellung wurde die InLab®422 Combination Semi-micro pH Electrode von METTLER TOLEDO genutzt. Das Dispergierwerkzeug S 25 N-18G von der Firma IKA-Werke bei 12000 U/min wurde für die Homogenisierungen eingesetzt. Für Einwaagen wurde die XP-300 von der Firma Denver Instrument verwendet. Zum Ansetzen von Lösungen und Puffern wurde das Magnetrührgerät MR2002 der Firma Heidolph verwendet. Die Sterilbank LaminAir von Holten wurde für die Vorbereitung der Proben ab der zweiten Chromatographie genutzt. Mit der LC-ESI MSD Trap XCT Ultra der Firma Agilent Technologies erfolgte die Identifizierung der tryptischen Peptide. Zur relativen Quantifizierung des durch UME umgesetzten humanen UII zu des-Val-UII wurde das Elektrospray-Ionisation-Ionenfallen-Massenspektrometer (ESI-IT-MS) LCQ DECA XPPlus, sowie der Autosampler SpectraSystem AS3000, die HPLC-Anlage SpectraSystem SCM1000 und P4000 von Thermo genutzt. Die computergestützte Steuerung des LC-ESI-IT-MS erfolgte über die Software LCQ tune und Xcalibur. Die Mikroinserts 0,1 ml (30 x 5 mm), die in den passenden Probenflaschen mit Naturgummi-Septum-Gewindeverschluss SUPELCO von der Firma Sigma-Aldrich stammen, wurden für die Probenzufuhr im Autosampler zur HPLC genutzt. Die direkte Injektion von Proben in das ESI-IT-MS erfolgte mit einer 500 µl Hamiltonspritze in der Spritzenpumpe.

2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Reagenzien

Acetonitril (ACN)	Firma Merck (Darmstadt)
AEBSF	Firma AppliChem (Darmstadt)
Ameisensäure,	Firma Fluka (Taufkirchen)
Ammoniumacetat	Firma Sigma (Taufkirchen)
(Apo) Transferin	Firma Sigma (Taufkirchen)
Aprotenin,	Firma AppliChem (Darmstadt)
Bestatin	Firma AppliChem (Darmstadt)
Bis-Tris	Firma Fluka (Taufkirchen)
Bis-Tris-Propan	Sigma (Taufkirchen)
Bradford-Lösung Commassie- Plus	

Protein Assay Reagent	Firma PIERCE (Bonn)
BSA (bevin Serum Albumin)	Firma Sigma (Taufkirchen)
Calcium-(II)-chlorid	Firma Merck (Darmstadt)
CAPS	Firma Sigma (Taufkirchen)
CHES	Firma Sigma (Taufkirchen)
Chymostatin	Firma AppliChem (Darmstadt)
CNBr-aktivierte Sepharose Beads (6MB)	Firma GE Healthcare (Freiburg)
Cobalt-(II)-chlorid	Firma AppliChem (Darmstadt)
Crosslinker EDC	Firma PIERCE (Bonn)
Diethanolamin	Firma Sigma (Taufkirchen)
2,5-Dihydroxy-benzoesäure (DHB)	Firma Sigma (Taufkirchen)
DTT	Firma Sigma (Taufkirchen)
EDTA	Firma Bio-RAD (München)
Eisen(III)-chlorid Hexahydrat	Firma Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Firma Fluka (Taufkirchen)
Ethanol	Firma Sigma (Taufkirchen)
Faktor IXa□	Firma Kordia life Sciences (Leiden, Niederlande)
Feritin	Firma Sigma (Taufkirchen)
Glycin	Firma Serva (Heidelberg)
Harnstoff	Firma Sigma (Taufkirchen)
HEPES,	Firma Sigma (Taufkirchen)
HSA (human Serum Albumin)	Firma Sigma (Taufkirchen)
IMAC-	Firma Merck (Darmstadt)
Iodacetamid	Firma Sigma (Taufkirchen)
K ₂ HPO ₄	Firma Merck (Darmstadt)
KCL	Firma Merck (Darmstadt)
Kupfer-Sulfat-Pentahydrat	Firma Sigma (Taufkirchen)
Leupeptin	Firma AppliChem (Darmstadt)
LiCrosolv	Firma Merck (Darmstadt)
Lysozym	Firma Sigma (Taufkirchen)
Magnesiumsulfat Heptahydrate	Firma Fluka (Taufkirchen)
MES	Firma Sigma (Taufkirchen)
MOPS	Firma Sigma (Taufkirchen)

Natriumchlorid (NaCl)	Firma Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Firma AppliChem (Darmstadt)
NaH ₂ PO ₄	Firma Merck (Darmstadt)
Natriumphosphat	Firma Merck (Darmstadt)
Natronlauge (NaOH)	Firma Merck (Darmstadt)
Nickel-(II)-sulfat	Firma AppliChem (Darmstadt)
N-methyl-diethanolamin	Firma AppliChem (Darmstadt)
N-Methylpiperazin	Firma Merck (Darmstadt)
Pepstatin A	Firma Serva (Heidelberg)
Piperazin	Firma Fluka (Taufkirchen)
Salzsäure (HCl)	Firma Merck (Darmstadt)
Triethanolamin	Firma Fluka (Taufkirchen)
Trifluoressigsäure (TFA)	Firma Fluka (Taufkirchen)
Tris 1,3	Firma Merck (Darmstadt)
UII vom Schwein	WITA GmbH (Berlin)
UII vom Menschen	Charite Peptidsynthese Dr. Henklein Inst. F. Biochemie (Berlin)
Zink-(II)-chlorid	Firma Sigma (Taufkirchen)

2.1.3 Chromatographiematerialien sowie Chromatographiesäulen

Chromatographiegele:

Butyl Sepharose 4FF	Firma GE Healthcare (Freiburg)
EAH Sepharose 4B	Firma GE Healthcare (Freiburg)
Fractogel EMD Chelat (M)	Firma Merck (Darmstadt)
Fractogel EMD SO ₃ ⁻ (M)	Firma Merck (Darmstadt)
HAP	Firma BioRad (München)
Macro-Prep-Methyl HIC Support	Firma BioRad (München)
Macro-Prep-t-Butyl HIC Support	Firma BioRad (München)
Octyl Sepharose 4FF	Firma GE Healthcare (Freiburg)
Phenyl Sepharose 6FF	Firma GE Healthcare (Freiburg)
QAE-550C	Firma Tyopearl

Q-Sepharose FF	Firma GE Healthcare (Freiburg)
Toyopearl Butyl 650M	Firma Tosoh (Stuttgart)
Toyopearl DEAE 650M	Firma Tosoh (Stuttgart)
Toyopearl Ether 650M	Firma Tosoh (Stuttgart)
Toyopearl Hexyl 650C	Firma Tosoh (Stuttgart)
Toyopearl Phenyl 650M	Firma Tosoh (Stuttgart)
Toyopearl Super Q 650M	Firma Tosoh (Stuttgart)
UNOsphere Q	Firma BioRad (München)

Säulengehäuse:

Pharmacia 10/10, XK 50	Firma GE Healthcare (Freiburg)
Superdex 200 HR 10/30	Firma GE Healthcare (Freiburg)
Tricorn	Firma GE Healthcare (Freiburg)
Reversed-Phase Chromatographie- Säule 5RPC 4.1x150	Firma GE Healthcare (Freiburg)
ZORBAX SB-C18 Prep HAT 21.2x210 mit Stahlgehäuse	Firma Agilent (Waldbronn)
HPLC Chip 40nl trap 75µm x 15mm 5µm C18 SB-ZX	Firma Agilent (Waldbronn)

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeiner Teil

2.2.1.1 Methoden der Chromatographien

Die Chromatographie ist eine Trennmethode, die mit Hilfe von Gas- oder Flüssigkeitsstrom gelöste Substanzmischungen über eine stationäre Phase leitet und diese in ihre einzelnen Bestandteile auftrennt [Lottspeich et al 2005]. Dabei werden die Bestandteile des Gemisches, auf Grund von molekularen Wechselwirkungen wie hydrophober oder elektrostatischer, unterschiedlich zwischen der stationären und der mobilen Phase verteilt. Methoden in denen sich die stationäre Phase in einer Säule oder Kapillare befindet und die mobile Phase als flüssiger Eluent diese durchströmt, wird Flüssigkeitschromatographie genannt und findet in dieser Arbeit Anwendung.

2.2.1.2 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Die HPLC bezeichnet eine spezielle Form der Flüssigkeitschromatographie [Schwedt et al 1996], bei der eine hohe Auflösung durch die Flussrate erzeugt wird. Bei diesem Prozess wird Druck freigesetzt. Eine HPLC-Anlage besteht aus vier Bestandteilen, der Pumpe, dem Einspritzsystem, der Trennsäule und einem Detektor [Quelle: Schwedt, Georg: Taschenatlas der Analytik; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1996].

2.2.1.3 Ionenaustausch-Chromatographie

Auf der Grundlage kompetitiver Wechselwirkungen beruht die Ionenaustausch-Chromatographie [Lottspeich et al 2005]. Abhängig vom pH-Wert und der Aminosäurezusammensetzung trägt jedes Protein eine positive oder negative Nettoladung. Je nach Ladungszustand bindet das Protein an positiv oder negativ geladene Materialien. Die stationäre Phase besteht meist aus einem unlöslichen organischen Polymer, wie Cellulose, Polystyrol oder vernetzte Polyacrylamid- oder Polydextrane, die an der Oberfläche elektrische Ladungen tragen und durch bewegliche Gegenionen neutralisiert sind. Die mobile Phase enthält Ionen, die je nach Affinität eine hohe Aufenthaltswahrscheinlichkeit an der stationären Phase haben. Dabei

wandern Ionen mit einer hohen Affinität langsamer durch die Säule als die mit einer niedrigen Affinität. Carboxylatgruppenderivate oder Sulfonsäurereste werden meist als funktionelle Gruppen bei Kationenaustauschern genutzt. Als Anionenaustauscher werden Ammoniumgruppen ($-\text{NR}_3^+$, NR_2H^+ oder NH_3) als funktionelle Gruppen eingesetzt [Lottspeich et al 2005].

2.2.1.4 Sample-Displacement-Chromatographie

Bei der Verdrängungs-Chromatographie (Displacement-Chromatographie) werden die an die stationäre Phase adsorbierten Moleküle durch ein Molekül aus ihrer Bindung gedrängt, das eine höhere Affinität zur stationären Phase hat, als die Probenmoleküle. Dieses Verdrängermolekül (Displacer) ist dem Eluent B zugemischt und wird auf die Säule gepumpt, sobald die Probe auf die Säule aufgetragen worden ist. Während des Elutionsvorgangs schiebt der Displacer die Probenmoleküle vor sich her. Die Sample-Displacement-Chromatographie ist eine spezielle Form der Displacement-Chromatographie, die sich durch hohe Konzentrierung und Reinheit des Getrennten Moleküls auszeichnet.

2.2.1.5 Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC)

Dieses chromatographische Verfahren nutzt hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Probenmolekülen und der stationären Phase. Dabei binden unter hohen Salzkonzentrationen Proteine mit ihrer unpolaren Oberflächenseite an schwach hydrophobe Liganden einer stationären Phase [Lottspeich et al 2005]. Hydrophobe Substanzen binden in einem hydrophilen Medium an hydrophobe funktionelle Gruppen (wie z.B. Phenyl-, n-Octyl- und n-Butyl- Gruppen).

2.2.1.6 Affinitäts-Chromatographie

Bei der Affinitäts-Chromatographie werden biologische Wechselwirkungen (wie elektrostatische-, hydrophobe Interaktionen, van der Waals Kräfte oder Wasserstoffbindungen) zwischen einem spezifischen Liganden und einem Protein oder einer Gruppe von Proteinen ausgenutzt und diese so getrennt. Dabei wird der spezifische Ligand an die jeweilige Chromatographiematrix kovalent gebunden. Die Affinitäts-Chromatographie bietet eine sehr hohe Selektivität, da es die einzige Chromatographiemethode ist, die ein Biomolekül auf der Grundlage seiner biologischen Funktion oder einzelner chemischer Strukturen reinigt. Mit der Methode kann man aktive Biomoleküle von denaturierten oder funktionell unterschiedlichen Formen trennen. Das adsorbierte Zielmolekül kann dann spezifisch mit einem konkurrierenden Liganden oder unspezifisch durch Änderungen des pH-Wertes, der Ionenstärke oder Polarität von der Chromatographiematrix eluiert werden [Lottspeich et al 2005].

2.2.1.7 Größenausschluss-Chromatographie

Größenausschluss-Chromatographie, auch Gelfiltration genannt, bezeichnet ein Trennverfahren, das Moleküle aufgrund ihrer Größe und Form trennt. Hierbei wird poröses Trägermaterial eingesetzt, das wie ein Molekularsieb wirkt. Im Ausschlussvolumen des Trägermaterials eluieren die großen Moleküle, die aufgrund ihrer Größe nicht in die Poren hineinpassen, während die kleinen Moleküle in die Poren des Trägermaterials wandern, aus diesem Grund einen deutlich längeren Weg durch die Chromatographiesäule zurücklegen und deshalb später eluieren [Lottspeich et al 2005].

2.2.1.8 MALDI-Massenspektrometrie (Matrix-unterstützte Laser Desorptions- / ionisations-Massenspektrometrie)

Mit der MALDI-Massenspektrometrie können intakte Proteinmoleküle bestimmt werden. Das Prinzip beruht auf einer Erzeugung von gasförmigen Ionen aus einer kristallinen Probe. Dafür wird die Probe auf einem metallischen Probenhalter mit einer Matrix aus organischen Molekülen vermischt. Anschließend kristallisieren die Matrix und das

Analyt nach dem Verdunsten des Lösungsmittels. Im Vakuum des Massenspektrometers wird dabei die kristalline Probe wenige Nanosekunden lang einem starken Impuls von kurzwelligem Laserstrahlen ausgesetzt und die Ionen in einen gasförmigen Zustand versetzt. Die Ionen in der Gasphase werden im Massenanalysator nach ihrem Verhältnis der Masse zur Ladung getrennt und anschließend detektiert. Mit Hilfe eines elektrischen Feldes werden die Ionen in Richtung des Detektors beschleunigt. Bei dem Flugzeitmassenspektrometer (TOF = Time of Flight) wird die Zeit, die zwischen der Ionisierung bis zum Erreichen des Detektors vergeht, zur Bestimmung der Masse genutzt [Lottspeich et al 2005].

2.2.1.9 LC-ESI MS/MS

Die LC-ESI MS/MS nutzt zur Ionisierung der Analyten die Elektrospray-Ionisation. Das Massenspektrometer ist in diesem Fall an eine HPLC-Anlage gekoppelt, mit der die zu untersuchende Probe vor der massenspektrometrischen Analyse chromatographisch getrennt wird. Durch diese Kopplung ist es möglich mit dem UV-Chromatogramm eine direkte Verbindung der Retentionszeit des Analyten und der entsprechenden Masse durch den Totalionenstrom (TIC = total ion current) des Massenspektrometers herzustellen. Bei der LC-ESI MS/MS werden die in einer Lösung gelösten Ionen im elektrischen Feld unter Atmosphärischemdruck in den gasförmigen Zustand überführt. Dazu wird kontinuierlich in eine leitfähige Kapillare die Analytlösung geführt. Die Ionen der Analytlösung werden durch ein angelegtes elektrisches Feld zwischen Kapillare und Massenspektrometer getrennt. Das elektrische Feld wird dann durch die Umverteilung der Ionen aufgehoben. Dabei kommt es auch zur Bildung mehrfach geladener Ionen. Entsprechend der Masse stellen sich für Peptide und Proteine eine Ionensignalserie mit jeweils einer Ladungsdifferenz im Massenspektrum dar. Einfach und doppelt geladene Moleküle können anhand der Abstände zwischen der Isotopen entschieden werden [Lottspeich et al 2005].

2.2.2 Spezieller Teil

2.2.2.1 Reinigungsstrategie

Die Reihenfolge der angewandten Methoden, zur Reinigung der Fraktion mit UME zur nahen Homogenität, wird in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Als Ausgangsmaterial wurden Schweinenieren aus einem lokalen Schlachthaus käuflich erworben.

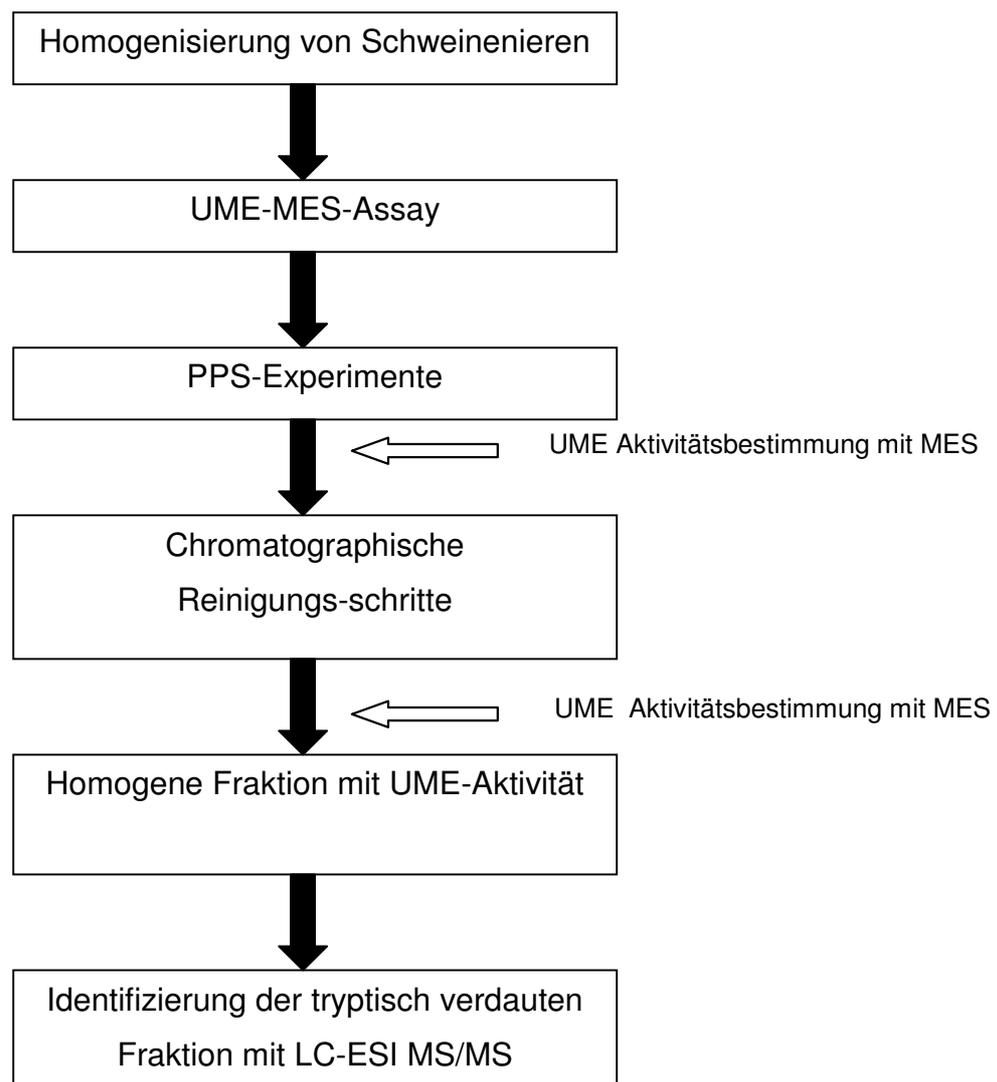


Abb. 5: Schema zur Reinigung der UME-Fractionen.

Zunächst wurde ein Assay zum Nachweis von UME-Aktivität entwickelt (UME-MES-Assay). Anschließend wurden mit Hilfe des Protein-Purification-Parameter-Scouting-System (PPS), dass ein automatisiertes parallelelaufendes Batchchromatographieverfahren ist, in kurzer Zeit viele chromatographische Parameter wie Puffer und Gele auf ihre Eignung zur optimalen Reinigung des Zielproteins getestet. Anhand des PPS können die optimalen chromatographischen Bedingungen gefunden und auf eine Säulenchromatographie übertragen werden [Thiemann et al. 2004].

2.2.2.2 Entwicklung eines Massenspektrometrie-basierten Enzym-Screening-Systems (MES-System) zur Detektion einer UME-Aktivität

2.2.2.2.1 Herstellung des UME-Substrats UII

Das porcine UII-Peptid mit der Aminosäuresequenz GPPSECFWKYCV wurde von der WITA GmbH Berlin synthetisiert. In 100 mM Ammoniumacetat bei einem pH-Wert von 7 wurde das Peptid aufgenommen und auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml eingestellt und anschließend 48 Stunden inkubiert. Die Lösung wurde anschließend auf 0,1 % TFA eingestellt und auf eine 75 ml Reversed Phase Säule 5RPC 4.1x150 aufgetragen. Der Puffer A bestehend aus 0,1 %iger TFA Lösung und Puffer B bestehend aus 80 % ACN wurde als mobile Phase verwendet. Die Reversed-Phase-Chromatographie (RPC) wurde bei einem Fluss von 15 ml/min durchgeführt. Der Gradient verlief linear von 0 % B auf 60 % B in 45 Minuten dann auf 100 % B für 5 Minuten. Es wurden 10 ml Fraktionen gesammelt. Aus der RPC gewonnene Peptid-Fractionen wurden bei -80 °C eingefroren und anschließend in der Vakuumzentrifuge Savant SPD111V getrocknet. Die getrockneten Peptide wurden in 1000 µl destilliertem Wasser gelöst. 1 µl dieser Lösungen wurde anschließend auf einen MTP AnchorChip aufgetragen, dazu wurde je 1 µl einer Lösung aus 30 mg/ml DHB in 50 % ACN pipettiert. Die dann eingetrockneten Proben wurden massenspektrometrisch analysiert. Die Peptid-Fractionen die ein Signal von 1413,6 Da zeigten, wurden für die weiteren Experimente verwendet.

2.2.2.2 Immobilisierung der Proteinfractionen

BrCN-aktivierten Affinitätsbeads wurden zur Immobilisierung der Proteinfractionen benutzt. Eine bestimmte Menge an trockenen Sepharosebeads wurden dafür in ein 15 ml Falcon Tube gegeben und mit der doppelten Menge an 1 mM HCl-Lösung aufgefüllt. Zum Quellen der Beads, wurde das Gefäß auf dem Überschlagrotor 1 Stunde inkubiert. Die überschüssige 1 mM HCl-Lösung wurde dann von den Beads abpipettiert und anschließend 6mal mit jeweils 15 ml 1 mM HCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH-Wert 8,3) und die jeweilige Proteinfractione zu den Beads gegeben (Volumina werden in den jeweiligen Kapiteln angegeben). Auf dem Überschlagrotor erfolgte dann die Immobilisierung für 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und verworfen, zu den Beads wurde dann Blockierungspuffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, 0,2 M Glycin, pH-Wert 8,3) gegeben (Volumen sind im jeweiligen Kapitel angegeben) und dieser für 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht auf dem Überschlagrotor inkubiert. Die immobilisierten Proteine wurden nach der Blockierung 3mal mit 100 µl destilliertem Wasser gewaschen und anschließend zu gleichen Aliquots in eine Mikrotiterplatte 96Well K verteilt und mit 100 µl destilliertem Wasser aufgefüllt. Der Überstand der Proteinfractionen wurde entfernt und die Beads 2mal mit 100 µl destilliertem Wasser gewaschen.

2.2.2.3 Inkubation der immobilisierten Proteinfractionen mit Ull

Die immobilisierten Proteinfractionen wurden mit 10 µl einer 1/50 Verdünnung von Ull gegeben und anschließend mit 40 µl destilliertem Wasser überschichtet. Auf einem Horizontalschüttler erfolgte die Inkubation.

2 µl einer DHB-Matrix-Lösung (5 mg/ml DHB in 50 % ACN; 0,1 % TFA) wurde auf einen MTP AnchorChip pipettiert und getrocknet. Nach 1, 2, 3 und 4 Stunden (falls es nicht anders vermerkt ist) wurden von der Reaktionsmischung jeweils 3mal 2 µl Aliquots abgenommen und auf die DHB-Matrix des AnchorChips pipettiert. Die Proben wurden dann mittels MALDI-MS analysiert.

2.2.2.2.4 Semiquantitativer Nachweis der Reaktionsprodukte mittels MALDI-Massenspektrometrie

Zunächst wurden die MALDI-Massenspektren der Reaktionslösungen gemessen. Anschließend wurde zum semiquantitativen Nachweis der Reaktionsprodukte, das Verhältnis der Signalintensitäten des Signals von des-Val-Ull 1314,79 Da zu Ull 1413,97 Da gebildet. Es wurden Mittelwerte von den n=3-Messungen der Intensitätsverhältnisse berechnet und von allen Zeitpunkten addiert. Der erhaltene Wert wurde als UME-Aktivität angegeben. Alle Schritte wurden mit einem Visual Basic Skript automatisch ausgeführt.

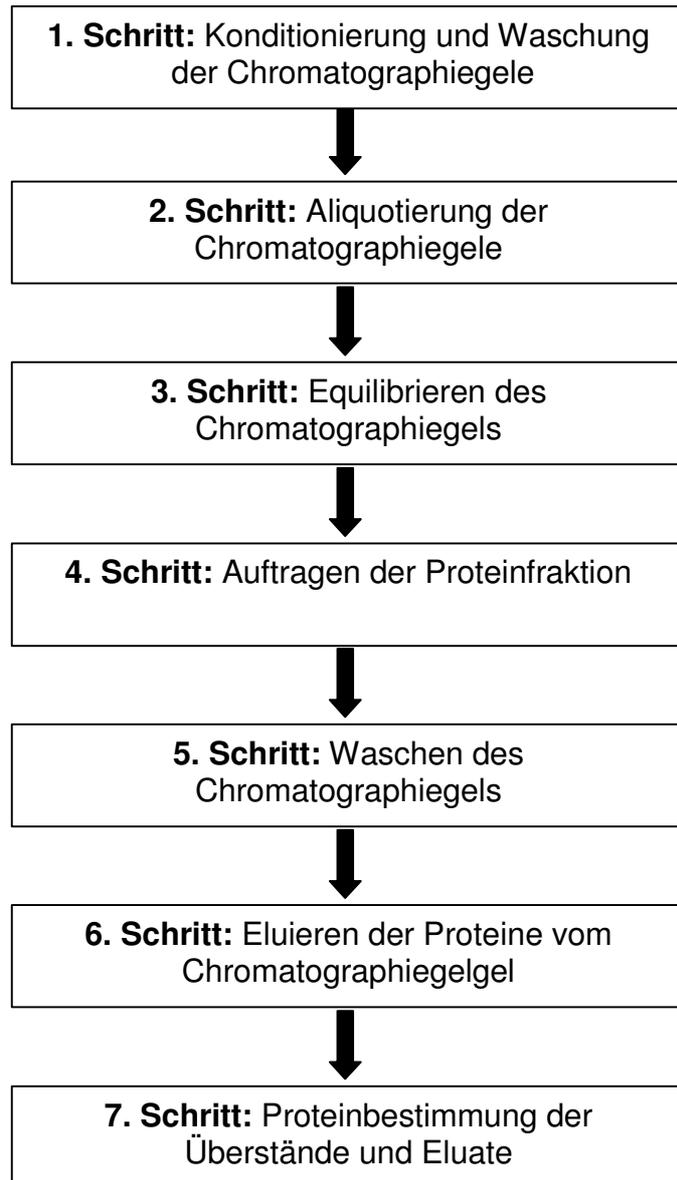
2.2.2.3 Gewinnung eines homogenen Pools aus Schweinenierengewebe

Aus einem lokalen Schlachthaus wurden 80 Schweinenieren bezogen. Die Schweinenieren wurden kurz nach der Entnahme in 1 cm³ kleine Stücke geschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach der Gefriertrocknung wurde aus dem Gewebe ein Pulver hergestellt.

2.2.2.4 Suche nach geeigneten chromatographischen Parametern zur Proteinreinigung (PPS)

Mit dem PPS-System, einem Verfahren zur schnellen Prüfung von Parametern auf ihre Eignung zur chromatographischen Reinigung von Zielproteinen, wurden die Bedingungen zur säulenchromatographischen Reinigung der UME-Fraktion bestimmt. Das PPS-System nutzt eine automatisierte parallele Batchchromatographie in der 96er-Deepwell-Platte. Die Schritte zur Durchführung der PPS-Experimente werden in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Der erste Schritt bestand darin, die Chromatographiematerialien zu konditionieren und zu waschen. Dazu wurde ein definiertes Volumen des zu testenden Chromatographiegels, in ein Gefäß gefüllt und bis zur Sedimentation des Gels abgewartet. Nach dem das Gel dann sedimentiert war, wurde der Überstand abgenommen und das Gel mit destilliertem Wasser dreimal gewaschen und anschließend konditioniert. Nach der Konditionierung wurde das Gel 3mal mit destilliertem Wasser gewaschen und der Überstand nach der Sedimentation des Gels verworfen. Im Anschluss wurde das Gefäß mit dem gleichen Volumen, wie

das des Gels, aufgefüllt bis ein 1:1 Gel-Wasser-Mischung entstanden war. Im zweiten Schritt wurde die Gel-Wasser- Mischung solange geschüttelt bis eine homogene Suspension entstanden war. Diese wurde dann in die jeweiligen PPS-Platten aliquotiert (Volumen sind im jeweiligen Kapitel angegeben). Ab dem dritten Schritt wurden die Pipettierroboter genutzt. Für die PPS-Experimente wurden je nach Roboter 96-Deepwell-Platten oder 1,2 ml DeepWell-Platten als PPS-Platten benötigt. Die PPS-Platten wurden dann auf dem Pipettierroboter angeordnet. Die Chromatographie-



materialien, Pufferzusammensetzungen und Volumina der einzelnen Schritte sind in den jeweiligen Kapiteln angegeben. Die Überstände der Chromatographiegele wurden von den Robotern automatisch abpipettiert. Anschließend wurden 100 μl (falls nicht anders vermerkt) eines Equilibrierungspuffers schnell zu den Gelsedimenten gegeben und vom Roboter 3mal an- und abgesaugt, damit eine homogene Suspension erreicht werden konnte. Der Überstand wurde nach dem die Gele sedimentiert waren entfernt. In jedem Well betrug das Gelsediment 10 μl (falls nicht anders vermerkt). Der ganze Ablauf wurde 3mal wiederholt. Im vierten Schritt wurden 10 μl der Probe mit 170 μl eines individuellen

Probenauftragspuffers zu den Gelen gegeben und vermischt

Abb. 6: Schema zur Durchführung der PPS-Experimente.

(andere Volumina sind im Kapitel vermerkt). Die Überstände wurden nach der Gelsedimentation verworfen. Der fünfte Schritt besteht im Waschen der Gele mit den individuellen Waschpuffern, dieser Schritt ist identisch mit dem dritten Schritt. Dann wurden die Überstände nach der Gelsedimentation verworfen. Im sechsten Schritt erfolgte die Elution der Probe, die Eluate wurden in eine UV-durchlässige 96-Deepwell-Platte überführt. Im siebenten Schritt erfolgte die Proteinbestimmung (2.2.2.5). Zur automatischen Durchführung der einzelnen Schritte wurden folgende PPS-Platten hergestellt: eine mit Chromatographiematerial (2. Schritt), eine mit Equilibrierungs- und Waschpuffern (3. und 5. Schritt), eine mit Probenauftragspuffern (4. Schritt), eine mit den Proteinfractionen (4. Schritt) und eine mit Elutionspuffern (6. Schritt), ebenso wurden UV-durchlässige 96-Deepwell-Platten (7. Schritt) oder Mikrotiterplatten 96Well F benötigt.

2.2.2.5 Proteinbestimmung der Eluate und Überstände

Die Proteingesamtkonzentration der Eluate und Überstände aus den PPS-Experimenten der Reinigungsschritte 1 und 2 wurden mit dem Photometer iEMS Reader MF bestimmt. Es wurden jeweils 10 µl der Eluate und Überstände entnommen und in eine Mikrotiterplatte 96Well F pipettiert. Anschließend wurden sie mit 290 µl Coomassie-Färbelösung vermischt und bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Anhand einer Eichgerade wurden die BSA-Äquivalente bestimmt und als Proteinausbeute dargestellt. Zur Proteinbestimmung wurde ab dem Reinigungsschritt 3 der UV-Reader Genios eingesetzt. In UV durchlässigen 96-Deepwell-Platten erfolgte die Proteinbestimmung bei einer Wellenlänge von 280 nm.

2.2.2.6 Suche einer UME-Aktivität in porcinen Nierenhomogenat mit dem MES-UME-Assay

In 15 ml 100 mM Na-Phosphat bei einem pH-Wert von 7 wurde 1 g Nierenpulver mit dem Dispergierwerkzeug 1 min homogenisiert. Das Homogenat wurde für 30 Minuten bei 30000 g zentrifugiert (Sorvall SS-34, 16000 rpm, 4 °C). Zum Immobilisieren des Nierenextrakts wurden 30 µl des Überstandes an 50 µl Beads immobilisiert. Die UME Aktivität wurde nach dem Waschen bestimmt, dafür wurden Aliquots nach 1, 2, 3 und 4 Stunden abgenommen. (siehe 2.2.2.2)

2.2.3 Reinigung des UME

2.2.3.1 Herstellung eines Proteinextrakts aus porcinem Nierengewebe

1 g Nierenpulver (siehe 2.2.2.3) wurden mit 15 ml 100 mM Bis-Tris-Propan bei einem pH-Wert von 7 homogenisiert und anschließend 30 Minuten bei 30000 g zentrifugiert (Sorvall SS-34, 16000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde für die PPS-Experimente genutzt.

2.2.3.2 Suche nach geeigneten Parametern zur chromatographischen Konzentrierung von UME mit einem Anionenaustauscher

Für die PPS-Experimente wurden insgesamt 5 DeepWell Platten vorbereitet. 150 µl QAE-550C wurden in 32 Kavitäten einer DeepWell Platte aliquotiert. Die Zusammensetzung und Anordnung der Equilibrierungs- und Waschpuffer, sowie der Probenauftragspuffer ist in Tabelle 3 und 4 dargestellt. Zum Eluieren wurde eine 2 M NaCl-Lösung benutzt. Zu 150 µl Gelsediment wurden 100 µl Probe gegeben und 3mal mit 1 ml Probenauftragspuffer gewaschen. Die Probe wurde dann mit 100 µl 2 M NaCl eluiert. Mit Hilfe des Photometers wurde die Proteinausbeute bestimmt (siehe 2.2.2.4). In 32 Kavitäten einer weiteren 96-DeepWell Platte wurden 50 µl aktivierte Beads gegeben und mit 800 µl Kopplungspuffer aufgefüllt, anschließend wurde in jede Kavität 100 µl Eluat gegeben. Die Blockierung erfolgte mit 1 ml Blockierungspuffer, später wurde die UME Aktivität bestimmt (siehe dazu 2.2.2.2).

Tab.3: Zusammensetzung und Anordnung des Equilibrierungs- und Waschpuffers, 2 DeepWell Platten.
 Fett: Bezeichnung der Kavität und die pH-Werte.

	1	2	3	4
A	133 µl 0,75 M N-Metylpiperazin, 867 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 5	133 µl 0,75 M N-Metylpiperazin, 50 µl 0,75 M NaCl, 817 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 5	133 µl 0,75 M N-Metylpiperazin, 100 µl 0,75 M NaCl, 767 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 5	133 µl 0,75 M N-Metylpiperazin, 200 µl 0,75 M NaCl, 667 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 5
B	133 µl 0,75 M Bis-Tris, 867 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 6	133 µl 0,75 M Bis-Tris, 50 µl 0,75 M NaCl, 817 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 6	133 µl 0,75 M Bis-Tris, 100 µl 0,75 M NaCl, 767 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 6	133 µl 0,75 M Bis-Tris, 200 µl 0,75 M NaCl, 667 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 6
C	133 µl 0,75 M Bis-Tris-Propan, 867 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 7	133 µl 0,75 M Bis-Tris-Propan, 50 µl 0,75 M NaCl, 817 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 7	133 µl 0,75 M Bis-Tris-Propan, 100 µl 0,75 M NaCl, 767 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 7	133 µl 0,75 M Bis-Tris-Propan, 200 µl 0,75 M NaCl, 667 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 7
D	133 µl 0,75 M Triethanolamin, 867 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 7,5	133 µl 0,75 M Triethanolamin, 50 µl 0,75 M NaCl, 817 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 7,5	133 µl 0,75 M Triethanolamin, 100 µl 0,75 M NaCl, 767 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 7,5	133 µl 0,75 M Triethanolamin, 200 µl 0,75 M NaCl, 667 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 7,5
E	133 µl 0,75 M Tris, 867 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 8	133 µl 0,75 M Tris, 50 µl 0,75 M NaCl, 817 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 8	133 µl 0,75 M Tris, 100 µl 0,75 M NaCl, 767 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 8	133 µl 0,75 M Tris, 200 µl 0,75 M NaCl, 667 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 8
F	133 µl 0,75 M Diethanolamin, 867 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 8,5	133 µl 0,75 M Diethanolamin, 50 µl 0,75 M NaCl, 817 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 8,5	133 µl 0,75 M Diethanolamin, 100 µl 0,75 M NaCl, 767 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 8,5	133 µl 0,75 M Diethanolamin, 200 µl 0,75 M NaCl, 667 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 8,5
G	133 µl 0,75 M CHES, 867 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 9	133 µl 0,75 M CHES, 50 µl 0,75 M NaCl, 817 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 9	133 µl 0,75 M CHES, 100 µl 0,75 M NaCl, 767 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 9	133 µl 0,75 M CHES, 200 µl 0,75 M NaCl, 667 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 9
H	133 µl 0,75 M CAPS, 867 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 10	133 µl 0,75 M CAPS, 50 µl 0,75 M NaCl, 817 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 10	133 µl 0,75 M CAPS, 100 µl 0,75 M NaCl, 767 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 10	133 µl 0,75 M CAPS, 200 µl 0,75 M NaCl, 667 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 10

Tab.4: Zusammensetzung und Anordnung des Probenauftragpuffers, 2 DeepWell Platten. Fett: Bezeichnung der Kavität und die pH-Werte.

	1	2	3	4
A	133 µl 0,75 M N-Metylpiperazin, 867 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 5	133 µl 0,75 M N-Metylpiperazin, 56 µl 0,75 M NaCL, 811 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 5	133 µl 0,75 M N-Metylpiperazin, 112 µl 0,75 M NaCL, 755 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 5	133 µl 0,75 M N-Metylpiperazin, 224 µl 0,75 M NaCL, 643 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 5
B	133 µl 0,75 M Bis-Tris, 867 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 6	133 µl 0,75 M Bis-Tris, 56 µl 0,75 M NaCL, 811 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 6	133 µl 0,75 M Bis-Tris, 112 µl 0,75 M NaCL, 755 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 6	133 µl 0,75 M Bis-Tris, 224 µl 0,75 M NaCL, 643 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 6
C	133 µl 0,75 M Bis-Tris-Propan, 867 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 7	133 µl 0,75 M Bis-Tris-Propan, 56 µl 0,75 M NaCL, 811 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 7	133 µl 0,75 M Bis-Tris-Propan, 112 µl 0,75 M NaCL, 755 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 7	133 µl 0,75 M Bis-Tris-Propan, 224 µl 0,75 M NaCL, 643 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 7
D	133 µl 0,75 M Triethanolamin 867 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 7,5	133 µl 0,75 M Triethanolamin 56 µl 0,75 M NaCL, 811 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 7,5	133 µl 0,75 M Triethanolamin 112 µl 0,75 M NaCL, 755 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 7,5	133 µl 0,75 M Triethanolamin 224 µl 0,75 M NaCL, 643 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 7,5
E	133 µl 0,75 M Tris, 867 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 8	133 µl 0,75 M Tris, 56 µl 0,75 M NaCL, 811 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 8	133 µl 0,75 M Tris, 112 µl 0,75 M NaCL, 755 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 8	133 µl 0,75 M Tris, 224 µl 0,75 M NaCL, 643 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 8
F	133 µl 0,75 M Diethanolamin, 867 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 8,5	133 µl 0,75 M Diethanolamin, 56 µl 0,75 M NaCL, 811 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 8,5	133 µl 0,75 M Diethanolamin, 112 µl 0,75 M NaCL, 755 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 8,5	133 µl 0,75 M Diethanolamin, 224 µl 0,75 M NaCL, 643 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 8,5
G	133 µl 0,75 M CHES, 867 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 9	133 µl 0,75 M CHES, 56 µl 0,75 M NaCL, 811 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 9	133 µl 0,75 M CHES, 112 µl 0,75 M NaCL, 755 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 9	133 µl 0,75 M CHES, 224 µl 0,75 M NaCL, 643 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 9
H	133 µl 0,75 M CAPS, 867 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 10	133 µl 0,75 M CAPS, 56 µl 0,75 M NaCL, 811 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 10	133 µl 0,75 M CAPS, 112 µl 0,75 M NaCL, 755 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 10	133 µl 0,75 M CAPS, 224 µl 0,75 M NaCL, 643 µl destilliertes Wasser, pH-Wert 10

2.2.3.3 Reinigung und Konzentrierung von UME mit der Sample-Displacement- Chromatographie (Reinigungsschritt 1)

100 g Nierenpulver wurde in 750 ml 100 mM Bis-Tris pH-Wert 6 homogenisiert. Anschließend wurde bei 20000 g 60 Minuten zentrifugiert (GSA Rotor). 500 ml QAE-550C Gel wurde mit einem Equilibrierungspuffer (0,1 M Bis-Tris, pH-Wert 6) equilibriert und mit dem Equilibrierungspuffer auf 1000 ml aufgefüllt. Die Gele wurden in 10 Glasflaschen zu 50 ml/Glasflasche aliquotiert. Im Kühlraum wurde anschließend der gesamte Nierenextrakt zu dem Gel in Flasche 1 gegeben und zu einer homogenen Suspension vermischt. Nach der Sedimentation des Gels wurde der Überstand aus Flasche 1 ohne Mitnahme von Gelsediment in die Flasche 2 überführt und vermischt. Alle 10 Gelaliquots wurden mit dem Überstand der vorherigen Chromatographie nach demselben Muster vermischt und anschließend gewaschen. Der Überstand aus der Flasche 10 wurde in ein Flasche 11 (ohne Gelaliquot) gefüllt. Aus jeder Flasche 1 bis 10 wurden 500 µl Gelsediment entnommen und in jeweils 1 Eppendorfgefäß (insgesamt 10) gefüllt. In ein elftes Eppendorfgefäß wurden 500 µl des gesammelten Überstands aus der Flasche 11 pipettiert. Der Überstand von den Gelaliquots in den Eppendorfgefäßen 1 bis 10 wurde verworfen und im Anschluss mit 300 µl eines Elutionspuffers (0,1 M Bis-Tris, 1 M NaCl, pH-Wert 6) 3mal gewaschen. Die Überstände wurde jeweils in 10 weitere Eppendorfgefäße gefüllt, die am Ende jeweils 900 µl Eluat enthielten. Die Eluate und der Durchfluss aus dem elften Eppendorfgefäß wurden zu je 20 µl aktivierte Beads pipettiert, mit 500 µl Kopplungspuffer vermischt und 2 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Blockierung mit 500 µl Blockierungspuffer (wie unter 2.2.2.2 beschrieben). Nach der Immobilierung der Proteine wurde die UME Aktivität gemessen (siehe 2.2.2.2). Die Flaschen 1, 2 und 3 wurden vereinigt und mit 200 ml 2 M NaCl eluiert, anschließend wurde das Eluat (Fraktion A) mit 200 ml 100 mM Na-Phosphat aufgefüllt, somit betrug das Endvolumen 400 ml.

2.2.3.4 Suche nach Parametern zur chromatographischen Reinigung des UME in der Fraktion A der Sample-Displacement-Chromatographie

Insgesamt wurden 5 DeepWell Platten für die PSS-Experimente vorbereitet. Das PSS-Experiment wurde mit dem Roboter durchgeführt (siehe 2.2.2.5). Fractogel EMD Chelat wurde mit jeweils 7 unterschiedlichen Metallionen beladen. Dafür wurde zunächst ein definiertes Volumen von Fractogel EMD Chelat in ein Gefäß gefüllt und 3mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wird in 7 Gefäßen 0,7 ml Gel aliquotiert. Im nächsten Schritt wurden 100 mM Metallionen-Lösungen aus Cobalt-(II)-chlorid (Lösung-1), Nickel-(II)-sulfat (Lösung-2), Calcium-(II)-chlorid (Lösung-3), Magnesiumsulfat Hepathydrate (Lösung-4), Kupfer-Sulfat-Pentahydrat (Lösung-5), Zink-(II)-chlorid (Lösung-6) und Eisen-(III)-chlorid Hexahydrate (Lösung-7) hergestellt. Für die Beladung des Gels mit den jeweiligen Metallionen wurden jeweils 0,7 ml der jeweiligen Lösung zum Gel gegeben und nach dem Sedimentieren des Gels der Überstand abgenommen. Dieser Vorgang wurde 3mal durchgeführt und anschließend mit 3,5 ml destilliertem Wasser aufgefüllt. Hydroxylapatit (HAP) und 8 verschiedene Hydrophobe-Interaktions-Gele wurden ebenfalls genutzt. Anschließend wurden alle für die PSS-Experimente benötigten Gele auf 1:5 verdünnt und 150 µl Gel in das jeweilige Well aliquotiert. In den Tabellen sieht man die Anordnung und Zusammensetzung in den DeepWell Platten.

Tab. 5: Gelplattenbelegung: 150 µl Gelsediment pro Well. Fett: Bezeichnung der Kavität.

	1	2	3	4
A	IMAC-Co	Toyopear Butyl-650 M	Toyopear Butyl-650 M	Toyopear Butyl-650 M
B	IMAC-Ni	Toyopear Ether-650 M	Toyopear Ether-650 M	Toyopear Ether-650 M
C	IMAC-Ca	Toyopear Phenyl-650 M	Toyopear Phenyl-650 M	Toyopear Phenyl-650 M
D	IMAC-Mg	Macroprep-t-Butyl	Macroprep-t-Butyl	Macroprep-t-Butyl
E	IMAC-Cu	Macroprep-Methyl	Macroprep-Methyl	Macroprep-Methyl
F	IMAC-Zn	Butyl Sepharose 4 FF	Butyl Sepharose 4 FF	Butyl Sepharose 4 FF
G	IMAC-Fe	Phenyl Sepharose 6 FF	Phenyl Sepharose 6 FF	Phenyl Sepharose 6 FF
H	HAP-Gel	Octyl Sepharose 4 FF	Octyl Sepharose 4 FF	Octyl Sepharose 4 FF

Tab. 6: Anordnung und Zusammensetzung der Equilibrierungs-, Waschpuffer und der Probenauftragspuffer. Fett: Bezeichnung der Kavität und die pH-Werte.

	1	2	3	4
A	50 µl 1 M Na-Phosphat; 250 µl 4 M NaCl; 700 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	67 µl 0,75 M Na-Phosphat; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 4	67 µl 0,75 M Bis-Tris; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 6	67 µl 0,75 M HEPES; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 8
B	50 µl 1 M Na-Phosphat; 250 µl 4 M NaCl; 700 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	67 µl 0,75 M Na-Phosphat; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 4	67 µl 0,75 M Bis-Tris; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 6	67 µl 0,75 M Bis-Tris; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 6
C	50 µl 1 M Na-Phosphat; 250 µl 4 M NaCl; 700 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	67 µl 0,75 M Na-Phosphat; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 4	67 µl 0,75 M Bis-Tris; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 6	67 µl 0,75 M Bis-Tris; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 6
D	50 µl 1 M Na-Phosphat; 250 µl 4 M NaCl; 700 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	67 µl 0,75 M Na-Phosphat; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 4	67 µl 0,75 M Bis-Tris; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 6	67 µl 0,75 M Bis-Tris; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 6
E	50 µl 1 M Na-Phosphat; 250 µl 4 M NaCl; 700 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	67 µl 0,75 M Na-Phosphat; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 4	67 µl 0,75 M Bis-Tris; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 6	67 µl 0,75 M Bis-Tris; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 6
F	50 µl 1 M Na-Phosphat; 250 µl 4 M NaCl; 700 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	67 µl 0,75 M Na-Phosphat; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 4	67 µl 0,75 M Bis-Tris; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 6	67 µl 0,75 M Bis-Tris; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 6
G	50 µl 1 M Na-Phosphat; 250 µl 4 M NaCl; 700 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	67 µl 0,75 M Na-Phosphat; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 4	67 µl 0,75 M Bis-Tris; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 6	67 µl 0,75 M Bis-Tris; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 6
H	50 µl 1 M Na-Phosphat; 250 µl 4 M NaCl; 990 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	67 µl 0,75 M Na-Phosphat; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 4	67 µl 0,75 M Bis-Tris; 500 µl 4 M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 6	67 µl 0,75 M Bis-Tris; 500 µl 4M NaCl; 433 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 6

Tab. 7: Anordnung und Zusammensetzung des Elutionspuffers. Fett: Bezeichnung der Kavität und die pH-Werte.

	1	2	3	4
A	67 µl 0,75 M Na-Phosphat; 250 µl 4 M NaCl; 683 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 4	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7
B	67 µl 0,75 M Na-Phosphat; 250 µl 4 M NaCl; 683 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 4	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7
C	67 µl 0,75 M Na-Phosphat; 250 µl 4 M NaCl; 683 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 4	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7
D	67 µl 0,75 M Na-Phosphat; 250 µl 4 M NaCl; 683 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 4	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7
E	67 µl 0,75 M Na-Phosphat; 250 µl 4 M NaCl; 683 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 4	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7
F	67 µl 0,75 M Na-Phosphat; 250 µl 4 M NaCl; 683 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 4	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7
G	67 µl 0,75 M Na-Phosphat; 250 µl 4 M NaCl; 683 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 4	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7
H	500 µl 1 M Na-Phosphat; 250 µl 4 M NaCl; 500 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7	25 µl 1 M Na-Phosphat; 975 µl destilliertes Wasser; pH-Wert 7

Eine DeepWell Platte diente als Probenplatte. In Position A1 bis D1 wurde 600 µl der Fraktion A aus der Sample-Displacement-Chromatographie pipettiert. Das PPS-Experiment erfolgte automatisch mit dem Pipettierroboter. Für die Equilibrierung wurde

das Gel mit 333 μ l Equilibrierungs- und Waschpuffern gewaschen und zu dem Gelsediment wurde dann 0,8 ml Probenauftragspuffer gegeben. Mit 100 μ l Elutionspuffer wurde dann eluiert. 600 μ l des Eluats wurden anschließend an 40 μ l aktivierten Beads immobilisiert und die UME Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2.2).

2.2.3.5 Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie der aktiven Fraktion A der Sample-Displacement-Chromatographie

Zur Hydrophoben-Interaktions-Chromatographie der Fraktion A aus der Sample-Displacement-Chromatographie mit UME-Aktivität wurden Macroprep t-Butyl Gel, Puffer A (0,75 M Na-Phosphat, 2 M NaCl, pH-Wert 4) und Puffer B (destilliertes Wasser) verwendet. Mit 250 ml des Gels wurde ein XK50-Säulengehäuse gefüllt. Die Säule wurde in das HPLC Explorer System eingesetzt und mit destilliertem Wasser gewaschen. Mit Puffer A wurde die Säule bei einem Fluss von 9 ml/min, bis zur Konstanz der Leitfähigkeit, equilibriert. Mit der SamplePump des Explorer Systems und einem Fluss von 9 ml/min wurden 400 ml Probe auf die Säule aufgetragen. Das Waschen der Säule erfolgte anschließend mit 200 ml Puffer A. Für die Elution der Probe verlief der Gradient linear von 0 % bis 100 % B bei einem Retentionsvolumen von 800 ml. 30 ml Fraktionen sind während der Elution gesammelt worden. Die Säule wurde anschließend 20 Minuten mit destilliertem Wasser gespült. Aus den Fraktionen deutlicher UV-Absorption bei 280 nm wurden 200 μ l entnommen, immobilisiert und die UME Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2.2).

2.2.3.6 Suche nach chromatographischen Parametern zur Reinigung des UME in der aktiven Fraktion B der Hydrophoben-Interaktions-Chromatographie

Mit PPS-Experimenten wurden 4 Kationenaustauschergele (SP-Sepharose FF, Fractogel SO₃⁻, Toyopearl CM-650M, Toyopearl SP-650M) bei 5 verschiedenen pH-Werten zur chromatographischen Reinigung überprüft. In jeweils 1 Eppendorfgefäß wurde 1 ml der oben genannten Gele gefüllt und 3mal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit 1 M NaCl konditioniert. Nach der Konditionierung der Gele wurden diese erneut 3mal mit Wasser gewaschen und eine homogene Suspension mit einer 1:1 Gel-Wasser-Mischung hergestellt. In das entsprechende Well

wurden dann 20 µl der Suspension pipettiert. Auf Tabelle 8 ist die Anordnung der Gele in einer 96-DeepWell Platte zu sehen. Zwei 96-DeepWell Platte wurden mit Equilibrierungs-, Waschpuffer und Probenauftragspuffer befüllt, dessen Anordnung ist in Tabelle 9 dargestellt. 500 µl 1 M NaCl pro Well enthielt die Elutionspufferplatte. Mit dem Dispenser erfolgte die Befüllung der Pufferplatten. Für die Probenplatte wurde aus der noch nicht eingegangenen Fraktion B der Hydrophoben Interaktions-Chromatographie jeweils 10 µl in Position A1-D1 einer 96-DeepWell Platte pipettiert.

Tab.8: Gelplattenbelegung: Pro Well 10 µl Gelsediment. Fett: Bezeichnung der Kavität.

Gel [10 µl]	1	2	3	4
A	SP-Sepharose FF	Fractogel SO ₃ ⁻	Toyopearl CM-650M	Toyopearl SP-650 M
B	SP-Sepharose FF	Fractogel SO ₃ ⁻	Toyopearl CM-650M	Toyopearl SP-650 M
C	SP-Sepharose FF	Fractogel SO ₃ ⁻	Toyopearl CM-650M	Toyopearl SP-650 M
D	SP-Sepharose FF	Fractogel SO ₃ ⁻	Toyopearl CM-650M	Toyopearl SP-650 M
E	SP-Sepharose FF	Fractogel SO ₃ ⁻	Toyopearl CM-650M	Toyopearl SP-650 M

Tab. 9: Anordnung und Zusammensetzung der Equilibrierungs- und Waschpuffer und der Probenauftragspuffer. Fett: Bezeichnung der Kavität.

Puffer [500 µl]	1	2	3	4
A	50 mM K ₂ HPO ₄ , pH-Wert 4	50 mM K ₂ HPO ₄ , pH-Wert 4	50 mM K ₂ HPO ₄ , pH-Wert 4	50 mM K ₂ HPO ₄ , pH-Wert 4
B	50 mM K ₂ HPO ₄ , pH-Wert 5	50 mM K ₂ HPO ₄ , pH-Wert 5	50 mM K ₂ HPO ₄ , pH-Wert 5	50 mM K ₂ HPO ₄ , pH-Wert 5
C	50 mM MES, pH-Wert 6			
D	50 mM MOPS, pH-Wert 7			
E	50 mM HEPS, pH-Wert 8			

Die Eluate wurden dann an aktivierten Beads immobilisiert und die UME Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2.2).

2.2.3.7 Kationenaustausch-Chromatographie der aktiven Fraktion B der Hydrophoben-Interaktions-Chromatographie

Aus den PPS-Experimenten ergab sich als Parametersatz Fractogel SO₃⁻, Puffer A 50 mM MOPS bei einem pH-Wert von 7 und als Puffer B 50 mM MOPS, 1 M NaCl und ein pH-Wert von 7. Diese Parameter wurden auf eine Säulechromatographie übertragen. Zunächst wurden 10 ml Gel mit 20 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Gel 3mal mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 1 M NaCl konditioniert, dann wurde es 1mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Ein Pharmacia 10/10 Säulengehäuse wurde mit dem Gel befüllt und an die HPLC Anlage angeschlossen. Es erfolgte dann die Equilibrierung der Säule mit Puffer A bei einem Fluss von 0,6 ml/min. Die aktive Fraktion aus der Hydrophoben Interaktions-Chromatographie, welche ein Volumen von 30 ml besaß, wurde über ein 10 kDa-Filter bei 4 °C und 4600 rpm auf ein Volumen von 1 ml eingengt und mit Puffer A gemischt. Anschließend wurde die Probe mit einem Fluss von 0,6 ml/min über eine 2 ml Probenschleife aufgetragen. Die Elution der Probe erfolgte bei einem Gradienten von 0 % auf 100 % B (1 M NaCl) und einem Retentionsvolumen von 52 ml. Die Fraktionen mit einer signifikanten UV-Absorption bei 280 nm wurden auf die UME Aktivität getestet. Für die Immobilisierung wurden 100 µl der jeweiligen Fraktionen entnommen und an 30 µl aktivierten Beads und 50 µl Kopplungspuffer inkubiert und danach mit 200 µl Blockierungspuffer blockiert (siehe 2.2.2.2). Die UME Fraktionen bei einem Retentionsvolumen von 30 ml bis 50 ml wurden vereinigt und über einen 10 kDa-Filter eingengt und als Fraktion C bezeichnet.

2.2.3.8 Charakterisierung der UME-Aktivität mit der aktiven Fraktion C mittels Protease-Inhibitoren

Zur Bestimmung der Proteaseklasse des UME wurden 50 µl der Fraktion C, aus der Kationenaustausch- Chromatographie, an 30 µl aktivierten Sepharosebeads immobilisiert, diese wurden mit 50 µl Kopplungspuffer inkubiert und mit 200 µl Blockierungspuffer geblockt (siehe 2.2.2.2). Danach wurde der Blockierungspuffer abpipettiert und 3mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Als Protease-Inhibitoren wurden 10 µM Leupeptin, 10 µM Pepstatin A, 1 mM EDTA, 10 µM Chymostatin, 100 µM Bestatin und 1 mM AEBSF eingesetzt. 4 µl der Inhibitoren wurden 30 Minuten vor Ull

Zugabe zu der immobilisierten Fraktion C gegeben und bei Raumtemperatur 30 Minuten auf den Schüttler gestellt, anschließend wurde 45 µl des 5-10 M Ull zu den Proben gegeben und weitere 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden Aliquots nach 1, 3, 5 und 20 Stunden abgenommen und mittels UME-Assay untersucht (siehe 2.2.2.2).

2.2.3.9 Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Proteaseinhibitor der aktiven Fraktion C der Kationenaustausch-Chromatographie

Dem Proteasen-Inhibitionsversuch konnte man entnehmen, dass die UME Aktivität stark durch den Serin/Cysteinprotesen Inhibitor Chymostatin gehemmt wurde. Für den Reinigungsschritt 4 wurde deshalb ein Affinitätsgel hergestellt, dafür wurde der Inhibitor Chymostatin über einen EDC Linker an das Gel EAH-Sepharose 4B immobilisiert. Für die Affinitäts-Chromatographie wurden 5 ml EAH-Sepharose mit einer 500 mM NaCl-Lösung 3mal gewaschen und dann noch mal mit einer 100 µM HCl-Lösung (pH-Wert 4,5). 200 mg des Crosslinkers EDC wurden in 100 µM HCl (pH-Wert 4,5) gelöst und zu 5 ml EAH-Sepharose gegeben. Anschließend wurden 5 mg Chymostatin in 1 ml 10 mM DMSO-Lösung gelöst und ebenfalls zu der EAH-Sepharose gegeben und gut vermischt. Auf dem Überschlagerotor erfolgte über Nacht die Reaktion bei 7 °C. In den ersten 2 Stunden wurde der pH-Wert kontrolliert und mit NaOH auf 4,5 eingestellt. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die EAH-Sepharose abwechselnd mit Puffer A (0,1 M Essigsäure, 500 mM NaCl, pH-Wert 4) und Puffer B (0,1 M Tris, 500 mM NaCl, pH-Wert 8) 3mal gewaschen. Hinterher wurde das Gel 3mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Durchführung der Chromatographie wurde ein Tricorn 5/50 Säulengehäuse mit 1 ml des hergestellten Affinitätsgels befüllt. Die Säule wurde anschließend an die HPLC-Anlage Purifier angeschlossen und mit Puffer C (50 mM HEPES, 500 mM NaCl, pH 8) bei einem Fluß von 0,15 ml/min equilibriert. 300 µl der Fraktion C wurden in 200 µl Puffer C aufgenommen. Dieses wurde dann auf die Säule mit einem Fluß von 0,15 ml/min aufgetragen. Mit einem Gradienten von 0 % auf 75 % Puffer D (50 mM Phosphatpuffer; pH 4) bei einem Retentionsvolumen von 2 ml und 100 % Puffer D bei einem Retentionsvolumen von 5 ml erfolgte die Probenelution. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Bei Fraktionen mit einer signifikanten UV-Absorption bei 280 nm wurde die UME Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2.2). Die aktive

Fraktion bei einem Retentionsvolumen von 0,4 ml und 1 ml aus der Affinitätschromatographie wurden über einen 10 kDa Filter vereinigt und werden als Fraktion D bezeichnet.

2.2.3.10 Größenausschluss-Chromatographie der aktiven Fraktion D der Affinitätschromatographie

In 100 µl Puffer A (50 mM Phosphatpuffer, 150 mM NaCl, pH 7) wurden 100 µl der Fraktion D (aus der Kationenaustausch-Chromatographie) aufgenommen. An die HPLC-Anlage Purifier wurde die Gelfiltrationssäule Superdex 200 HR 10/30 angeschlossen. Anschließend wurde die Probe mit einem Fluss von 250 µl/min aufgetragen. Mit Puffer A wurde die Chromatographie durchgeführt und 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen mit einer deutlichen UV-Absorption von 280 nm wurden immobilisiert und die UME Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2.2).

2.2.4 Identifizierung der aktiven Fraktion E der Größenausschluss-Chromatographie

2.2.4.1 Tryptischer Verdau der aktiven Fraktion E der Größenausschluss Chromatographie

Eine hohe UME Aktivität konnte in der Fraktion E bei einem Retentionsvolumen von ca. 13 ml (siehe Chromatogramm der Größenausschluss-Chromatographie) gefunden werden. Jeweils 1 ml der Fraktion E wurde bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstände wurden in 50 µl 6 M Harnstoff aufgenommen und 5 µl einer 200 mM DTT-Lösung, 100 mM NaHCO₃ (pH 8,3) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Zu dem Inkubationsansatz wurden 10 µl einer 200 mM Iodacetamid-Lösung, 100 mM NaHCO₃ (pH 8,3) pipettiert und 1 h auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 µl der 200 mM DTT-Lösung, 100 mM NaHCO₃ (pH 8,3) zu dem Ansatz pipettiert und wieder 1 h auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 425 µl einer 100 mM NaHCO₃-Lösung (pH 8,3) zugegeben und der Reaktionsansatz in ein Glasvial überführt. In das Glasvial wurden 5 µl einer 0,25 µg/µl Trypsin-Lösung pipettiert und 24 h bei

Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Lösung mit Ameisensäure auf 0,1 % eingestellt.

2.2.4.2 Identifizierung der tryptisch verdauten Peptide der UME Fraktionen der Größenausschluss-Chromatographie mittels LC-ESI MS/MS

Es wurden 20 µl der verdauten Fraktion E in eine 96-Well-PCR-Platte überführt und in den Autosampler des LC-ESI MS/MS gestellt. Der Autosampler injizierte 8 µl Probe auf ein Chip-System der Firma Agilent. Die Probe wurde auf eine Trapping C18-Säule 75 µm x 43 mm die sich auf dem Chip befand, mit einem Fluss von 4 µl/min 10 Minuten mit 100 % Puffer A (3 % ACN, 0,1 % Ameisensäure) aufgetragen. Als Trennsäule wurde eine C18-Säule 75 µm x 43 mm erwendet. Die Probentrennung erfolgte in einem 45 minütigem Gradienten mit einem linearen Anstieg von 0 % auf 35 % von Puffer B (80 % ACN, 0,1 % Ameisensäure). Anschließend wurde innerhalb von 3 Minuten der Anteil des Puffer B von 35 % auf 97 % linear erhöht und für weitere 2 Minuten gehalten. Dann wurde Puffer B für nachfolgende Proben wieder auf 3 % reduziert. Zur Auswertung der generierten Daten wurde die Software DataAnalysis und Mascot verwendet.

2.2.5 Etablierung einer relativen Quantifizierung von des-Val-Ull mittels dem LC-ESI-IT-MS

Humanes Ull mit der Aminosäuresequenz ETPDCFWKYCV und humanes des-Val-Ull mit der Aminosäuresequenz ETPDCFWKYC wurden für die Etablierung des LC-ESI-IT-MS Nachweissystems benötigt. Zuerst wurde eine 10^{-5} M humane des-Val-Ull-Lösung in 2 % Ameisensäure über eine Hamilton-Spritzenpumpe in die Elektrosprayzufuhr injiziert. Damit wurden die Detektionseigenschaften des Ull und des des-Val-Ull analysiert und für den Nachweis von Peptiden in der Ionenfalle des Massenspektrometers verwendet. Anschließend wurden die Peptide über die Reversed-Phase HPLC getrennt und massenspektrometrisch analysiert. Die Lösungsmittel waren 0,2 % Ameisensäure in Wasser und 100 % ACN. Die Flussrate betrug 0,3 ml/min. Der ACN-Gradient lag in der ersten Minute bei 80 % und wurde in den nächsten Minuten kontinuierlich auf 60 % herabgesetzt. Bei 7 min und 8 min lag der ACN-Gradient bei 40 % und ab 9 min stieg der Gradient auf 97 % und blieb bis zum Ende der Analyse konstant. Die Signalintensitäten richteten sich nach der Dauer, die benötigt wurde, um

die IT mit der zu isolierenden Peptidfragmentmasse Masse zu füllen. Eine zunehmende Massenkonzentration hatte somit eine geringere Öffnungsdauer der IT zur Folge. Die einzelnen Signale wurden zu einer Kurve umgerechnet. Die Fläche unter der Kurve wurde durch Integration berechnet und als relative Signalintensitäten angegeben. Bei der Auswertung wurden zudem die einzelnen Signale auf eine Isotopenverteilung geprüft, so konnte zwischen einer Verunreinigung und den Peptiden unterschieden werden. Die relative Quantifizierung erfolgte durch die Darstellung der relativen Signalintensitäten der Flächen unter der Kurve einer Probe. Der Gradient wurde vor der Analyse der Proben aus dem MES optimiert und verkürzt. Die Flussrate betrug gleich bleibend 0,3 ml/min. Ausgehend von 97 % ACN am Startpunkt sank die ACN-Konzentration in der ersten Minute auf 80 % an. Diese 80 % sanken in den ersten 6 Minuten weiter auf 60 % und bis zur 8. Minute auf 40 % anschließend stieg sie bis zur 9. Minute auf 97 % und blieb bis zum Ende der Messungen konstant.

2.2.6 Nachweis von Ull Metabolisierung durch Faktor IXa mittels LC-ESI-IT-MS

10 µl einer käuflich erworbenen humanen Faktor IXa Lösung (1,53 mg/ml), 50 µl einer 10^{-5} M humanen Ull gelöst in einem Puffer aus 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na_2HPO_4 und K_2HPO_4 bei einem pH von 7,4 und als Cofaktor 5 mM CaCl_2 an 30 µl Beads unter Verwendung von 50 µl Kopplungspuffer und 200 µl Blockierungspuffer immobilisiert (siehe 2.2.2.2.2). 5 µl Aliquots der Inkubationsansätze wurden nach 2 h, 4 h, 6 h und 24 h abgenommen und mit 2 % Ameisensäure im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Analyse erfolgte anschließend mittels LC-ESI-IT-MS analysiert. Als Puffer A wurde 0,2 % Ameisensäure und als Puffer B 100 % ACN genutzt. Die 50 µl Proben wurden mit einem Fluss von 0,3 ml/min auf die Säule aufgetragen. Für die Elution der Probe verlief der Gradient unter stetiger Zunahme von B in der ersten Minute von 3 % auf 20 %, anschließend in den nächsten 5 Minuten auf 40 %, bleibend bei 40 % für 0,1 Minuten. Dann stetiger Anstieg von Puffer B von 40 % nach 60 % bis zur Minute 7, halten dieser Konzentration für eine Minute und anschließend stetige Abnahme von B auf 3 % innerhalb der nächsten Minute. Die 3 % B wurden bis zum Chromatographieende gehalten.

3 Ergebnisteil

3.1 Übersicht

Zunächst musste ein Nachweis für die Ull metabolisierende Enzymaktivität (UME) etabliert werden, um mit dem UME-Assay Protein-Fractionen auf ihre Ull metabolisierende Enzymaktivität zu untersuchen. Als Quelle für die Suche nach dem UME wurde Nierengewebe vom Schwein gewählt. Mit Hilfe von fünf aufeinander folgenden chromatographischen Reinigungsschritten wurde der Proteinextrakt aus Nierengewebe bis zur nahen Homogenität aufgereinigt. Inhibitionsversuche wurden zur Charakterisierung von UME durchgeführt und mittels LC-ESI-MS/MS erfolgten Versuche zur Identifizierung des UME. Anschließend wurde das identifizierte UME käuflich erworben und auf des-Val-Ull-generierende Aktivität mittels ESI-IT-MS überprüft.

3.1.1 MES-Assays zum Nachweis der Ull metabolisierenden Aktivität

UME ist eine Protease, die von Ull eine Aminosäure (Valin) abspaltet und somit des-Val-Ull generiert. Bevor nach dem UME gesucht werden konnte, musste ein Nachweis etabliert werden. Zu diesem Zweck wurden die zu testenden Proteinfractionen unter Anwendung des MES-Assay untersucht. Der MES-Assay beinhaltet die kovalente Immobilisierung der Proteine der zu untersuchenden Fraktion an Beads. Die immobilisierten Proteine wurden mit Ull inkubiert. Anschließend wurden Aliquots nach definierten Inkubationszeiten aus dem Inkubationsansatz abgenommen und massenspektrometrisch analysiert. Die Signale der Reaktionsprodukte einer solchen Inkubation sieht man in den MALDI Spektren in Abbildung 7. Die Signale können der Masse des Substrats Ull beziehungsweise des Produktes des-Val-Ull zugeordnet werden. Auf der Abbildung erkennt man eine deutliche Abnahme des Ull-Signals mit zunehmender Inkubationszeit und eine Zunahme des des-Val-Ull-Signals, was darauf hindeutet, dass UME in der getesteten Fraktion vorhanden war.

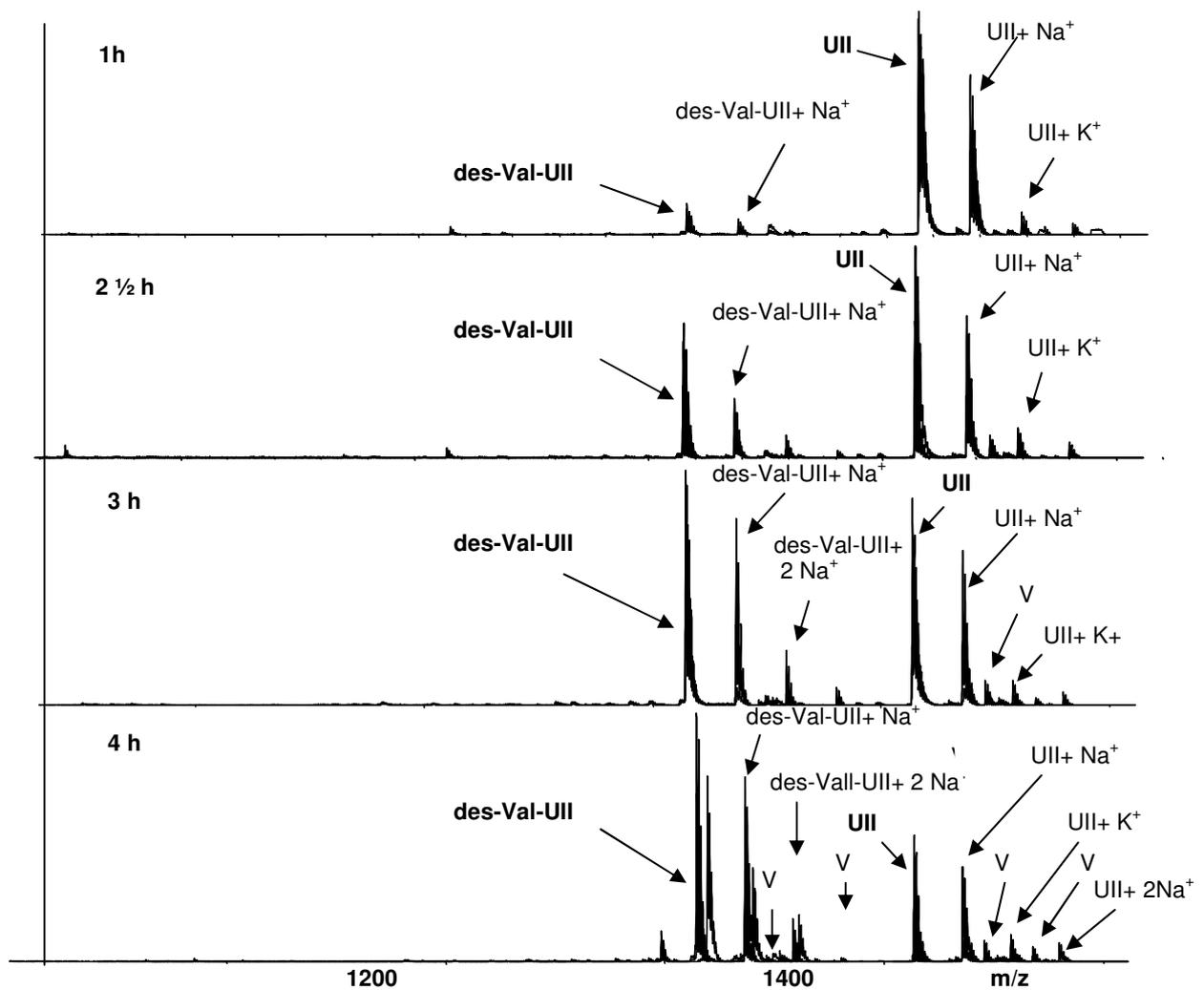


Abb. 7: MES-Assay: MALDI Spektren von Reaktionsprodukten von Ull nach verschiedenen Inkubationszeiten mit immobilisierten Proteinen. Die Proteine wurden aus Schweinenierenrohextrakt gewonnen. Des-Val-Ull: 1314,50 Da, Ull: 1413,60 Da, des-Val-Ull+ Na⁺: 1336,90 Da, des-Val-Ull+ 2Na⁺:1358,80 Da, Ull+ Na⁺: 1436,05 Da, Ull+ K⁺: 1450,00 Da, Ull+ 2 Na⁺: 1468,07 Da, V: Verunreinigung.

3.1.2 Reinigung von Ull für den Nachweis der UME Aktivität mittels MES-Assay

Porcines Ull wurde von der Firma Wita synthetisiert. Für die zyklische Peptidstruktur wurden die zwei Cysteine oxidiert, so dass sie eine Disulfidbrücke bildeten. Anschließend wurde das zyklische Ull gereinigt. In Abbildung 8 ist das Chromatogramm der Ull Aufreinigung dargestellt. Als Ull für den Nachweis von UME Aktivität wurde die Fraktion, welche bei einem Retentionsvolumen von 650 ml eluierte, verwendet und massenspektrometrisch analysiert.

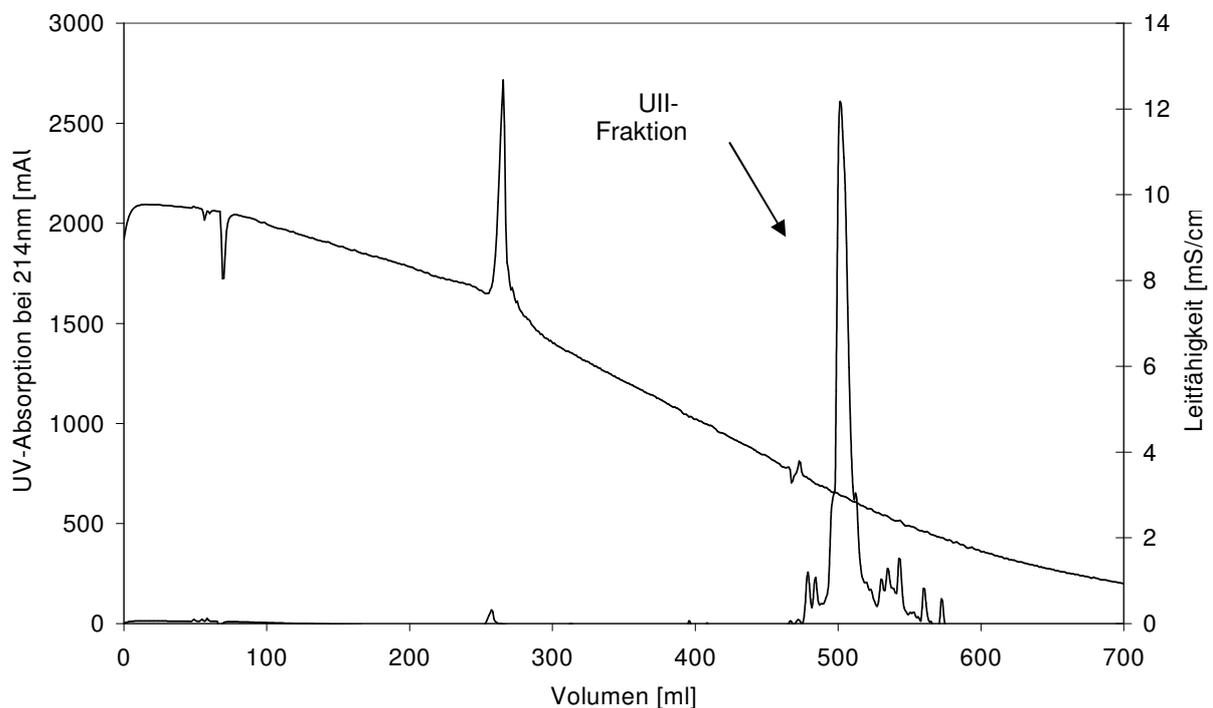


Abb. 8: Chromatogramm der Ull Aufreinigung. Probenvolumen: 1 ml (ca.10 mg) Säule: 75 ml ZORBAX SB-C18 Prep HAT 21.2X210. Flussrate: 15 ml/min. Puffer A: 0,1 % TFA. Puffer B: 80 % ACN. Gradient 0-60 % B bei einem Retentionsvolumen von 650 ml und danach auf 100 % B umgespült. X-Achse: Retentionsvolumen [ml]. Y-Primärachse: UV-Absorption bei 214 nm [mAU]. Y-Sekundärachse: Leitfähigkeit [mS/cm]. Fraktionsgröße: 2 ml.

3.2 Überblick über den Reinigungsweg

In Abbildung 9 sieht man eine schematische Darstellung der einzelnen Schritte, die zur Reinigung von UME durchgeführt worden sind. Für die Suche nach geeigneten Parametern zur chromatographischen Reinigung von UME wurde das Protein-Purifikations-Parameter-Such-System (PPS) genutzt. PPS ist ein System, mit welchem in kurzer Zeit eine größere Zahl von Parametern auf ihre Eignung zur chromatographischen Reinigung von Proteinen getestet werden können.

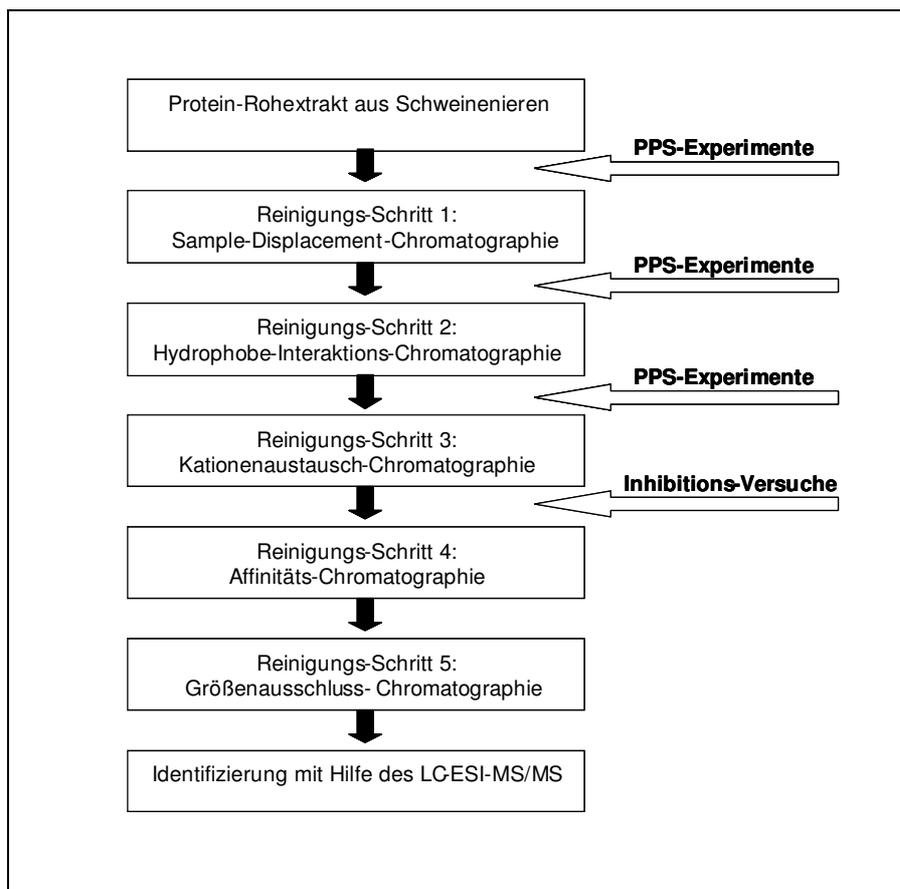


Abb. 9: Schematische Darstellung des Reinigungsweges zur Reinigung von UME. PPS: Protein-Purifikations-Parameter-Such-System.

2.1 Suche nach geeigneten Parametern zur chromatographischen Konzentrierung von UME mit einem Anionenaustauscher

In Abbildung 10 sind Ergebnisse von PPS-Experimenten mit einem Anionenaustauscher und einem aus dem Nierengewebe gewonnenen Proteinextrakt dargestellt. Die Abbildung 10A zeigt die UME Aktivität der Eluate der 32 Chromatographien. Bei einem pH-Wert von 6 und 7,5 eines 0,75 M Bis-Tris Puffers und in Abwesenheit von NaCl sieht man die höchste UME Aktivität. In der Abbildung 10B sind die Proteinausbeuten der einzelnen Eluate dargestellt. Man erkennt in Abbildung 10C die spezifischen Ausbeuten an UME Aktivitäten. In Abwesenheit von NaCl und bei einem pH-Wert von 6 und 7,5 eines 0,75 M Bis-Tris Puffers findet man die höchsten spezifischen Ausbeuten.

		pH-Wert							
		5	6	7	7.5	8	8.5	9	10
A	NaCl								
	0	0	74	40	76	31	13	7	12
	100	0	1	6	9	2	4	3	3
	200	0	0	0	3	1	0	0	4
	400	0	2	0	0	0	0	1	1
B	0	8	344	294	360	399	417	456	476
	100	12	200	189	253	321	322	388	342
	200	1	119	100	149	172	158	244	194
	400	0	32	16	21	29	18	29	26
	C	0	0	0.22	0.14	0.21	0.08	0.03	0.02
100		0.00	0.01	0.03	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01
200		0	0	0	0.02	0.01	0	0	0.02
400		0	0.06	0	0	0	0	0.03	0.04

Abb.10: Ergebnismatrix von Anionenaustausch-PPS-Experimenten mit einem Extrakt aus Schweinenierengewebe. Probevolumen: 100 µl pro Kavität. A: UME Aktivitäten. B: Proteinausbeuten [µg]. C: spezifische UME Aktivitäten. Gelmaterial: 150 µl QAE-550C Toyopearl pro Kavität. X-Achse: Unterschiedliche pH-Werte. Y-Achse: NaCl-Konzentrationen [mM].

3.2.2 Konzentrierung und Reinigung des UME aus Schweinenierenrohextrakt mit der Sample-Displacement-Chromatographie

Aufgrund der vorangegangenen PPS-Experimente wurde der Proteinextrakt mit einem Anionenaustauscher-Material unter Verwendung der Sample-Displacement-Chromatographie (SDC) Methode getrennt. Das Anionenaustauscher-Material war zuvor mit den durch die PPS-Experimente bestimmten Parametern, nämlich 100 mM Bis-Tris bei einem pH-Wert von 4, equilibriert worden. Die SDC wurde mit einem Extrakt aus Schweinenierengewebe durchgeführt, die Abbildung 11 zeigt das Aktivitätsprofil der SDC.

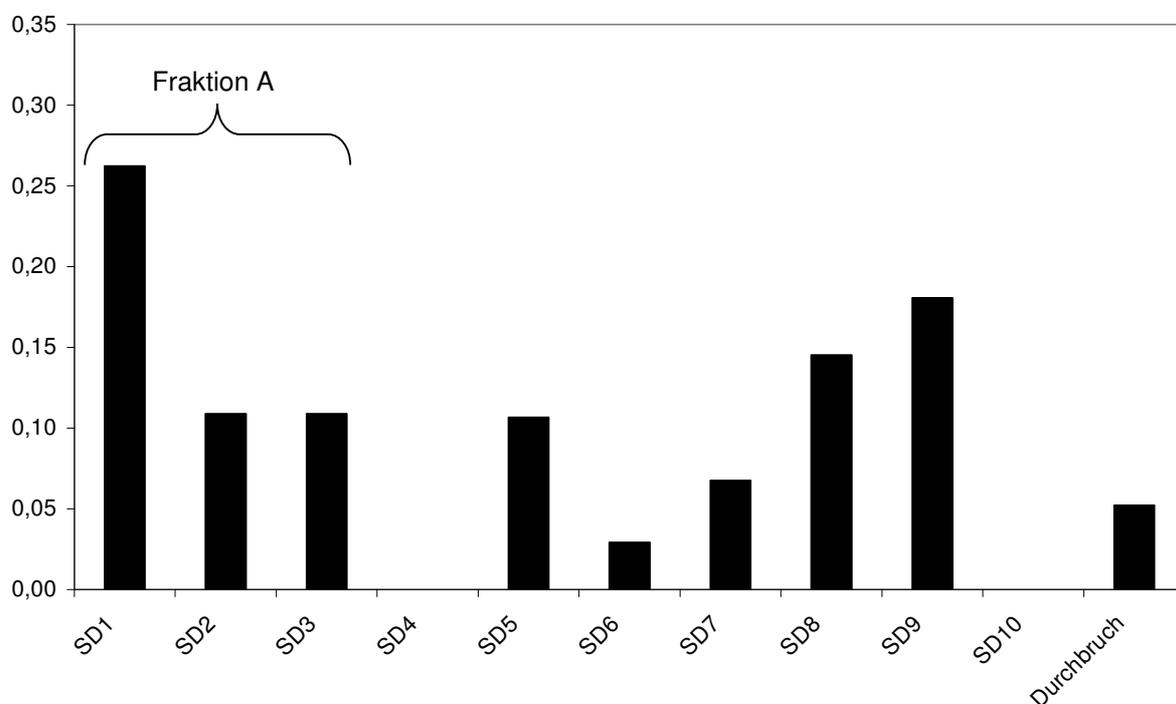


Abb.11: Ergebnis der Sample-Displacement-Chromatographie (SDC) aus einem Nierenrohextrakt. Probe: 750 ml Nierenrohextrakt (ca. 2 mg/ml Protein). Gelmaterial: 50 ml QAE-550C-Gel pro SDC-Segment. Puffer A: 100 mM Bis-Tris, pH-Wert 6. Puffer B: 2 M NaCl. X-Achse: einzelne Fraktionen der Sample Displacement Chromatographie. Y-Achse: UME Aktivität.

Die höchste Aktivität sieht man in der SD1-Fraktion (SDC-Segment 1). Für den 2. Reinigungsschritt wurden die Fraktionen 1-3 aus der SDC vereinigt und im weiteren Verlauf als Fraktion A bezeichnet.

3.2.3 PPS-Experimente für die Suche nach geeigneten Parametern zur chromatographischen Reinigung von UME

In Abbildung 12 A oben sieht man die Versuchsmatrix für die PPS-Experimente mit einem Metall-Chelatgel (IMAC-Gel), beladen mit 7 unterschiedlichen Metallionen, Hydroxylapatit (HAP) und 8 verschiedenen Hydrophoben-Interaktions-Gelen. Zur Durchführung der Hydrophoben-Interaktions-Chromatographien (HIC) wurden drei verschiedene pH-Werte benutzt. In der Abbildung 12 B darunter sieht man die Ergebnismatrix der PPS-Experimente.

A

IMAC-Co	IMAC-Ni	IMAC-Ca	IMAC-Mg	IMAC-Cu	IMAC-Zn	IMAC-Fe	HAP
Butyl-650-M pH4	Ether 650-M pH4	Phenyl 650-M pH4	Macrorep-t-Butyl pH4	Macrorep-t-Methyl pH4	Butyl Sepharose pH4	Phenyl Sepharose pH4	Octyl Sepharose pH4
Butyl-650-M pH6	Ether 650-M pH6	Phenyl 650-M pH6	Macrorep-t-Butyl pH6	Macrorep-t-Methyl pH6	Butyl Sepharose pH6	Phenyl Sepharose pH6	Octyl Sepharose pH6
Butyl-650-M pH8	Ether 650-M pH8	Phenyl 650-M pH8	Macrorep-t-Butyl pH8	Macrorep-t-Methyl pH8	Butyl Sepharose pH8	Phenyl Sepharose pH8	Octyl Sepharose pH8

B

0,2	1,8	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0
0,0	0,1	5,3	5,9	0,3	0,2	0,0	0,0
0,0	0,0	0,2	0,1	0,1	0,2	0,0	0,1
0,0	0,2	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2	0,2

Abb 12: A: Versuchsmatrix für die PPS-Experimente. B: Ergebnismatrix der PPS-Experimente aus der Fraktion A. Probevolumen: 10 µl (ca. 4 µg Protein). Gelvolumen: 10 µl. Dunkle Felder: hohe UME Aktivitäten.

UME Aktivität konnte in drei Eluaten gefunden werden. Die Eluate aus den Chromatographien mit Phenyl 650-M und Makrorep-t-Methyl, beide bei einem pH-Wert von 4, haben eine höhere UME Aktivität als das Eluat der Chromatographie mit IMAC-Ni.

3.2.4 Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC) zur Reinigung von UME

Anhand der Ergebnisse der PPS-Experimente (Abbildung 14) wurde eine Chromatographie mit Macroprep-t-Butyl und einem pH-Wert von 4 durchgeführt. In Abbildung 13 kann man das Chromatogramm der Hydrophoben-Interaktions-Chromatographie mit der Fraktion A aus der SDC sehen. Man erkennt in dem Elutionsintervall von 1000 ml bis 1200 ml eine signifikante UV-Absorption. Bei einem Elutionsvolumen von ca. 1100 ml erkennt man die höchste UME Aktivität. Diese Fraktion B wird für den nächsten Reinigungsschritt mit Hilfe eines 10 kDa-Filters konzentriert.

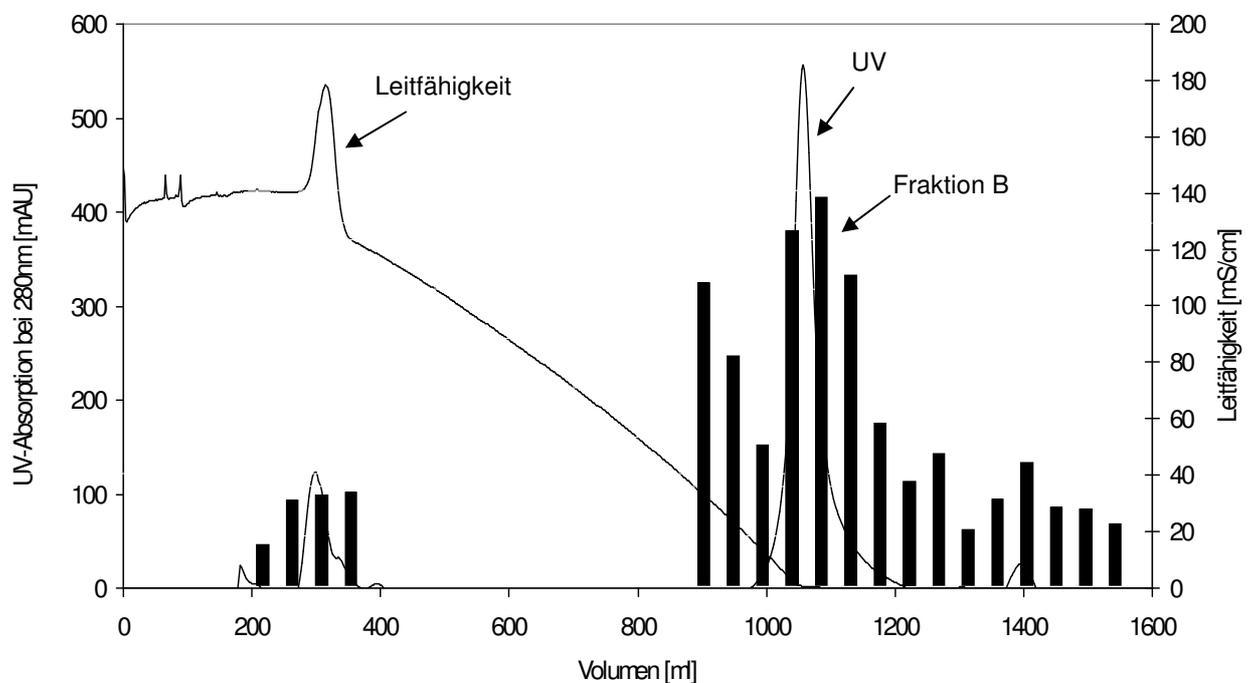


Abb.13: HIC Chromatogramm der UME Fraktion A aus der Sample-Displacement-Chromatographie, dem Reinigungs-Schritt 1 (Abb. 13). Probenvolumen: 400 ml (ca.150 mg Protein). Säule: 250 ml Makroprep-t-Butyl gepackt in XK 50 Säulengehäuse. Puffer A: 50 mM Na-Phosphat; 2 M NaCl; pH-Wert 4. Puffer B: Wasser. Flussrate: 9 ml/min. Gradient: 0 % - 100 % B bei Retentionsvolumen von 800 ml. X-Achse: Retentionsvolumen [ml]. Linke Y-Achse: UV-Absorption bei 280 nm. Rechte Y-Achse: Leitfähigkeit [mS/cm]. Schwarze Säulen: UME Aktivitäten.

3.2.5 Suche nach chromatographischen Parametern für die Chromatographie der Fraktion B

Auf Abbildung 14 ist die Ergebnismatrix der PPS-Experimente mit der Fraktion B (Abb. 13) mit Kationenaustauschgelen dargestellt. Im Eluat der Chromatographie mit Fractogel SO_3^- bei einem Puffer von pH-Wert 7 ist die höchste UME Aktivität zu sehen.

Gel pH	SP- Sepharose FF	Fractogel SO_3^-	Toyopearl CM-650M	Toyopearl SP-650M
4	0.82	0.02	0.01	0.43
5	0.00	0.29	0.44	0.94
6	0.06	0.00	2.32	1.21
7	0.00	5.40	0.07	0.00
8	0.08	0.00	0.00	2.71

Abb. 14: Ergebnismatrix der PPS-Experimente mit unterschiedlichen Kationenaustauschern und der aus Reinigungs-Schritt 2 gewonnenen UME Fraktion B (Abb. 13). Probenvolumen: 10 μl (ca. 600 μg Protein). Gelvolumen: 10 μl . dunkle Felder: hohe UME Aktivitäten. X-Achse: unterschiedliche Gelmaterialien. Y-Achse: unterschiedliche pH-Werte

3.2.6 Kationenaustausch-Chromatographie der Fraktion B

Aufgrund der Resultate der Kationenaustausch-PPS-Experimente (Abbildung 15), wurde eine Kationenaustausch-Chromatographie mit dem Parametersatz Fractogel SO_3^- und einem Puffer von pH-Wert 7 durchgeführt. Die Fraktion B (Abbildung 13) wurde umgepuffert und anschließend mit einer Kationenaustauschersäule chromatographiert. Das Chromatogramm mit den UME Aktivitäten zeigt die Abbildung 17.

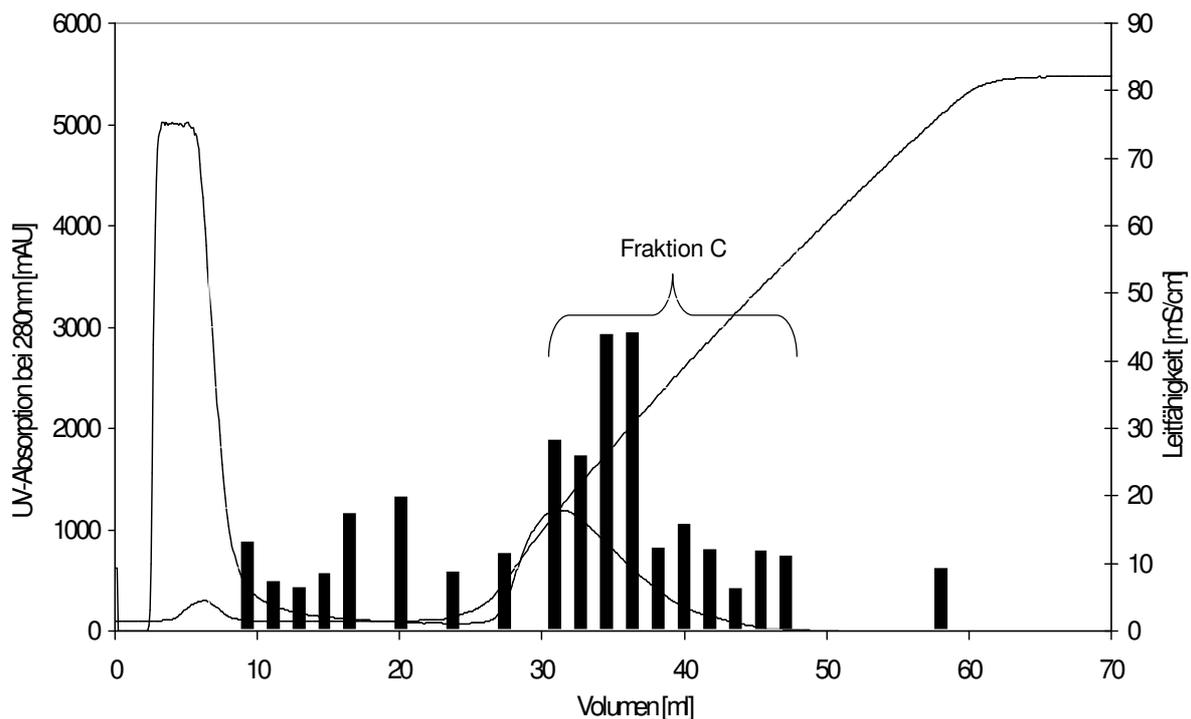


Abb. 15: Kationenaustausch-Chromatogramm der Fraktion B (Abb. 15). Probenvolumen: 2 ml (ca. 60 mg Protein). Säule: 10 ml Fractogel SO_3^- gepackt in Pharmacia 10/10 Säulengehäuse. Puffer A: 50 mM MOPS; pH 7. Puffer B: 1 M NaCl; pH 7. Flussrate: 0,6 ml/min. Gradient: 0 % - 100 % B ab Retentionsvolumen von 17 ml, 100 % B bei Retentionsvolumen von 52 ml. X-Achse: Retentionsvolumen [ml]. Linke Y-Achse: UV-Absorption bei 280 nm. Rechte Y-Achse: Leitfähigkeit [mS/cm]. Schwarze Säulen: UME Aktivitäten

Eine relativ hohe UME Aktivität wurde zwischen dem Retentionsvolumen von ca. 30 ml- ca. 50 ml gemessen, diese wurden vereinigt und über ein 10 kDa-Filter eingengt. Im weiteren Verlauf wird diese als Fraktion C bezeichnet.

3.2.7 Charakterisierung der UME der Fraktion C mittels Protease-Inhibitoren

Zur Charakterisierung der Eigenschaften von UME und zur Identifizierung der Proteasenklasse wurden Inhibitionsversuche der aktiven Fraktionen C aus der dritten Aufreinigungsstufe vorgenommen.

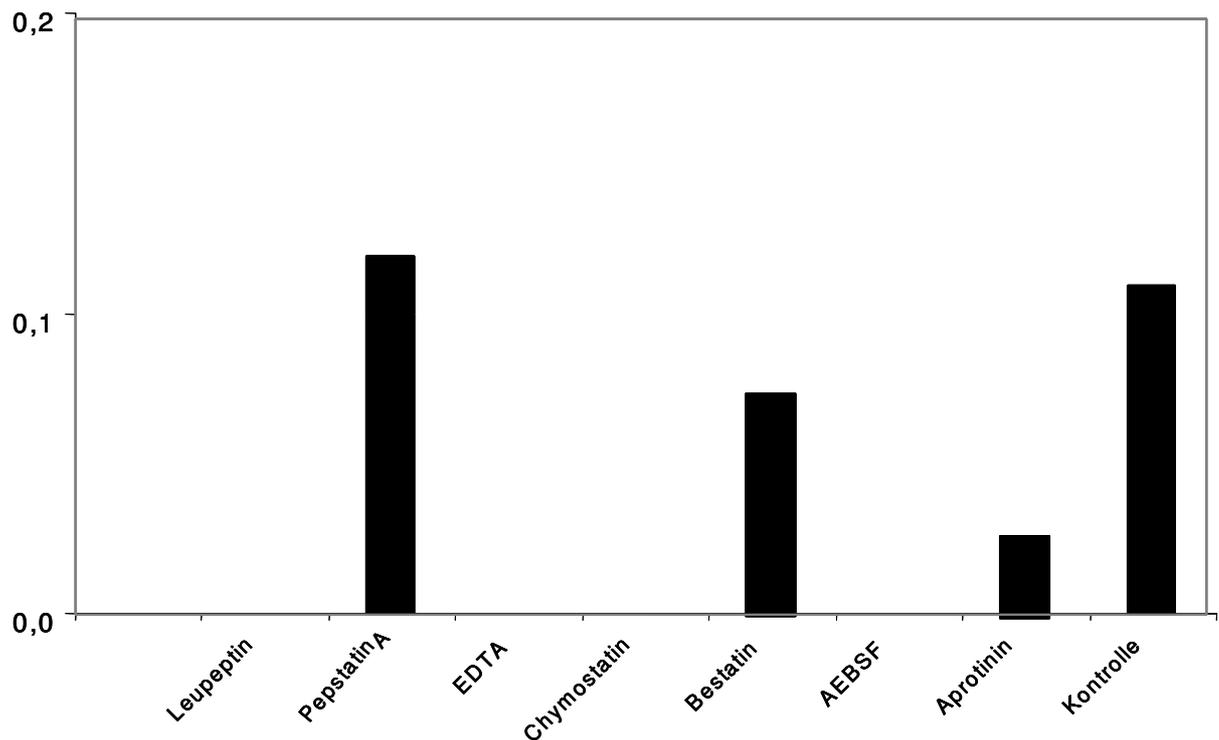


Abb.16: Aktivitätsprofil der Fraktion C (Abb. 15) in Gegenwart verschiedener Proteaseinhibitoren. Probenvolumen: 50 μ l. Inhibitorkonzentrationen: 10 μ M Leupeptin, 10 μ M Pepstatin A, 1 mM EDTA, 10 μ M Chymostatin, 100 μ M Bestatin, 1 mM AEBSF, 1 μ M Aprotinin

Abbildung 16 zeigt, dass die UME Aktivität stark durch die Serin/Cystein-Protease-Inhibitoren Leupeptin und Chymostatin sowie EDTA (ein Metallo-Protease-Inhibitor) und AEBSF (ein Serin-Protease-Inhibitor) gehemmt wird. Indessen inhibieren Bestatin (ein Amino-Peptidase-Inhibitor) und Aprotinin (ein Serin-Protease-Inhibitor) die UME Aktivität sehr gering. Pepstatin A, ein Aspartat-Protease-Inhibitor hemmt dagegen die UME Aktivität nicht. Da unter anderem die UME Aktivität gut durch Chymostatin inhibiert wurde, wurde für den vierten chromatographischen Reinigungsschritt eine Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Chymostatin gewählt.

3.2.8 Affinitäts-Chromatographie der Fraktion C

Man kann den Charakterisierungsversuchen entnehmen, dass UME unter anderem stark von dem Serin/Cysteinproteasen Inhibitor Chymostatin gehemmt wird (Abbildung 16). Mittels EDC-Linker wurde dieser Inhibitor kovalent an EAH Sepharose 4B gebunden und anschließend als Affinitätsgel für die Säulen-Affinitäts-Chromatographie verwendet. Mit dieser Chromatographie wurde die Fraktionen C (Abbildung 15) weiter gereinigt. Auf Abbildung 17 ist das Chromatogramm mit der UME Aktivitäten zu sehen. Im Balkendiagramm erkennt man, dass die Fraktion direkt nach dem Ausschlussvolumen zusammen mit einem UV-Peak eluiert (Fraktion D).

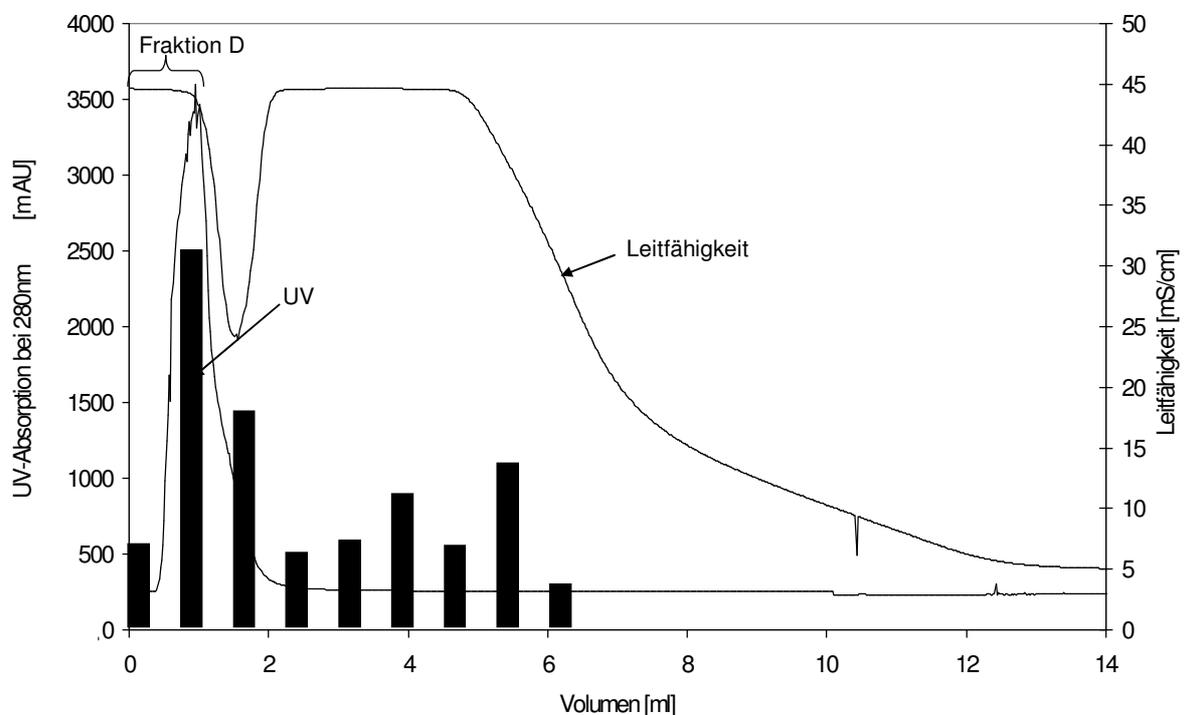


Abb. 17: Chromatogramm einer Chymostatin-Affinitäts-Chromatographie der Fraktion C (Abb. 15). Probenvolumen: 500 ml. Säule: Tricorn 5/50 Säulengehäuse 1 ml EAH Sepharose 4B Gel mit immobilisiertem Chymostatin. Puffer A: 500 mM NaCl; 50 mM HEPES; pH-Wert 8. Puffer B: 50 mM Phosphat; pH-Wert 4. Flussrate: 0,15 ml/min. Gradient: 0 % B bei 3 ml Retentionsvolumen, 75 % B bei 1 ml Retentionsvolumen, 100 % B bei 6 ml Retentionsvolumen. X-Achse: Retentionsvolumen [ml]. Linke Y-Achse: UV-Absorption bei 280 nm. Rechte Y-Achse: pH-Wert. Schwarze Säulen: UME Aktivitäten.

Eine weitere aktive Fraktion eluierte bei einem Retentionsvolumen von ca. 1 ml bei abfallender UV-Absorption und abfallender Leitfähigkeit. Beide Fraktionen wurden vereinigt und über einen 10 kDa Filter eingengt, diese wird dann im weiteren Verlauf als Fraktion D bezeichnet.

3.2.9 Größenausschluss-Chromatographie der Fraktion D

Auf Abbildung 18 ist das Chromatogramm einer Größenausschluss-Chromatographie der Fraktion D aus der Affinitäts-Chromatographie (Abbildung 17) zu sehen. Für einen Identifizierungsversuch wurde die aktive Fraktion E bei einem Retentionsvolumen von ca. 13 ml herangezogen, tryptisch verdaut und mittels LC-ESI MS/MS analysiert.

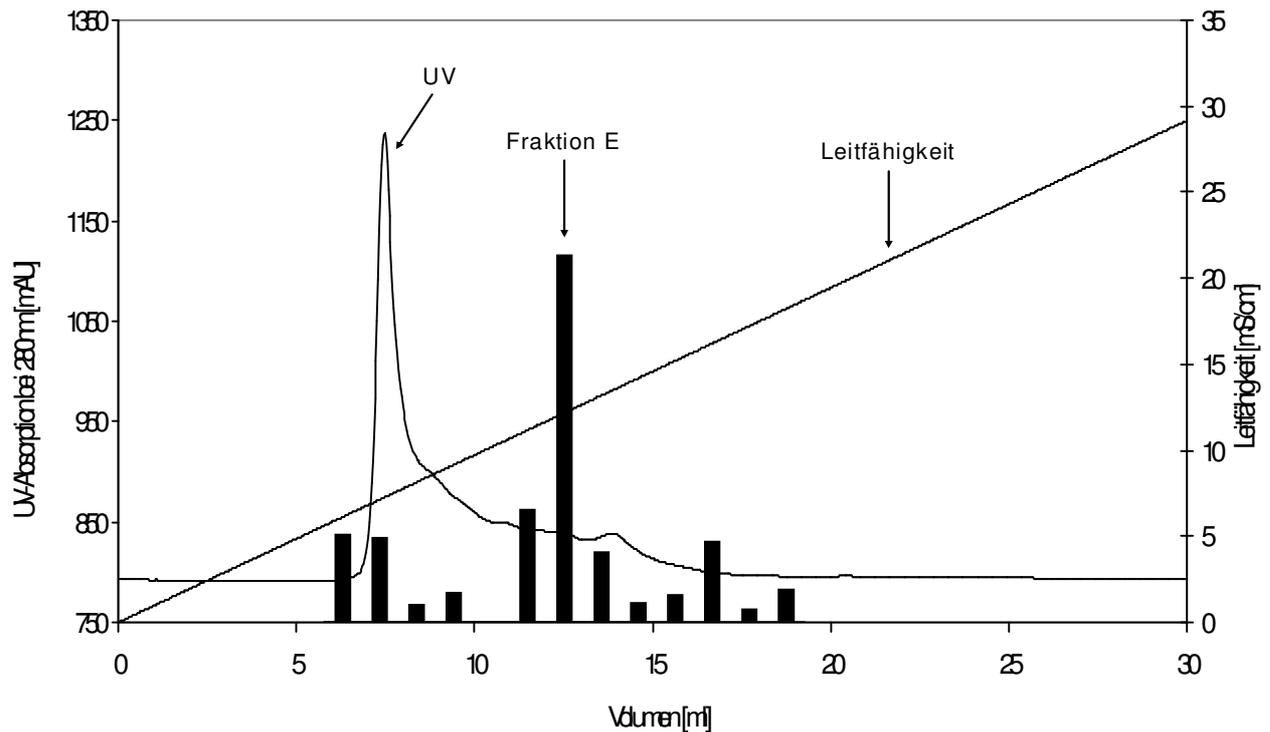


Abb. 18: Chromatogramm einer Größenausschluss-Chromatographie der Fraktion D (Abb. 17). Probenvolumen: 200 μ l Säule: Superdex 200 HR 10/30. Puffer A: 50 mM Phosphat; 150 mM NaCl; pH-Wert 7. Flussrate: 250 μ l/min. X-Achse: Retentionsvolumen [ml]. Y-Achse: UV-Absorption bei 280 nm.

3.3 Bestimmung des Molekulargewichts der UME mit der Größenausschluss-Chromatographie

Neben der Trennung von Proteinen kann die Größenausschluss-Chromatographie auch zum Abschätzen des Molekulargewichts von Proteinen genutzt werden. In der Tabelle 10 sind die Elutionsvolumina und die Partitionskoeffizienten (K_{AV}) der Standardproteine und der Fraktion E (Abb. 20) sowie der aus den K_{AV} -Werten berechneter Molekulargewichtsbereich des UMEs zu sehen.

Tab. 10: Tabelle zur Bestimmung des Molekulargewichts der UME. Elutionsvolumina verschiedener Standardproteine deren zugehörige Molekulargewichte (MG) sowie die zugehörigen berechneten K_{AV} Fraktion E mit den jeweiligen Elutionsvolumina.

	MG [Da]	Elutionsvolumen [ml]	K_{AV}
Ferritin	440000	10,4	0,2
IgG	150000	11,75	0,28
Transferrin	81000	13,35	0,37
Lysozym	43000	16,2	0,54
Myoglobin	17600	18,6	0,68
Fraktion E	ca. 80000-100000	13	0,35

Das Säulenvolumen betrug 24 ml. Das Elutionsvolumen der Fraktion E (Abb. 18) betrug ca. 13 ml und hatte einen K_{AV} von 0,352. Abbildung 21 zeigt die Kalibrierungskurve, die zur Bestimmung des Molekulargewichts von UME herangezogen wurde. Das UME somit hat ein Molekulargewicht in der Größenordnung von ca. 80 - 100kDa.

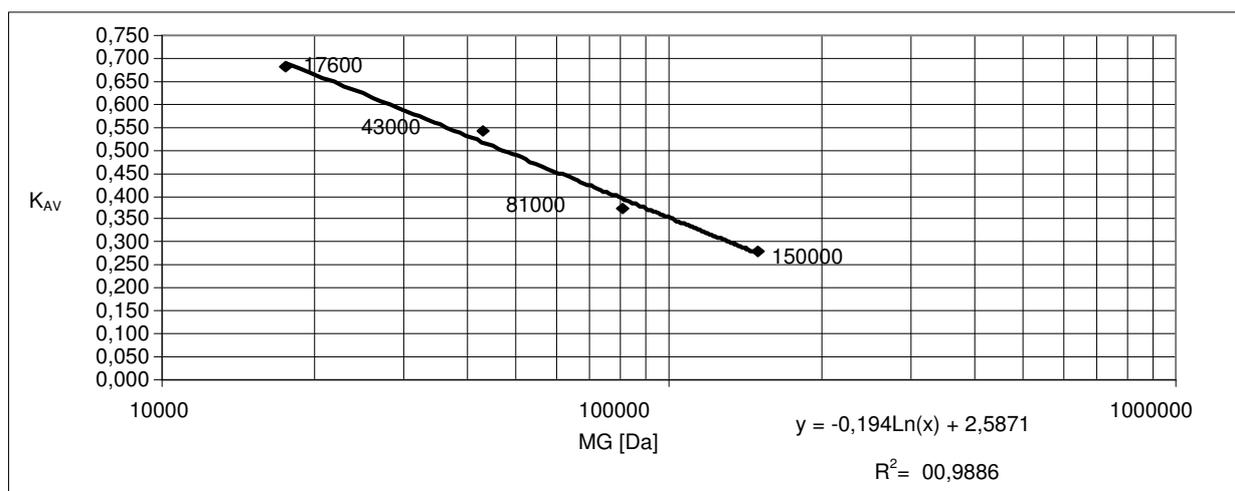


Abb. 19: Kalibrierungskurve der Größenausschluss-Chromatographie. Gegen den Logarithmus der Molekulargewichte (MG) ist der Partitionskoeffizient K_{AV} der Standardproteine aufgetragen. Der ermittelte K_{AV} für die Fraktion E beträgt 0,352.

3.4 Versuche zur Identifizierung des UMEs

Fraktion E (Abbildung 18) wurde tryptisch verdaut und die resultierenden Peptide mit der Flüssigkeits-Chromatographie-Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) analysiert. In Abbildung 22 ist das Chromatogramm dargestellt. Anschließend wurde eine Mascot Datenbankabfrage durchgeführt.

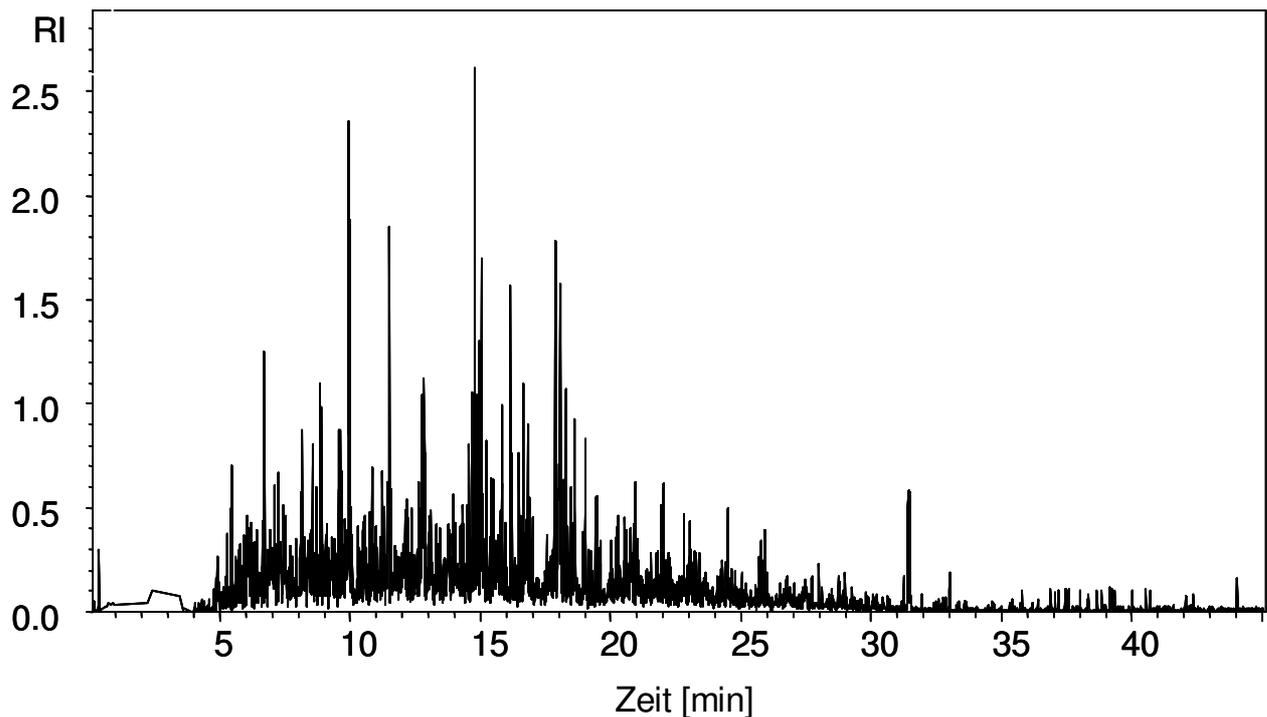


Abb. 20: Chromatogramm einer LC-ESI-MS/MS der tryptischen Peptide der Fraktion E (Abb. 18). Puffer A: 3 % ACN, 0,2 % Ameisensäure B: 80 % ACN, 0,2 % Ameisensäure. Chip Trapping Säule: 40 nl Reversed-Phase. Analytische Säule: Reversed-Phase 150 mm x 75 µm. Probenvolumen: 8 µl. X-Achse: Retentionszeit [min]. Y-Achse: Relative Intensität der Gesamtzahl der detektierten Ionen.

Mit Hilfe der Datenbankabfrage konnten zwei Proteasen identifiziert werden. Der Faktor IX (EC 3.4.21.22) mit der Acession Nummer P16296 konnte mit einem signifikanten Score von 429 identifiziert werden. Es konnten 10 Peptide mit den Peptidsequenzen SATILQYLK, FGSGYVSGWGR, VLCSTTGYR, VSVSHSPTTLTR, NCELDTCNK, SCKPAVPFPCGR, IDAFCGGSIINEK, WVVTAAHCIIEPGVK, ITVVAGEYNTEETEPTEQR, ITVVAGEYNTEETEPTEQRR dem Faktor IX zugeordnet werden. In der Abbildung 21 ist die Aminosäuresequenz des Faktor IX zu sehen.

```

1  YNSGKLEESF VRGNLERECI EEKCSFEER EFVENTEKTN EFWKQYVDGD
51  QCEPNPCLNG GLCKDDINSY ECWCQVGFEG KNCELDATCN IKNGRCKQFC
101 KTGADSKVLC SCTTGYRLAP DQKSCKPAVP FPCGRVSVSH SPTTLTRAEI
151 IFSNMDYENS TEVEPILDSL TESNQSSDDF IRIVGGENAK PGQFPWQVLL
201 NGKIDAFCGG SIINEKWVVT AAHCIEPGVK ITVVAGEYNT EETEPTEQRR
251 NVIRAIPHHS YNATVNKYSH DIALLELDEP LTLNSYVTPI CIADKEYTNI
301 FLKFGSGYVS GWGRVFNRGR SATILQYLKV PLVDRATCLR STKVTIYSNM
351 FCAGFHEGGK DSCLGDSGGP HVTEVEGTSF LTGIISWGEE CAVKGKYGII
401 TKVSRYVNW

```

Abb. 21: Faktor IX Aminosäuresequenz: Fett hervorgehoben sind die in der LC-ESI-MS/MS-Analyse detektierten Peptide.

Die Sequenzabdeckung lag für den Faktor IX bei 27 %. Als weitere Protease konnte die Xaa-Pro Aminopeptidase 1 (EC 3.4.11.9) mit der primäre Accession Nummer P0A3Z1 und der seconderie Accession Nummer Q05813 und mit einem Score von 96 identifiziert werden. Der Xaa-Pro Aminopeptidase 1 konnten 3 Peptide mit der Peptidsequenz VTSELLR, GHLLDSFAR, IENVVLVVPVK zugeordnet werden. Für Xaa-Pro Aminopeptidase 1 lag die Sequenzabdeckung bei 4 %. Die Aminosäuresequenz ist auf der Abbildung 22 zu sehen.

```

1  PPKVTSELLR QLRQAMRNSE YVTEPIQAYI IPSGDAHQSE YIAPCDARRA
51  FVSGFDGSAG TAIITEEHAA MWTDGRYFLQ AAKQMDSNWT LMKMGLKDTP
101 TQEDWLVSVL PEGSRVGVDP LIIPTDYWKK MAKVLRSGH HLIPVKENLV
151 DKIWTDRLPER PCKPLTLGL DYTGISWKDK VADLRLKMAE RNVMWFVTA
201 LDEIAWLFNL RGS DVEHNPV FFSYAIIGLE TIMLFIDGDR IDAPSVKEHL
251 LLDLGLEAEY RIQVHPYKSI LSELKALCAD LSPREKVVVS DKASYAVSET
301 IPKDHRCMP YTPICIAKAV KNSAESEGMR RAHIKDAVAL CELFNWLEKE
351 VPKGGVTEIS AADKAEFRF QQADFDLSF PTISSTGPNP AIIHYAPVPE
401 TNRTLSDLEV YLIDSGAQYK DGTTDVTRTM HFGTPTAYEK ECFTYVLKGH
451 IAVSAAVPT GTKGHLLDSF ARSALWDSGL DYLHGTGHGV GSFLNVHEGP
501 CGISYKTFSD EPLEAGMIVT DEPGYEDGA FGIRIENVVL VVPVKTKYNF
551 NNRGSLTFEP LTLVPIQTKM IDVDSLTDKE CDWLNNYHLT CRDVGKELQ
601 KQGRQEALW LIRETQPISK QH

```

Abb. 22: Xaa-Pro Aminopeptidase 1 Aminosäuresequenz: Fett hervorgehoben sind die detektierten Peptide

3.4.1 MS/MS-Spektren der Fragmentierung vom Faktor IXa

Die Bruchstücke der fragmentierten Peptide, die für den Faktor IX detektiert wurden, sind auf den Abbildungen 23 bis 32 zu sehen. Auf der Abbildung 23 ist die Fragmentierung des Peptids mit der AS-Sequenz SATILQYLK und einer Masse von 1035,5964 Da zu sehen.

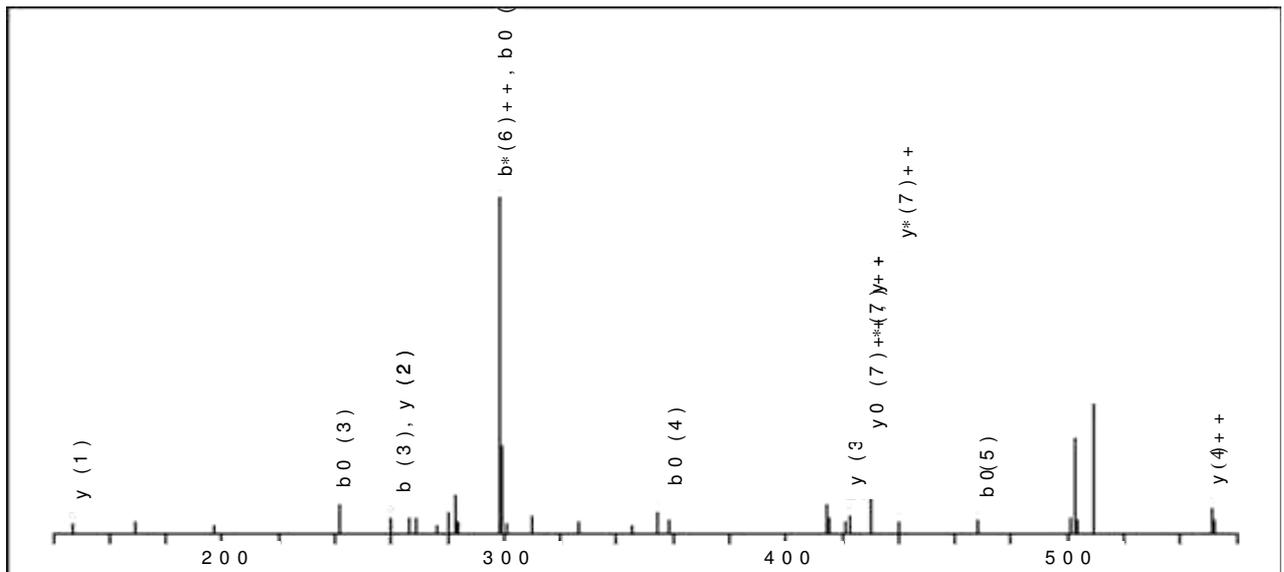


Abb. 23: MS/MS-Spektren der AS-Sequenz SATILQYLK bei einem Score von 41.

Die Abbildung 24 zeigt die Fragmentierung des Peptids mit der AS-Sequenz FGSGYVSGWGR und einer Masse von 1171,5410 Da.

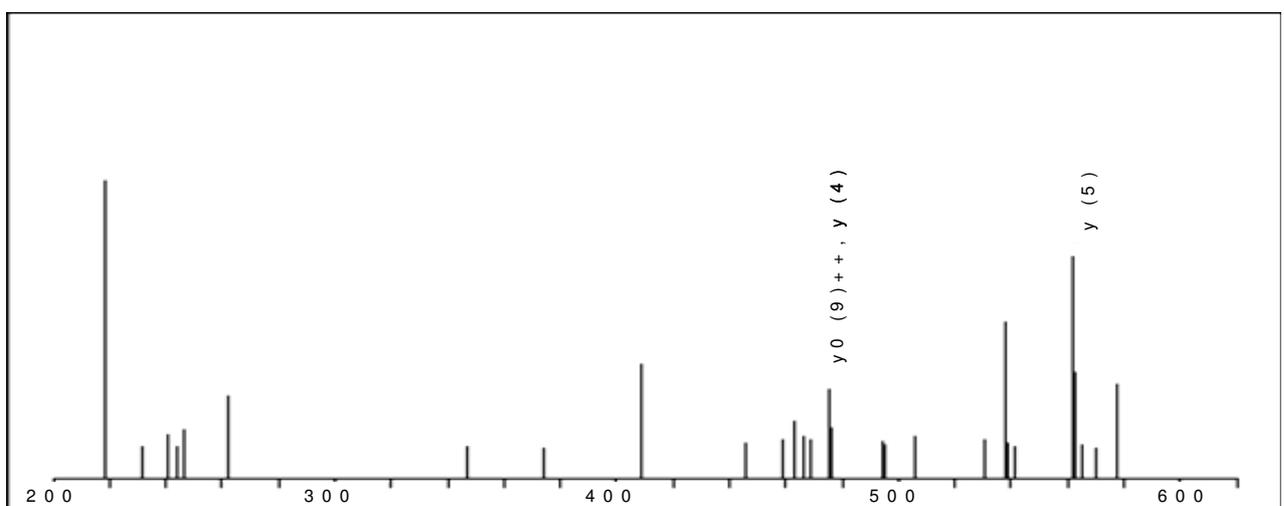


Abb. 24: MS/MS-Spektren der AS-Sequenz FGSGYVSGWGR bei einem Score von 17.

Abbildung 25 stellt die Fragmentierung des Peptids mit der AS-Sequenz VLCSCTTGYR und einer Masse von 1215,5376 Da dar.

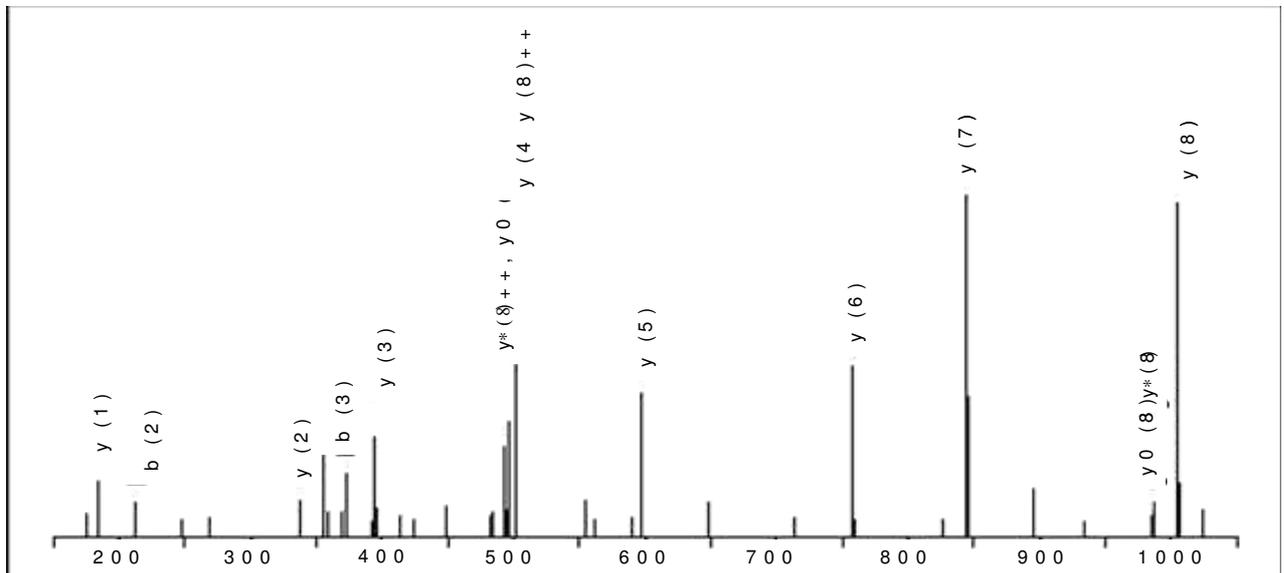


Abb. 25: MS/MS-Spektren der AS-Sequenz VLCSCTTGYR bei einem Score von 42.

Auf der Abbildung 26 ist die Fragmentierung des Peptids mit der AS-Sequenz VSVSHSPTTLTR und einer Masse von 1283,6834 Da dargestellt.

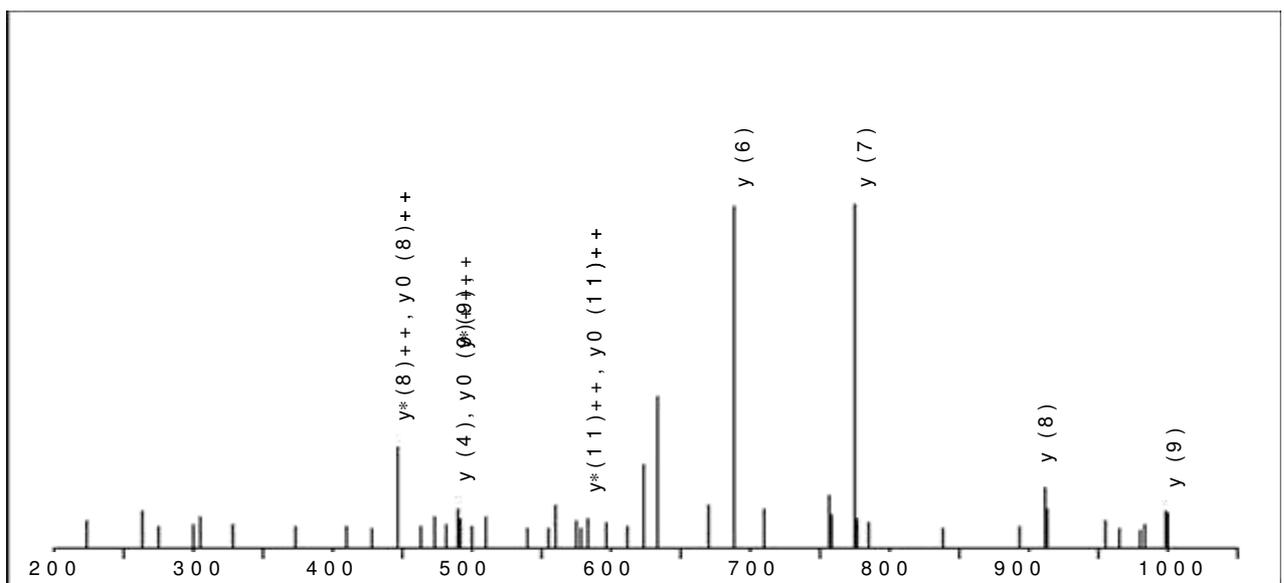


Abb. 26: MS/MS-Spektren der AS-Sequenz VSVSHSPTTLTR bei einem Score von 26.

Abbildung 27 zeigt die Fragmentierung des Peptids mit der AS-Sequenz NCELDATCNK und einer Masse von 1336,5751 Da.

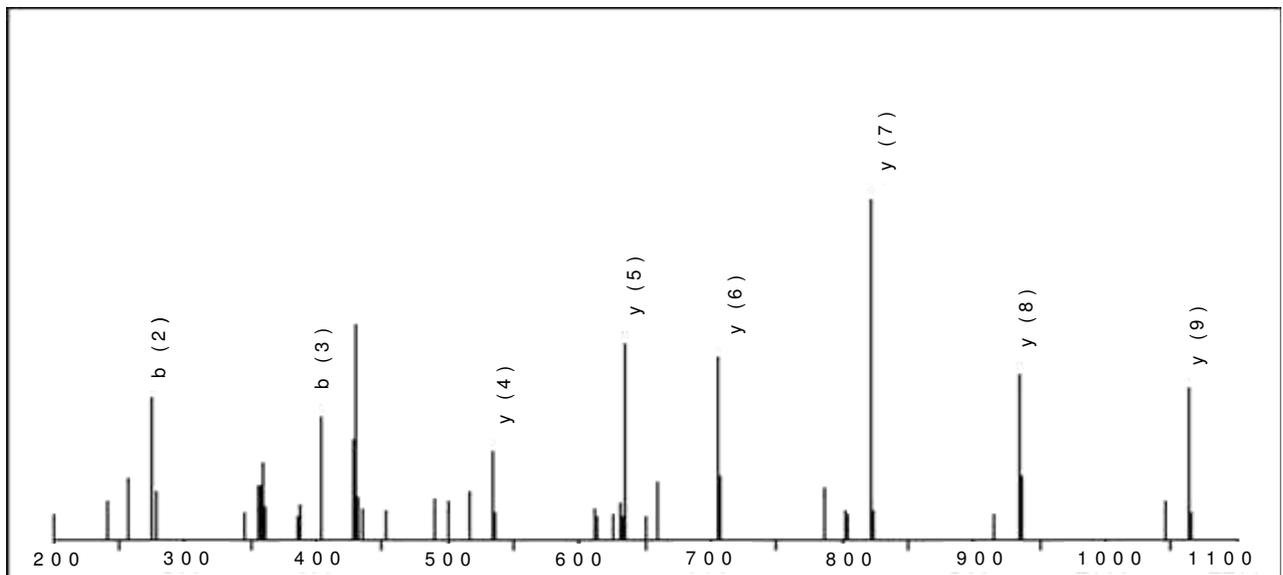


Abb. 27: MS/MS-Spektren der AS-Sequenz NCELDATCNK bei einem Score von 43.

Die Abbildung 28 zeigt die Fragmentierung des Peptids mit der AS-Sequenz SCKPAVPFPCGR und einer Masse von 1374,6536 Da.

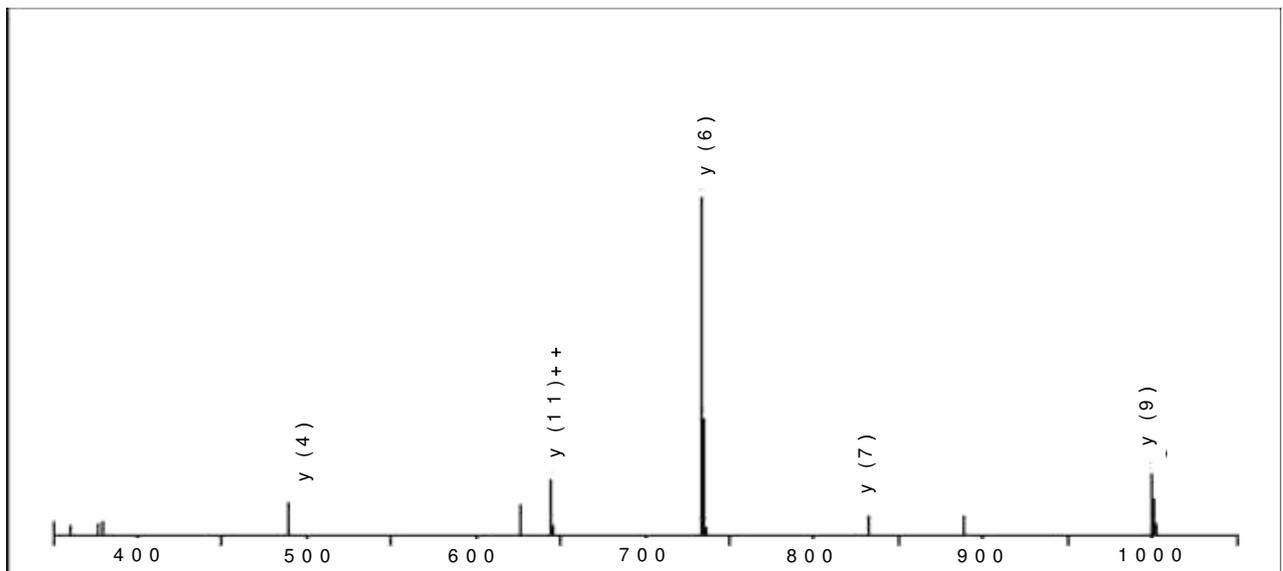


Abb. 28: MS/MS-Spektren der AS-Sequenz SCKPAVPFPCGR bei einem Score von 25.

Die Fragmentierung des Peptids mit der AS-Sequenz IDAFCGGSIINEK und einer Masse von 1422,6813 Da kann man auf Abbildung 29 sehen.

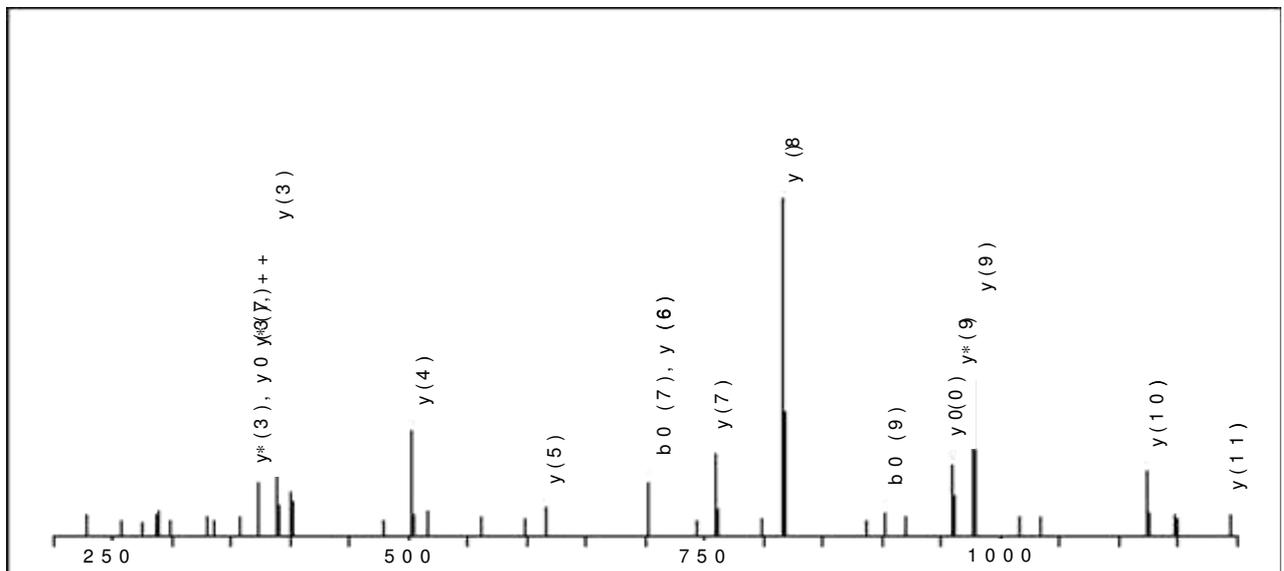


Abb. 29: MS/MS-Spektren der AS-Sequenz IDAFCGGSIINEK bei einem Score von 72.

Auf der Abbildung 30 ist die Fragmentierung des Peptids mit der AS-Sequenz WVVTAAHCIIEPGVK und einer Masse von 1565,8024 Da dargestellt.

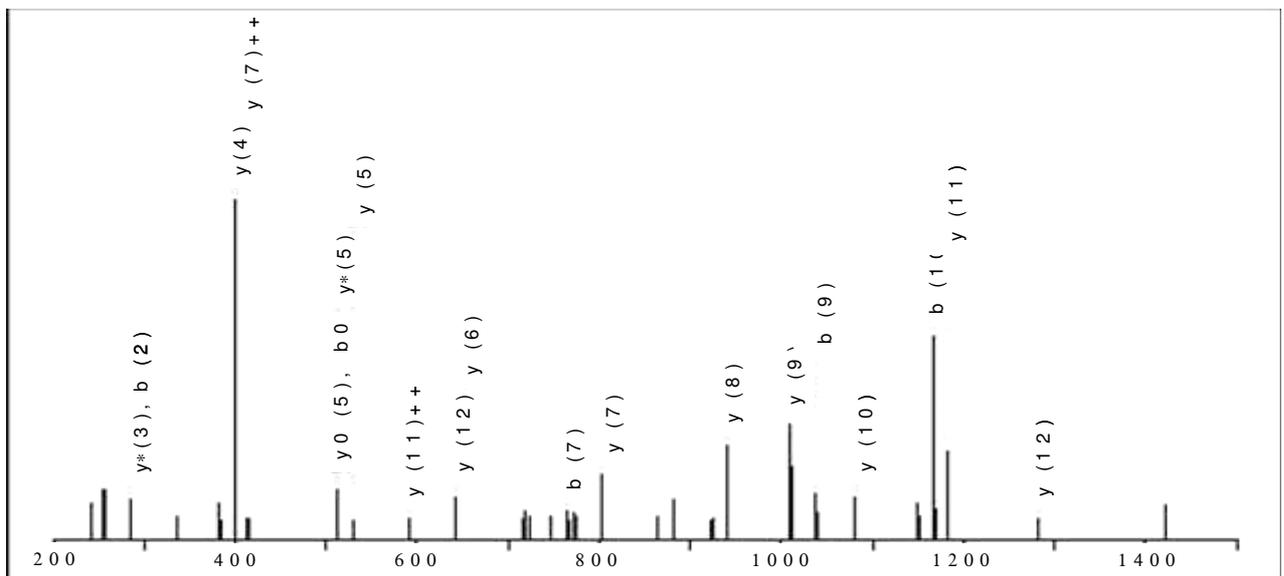


Abb. 30: MS/MS-Spektren der AS-Sequenz WVVTAAHCIIEPGVK bei einem Score von 64.

Die Abbildung 31 zeigt die Fragmentierung des Peptids mit der AS-Sequenz ITVVAGEYNTTEETEPTEQR und einer Masse von 2165,0124 Da.

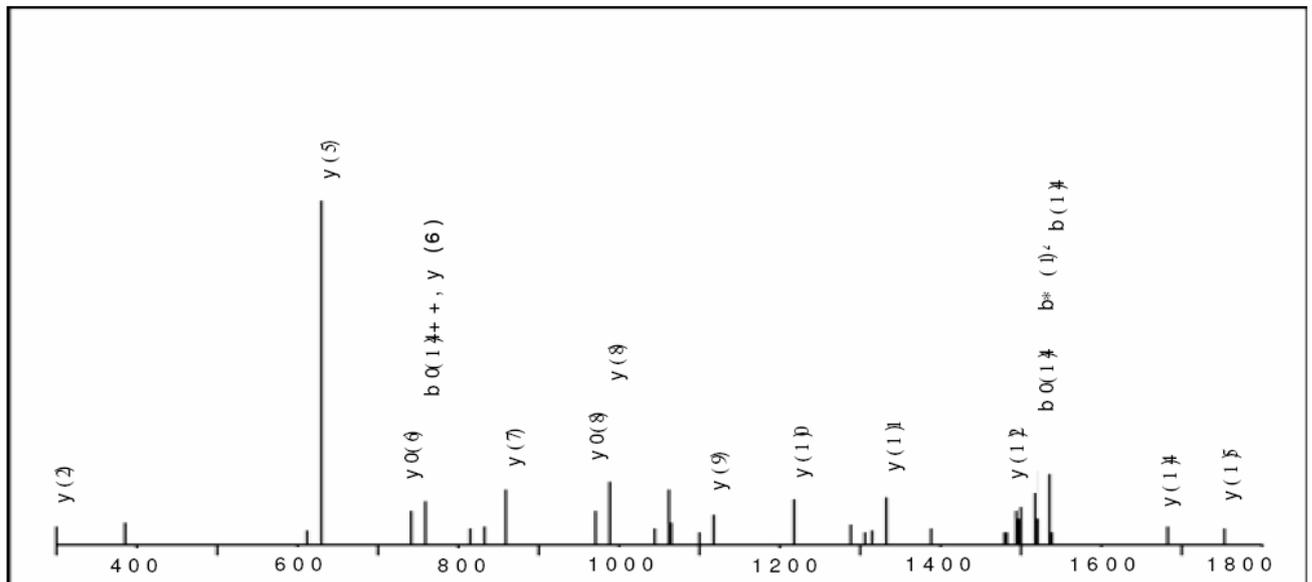


Abb. 31: MS/MS-Spektren der AS-Sequenz ITVVAGEYNTTEETEPTEQR bei einem Score von 72.

Die Fragmentierung des Peptids mit der AS-Sequenz ITVVAGEYNTTEETEPTEQRR und einer Masse von 2321,1135 Da kann man auf Abbildung 32 sehen.

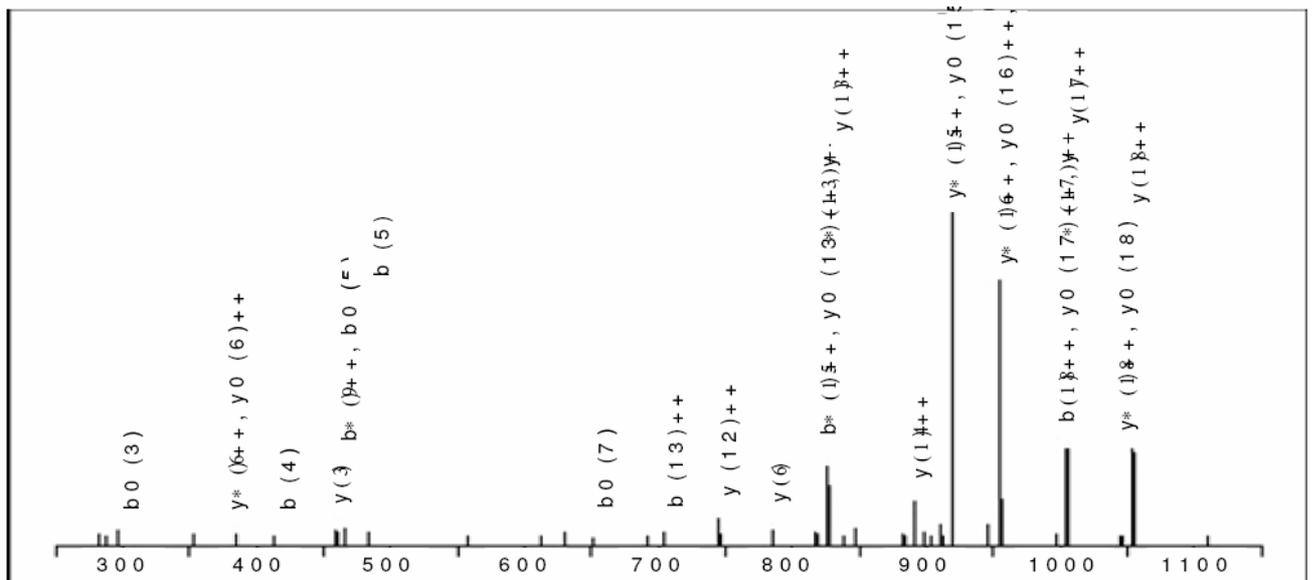


Abb. 32: MS/MS-Spektren der AS-Sequenz ITVVAGEYNTTEETEPTEQRR bei einem Score von 29.

3.4.2 MS/MS-Spektren der Fragmentierung vom Xaa-Pro Aminopeptidase 1

Die Bruchstücke der fragmentierten Peptide, die für die Xaa-Pro Aminopeptidase detektiert wurden, sind auf den Abbildungen 33 bis 35 zu sehen. Die Abbildung 33 und zeigt die Fragmentierung des Peptids mit der AS-Sequenz VTSELLR und einer Masse von 816.4705 Da.

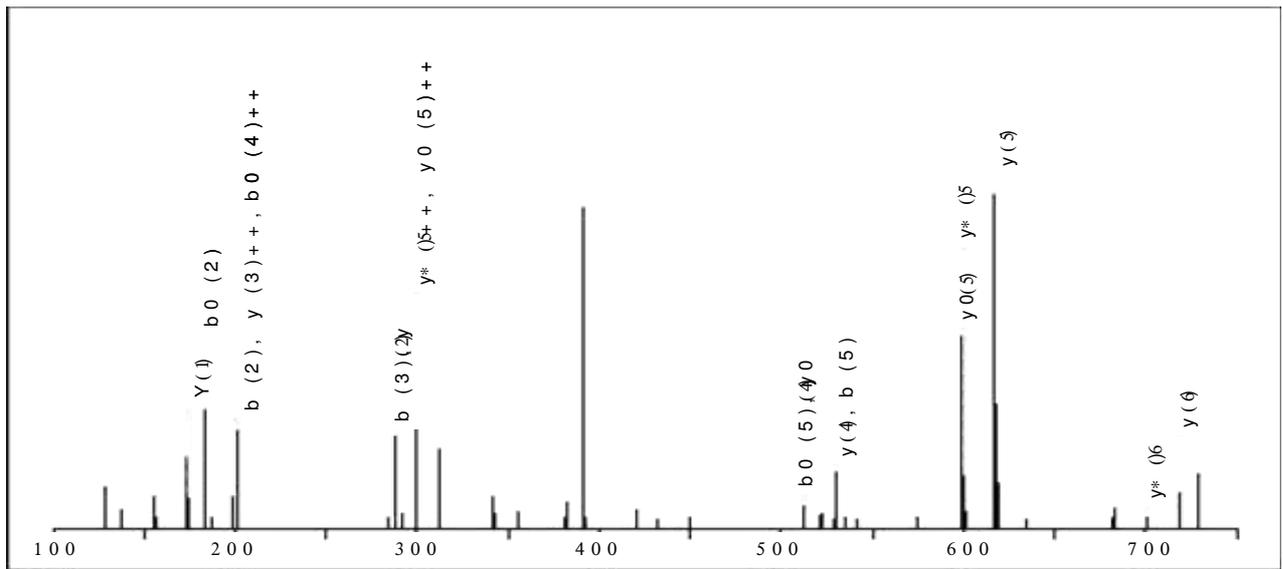


Abb. 33: MS/MS-Spektren der AS-Sequenz VTSELLR bei einem Score von 20.

Auf der Abbildung 34 ist die Fragmentierung des Peptids mit der AS-Sequenz GHLLDSFAR und einer Masse von 1014.5246 Da dargestellt.

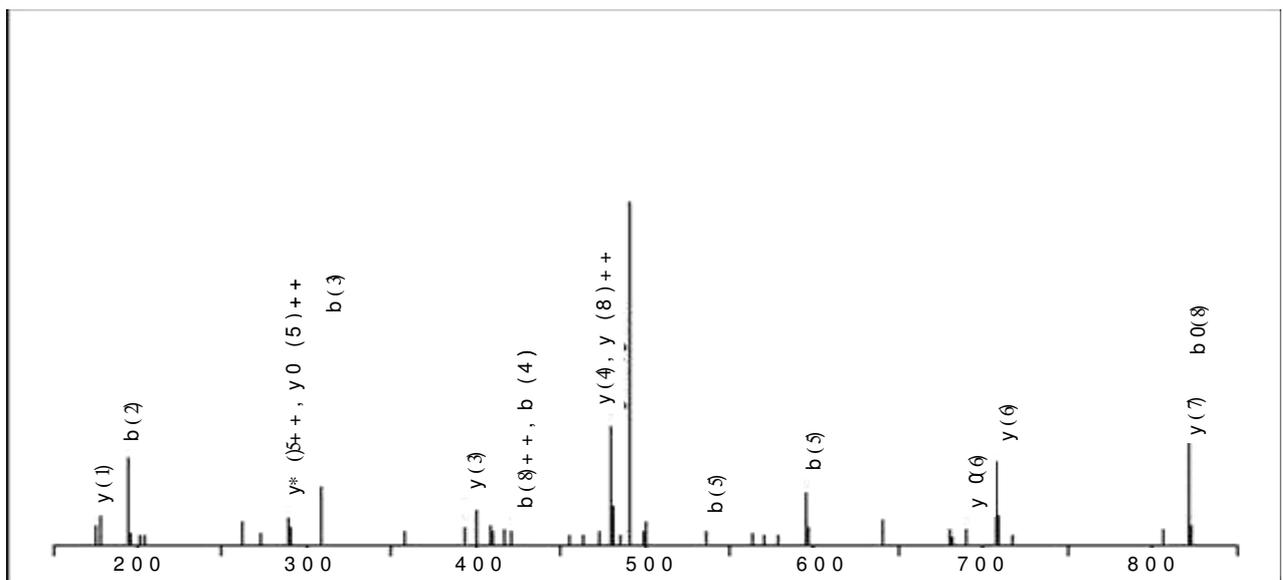


Abb. 34: MS/MS-Spektren der AS-Sequenz GHLLDSFAR bei einem Score von 24.

Die Fragmentierung des Peptids mit der AS-Sequenz IENVVLVVPVK und einer Masse von 1207.7539 Da kann man auf Abbildung 35 sehen.

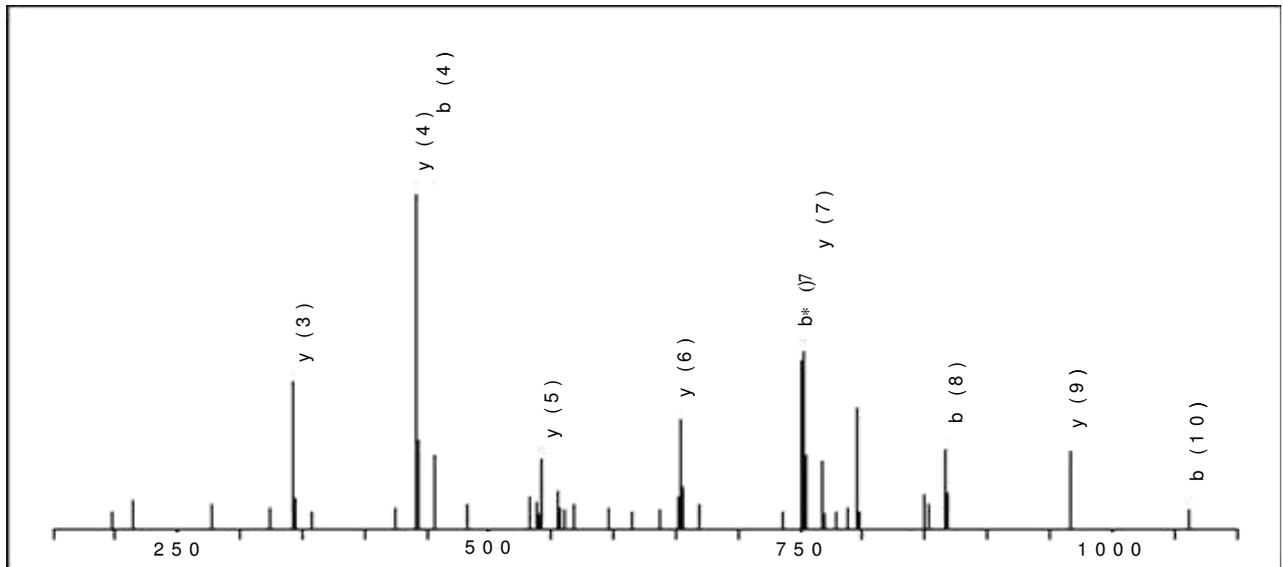


Abb. 35: MS/MS-Spektren der AS-Sequenz IENVVLVVPVK bei einem Score von 55.

3.5 ESI-MS basierter Assay zum Nachweis der UME-Aktivität

Für die Messung der UME-Aktivität mit der ESI-IT-MS musste zunächst ein Verfahren zur Quantifizierung der Analyten UII und des-Val-UII entwickelt werden. Hierzu war eine Reihe von Vorexperimenten erforderlich. Zunächst wurde eine Probe mit dem nachzuweisenden Peptid über eine Spritzenpumpe infundiert und eine Fullscan-Messung durchgeführt. Im zweiten Schritt wird das Ion, welches von Interesse ist, in der Ionenfalle isoliert. Zum Erreichen einer möglichst hohen Nachweisintensität wurde das Analyt-Ion ausgewählt, welches die höchste Signalintensität zeigt. Dann wurde dieses Ion in der IT fragmentiert und die resultierenden Fragment-Ionen mit einer Scan-Messung analysiert, um das Fragment-Ion mit der höchsten Signalintensität zu bestimmen und zu zeigen. Diese vier Schritte wurden für das Substrat humanes UII und das Reaktionsprodukt humanes des-Val-UII mit einer 10^{-5} M Lösung durchgeführt. Die Fullscan-Messung aus Schritt eins ist in der Abbildung 36 dargestellt.

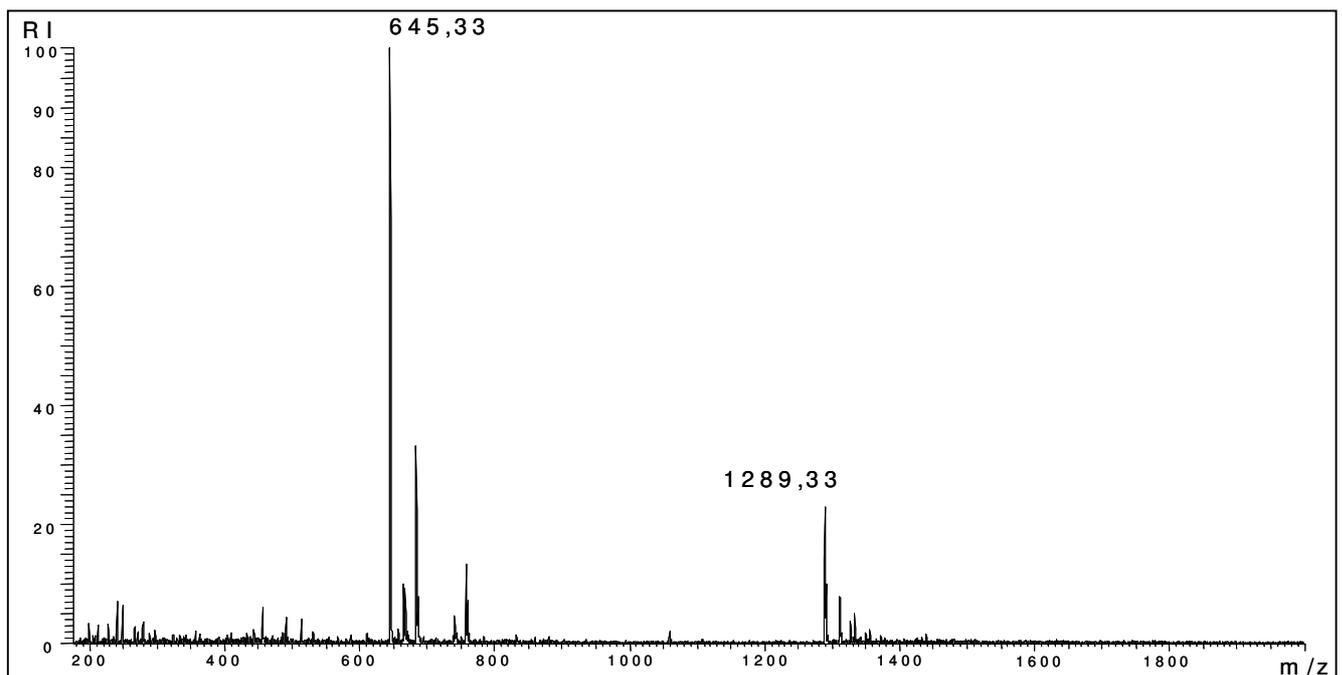


Abb. 36: Fullscan-ESI-IT-MS-Spektrum von humanem des-Val-UII; die höchste Intensität liegt bei $M+2H^+$: 645,33 m/z. Y-Achse: Relative Intensität. X-Achse: m/z

Die höchste Signalintensität im Spektrum zeigte das zweifach positiv geladene Ion des humanen des-Val-UII bei einer Masse von 645,33 pro Ladung. Um eine möglichst hohe

Nachweisempfindlichkeit zu erreichen, wurde die Masse des zweifach geladenen Peptids vorgegeben, welche in der IT im zweiten und dritten Schritt angereichert und fragmentiert werden soll. Die im dritten Schritt durchgeführte Fragmentierung des zweifach geladenen Peptids ergab ein MS/MS-Spektrum des humanen des-Val-Ull mit einem Fragment höchster Signalintensität bei einer Masse pro Ladung von 530,73. Auf Abbildung 37 ist das MS/MS-Spektrum nach der Fragmentierung des zweifach geladenen Peptids zu sehen.

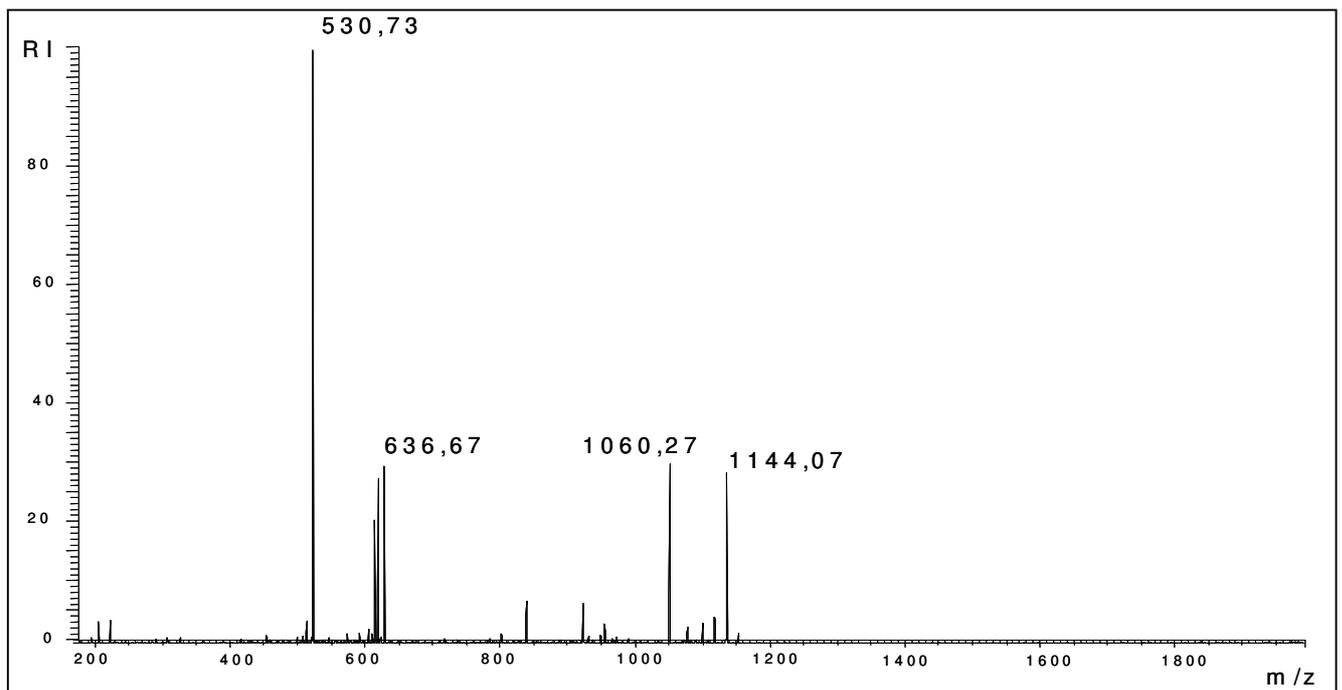


Abb. 37: MS/MS-Spektrum des zweifach geladenen Peptids des humanen des-Val-Ull. Höchste Signalintensität bei 530,73 m/z. Y-Achse: Relative Intensität. X-Achse: m/z

Die oben beschriebenen Ergebnisse der ESI-IT-MS Experimente (Abbildung 36 und 37) dienen zur Festlegung der Parameter zur selektiven Detektion des Peptids humanes des-Val-Ull mit der ESI-IT-MS in dem Eluent einer Reversed-Phase Chromatographie. Das gleiche Verfahren wurde auch für das Peptid humanes Ull angewendet.

Die Chromatographie des humanen des-Val-Ull wurde mit der ESI-IT-MS mit den oben bestimmten Parametern verfolgt. Des-Val-Ull eluierte bei einer Retentionszeit zwischen 8 min und 9 min. In der Abbildung 38 ist das Chromatogramm zum humanen des-Val-Ull zu sehen.

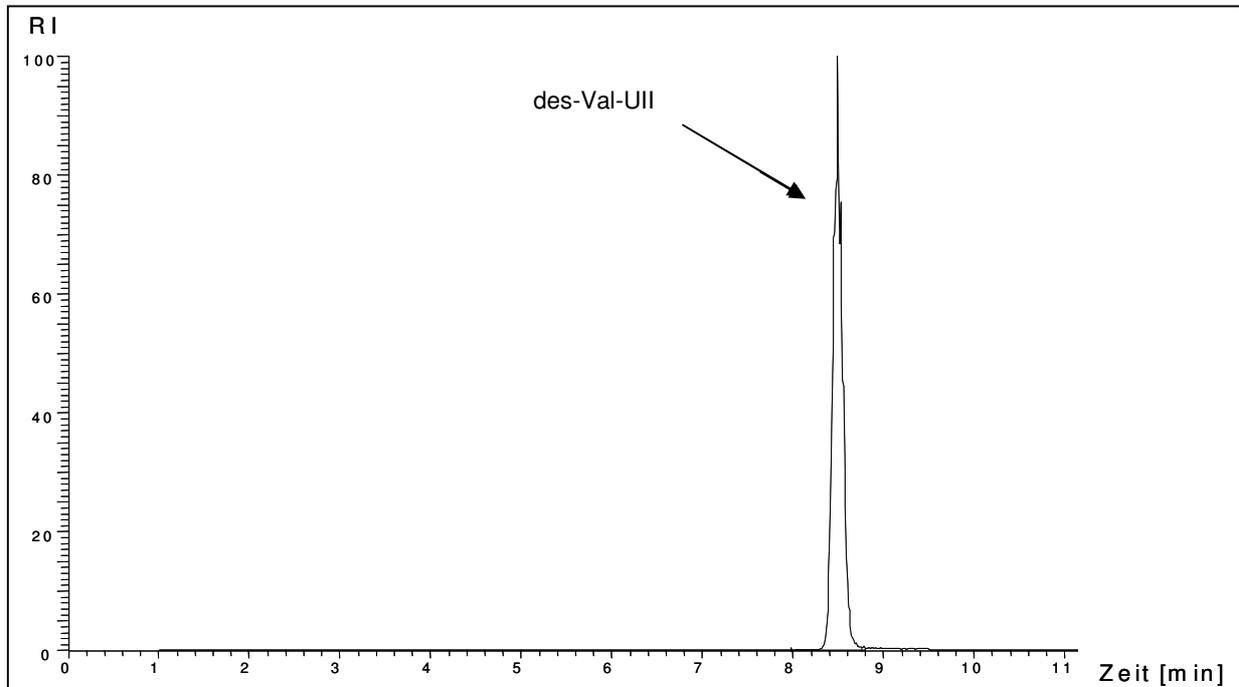


Abb. 38: Chromatogramm einer 10^{-5} M humanen des-Val-Ull Probe; Detektion mittels ESI-IT-MS. Probenvolumen: 50 μ l. Säule: 5RPC 4.1x150. Puffer A: 0,2 % Ameisensäure. Puffer B: 100 % ACN. Flussrate: 0,3 ml/min. X-Achse: Retentionszeit [min]. Y-Achse: Relative Intensität der detektierten Ionen.

3.6 Nachweis einer des-Val-Ull-generierenden Aktivität des Faktor IXa

Es erfolgte zunächst eine kovalente Immobilisierung des humanen Faktor IXa an Beads. Das immobilisierte Enzym wurde mit Ull inkubiert. Anschließend wurden Aliquots nach definierten Inkubationszeiten aus dem Inkubationsansatz abgenommen und mittels ESI-IT-MS wie oben beschrieben analysiert. Das Diagramm auf Abbildung 39 stellt die des-Val-Ull-generierende Aktivität der Kontrolle und der humanem Faktor IXa Inkubation mit Ull gegenüber. Es wird deutlich, dass die des-Val-Ull-Generierung durch den humanen Faktor IXa katalysiert wird.

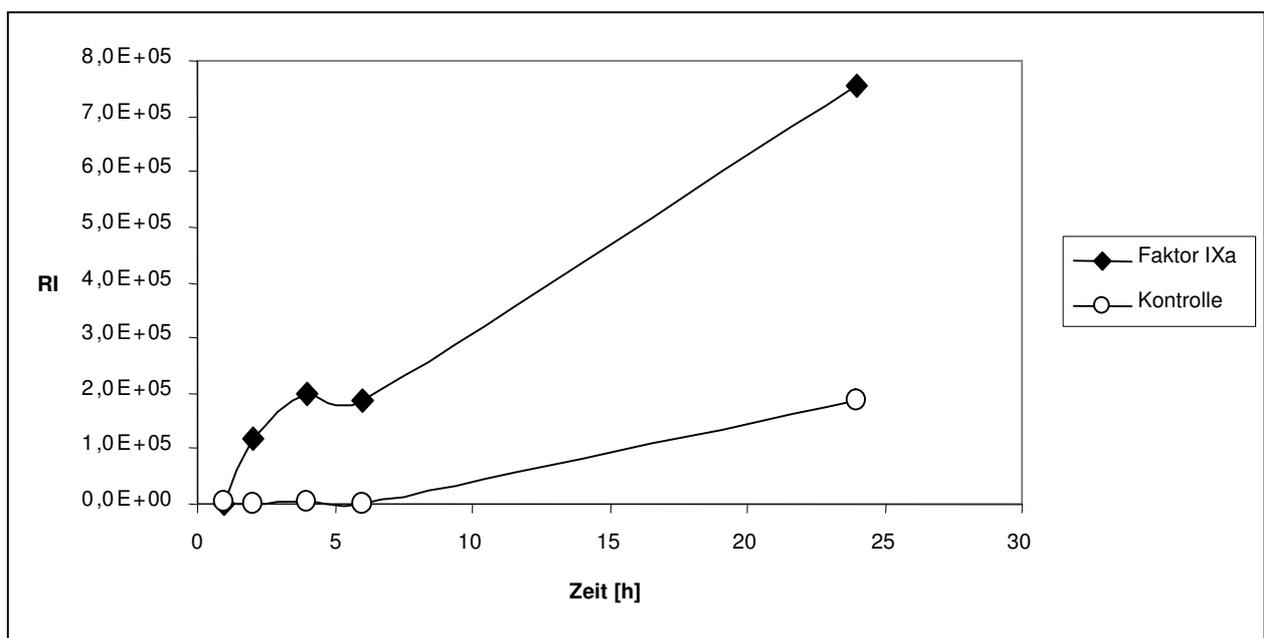


Abb. 39: Diagramm zeigt die des-Val-Ull-Konzentration nach unterschiedlichen Inkubationszeiten von immobilisiertem Faktor IXa und der Kontrolle (ohne humanem Faktor IXa) mit Ull.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit lautete, ein Urotensin-II-metabolisierendes Enzym (UME) aus Schweinenierengewebe aufzuspüren und mittels chromatographischer Methoden zu reinigen, um es anschließend zu identifizieren.

Zu Beginn der Arbeit musste ein System etabliert werden, mit welchem die UME-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Zu diesem Zweck wurde das Massenspektrometrie-basierte Enzym-Screening-System (MES-System), genutzt [Schlüter et al. 2003]. Das MES-System beinhaltet die kovalente Immobilisierung von Proteinen aus den zu testenden Fraktionen an Affinitätschromatographiematerialien und die anschließende Inkubation der immobilisierten Proteine mit reaktionsspezifischen Sonden, in diesem Fall mit Urotensin. Zu definierten Zeiten werden anschließend Aliquots aus der Reaktionslösung abgenommen und mit Hilfe der MALDI-MS analysiert. Der Vorteil des MES-Systems besteht gegenüber den herkömmlichen Verfahren wie photometrischen oder fluoreszenz-basierten Nachweissystemen darin, dass das Substrat in authentischer Form verwendet werden kann. Bei photometrischen Nachweissystemen muss das Substrat oft mit Chromophoren, Fluorophoren oder Radioisotopen gelabelt werden. Das Labeln mit chemischen Gruppen könnte die Substratspezifität und somit wiederum die Enzymaktivität beeinflussen. Das Resultat könnte damit ein falsch negatives Ergebnis sein, das durch Störung der Substratbindung verursacht sein könnte. Radioaktive Substrate als Alternative sind dagegen sehr teuer und aufwendig von der Handhabung. Zudem sagt die Messung der Radioaktivität nichts über die Identität des Reaktionsproduktes aus. Durch die Verwendung authentischer Substrate und die massenspektrometrische Analyse der Reaktionslösung in der MES-Methodik wird dieses Problem vermieden. Die Signale in den Massenspektren stammen ausschließlich von den Substraten und den Reaktionsprodukten. Durch die Immobilisierung der Enzyme an eine hydrophile stationäre Phase wird die Struktur der meisten Enzyme stabilisiert, so dass auf Puffersalze verzichtet werden kann [Mansur et al. 2005] und damit ideale Bedingungen für die massenspektrometrische Analyse bestehen.

Um zu beurteilen, ob das gesuchte Enzym in einer Proteinfraction vorhanden ist, musste geprüft werden, ob die Signale des erwarteten Reaktionsproduktes und des Substrats auf der Massenskala an der richtigen Stelle erscheinen. Dabei wurde auch

betrachtet, ob die Signalintensität vom Substrat mit der Zeit abnahm und ob die vom gesuchten Produkt zunahm. In Abbildung 7 sieht man MES-Massenspektren, die eine UME-Aktivität nachweisen. In diesem Fall wurden Proteinfractionen aus Schweinenierengewebe an Affinitätschromatographiematerialien immobilisiert und anschließend diese mit Ull inkubiert. Bei des-Val-Ull handelt es sich um ein Peptid, das im Vergleich zu Ull um eine Aminosäure, dem Valin, am C-Terminus verkürzt ist. Das Signal von des-Val-Ull sieht man bei 1314,50 Da und die von Ull bei 1413,60 Da auf der m/z-Skala. Wie erwartet, nahmen die Signalintensität von Ull mit der Zeit ab und die von des-Val-Ull zu. Dieses ist ein Hinweis darauf, dass in der Protein-Fraktion UME anwesend war. Im Massenspektrum kann man auch andere Massen erkennen und somit kann das Schicksal von Ull genau verfolgt werden, was mit konventionellen Enzymassays nicht möglich ist.

Damit entschieden werden kann, welche Proteinfraction das gesuchte UME beinhaltet und damit weiter gereinigt werden kann, muss das MES-System sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen über die Enzymaktivität geben können. Um eine verhältnismäßige Quantifizierung über das Produkt des-Val-Ull treffen zu können, wurden von den Signalintensitäten von des-Val-Ull und Ull Intensitätsverhältnisse gebildet. Zur Messung mit der MALDI-MS wurde zunächst die MALDI-Matrix [Lottspeich & Zorbas, 2006], eine organische Säure, in Wasser gelöst und auf den Probenhalter aufgetragen. Die Proben wurden dann jeweils dreimal auf den Probenhalter pipettiert und massenspektrometrisch vermessen. Anschließend wurden aus den Signalintensitäten die Mittelwerte gebildet. Während der Kristallisation der Matrix-Kristalle kann es zu einer inhomogenen Verteilung der Probenmoleküle in den Kristallen kommen. Es entstehen so Hot Spots mit Bereichen hoher Probenkonzentrationen. Diese Hot Spots müssen bei der Messung beachtet werden, um falsch positive Werte zu vermeiden. Die Gefahr falsch positiver Werte durch Hot Spots wurde durch das Programmieren einer automatisierten Messprozedur vermindert. So wurden an einer Stelle des Kristalls maximal 20 Spektren summiert, wenn die Software signifikante Signale erkannte und dann eine andere Stelle des Kristalls gewählt und mit dem Laser beschossen. Auf diese Art wurden 100 Spektren pro Probe summiert.

Die Aminosäuresequenz des Ull sieht man in Abbildung 40. Das Peptid wurde nach der Synthese oxidiert, um eine Disulfidbrücke zu erhalten. Mit Hilfe einer RP-Chromatographie wurde anschließend das Ull gereinigt. Das Chromatogramm ist in Abbildung 8 zu sehen. Es wurde von der Ull-Fraktion, die bei einem Retentionsvolumen

von 650 ml eluiert, ein Aliquot abpipettiert und anschließend massenspektrometrisch vermessen. Das MALDI-Massenspektrum sieht man in Abbildung 7.

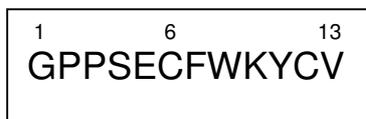


Abb. 40: Aminosäuresequenz von Urotensin-II (Ull) des Schweins mit 13 Aminosäuren. Die Cysteine sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden.

Ull ist ein vasoaktives Peptid, das im Plasma nachgewiesen werden konnte [Totsune et al. 2001, 2004]. Es ist an der Aufrechterhaltung der vaskulären Hämostase beteiligt. Aufgrund seiner Vasoaktivität vermuten einige Autoren einen Zusammenhang zwischen Ull und Blutdruckregulation. Bei essentieller Hypertonie konnte zum Beispiel eine erhöhte Ull-Konzentration im Urin festgestellt werden [Matsushita et al. 2001]. Ebenso wiesen Patienten mit einer systemischen Hypertonie eine erhöhte Ull-Plasmakonzentration auf [Cheung et al. 2004]. Es ist nicht unwahrscheinlich ein Ull-metabolisierendes Enzym in einem Organ aufzuspüren, was wesentlich an der Hämostase beteiligt ist. Die Niere spielt in diesem Zusammenhang eine große Rolle, so das vermutet werden kann, dass UME auch im Nierengewebe zu finden ist. Zahlreiche Autoren beschreiben den Nachweis von Präpro-Ull mRNA in der Niere [Coulouarn et al. 1998; Totsune et al. 2001; Matsushita et al. 2001, Elshourbagy et al. 2002]. Deshalb wurde Nierengewebe als Quelle für die Versuche zum Nachweis des UME gewählt. Nach Extraktion der Proteine aus dem Nierengewebe wurden diese mit dem MES-Protease Assay auf UME-Aktivität geprüft. Das Vorhandensein von UME im Nierengewebe des Schweins sieht man anhand der Ergebnisse der MALDI-Spektren des MES-UME-Assays in Abbildung 7. Das Signal von des-Val-Ull sieht man bereits nach einer Stunde. Nach 2½ Stunden ist das Signal sehr deutlich. Dieses deutet darauf hin, dass eine Protease, die Ull metabolisiert, vorhanden sein muss. Abbildung 41 zeigt die von UME katalysierte Reaktion.

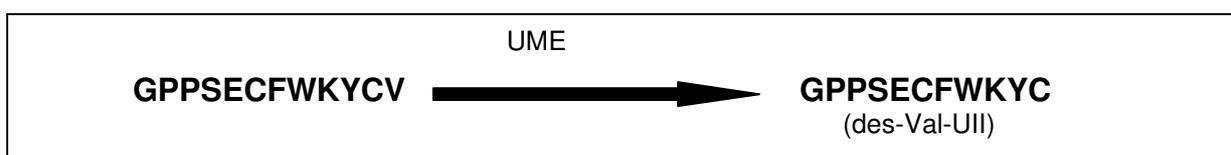


Abb. 41: Darstellung des Peptids, welches von UME aus Ull generiert wird.

Bei der Proteinreinigung ist es wichtig das Zielprotein in möglichst wenigen Schritten zu reinigen. So soll vermieden werden, dass eine große Menge des Zielproteins verloren geht, denn durch jede Chromatographie und die damit verbundenen irreversiblen Wechselwirkungen geht zwischen Zielprotein und der stationären Phase ein Teil des Zielproteins verloren. Um diesen Verlust so gering wie möglich zu halten, ist es wichtig einen Parametersatz für die Reinigung zu finden, der am besten zu den Eigenschaften des Zielproteins passt. Auf diese Weise lassen sich möglichst viele Biomoleküle aus dem gesamten Pool entfernen, ohne großen Verlust des gewünschten Zielproteins und unter Beibehaltung der Aktivität. Dafür wurde das PPS-System entwickelt [Thiemann et al. 2004]. Mit dem PPS-System können Batchchromatographien im 96-Well-Format parallel in kurzer Zeit durchgeführt werden. Auf diese Weise können schnell viele chromatographische Parameter wie pH-Wert, Chromatographiegele und Salzkonzentration auf ihre Eignung zur chromatographischen Reinigung des Zielproteins getestet werden. Die daraus ermittelten Parameter können dann für die optimale Reinigung des Zielproteins genutzt werden. PPS-Experimente wurden aus diesem Grund den Reinigungsschritt 1-3 vorgeschaltet.

Für den ersten Reinigungsschritt zum Anreichern von UME aus dem Rohextrakt des Nierengewebes mit Anionenaustauschchromatographiematerialien wurde zunächst nach geeigneten chromatographischen Parametern mit dem PPS-System gesucht. Die Proteinbindung an Chromatographiegele wird von der Matrix, den funktionellen Gruppen sowie dem pH-Wert und der Salzkonzentration bestimmt. Das Prinzip von Ionenaustauschergelen basiert auf Interaktionen zwischen Matrix und gelösten positiv oder negativ geladenen Molekülen. Da Proteine je nach pH-Wert eine unterschiedliche Zahl von Ladung zeigen, eignen sich Ionenaustauschergele sehr gut zum Reinigen von Proteinen. Aufgrund dessen wurde das Anionenaustauschergel QAE-550C in einem pH-Bereich von 5-10 und bei Salzkonzentrationen von 0-400 mM getestet. Abbildung 10 A-C zeigt die Ergebnisse der PPS-Experimente. Bei einem pH-Wert von 6 und 7,5 in Abwesenheit von NaCl sieht man in Abbildung 10 A die höchste UME-Aktivität. Die Proteinausbeute der Eluate ist in Abbildung 10 B wiedergegeben, dabei sieht man die höchste Ausbeute bei einem pH-Wert von 9 und 10 in Abwesenheit von NaCl. Abbildung 10 C zeigt bei einem pH-Wert von 6 und 7,5 in Abwesenheit von NaCl die höchste spezifische UME-Aktivität. Die hohe Proteinausbeute in Abbildung 12B bei unterschiedlichem pH-Wert lässt sich damit begründen, dass bei einem pH-Wert von 9

und 10 Begleitproteine gebunden sind. Für die Aufkonzentrierung von UME wurde daraufhin ein pH-Wert von 6 in Abwesenheit von NaCl gewählt. Dieser Parametersatz bietet eine hohe spezifische UME-Aktivität bei einer hohen Proteinausbeute.

Die Konzentrierung und Reinigung von UME wurde im ersten Reinigungsschritt mit einer Sample-Displacement-Chromatographie (SDC) [Manseth et al. 2004] durchgeführt. Der Parametersatz für die SDC wurde wie oben beschrieben aus dem PPS-Experiment bestimmt. Der Rohextrakt wurde deshalb mit dem Anionenaustauschergel QAE 550C und einem Probenauftragspuffer mit einem pH-Wert von 6 chromatographiert. Die Probe wurde entsprechend dem SDC-Prinzip auf in Reihe geschalteten Säulen im Batch-Verfahren aufgetragen (siehe 2.2.1.4). Chromatographiesäulen würden bei direktem Auftragen von Rohextrakt, welches größere Partikel enthält verstopfen. Unter Berücksichtigung dieses Aspekts wurden nicht Säulen, sondern Glasflaschen zu gleichen Volumina mit QAE 550C-Gel gefüllt und in Reihe geschaltet. Eine Anreicherung von UME war in den SDC-Fractionen 1-3 sowie SDC-Fraktion 7-9 zu sehen. Höchstwahrscheinlich handelt es sich um zwei verschiedene Enzyme mit Ull metabolisierender Aktivität. Da die höchste UME-Aktivität in der SDC 1-Fraktion zu finden war, wurden die SDC 1-3 Fraktionen zur Fraktion A vereinigt und für die weitere Reinigung genutzt (siehe hierzu Abbildung 11).

Für die weitere Chromatographie der aktiven Fraktion musste erneut nach geeigneten chromatographischen Parametern gesucht werden. Diese Suche erfolgte ebenfalls mit dem PPS-System. Es wurden ein Metall-Chelatgel (IMAC-Gel), welches mit 7 unterschiedlichen Metallionen beladen war und HAP sowie 8 verschiedene Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie-Gele getestet. Die Experimente wurden mit drei verschiedenen pH-Werten durchgeführt (siehe Abbildung 12 A). Anhand der PPS-Experimente konnte man sehen, dass UME sich am besten an Makroprep-t-Methyl bei einem pH-Wert von 4 binden ließ. Bei dem genannten Parametersatz wurde die höchste UME-Aktivität gesehen (siehe Abbildung 12 B). Die HIC wurde mit der Fraktion A aus der SDC und mit diesem Parametersatz durchgeführt. In Abbildung 13 ist das Chromatogramm der HIC zu sehen. Fraktion B wies die höchste UME-Aktivität auf, daher wurde sie für den Reinigungsschritt 3 über ein 10 kDa-Filter aufkonzentriert und weiter genutzt.

Mit verschiedenen Kationenaustauschgelten wurden erneut PPS-Experimente zur Suche nach geeigneten Parametern für die weitere Reinigung durchgeführt. Dafür wurden 5 verschiedene pH-Werte variiert. Die Ergebnismatrix in Abbildung 14 zeigt, dass die

höchste UME-Aktivität bei dem Parametersatz von Fractogel SO₃- und einem pH-Wert von 7 vorkommt. So wurde dieser Parametersatz für den Reinigungsschritt 3 verwendet. Eine hohe UME-Aktivität ist bei einem Retentionsvolumen von ca. 9 ml bis 20 ml und bei einem Retentionsvolumen von ca. 30 ml bis 50 ml auf dem Kationenaustausch-Chromatogramm (Abbildung 15) zu erkennen. Dieses spricht ebenfalls für das Vorhandensein eines weiten Enzyms mit Ull metabolisierender Aktivität. Da die höchste UME-Aktivität bei einem Retentionsvolumen von ca. 30 ml – 50 ml zu sehen ist, wurde diese vereinigt und über ein 10 kDa-Filter eingeeengt und als Fraktion C bezeichnet. Fraktion C wurde für die Charakterisierungsversuche weiter verwendet.

In der Abbildung 42 sind im Überblick die Ergebnisse der chromatographischen Reinigungsschritte dargestellt.

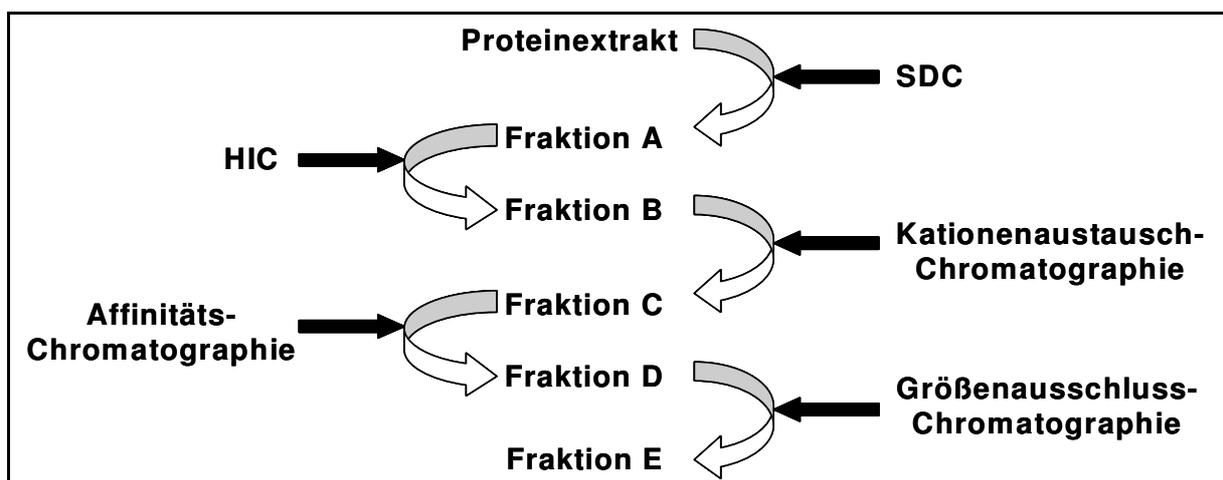


Abb. 42: Schematische Darstellung der chromatographischen Reinigung des UME.

Zur Charakterisierung von UME wurden Experimente mit Protease-Inhibitoren durchgeführt. Dazu wurden Inhibitoren für unterschiedliche Protease-Klassen genutzt. Leupeptin und Chymostatin inhibieren Serin/Cystein-Proteasen. Beide inhibierten die UME stark (siehe Abbildung 16). Eine starke UME Hemmung konnte auch durch EDTA, einem Metallo-Proteasen-Inhibitor und AEBSF, einem Serin-Proteasen-Inhibitor (mit einer hohen Spezifität), erreicht werden. Bestatin, ein Amino-Peptidase-Inhibitor und Aprotenin, ein Serin-Protease-Inhibitor, hemmen die UME-Aktivität nur gering. Da Leupeptin, Chymostatin, AEBSF und Aprotenin Serin-Proteasen inhibieren, kann man davon ausgehen, dass das UME eine Serin-Protease ist. Die starke Hemmung durch EDTA könnte auf eine Metallionen bindende Domäne hinweisen. Pepstatin A, ein

Aspartat-Proteasen-Inhibitor, dass z.B. der Renin, Cathepsin E und D hemmt, vermindert die UME-Aktivität nicht, im Gegenteil, es scheint sogar, dass die UME-Aktivität leicht zunimmt. Ursache dafür könnte sein, dass Pepstatin A des-Val-UII abbauende Proteasen inhibieren könnte.

J. Rykl et al., konnte aufgrund der Inhibition Angiotensin-II generierender Enzym Aktivität durch Chymostatin eine Affinitätschromatographie durchführen [Rykl & Thiemann, 2006]. Dabei wurde Chymostatin über einen Linker kovalent an Affinitätsgel gebunden. Die Ergebnisse der Inhibitions-Versuche zeigen, dass Chymostatin ebenfalls die UME-Aktivität hemmt, aus diesem Grund wurde entschlossen, den nächsten Reinigungsschritt mit einer Affinitätschromatographie durchzuführen. Fraktion C wurde somit über eine Chymostatin-Affinitätschromatographiesäule weiter gereinigt. Das Affinitätschromatogramm ist in Abbildung 17 zu sehen. Es ist zu erkennen, dass UME nicht an die Chymostatin-Affinitätschromatographiesäule gebunden hat. Eine Ursache könnte darin liegen, dass Chymostatin schwer zu lösen ist und daher eine unzureichende Menge an die EAH Sepharose gebunden haben könnte. Da die Probenmenge für weitere Versuche zum Auffinden einer geeigneter Affinitätschromatographie unzureichend war, wurde als letzter Reinigungsschritt eine Größenausschlusschromatographie bzw. Gelfiltration durchgeführt. Dazu wurden die Fraktionen bei einem Retentionsvolumen von ca. 0,4 ml und ca. 1 ml vereinigt, über ein 10 kDa-Filter konzentriert und als Fraktion D bezeichnet.

Das Chromatogramm der Gelfiltration mit der Fraktion D ist in Abbildung 18 dargestellt. Es konnte eine Fraktion mit hoher UME-Aktivität bei einem Retentionsvolumen von ca. 13 ml nachgewiesen werden. Diese Fraktion wurde als Fraktion E bezeichnet. Mittels der Größenausschluss-Chromatographie konnte für das UME eine Schätzung des Molekulargewichts vorgenommen werden. Das geschätzte Molekulargewicht lag zwischen 80-100 kDa. Um mit der LC-ESI-MS/MS die Identifizierung des UME vornehmen zu können, musste die Fraktion E zunächst tryptisch verdaut werden. Erst nach dem Verdau konnte die Analyse erfolgen. Mit der tryptisch verdauten Fraktion E wurde anschließend eine Chip-Reversed-Phase-Chromatographie, gekoppelt an ein ESI-MS/MS, durchgeführt. Die MS/MS-Daten der eluierten Peptide wurden während des Gradienten aufgenommen. Abbildung 20 zeigt das Chromatogramm. Die Massen der gefundenen Peptide wurden mit Hilfe des Data-Analysis Programms erstellt. Anschliessend wurde eine Mascot-Datenbankabfrage mit den MS/MS-Daten und der erstellten Massen durchgeführt. Es konnten zwei Proteasen in der aktiven Fraktion E

identifiziert werden, zum einen der Faktor IXa, auch Christmas Faktor genannt und zum anderen die Xaa-Pro Aminopeptidase 1, auch APP genannt.

Die Xaa-Pro Aminopeptidase 1 ist eine Metallopeptidase [Virginie Laurent et al. 2001] und gehört zur M24 Familie [Angela Stöckel-Maschek et al. 2005]. Diese Metallopeptidase kommt in der Lunge, Niere, Gehirn und im Plasma von Ratten und Menschen [Vanhoof et al. 1992] vor. Es ist ein Dimer, das beim Schwein ein Molekulargewicht von 218 kDa hat. Es lässt sich nach Reduktion und Denaturierung in zwei Untereinheiten von 81,5 kDa und 89 kDa spalten [Ryan et al. 1992]. Das Molekulargewicht würde der Schätzung der Größenausschlusschromatographie nahe kommen. Durch Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} und Ca^{2+} lässt es sich stark aktivieren [Ryan et al. 1992] und durch EDTA wird es gehemmt [Rusu und Yaron. 1992], dies würde ebenfalls zu den Ergebnissen der Inhibitionsversuche gut passen. Moreau et al. konnte zeigen, dass Xaa-Pro Aminopeptidase 1 eine wichtige Rolle in der Metabolisierung von Kininen im Plasma spielt. Es existiert eine zytosolische und eine membrangebundene Form. Die membrangebundene Form metabolisiert Bradykinin und die Substanz P [Lloyd et al. 1996], die zytosolische Form metabolisiert ebenfalls Bradykinin. Über diesen Weg könnte das Ull im Hämostasesystem wirken. Bradykinin begünstigt die körpereigene Fibrinolyse, indem es die Bildung von t-PA fördert [Smith et al. 1985]. Bradykinin wirkt am Nierentubulus natriuretisch und steigert so die Wasserausscheidung. Die Konzentrationserhöhung von Ull bei Niereninsuffizienz könnte damit im Zusammenhang stehen. Bradykinin hat vaskuläre und antiproliferative Wirkung [Sharma et al. 2002]. Die Wahrscheinlichkeit, daß die Xaa-Pro Aminopeptidase 1 neben ihrer bekannten Funktion auch noch eine Carboxypeptidase-Aktivität besitzt ist jedoch klein, weshalb diese Möglichkeit in dieser Arbeit nicht weiter experimentell verfolgt wurde.

Die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen von Faktor IXa in der Fraktion mit UME-Aktivität ist sehr viel höher. Dieses Protein wurde mit einem Score von 429 und einer Sequenzabdeckung von 27 % vorgeschlagen. Dem Faktor IXa konnten 10 Peptide zugeordnet werden.

Der Faktor IX ist ein Blutgerinnungsfaktor der, Vitamin K abhängig, in der Leber synthetisiert wird [Wirnt, 1990]. Es ist ein Glykoprotein aus 415 Aminosäuren, dessen Molekulargewicht zwischen 54 kDa und 65 kDa beim Menschen [Belgacem et al. 2002]

und 45,51 kDa beim Schwein [Expasy Molecular Biology Server] liegt. Intramolekular sind 11 Disulfidbrücken vorhanden. Es ist eine Serin-Protease mit einer S1-Domäne sowie einer Ca^{2+} bindenden Gla-Domäne und zwei Wachstumsfaktor ähnlichen EGF-Domänen (Abb. 43) [Bajaj et al. 2001]. Das Ergebnis der Datenbankabfrage, wird durch die Inhibition mittels EDTA (einem Metallionenchelator) bekräftigt, da der Faktor IX in einer biologisch inaktiven Form im Blut zirkuliert und zur Aktivierung Ca^{2+} Ionen benötigt. Auf der Abbildung 43 ist die Ca^{2+} Bindungsdomäne zu sehen. Durch die Aktivierung der Blutgerinnungskaskade wird der Faktor XIa (eine Protease) gebildet, der in einer Ca^{2+} abhängigen Reaktion [Osterud et al. 1978, Roth 2004] den Faktor IX zwischen $\text{Arg}^{145}\text{-Ala}^{146}$ und $\text{Arg}^{180}\text{-Val}^{181}$ spaltet. Die Freisetzung des zwischenliegenden Peptids aus 35 Aminosäuren bewirkt eine Aktivierung des Faktor IX zu Faktor IXa. Alternativ zu Faktor XIa kann ein Komplex aus Faktor VIIa und Gewebsthromboplastin (ebenfalls Ca^{2+} abhängig) den Faktor IX zu Faktor IXa aktivieren [Schmidt et al. 2005]. Faktor IXa spaltet dann in einem Komplex aus Ca^{2+} , PF3 (platelet factor) und dem katalytisch wirkenden Faktor VIIIa den Faktor X zwischen Arg/Ile zu Faktor Xa [Hiller et al., 1998]. Faktor Xa bildet zusammen mit Faktor Va, Plättchenfaktor 3, Ca^{2+} -Ionen und Phospholipiden den Prothrombinaktivator Komplex. Dieser Komplex wandelt Prothrombin in Thrombin um, der letztendlich in einer Ca^{2+} -Ionen abhängigen Reaktion Fibrin aus Fibrinogen bildet.

Der Faktor IXa besteht im Gegensatz zu Faktor IX aus zwei Ketten, aus einer leichten Kette mit einem Molekulargewicht von 17 kDa und einer schweren Kette mit einem Molekulargewicht von 27 kDa [Osterud et al. 1978]. Zwischen Cys^{132} und Cys^{289} befindet sich eine Disulfidbrücke, die die beiden Ketten miteinander verbindet. Abbildung 43 zeigt die Struktur des Faktor IX bzw. der aktivierten Form IXa [Roth 2004].

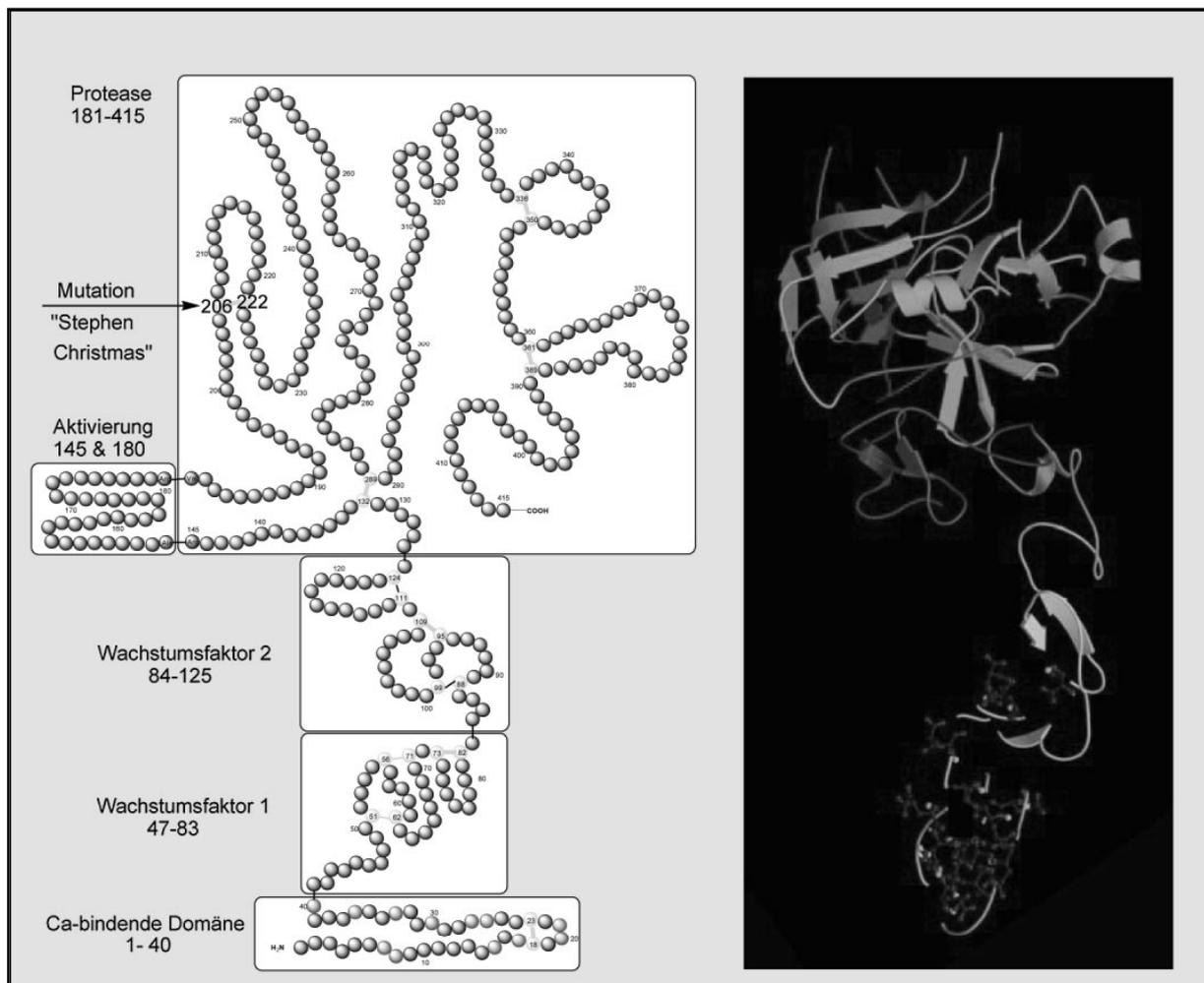


Abb. 43: Struktur des Faktor IX bzw. der aktivierten Form IXa [Roth 2004].

Es ist zu erkennen, dass es sich um ein tulpenartiges Protein mit länglicher Struktur handelt [Roth 2004]. Diese längliche Struktur könnte der Grund einer frühen Elution (bei einem Retentionsvolumen von ca. 13 ml) in der Größenausschluss-Chromatographie (Abbildung 18), trotz des geringen Molekulargewichts sein. Die Bestimmung des Molekulargewichts anhand der Größenausschluss-Chromatographie ist von vielen Faktoren abhängig wie zum Beispiel der Beschaffenheit des Gels und der Struktur des zu messenden Enzyms, sie ist ein grober Schätzwert.

Zur Verifizierung einer UME-Aktivität des Faktor IX wurde mit einer kommerziell erworbenen Faktor IXa-Präparation und Ca^{2+} als Co-Faktor Ull inkubiert und eine LC-ESI-IT-MS Messung der Reaktionsprodukte nach verschiedenen definierten Inkubationszeiten durchgeführt. Im Spektrum einer Fullscan-ESI-IT-MS-Analyse einer 10^{-5} M Lösung von humanem des-Val-Ull zeigte das zweifach positiv geladene Ion die höchste Signalintensität (Abbildung 36). Anschließend wurde von dem zweifach positiv

geladenen Ion ein Fragmentspektrum gemessen. Abbildung 37 zeigt ein Peptid mit höchster Signalintensität bei einer Masse pro Ladung von 530,73. Zur spezifischen Detektion des des-Val-Ull wurde dieses Fragment in der Chromatographie genutzt. Für des-Val-Ull lag die Nachweisgrenze in der LC-ESI-IT-MS-Methode bei 10^{-6} M. Zur Etablierung des Nachweisverfahrens für des-Val-Ull mit der LC-ESI-ITMS wurde ebenfalls eine 10^{-5} M Lösung genutzt. Zum Nachweis von Ull und des-Val-Ull wurde ein Probengemisch über eine Säulenchromatographie zuvor voneinander getrennt und konnten dann zeitlich versetzt im MS detektiert werden. Aus den Inkubationsproben wurden jeweils 5 μ l für die relative Quantifizierung der Peptide verwendet. Diese Detektionsmethode wurde zum Nachweis einer Ull Metabolisierung zu des-Val-Ull durch Faktor IXa angewandt. Abbildung 39 zeigt die des-Val-Ull Signalintensitäten der Chromatogramme im zeitlichen Verlauf. Es zeigte sich nach sechs Stunden eine des-Val-Ull-generierende Aktivität, die mit zunehmender Inkubationszeit zunimmt. Dass der Faktor IXa an der Metabolisierung des Ull beteiligt sein könnte, kann ein Hinweis auf das Mitwirken von Ull in Hämostaseprozessen sein. Störungen im Hämostaseseystem spielen bei vielen Erkrankungen eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden, dass eine D-Dimer Erhöhung mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergeht [Smith et al. 1997; Folsom et al. 2001] und eine verstärkte Fibrinbildung wird durch eine hohe D-Dimer Konzentration angezeigt [Korte et al. 2004]. Dies könnte eine Ursache der unterschiedlichen Ull Plasmakonzentrationen bei ischämischen Herzerkrankungen sein. Es konnte wie bereits in der Einleitung erwähnt bei Ratten nach einem Herzinfarkt eine erhöhte Ull und UTR Expression gezeigt werden [Tzanidis et al., 2003], dies könnte ebenfalls mit einer Störung des Hämostasegleichgewichts zusammenhängen. Ull aktiviert die Nikotinamidadenosindinukleotidphosphat-Synthase (NADPHS) über die Reaktiven-Oxygenen-Spezies (ROS) und im weiteren Verlauf die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) und Proteinkinase B (Akt), diese aktivieren dann den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) [Djordjevic et al. 2005]. Die Aktivierung des PAI-1 könnte zu einer Schlüsselfunktion des Ull gehören. PAI-1 ist ein Glykoprotein, welches zu der Familie der Serinprotease Inhibitoren gehört. Neben der Inhibition der Plasminogen Aktivatoren wie t-PA und u-PA, spielt es unter anderem eine wichtige Rolle in der Regulierung der Zellmigration, Tumormetastasierung und Angiogenese [Kohler et Grant, 2000].

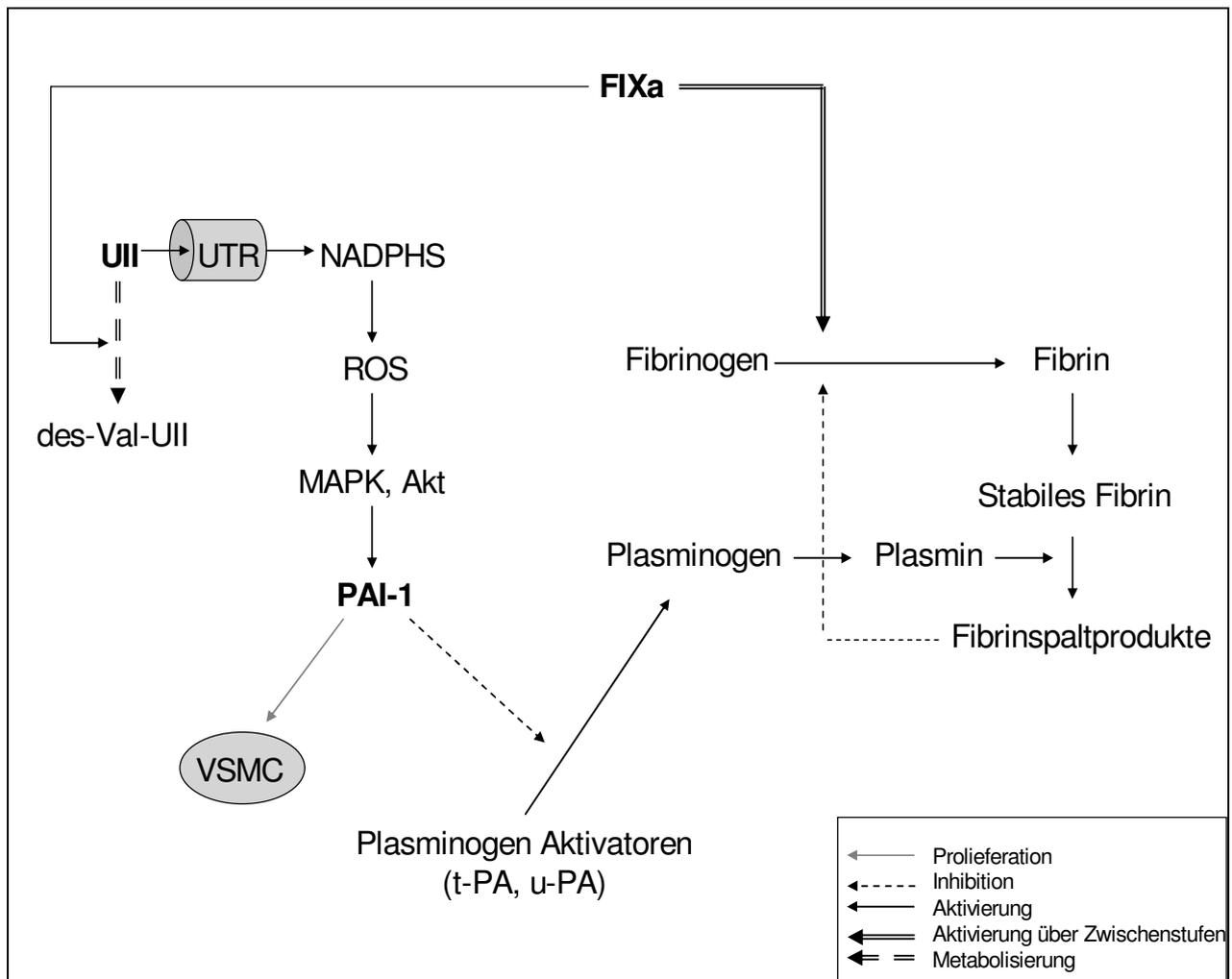


Abb. 44 Schematische Darstellung eines möglichen Zusammenhangs zwischen UII und dem Hämostasesystem.

Die Metabolisierung des UII durch Faktor IXa könnte ein Regulationsmechanismus des Hämostasesystems sein. Der Abbau zu des-Val-UII könnte ein Gegenmechanismus zur Fibrinolyse darstellen. Vermutlich wäre dann die hohe UII Expression beim Herzinfarkt eine Regulation zur Protektion. Mit kardiovaskulären Risikofaktoren geht auch das metabolische Syndrom einher. UII scheint auch hierbei (wie in der Einleitung erwähnt) eine Rolle zu spielen. Die PAI-1 und Fibrinogenerhöhung beim metabolische Syndrom [Koenig und Marx, 2004], könnten ein Hinweis auf eine Störung im Hämostasesystem sein. Ob nun eine Störung im Hämostasesystem zu UII Konzentrationsveränderungen bei gewissen kardiovaskulären Erkrankungen oder eine Konzentrationsveränderung von UII zu Störungen im Hämostasesystem führt, ist noch zu klären. Brown et al. konnte PAI-1 Konzentrationserhöhungen bei Diabetes, Hypertonie, Hyperlipidämie und bei atherosklerotischen Läsionen feststellen. Ebenso konnte von ihr festgestellt werden,

dass eine PAI-1 Konzentrationserhöhung mit einer starken Erhöhung eines Myokardinfarkts einhergeht. In ihren Forschungen konnte sie zeigen, dass das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) zu einem Anstieg des PAI-1 führt [Brown et al. 1999], dies könnte ein Hinweis auf einen Zusammenhang von UII auf das RAAS und umgekehrt sein.

Valin spielt eine wichtige Rolle in der Aktivität und Affinität des hUII [Brkovic et al.2003]. So ist noch zu klären ob des-Val-UII eine Wechselwirkung zum UTR in Form einer Inhibierung oder einer abgeschwächten Aktivierung aufzeigt oder sogar nicht an das UTR adaptieren kann. In zukünftigen Experimenten sollte die Wirkung von des-Val-UII auf den UTR (z.B. an perfundierten Organen) herausgefunden werden. Es wäre ebenfalls sinnvoll in weiteren Forschungsarbeiten klinische Studien zu etablieren. So könnten z.B. UII und des-Val-UII Plasmakonzentrationen bei Patienten mit einer Thrombophilie oder Hämophilie bestimmt werden, um nähere Korrelationen zwischen UII und Hämostasesystem herauszufinden. Im Rahmen zukünftiger Forschungsarbeiten sollte ebenfalls geklärt werden, ob es sich bei der Xaa-Pro Aminopeptidase 1 um ein weiteres UME handelt.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war, ein Urotensin II (Ull) metabolisierendes Enzym (UME) aus dem Gewebe von Schweinenieren aufzuspüren, zu reinigen und zu identifizieren. Das Massenspektrometrie-basierte Enzym Screening System (MES-System) wurde zum Nachweis der UME-Aktivität genutzt. Die optimalen chromatographischen Parameter zur Reinigung des UME wurden mittels PPS-Systems bestimmt. Unter Anwendung der beiden Systeme MES und PPS wurde nach vier chromatographischen Reinigungsschritten eine nahezu homogene Fraktion mit UME-Aktivität aus Nierengewebe gewonnen. In dieser Fraktion konnten mittels LC-ESI MS/MS Analyse die Proteasen Faktor IXa und Xaa-Pro Aminopeptidase 1 identifiziert werden. Zur Validierung dieses Ergebnisses und zur Beantwortung der Frage, ob der F IXa auch im Menschen eine Ull-metabolisierende Funktion hat, wurde humaner Faktor IXa kommerziell erworben und mit positivem Ergebnis auf Ull metabolisierende Aktivität überprüft. Damit ist es gelungen erste Hinweise zu sammeln, dass der Faktor IXa im menschlichen Organismus an der Inaktivität des Ull beteiligt ist. Dieser Zusammenhang könnte auch auf eine Rolle des Ull im Hämostasesystem deuten.

6 Summary

The objective of this work was to detect, purify and identify an Ull metabolizing enzyme (UME) in the porcine renal tissue extract. For detecting the UME activity a mass spectrometry-based screening enzyme system (MES-system) was developed. The optimum chromatographic parameters to purify the UME were determined with the PPS system. After four chromatographic purification steps a nearly homogenous fraction with UME activity was purified from renal tissue. In this fraction the proteases factor IXa and Xaa-Pro 1 aminopeptidase were identified by LC-ESI MS / MS analysis. For validating these findings and answering the question, if factor IXa metabolizes Ull in humans also, human factor IXa was purchased and tested for its UME activity with a positive result. Therefore in this study first data were collected showing that factor IXa is involved in the inactivation of Ull pointing to a potential role of Ull in the haemostatic system.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Loudon CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Ohlstein EH, Bergsma DJ, Douglas SA (1999). "Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14." *Nature* 401: 282-6.
- 2 Ashton N (2006). "Renal and vascular actions of urotensin II." *Kidney International* 70: 624–9.
- 3 Balment RJ, Song W, Ashton N (2005). "Urotensin II: ancient hormone with new functions in vertebrate body fluid regulation." *Ann NY Acad Sci* 1040: 66–73.
- 4 Behm DJ, Doe CPA, Johns DG, Maniscalco K, Stankus GP, Wibberley A, et al. (2004). "Urotensin II: a novel systemic hypertensive factor in the cat." *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369: 274–280.
- 5 Bajaj SP, Schmidt AE, Mathur A, Padmanabhan K, Zhong D, Mastri M, Fay PJ (2001). "Factor IXa:factor VIIIa interaction. helix 330-338 of factor IXa interacts with residues 558-565 and spatially adjacent regions of the α_2 subunit of factor VIIIa." *J Biol Chem.* 276(19): 16302-9.
- 6 Barthels M, von Depka M (2003). „Das Gerinnungskompndium.“ Georg Thieme Verlag KG Stuttgart: 428.
- 7 Belgacem O, Buchacher A, Pock K, Josic D, Sutton C, Rizzi A, et al. (2002). "Molecular mass determination of plasma-derived glycoproteins by ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry with internal calibration." *J Mass Spectrom* 37: 1118–1830.

- 8 Bern HA and Lederis K (1969). "A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts." *J.Endocrinol.* 45(1): (Suppl.): xi-xii.
- 9 Bern HA, Pearson D, Larson BA, Nishioka RS (1985). "Neurohormones from fish tails: the caudal neurosecretory system. I. "Urophysiology" and the caudal neurosecretory system of fishes." *Recent Prog Horm Res* 41: 533-552.
- 10 Birker-Robaczewska M, Boukhadra C, Studer R, Mueller C, Binkert C, Nayler O (2003) "The expression of urotensin II receptor (U2R) is up-regulated by interferon-gamma." *J Recept Signal Transduct Res.* 23(4): 289-305.
- 11 Bond H, Winter MJ, Warne JM et al. (2002). "Plasma concentrations of arginine vasotocin and urotensin II are reduced following transfer of the euryhaline flounder (*Platichthys flesus*) from seawater to fresh water." *Gen Comp Endocrinol* 125: 113–120.
- 12 Bohm F. and Pernow J. (2002). "Urotensin II evokes potent vasoconstriction in humans in vivo." *Br. J. Pharmacol* 135: 25–7.
- 13 Bottrill FE, Douglas SA, Hiley CR, White R (2000). "Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries." *Br J Pharmacol* 130(8): 1865-70.
- 14 Bousette NL, Patel L, Douglas SA, Ohlstein EH, Giaid A (2004). "Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GRP14 in atherosclerotic lesions of the human aorta." *Atherosclerosis* 176: 117-123.
- 15 Brown NJ, Agirbasli M, Vaughan DE (1999). "Comparative effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type I receptor antagonism on plasma fibrinolytic balance in humans." *Hypertension* 34: 285–90.

-
- 16 Brkovic A, Hattenberger A, Kostenis E, Klabunde T, Flohr S, Kurz M, Bourgault S, Fournier A (2003). "Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay." *J Pharmacol Exp Ther* 306(3): 1200-9.
- 17 Camarda V, Rizzi A, Calo G, Gendron G, Perron SI, Kostenis E, Zamboni P, Mascoli F, Regoli D (2002). "Effects of human urotensin II in isolated vessels of various species; comparison with other vasoactive agents." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365(2): 141-9.
- 18 Camarda V, Song W, Marzola E et al. (2004). "Urantide mimics urotensin-II induced calcium release in cells expressing recombinant UT receptors." *Eur J Pharmacol* 498: 83–6.
- 19 Castel H, Diallo M, Chatenet D, Leprince J, Desrues L, Schouft M, Fontaine M, Dubessy C, Lihrmann I, Scalbert E, Malagon M, Vaudry H, Tonon M and Gandolfo P (2006). "Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes." *Journal of Neurochemistry* 99: 582–95.
- 20 Chatenet D, Dubessy C, Leprince J, Boularan C, Carlier L, Segalas-Milazzo I, Guilhaudis L, Oulyadi H, Davoust D, Scalbert E et al (2004). "Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide." *Peptides* 25: 1819–30.
- 21 Chartrel N., Leprince J., Dujardin C., Chatenet D., Tollemer H., Baroncini M., Balment R. J., Beauvillain J. C. and Vaudry H. (2004). "Biochemical characterization and immunohistochemical localization of urotensin II in the human brainstem and spinal cord." *J. Neurochem.* 91: 110–18.
- 22 Chen Y, Zhao M, Liu X, Yao W, Yang J, Zhang Z, Tang C (2001). "Urotensin II receptor in the rat airway smooth muscle and its effect on the rat airway smooth muscle cells proliferation." *Chin Med Sci J* 16(4): 231-5.

-
- 23 Cheung BM, Leung R, Man YB, Wong LY (2004). "Plasma concentration of urotensin II is raised in hypertension." *J Hypertens.* 22: 1341–4.
- 24 Clark SD, Nothacker HP, Wang Z, Saito Y, Leslie FM & Civelli O (2001). "The urotensin II receptor is expressed in the cholinergic mesopontine tegmentum of the rat." *Brain Res* 923: 120–7.
- 25 Conlon JM., O'Harte F., Smith D. D., Balment R. J. and Hazon N. (1992a). "Purification and characterization of urotensin II and parvalbumin from an elasmobranch fish, *Scyliorhinus canicula* (common dogfish)." *Neuroendocrinology* 55: 230–5.
- 25 Conlon JM, O'Harte F, Smith DD, Tonon MC and Vaudry H (1992b) "Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188: 578–83.
- 27 Conlon JM (2000) "Singular contributions of fish neuroendocrinology to mammalian regulatory peptide research." *Regul Pept* 93: 3–12.
- 28 Coulouarn Y, Lihmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conlon JM, Bern HA, Vaudry H (1998). "Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15803-8.
- 29 Coulouarn Y, Je'gou S, Tostivint H, Vaudry H and Lihmann I (1999). "Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors." *FEBS Lett.* 457: 28–32.
- 30 Do-Re'go JC, Chatenet D, Orta MH, Naudin B, Le Cudennec C, Leprince J, Scalbert E, Vaudry H and Costentin J (2005). "Behavioral effects of urotensin-II centrally administered in mice." *Psychopharmacology* 183: 103–17.

-
- 31 Douglas SA, Ashton DJ, Sauermelch CF, et al. (2000a). "Human urotensin-II is a potent vasoactive peptide: pharmacological characterization in the rat, mouse, dog and primate." *J Cardiovasc Pharmacol* 36: 163–6.
- 32 Douglas SA and Ohlstein EH (2000b). "Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease." *Trends Cardiovasc Med* 10(6): 229-37.
- 33 Douglas SA, Sulpizio AC, Piercy V, Sarau HM, Ames RS, Aiyar NV, Ohlstein EH, Willette RN (2000c). "Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey." *Br J Pharmacol* 131(7): 1262-74.
- 34 Douglas SA and Ohlstein EH (2001). "Urotensin Receptors in the IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification." ed. Girdlestone, D. pp. 365 ± 72. London: IUPHAR Media.
- 35 Douglas SA, Tayara L, Ohlstein EH, Halawa N, Giaid A (2002). "Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II." *Lancet* 359(9322): 1990-7.
- 36 Elshourbagy NA, Douglas SA, Shabon U et al. (2002). "Molecular and pharmacological characterization of genes encoding urotensin- II peptides and their cognate G-protein-coupled receptors from the mouse and monkey." *Br. J. Pharmacol.* 136: 9–22.
- 37 Expasy Molecular Biology Server. www.expasy.org/uniprot/p16293 .
- 38 Flohr S, Kurz M, Kostenis E, Brkovich A, Fournier A, Klabunde T (2002). "Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II." *J Med Chem* 45(9): 1799-1805.

-
- 39 Folsom AR, Aleksic N, Park E, Salomaa V, Juneja H, Wu KK (2001). "Prospective study of fibrinolytic factors and incident coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(4): 611-7.
- 40 Gardiner SM et al. (2001). "Depressor and regionally-selective vasodilator effects of human and rat urotensin II in conscious rats." *Br. J. Pharmacol.* 132: 1625–9.
Gartlon J, Parker F, Harrison DC et al. (2001). "Central effects of urotensin-II following ICV administration in rats." *Psychopharmacology* 155: 426–33.
- 41 Gendron G, Gobeil F Jr, Belanger S et al.(2005). "Urotensin II-induced hypotensive responses in Wistar–Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats." *Peptides* 26: 1468–74.
- 42 Giebing G, Tölle M, Jürgensen J, Eichhorst J, Furkert J, Beyermann M, Neuschäfer-Rube F, Rosenthal W, Zidek W, van der Giet M, Oksche A (2005). "Arrestin Independent Internalization and Recycling of the Urotensin Receptor Contribute to Long-Lasting Urotensin II–Mediated Vasoconstriction". *Circ. Res:* 97: 707-15.
- 43 Gray GA, Jones MR, Sharif I (2001). "Human urotensin II increases coronary perfusion pressure in the isolated rat heart: potentiation by nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibition." *Life Sci* 69(2): 175-80.
- 44 Grieco P, Carotenuto A et al (2002). "Design, synthesis, conformational analysis, and biological studies of urotensin-II lactam analogues." *Bioorg Med Chem* 10(12): 3731-9.
- 45 Gruson D, Rousseau MF, Ahn SA et al. (2005). "Circulating urotensin II levels in moderate to severe congestive heart failure: its relations with myocardial function and well established neurohormonal markers." *Peptides* 27(6): 1527-31.

-
- 46 Hassan GS, Douglas SA, Ohlstein EH, Giaid A (2005). "Expression of urotensin-II in human coronary atherosclerosis." *Peptides* (26): 2464–72.
- 47 Heringlake M, Kox T, Uzun O, Will B, Bahlmann L, Klaus S, Eleftheriadis S, Armbruster FP, Franz N, Kraatz E (2004). "The relationship between urotensin II plasma immunoreactivity and left ventricular filling pressures in coronary artery disease." *Regul Pept* 121: 129-36.
- 48 Hiller E, Riess H. (1998). „Hämorrhagische Diathese und Thrombose.“ 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- 49 Huitron-Resendiz S, Kristensen MP, Sanchez-Alavez M, Clark SD, Grupke SL, Tyler C, Suzuki C, Nothacker HP, Civelli O et al (2005). "Urotensin II modulates rapid eye movement sleep through activation of brainstem cholinergic neurons." *J Neuroscience* 25: 5465–74.
- 50 Huynh T, Joyal D, Douglas S & Giaid A. (2003). "Urotensin-II in patients with coronary artery disease." *Can J Cardiol* 19 (Suppl. A): 408.
- 51 Johns DG, Ao Z, Naselsky D, Herold CL, Maniscalco K, Sarov-Blat L, Steplewski K, Aiyar N, Douglas SA (2004). "Urotensin-II-mediated cardiomyocyte hypertrophy: effect of receptor antagonism and role of inflammatory mediators." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370(4): 238-50.
- 52 Je´gou S, Cartier D, Dubessy C, Gonzalez B, Chatenet D, Tostivint H, Scalbert E, Leprince J, Vaudry H and Lihrmann I (2006). "Localization of the urotensin-II receptor in the rat central nervous system." *J. Comp. Neurol.* 495: 21–36.
- 53 Kinney WA, Almond Jr HR, Qi J, Smith CE, Santulli RJ, de Garavilla L, Andrade-Gordon P, Cho DS, Everson AM, Feinstein MA, Leung PA, Maryanoff BE (2002). "Structure-function analysis of urotensin II and its use in the construction of a ligand-receptor working model." *Angew Chem Int Ed Engl* 41: 2940-4.

-
- 54 Kitazawa T, Eto M, Woodsome TP & Brautigan DL (2000). "Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility." *J Biol Chem* 275: 9897–9900.
- 55 Koenig W, Marx N (2001). „Atherothromotische Komplikationen, Warum Diabetiker besonders stark gefährdet sind.“ *CARDIOVASC* 1(4): 34.
- 56 Korte W, Walter F, Riesen W, Battegay E, Darioli R, Graf C, Miserez A, Saner B, Schulthess G (2004). „Hämostatische Risikofaktoren für kardiovaskuläre Krankheiten: D-Dimer.“ *Kardiovaskuläre Medizin* 7: 78-80
- 57 Labarre`re P, Chatenet D, Leprince J et al. (2003). "Structure–activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction." *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 18: 77–88.
- 58 Langham RG, Kelly DJ, Gow RM, Zhang Y, Dowling JK, Thomson NM, Gilbert RE (2004). "Increased expression of urotensin II and urotensin II receptor in human diabetic nephropathy." *Am J Kidney Dis* 44(5): 826-31.
- 59 Lapp H, (2004). „Biochemische Charakterisierung von Herzinsuffizienz und myokardialem Remodeling - Eine Untersuchung serologischer Surrogatparameter und ihre Beziehung zu klinischen Befunden.“ Dissertationen und Habilitationen. Universität Witten/Herdecke
- 60 Leifeld L, Clemens C, Heller J, Sauerbruch T, Spengler U (2005). „Verminderte intrahepatische Urotensinexpression bei Leberzirrhose.“ *Z Gastroenterol* -thieme-connect.com.
- 61 Le Mé´vel JC, Olson KR, Conklin D, Waugh D, Smith DD, Vaudry H and Conlon JM (1996). "Cardiovascular actions of trout urotensin II in the conscious trout, *Oncorhynchus mykiss*." *J. Physiol.* 271: 1335–43.

-
- 62 Li L, Eto M, Lee MR, Morita F, Yazawa M & Kitazawa T (1998). "Possible involvement of the novel CPI-17 protein in protein kinase C signal transduction of rabbit arterial smooth muscle." *J Physiol* 508: 871–81.
- 63 Lim M, Honisett S, Sparkes CD, Komesaroff P, Kompa A & Krum H (2004). „Differential effect of urotensin II on vascular tone in normal subjects and patients with chronic heart failure." *Circulation* 109: 1212–4.
- 64 Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Abe I, Iida M (2003). "Central cardiovascular action of urotensin II in conscious rats." *J Hypertens* 21:159-165.
- 65 Lin Y, Matsumura K, Tsuchihashi T, Fukuhara M, Fujii K & Iida M (2004). "Role of ERK and Rho kinase pathways in central pressor action of urotensin II." *J Hypertens* 22: 983–8.
- 66 Liu Q, Pong SS, Zeng Z, Zhang Q, Howard AD, Williams DL Jr, Davidoff M, Wang R, Austin CP, McDonald TP, Bai C, George SR, Evans JF, Caskey CT (1999). "Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14." *Biochem Biophys Res Commun* 266: 174-78.
- 67 Lyon GS, Hryszko J, Hooper NM and Turner AJ (1996). "Inhibition and Metal Ion Activation of Pig Kidney Aminopeptidase P: Dependence on Nature of Substrate." *Biochem. Pharmacol.* 52: 229-36.
- 68 Loretz CA (1985). Species specificity and cellular mechanism of action of urotensin II in osmoregulation. In *Neurosecretion and the Biology of Neuropeptides* (Eds: Kobayashi H, Bern HA, Urano A). Springer-Verlag: Berlin: 479–85.
- 69 Lottspeich F und Zorbas H (2006). *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag 2. Auflage: 324-34.
- 70 Lu Y, Zou CJ, Huang DW, Tang CS (2002). "Cardiovascular effects of urotensin II in different brain areas." *Peptides* 23: 1631-5.

-
- 71 MacLean MR, Alexander D, Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Morecroft I, Polland K (2000). "Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat." *Br J Pharmacol* 130(2): 201-4.
- 72 Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP (2000). "Orphan-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1." *Br J Pharmacol* 131(3): 441-6.
- 73 MAGUIRE JJ, KUC RE, WILEY KE, KLEINZ MJ & DAVENPORT AP (2004). "Cellular distribution of immunoreactive urotensin-II in human tissues with evidence of increased expression in atherosclerosis and a greater constrictor response of small compared to large coronary arteries." *Peptides* 25: 1767-74.
- 74 Mallamaci F, Cutrupi S, Pizzini P et al. (2005). "Urotensin II in end-stage renal disease: an inverse correlate of sympathetic function and cardiac natriuretic peptides." *J Nephrol* 18: 727-32.
- 75 Manseth E, Skjervold PO et al. (2004). "Sample displacement chromatography of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) thrombin." *J Biochem Biophys Methods* 60(1): 39-47.
- 76 Mansur HS, Orefice RL et al. (2005). "Biomaterial with chemically engineered surface for protein immobilization." *J Mater Sci Mater Med* 16(4): 333-40.
- 77 Marchese A, Heiber M, Nguyen T, Heng HH, Saldivia VR, Cheng R, Murphy PM, Tsui LC, Shi X, Gregor P (1995). "Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors." *Genomics* 29(2): 335-44.
- 78 Matsushita M, Shichiri M, Imai T, Iwashina M, Tanaka H, Takasu N, Hirata Y (2001a). "Co-expression of urotensin II and its receptor (GPR14) in human cardiovascular and renal tissues." *J Hypertens* 19(12): 2185-90.

-
- 79 Matsushita M, Shichiri M, Fukai N, Ozawa N, Yoshimoto T, Takasu N et al. (2003). "Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for the porcine renal epithelial cell line, LLCPK1." *Endocrinology* 144: 1825–31.
- 80 Matsumoto Y, Abe M, Watanabe T et al. (2004). "Intracerebroventricular administration of urotensin II promotes anxiogenic-like behaviors in rodents." *Neurosci. Lett.* 358: 99–102.
- 81 McMaster D, Kobayashi Y, Rivier J, Lederis K (1986). "Characterization of the biologically and antigenically important regions of urotensin II." *Proc West Pharmacol Soc* 29: 205-8.
- 82 Morano I (2003). "Tuning smooth muscle contraction by molecular motors." *J Mol Med* 81: 481–7.
- 83 Mori M, Sugo T, Abe M et al. (1999). "Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14)." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265: 123–9.
- 84 Moriwaki H, Kume N, Sawamura T, Aoyama T, Hoshikawa H, Ochi H et al. (1998). "Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1541–47.
- 85 Nothacker HP, Wang Z, McNeill AM, Saito Y, Merten S, O'Dowd B, Duckles SP and Civelli O (1999). "Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction." *Nat. Cell Biol.* 1: 383–5.
- 86 Nothacker HP, Clark S (2005). "From heart to mind: The urotensin II system and its evolving neurophysiological role." *FEBS J.* 272(22): 5694-5702.
- 87 Okamura T, Okunishi H, Ayajiki K, Toda N (1990). "Conversion of angiotensin I to angiotensin II in dog isolated renal artery: role of two different angiotensin II-generating enzymes." *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15: 353-9.

-
- 88 Okunishi H, Oka Y, Shiota N, Kawamoto T, Song K, Miyazaki M (1993). "Marked species-difference in the vascular angiotensin II-forming pathways: humans versus rodents." *Jpn J Pharmacol* 62(2): 207-10.
- 89 Onan D & Thomas WG (2003). "Atypical regulation of the urotensin-II receptor." *European Journal of Biochemistry* 270(1): 48
- 90 Onan D, Pipolo L, Yang E, Hannan RD & Thomas WG (2004). "Urotensin-II promotes hypertrophy of cardiac myocytes via mitogenactivated protein kinases." *Mol Endocrinol* 18: 2344–54.
- 91 Opgaard O, Nothacker H, Ehlert FJ, Krause DN (2000). Human urotensinII mediates vasoconstriction via an increase in inositol phosphates. *Eur J Pharmacol.* 406:265–271.
- 92 Osterud B, Bouma BN, Griffin JH (1978). "Human blood coagulation factor IX. Purification, properties, and mechanism of activation by activated factor XI." *J Biol Chem.* Sep 10; 253(17): 5946-51.
- 93 Paysant J, Rupin A, Simonet S, Fabiani JN & Verbeuren TJ (2001). "Comparison of the contractile responses of human coronary bypass grafts and monkey arteries to human urotensin-II." *Fundam Clin Pharmacol* 15: 227–31.
- 94 Patacchini R, Santicoli P, Giuliani S, Grieco P, Novellino E, Rovero P, Maggi CA (2003). "Urantide: an ultrapotent urotensin II antagonist peptide in the rat aorta." *Br J Pharmacol* 140(7): 1155-8.
- 95 Pearson D, Shively JE, Clark BR, Geschwind II, Barkley M, Nishioka RS, Bern HA (1980). "Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(8): 5021-4.

-
- 96 Pelletier G, Lihmann I, Dubessy C, Luu-The V, Vaudry H & Labrie F (2005). "Androgenic down-regulation of urotensin II precursor, urotensin II-related peptide precursor and androgen receptor mRNA in the mouse spinal cord." *Neuroscience* 132: 689–96.
- 97 Rakowski E, Ghada S Hassan, Dashyant Dhanak, Eliot H Ohlstein, Stephen A Douglas, Adel Giaid (2005). "A role for urotensin II in restenosis following balloon angioplasty: use of a selective UT receptor blocker." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 39: 785–91.
- 98 Richards AM and Charles C (2004). "Urotensin II in the cardiovascular system." *Peptides* 25(10): 1795-802.
- 99 Ritter O, Hack S, Schuh K, Rfthlein N, Perrot A, Osterziel KJ et al. (2002). "Calcineurin in human heart hypertrophy." *Circulation* 105: 2265–69.
- 100 Rohlena J, Kolkman JA, Boertjes RC, Mertens K, Lenting PJ (2003). "Residues Phe342-Asn346 of activated coagulation factor IX contribute to the interaction with low density lipoprotein receptor-related protein." *J Biol Chem.* 278(11): 9394-9401.
- 101 Rossowski WJ, Cheng BL et al. (2002). "Human urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists." *Eur J Pharmacol* 438(3): 159-70.
- 102 Roth Klaus (2004). „Der Christmas-Faktor.“ *Chem. Unserer Zeit* 38: 426-33.
- 103 Russell FD, Molenaar P, O'Brien DM (2001). "Cardiostimulant effects of urotensin-II in human heart in vitro." *Br J Pharmacol* 132(1): 5–9.
- 104 Russell FD, Kearns P, Toth I, Molenaar P (2004). "Urotensin-II-converting enzyme activity of furin and trypsin in human cells in vitro." *J Pharmacol Exp Ther* 310: 209–14.

-
- 105 Russell FD & Molenaar P (2004). "Cardiovascular actions of human urotensin II—considerations for hypertension." *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369: 271–3.
- 106 Russell FD (2004). "Emerging roles of urotensin-II in cardiovascular disease." *Pharmacol. Ther.* 103: 223–43.
- 107 Rykl J, Thiemann J, Kurzawski S, Pohl T, Gobom J, Zidek W, Schlüter H (2006). "Renal cathepsin G and angiotensin II generation." *J Hypertens* 24(9): 1797-1807.
- 108 Sauzeau V, Le Mellionec E, Bertoglio J, Scalbert E, Pacaud P & Loirand G (2001). "Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rhokinase." *Circ Res* 88: 1102–4.
- 109 Schlüter H, Jankowski J, Rykl J, Thiemann J, Belgardt S, Zidek W, Wittmann B, Pohl T (2003). "Detection of protease activities with the mass-spectrometry-assisted enzyme-screening (MES) system." *Anal Bioanal Chem* 377(7-8): 1102-7.
- 110 Schmidt RF, Lang F, Thews G (2005). *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag 29. Auflage: 634-8.
- 111 Shenouda A, Douglas SA, Ohlstein EH, Giaid A (2002). "Localization of urotensin-II immunoreactivity in normal human kidneys and renal carcinoma." *J Histochem Cytochem* 50(7): 885-9.
- 112 Silvestre RA, Rodríguez-Gallardo J, Egido EM & Marco J. (2001). "Inhibition of insulin release by urotensin II—a study on the perfused rat pancreas." *Horm Metab Res* 33: 379–81.
- 113 Smith FB, Lee AJ, Fowkes FG, Price JF, Rumley A, Lowe GD (1997). "Hemostatic factors as predictors of ischemic heart disease and stroke in the Edinburgh Artery Study." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 3321-5.

-
- 114 Sohail Q Khan , Sanjay S Bhandari, Paulene Quinn, Joan E Davies, Leong L Ng (2007). "Urotensin II is raised in acute myocardial infarction and low levels predict risk of adverse clinical outcome in humans." *International Journal of Cardiology* 117(3): 323-8.
- 115 Somlyo, A. P., & Somlyo, A. V. (2003). "Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase." *Physiol Rev* 83: 1325–58.
- 116 Sondermeijer B, Komp A, Komesaroff P & Krum H (2005).. "Effect of exogenous urotensin-II on vascular tone in skin microcirculation of patients with essential hypertension." *Am. J. Hypertens.* 18: 1195–9.
- 117 Song W, Ashton N & Balment RJ (2003). "Effects of single bolus urotensin II injection on renal function in anaesthetised rats." *J Physiol* P552, P107.
- 118 Song W, Abdel-Razik AES, Lu W et al. (2006). "Urotensin II and renal function in the rat." *Kidney Int.* 69: 1360–8.
- 119 Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Berry C, Kirk A, Richardson M, MacLean MR (2001). "Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(2): 925-8.
- 120 Sugo T, Murakami Y, Shimomura Y, Harada M, Abe M, Ishibashi Y, Kitada C, Miyajima N, Suzuki N, Mori M, Fujino M (2003). "Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain." *Biochem Biophys Res Commun* 310(3): 860-8.
- 121 Sun HX, Du WN, Zuo J, Wu GD, Shi GB, Shen Y, et al. (2002). "The association of two single nucleotide polymorphisms in PRKCZ and UTS2 respectively with type 2 diabetes in Han people of northern China." *Zhongguo Yi Xue Ke Xue YuanXue Bao* 24: 223–7.

-
- 121 Suzuki S, Wenyi Z, Hirai M, Hinokio Y, Suzuki C, Yamada T et al. (2004). "Genetic variations at urotensin II and urotensin II receptor genes and risk of type 2 diabetes mellitus in Japanese." *Peptides* 25: 1803–8.
- 122 Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Arihara Z, Noshiro T, Hayashi Y et al. (2003). "Expression of urotensin II and its receptor in adrenal tumors and stimulation of proliferation of cultured tumor cells by urotensin II." *Peptides* 24:301–6.
- 123 Tal M, Ammar DA, Karpuj M, Krizhanovsky V, Naim M & Thompson DA (1995). "A novel putative neuropeptide receptor expressed in neural tissue, including sensory epithelia." *Biochem Biophys Res Commun* 209: 752–9.
- 124 Tamura K, Okazaki M, Tamura M, Isozumi K, Tasaki H & Nakashima Y (2003). "Urotensin II-induced activation of extracellular signal-regulated kinase in cultured vascular smooth muscle cells: involvement of cell adhesion-mediated integrin signaling." *Life Sci* 72: 1049–60.
- 125 Tasaki K, Hori M, Ozaki H, Karaki H & Wakabayashi I (2004). "Mechanism of human urotensin II-induced contraction in rat aorta." *J Pharmacol Sci* 94: 376–83.
- 126 Thiemann J, Jankowski J, Rykl J, Kurzawski S, Pohl T, Wittmann-Liebold B, Schluter H (2004). "Principle and applications of the protein-purification-parameter screening system." *J Chromatogr A* 1043: 73-80.
- 127 Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Satoh F, Ito S, Kimura Y, Sasano H, Murakami O (2001). "Role of urotensin II in patients on dialysis." *Lancet* 358(9284): 810-1.
- 128 Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Ito S, Murakami O (2003). "Increased plasma urotensin II levels in patients with diabetes mellitus." *Clin Sci (Lond)* 104(1): 1-5.

-
- 129 Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Murakami O, Ito S, Kikuya M, Ohkubo T, Hashimoto J, Imai Y (2004). "Elevated plasma levels of immunoreactive urotensin II and its increased urinary excretion in patients with Type 2 diabetes mellitus: association with progress of diabetic nephropathy." *Peptides* 25(10): 1809-14.
- 130 Tzanidis A, Hannan RD, Thomas WG, Onan D, Autelitano DJ, See F, Kelly DJ, Gilbert RE, Krum H. (2003). "Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy." *Circ Res* 93(3):246-53.
- 131 Watanabe T, Kanome T, Miyazaki A and Katagiri T (2006). "Human Urotensin II as a Link between Hypertension and Coronary Artery Diseases." *Hypertens Res.* 29: 375-87
- 132 Watson AM, Lambert GW, Smith KJ & May CN (2003). "Urotensin II acts centrally to increase epinephrine and ACTH release and cause potent inotropic and chronotropic actions." *Hypertension* 42: 373–9.
- 133 Watson AM and May CN (2004). "Urotensin II, a novel peptide in central and peripheral cardiovascular control." *Peptides* 25(10): 1759-66.
- 134 Waugh D and Conlon JM (1993). "Purification and characterization of urotensin II from the brain of a teleost (trout, *Oncorhynchus mykiss*) and an elasmobranch (skate, *Raja rhina*)." *Gen. Comp. Endocrinol.* 92: 419–27.
- 135 Wenyi Z, Suzuki S, Hirai M, Hinokio Y, Tanizawa Y, Matsutani A, Satoh J, Oka Y (2003). "Role of urotensin II gene in genetic susceptibility to Type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects." *Diabetologia* 46(7): 972-6.
- 136 Wirnt (1990). *Klinische Chemie und Mikroskopie*. Springer Verlag 6. Auflage: 134
- 137 Witztum JL & Steinberg D (2001). "The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans?" *Trends Cardiovasc Med* 11: 93–102.

- 138 Zhang Y, Li J, Cao J, Chen J, Yang J, Zhang Z, Du J, Tang C (2002). "Effect of chronic hypoxia on contents of urotensin II and its functional receptors in rat myocardium." *Heart Vessels* 16(2): 64-8.
- 139 Zhang AY et al. (2003). "Urotensin II is a nitric oxide-dependent vasodilator and natriuretic peptide in the rat kidney." *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 285: 792–8.
- 140 Zhou P, Wu SY, Yu CF, Wang H, Tang CS, Lin L et al. (2003). "Effects of urotensin II on isolated rat hearts under normal perfusion and ischemia reperfusion." *Sheng Li Xue Bao* 55: 442– 8.
- 141 Zhu F, Ji L, Luo B (2002). "The role of urotensin II gene in the genetic susceptibility to type 2 diabetes in Chinese population." *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 82(21): 1473-5.
- 142 Zhu YZ, Wang ZJ, Zhu YC, Zhang L, Oakley RM, Chung CW, Lim KW, Lee HS, Ozoux ML, Linz W, Bohm M & Kostenis E (2004). "Urotensin II causes fatal circulatory collapse in anesthetized monkeys in vivo: a 'vasoconstrictor' with a unique hemodynamic profile." *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286: 830–6.
- 143 Ziltener P, Mueller C, Haenig B, Scherz MW and Nayler O (2002). "Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines." *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 22: 155–68.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite	
Abb. 1	Strukturvergleich von Ull und Somatostatin	2
Abb. 2	Ull und URP (Urotensin-related peptide)	3
Abb. 3	Schematische Übersicht der intrazellulären Signalkaskade vom Ull an dem UTR	5
Abb. 4	Mögliche Rolle des Ull im metabolischen Syndrom	15
Abb. 5	Schema zur Reinigung der UME-Fractionen	28
Abb. 6	Schema zur Durchführung der PPS-Experimente	32
Abb. 7	MES-Assay: MALDI Spektren von Reaktionsprodukten von Ull nach verschiedenen Inkubationszeiten mit immobilisierten Proteinen	50
Abb. 8	Chromatogramm der Ull Aufreinigung	51
Abb. 9	Schematische Darstellung des Reinigungsweges zur Reinigung von UME	52
Abb. 10	Ergebnismatrix von Anionenaustausch-PPS-Experimenten mit einem Extrakt aus Schweinenierengewebe	53
Abb. 10 A	UME Aktivität der Eluate der 32 Chromatographien.	53
Abb. 10 B	Proteinausbeuten der einzelnen Eluate	53
Abb. 10 C	spezifischen Ausbeuten an UME Aktivitäten	53
Abb. 11	Ergebnis der Sample-Displacement-Chromatographie (SDC) aus einem Nierenrohextrakt	54
Abb. 12 A	Versuchsmatrix für die PPS-Experimente aus der Fraktion A	55
Abb. 12 B	Ergebnismatrix der PPS-Experimente aus der Fraktion A	55
Abb. 13	HIC Chromatogramm der UME Fraktion A aus der Sample-Displacement-Chromatographie	56
Abb. 14	Ergebnismatrix der PPS-Experimente mit unterschiedlichen Kationenaustauschern und der aus Reinigungs-Schritt 2 gewonnenen UME Fraktion B	57
Abb. 15	Kationenaustausch-Chromatogramm der Fraktion B	58
Abb. 16	Aktivitätsprofil der Fraktion C in Gegenwart verschiedener Proteaseinhibitoren	59

Abb. 17	Chromatogramm einer Chymostatin-Affinitäts-Chromatographie der Fraktion C	60
Abb. 18	Chromatogramm einer Größenausschluss-Chromatographie der Fraktion D	61
Abb. 19	Kalibrierungskurve der Größenausschluss-Chromatographie	62
Abb. 20	Chromatogramm einer LC-ESI-MS/MS der tryptischen Peptide der Fraktion E	63
Abb. 21	Faktor IX Aminosäuresequenz	64
Abb. 22	Xaa-Pro Aminopeptidase 1 Aminosäuresequenz	64
Abb. 23	MS/MS-Spektren der AS-Sequenz SATILQYLK	65
Abb. 24	MS/MS-Spektren der AS-Sequenz FGSGYVSGWGR	65
Abb. 25	MS/MS-Spektren der AS-Sequenz VLCSCCTTGYR	66
Abb. 26	MS/MS-Spektren der AS-Sequenz VSVSHSPTTLTR	66
Abb. 27	MS/MS-Spektren der AS-Sequenz NCELDATCNIK	67
Abb. 28	MS/MS-Spektren der AS-Sequenz SCKPAVPFPCGR	67
Abb. 29	MS/MS-Spektren der AS-Sequenz IDAFCGGSIINEK	68
Abb. 30	MS/MS-Spektren der AS-Sequenz WVVTAAHCIEPGVK	68
Abb. 31	MS/MS-Spektren der AS-Sequenz ITVVAGEYNTEETEPEQQR	69
Abb. 32	MS/MS-Spektren der AS-Sequenz ITVVAGEYNTEETEPEQRR	69
Abb. 33	MS/MS-Spektren der AS-Sequenz VTSELLR	70
Abb. 34	MS/MS-Spektren der AS-Sequenz GHLLDSFAR	70
Abb. 35	MS/MS-Spektren der AS-Sequenz IENVVLVVPVK	71
Abb. 36	Fullscan-ESI-IT-MS-Spektrum von humanem des-Val-Ull	72
Abb. 37	MS/MS-Spektrum des zweifach geladenen Peptids des humanen des-Val-Ull	73
Abb. 38	Chromatogramm einer 10^{-5} M humanen des-Val-Ull Probe; Detektion mittels ESI-IT-MS	74
Abb. 39	des-Val-Ull-Konzentration nach unterschiedlichen Inkubationszeiten von immobilisiertem Faktor IXa und der Kontrolle (ohne humanem Faktor IXa) mit Ull	75
Abb. 40	Aminosäuresequenz von Urotensin-II (Ull) des Schweins mit 13 Aminosäuren	78

Abb. 41	Darstellung des Peptids, welches von UME aus UII generiert wird	78
Abb. 42	Schematische Darstellung der chromatographischen Reinigung des UME.	80
Abb. 43	Struktur des Faktor IX bzw. der aktivierten Form	85
Abb. 44	Schematische Darstellung eines möglichen Zusammenhangs zwischen UII und dem Hämostasesystem	87

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle		Seite
Tab. 1	UII vermittelte Gefäßreaktionen bei Säugetieren	9
Tab. 2	Signifikante Veränderungen UII und UTR bei Erkrankungen	17
Tab. 3	Zusammensetzung und Anordnung des Equilibrierungs- und Waschpuffers	35
Tab. 4	Zusammensetzung und Anordnung des Probenauftragpuffers	36
Tab. 5	Gelplattenbelegung	38
Tab. 6	Anordnung und Zusammensetzung der Equilibrierungs-, Waschpuffer und der Probenauftragspuffer	39
Tab. 7	Anordnung und Zusammensetzung des Elutionspuffers	40
Tab. 8	Gelplattenbelegung	42
Tab. 9	Anordnung und Zusammensetzung der Equilibrierungs- und Waschpuffer und der Probenauftragspuffer	42
Tab. 10	Tabelle zur Bestimmung des Molekulargewichts der UME	62

10 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
Akt	Proteinkinase B
Ala	Alanin
Arg	Aspartat
AS	Aminosäure
Asn	Argenin
Asp	Asparagin
BNP	Brain natriuretic peptide
Ca	Calcium
CHES	2-(Cyclohexylamino)ethansulonsäure
CHF	Chronische Herzinsuffizienz
CHO	Chinese Hamster Ovary
cm ³	Kubikzentimeter
Co	Cobalt
CPI-17	Proteinkinase C-potentiated inhibitor protein von 17kDa
Cys	Cystein
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DHB	2,5 Dihydroxybenzoic Acid
DTT	Dithiotreithol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	Extracellular signal regulated kinase
ESI	Elektrospray Ionisation
ET1	Endothelin-1
g	Gramm
G. Cyklase	G-Proteincyklase
Gln	Glutamin
Gly	Glycin

Glu	Glutamat	
GPCR	G-Protein gekoppelten Rezeptor	
GPR14	G-Protein gekoppelte Rezeptor 14	
h	Stunde	
HIC	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie	
His	Histidin	
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography	
hUll	Humanes Urotensin II	
HZV	Herzzeitvolumen	
Ile	Isoleucin	
IMAC	Immobilized-Metal-Ion-Affinity-Chromatography	
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat	
JNK	C-Jun N-terminale Kinasen	
KHK	Koronare Herzkrankheit	
LC	Liquid Chromatography	
LDL	Low density lipoprotein	
Leu	Leucin	
LOX-1	Oxidierten LDL Rezeptor	
Lys	Lysin	
M	Mol	
MALDI	Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation	
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	
MES-System	Massenspektrometrie-basierendes System	Enzym-Screening-System
Met	Methionin	
Mg	Magnesium	
µg	Mikrogramm	
mg	Milligramm	
min	Minute	
ml	Milliliter	
mM	Millimol	
MLC20	Regulatory myosin light chain	
MLCK	Myosin Light Chain Kinases	
MLCP	Myosin light chain phosphatase	

Mm	Millimeter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
Mn	Mangan
MS	Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NAPDHS	Nikotinamidadenosindinukleotidphosphat-Synthase
NH ₃	Ammoniak
NIDDM	Non-insulin dependent diabetes mellitus
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
PF3	Platelet factor
Phe	Phenylalanin
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PPS	Protein purification parameter souting
Pro	Prolin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
ROCK	RhoA/Rho-Kinase
ROS	Reactive oxygen species
RPC	Reverssed Phase-Chromatographie
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
SDC	Sample Displacment-Chromatographie
SENR	Sensory epithelia neuropeptide-like receptor
Ser	Serin
SHR	Spontan hypertensiven Ratten
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure

Thr	Threonin
TIC	Total ion current
TOF	Time of flight
t-PA	Tissue plasminogen activator
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Umdrehung
Ull	Urotensin II
UCE	Urotensin converting Enzym
UME	Urotensin-II-metabolisierendes Enzym
URP	Urotensin-related peptid
UTR	Urotensin II Rezeptor
UV	Ultraviolett
Val	Valin
WKY	Kontroll Wistar-Kyoto Ratten
z.B.	Zum Beispiel

11 Anhang

11.1 Danksagungen

Zunächst möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei meiner Promotionsarbeit unterstützt haben.

Ich danke Prof. Dr. Hartmut Schlüter für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, der interessanten Thematik und der sehr netten Zusammenarbeit. Er ermöglichte mir als Mediziner den Einblick in die Massenspektrometrie und Proteinreinigung. Ebenso bedanke ich mich für seine Mühen zur Korrektur meiner Arbeit.

Dr. Joachim Thiemann danke ich für das Heranführen an die Thematik und seine Geduld.

Dr. Sandra Kurzawski und Nadin Jahnke danke ich sehr für die Unterstützung in Krisensituationen und ihrer steten Hilfsbereitschaft. Und ich danke ihnen für die lockere und lustige Atmosphäre im Labor und vor allem dafür, dass sie meine Stimmungsschwankungen geduldig ertragen haben und mir zu guten Freunden geworden sind.

Ebenso gilt ein ganz besonderes Dankeschön meinen Freunden Shideh Faramarzi, Samira El-Chamalie, Maruan Kammel, Jusuf Yilmaz, Ilim Ulutürk, Said Sultani und Valerio Bisanti, jeder von Ihnen hat auf eine ganz besondere Art mein Leben positiv verändert.

Abschließend danke ich meinen Eltern sehr, dass sie mich stets motiviert haben, meinen Weg weiterzugehen und nicht aufzugeben. Ein Dankeschön auch an meine Geschwister, die geduldig auf mich gewartet haben und wie meine Eltern an mich geglaubt haben. Ganz besonders danke ich meinem kleinen Lauin, der wegen meines Zeitmangels vieles entbehren musste, mir dass jedoch nie böse genommen hat, der mich mit seinen aufbauenden Kindersätzen immer wieder überraschte.

11.2 Erfolgte Publikation

Shenge Ahmed, et al. (2005). "Application of peptides as reaction specific probes for the automated mass spectrometry-assisted enzyme screening (MES)."

J Electrophoresis 49(1): 29-34.

11.3 Lebenslauf

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

11.4 Erklärung

„Ich, Shenge Ahmed, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Suche, Reinigung und Identifizierung eines Urotensin II metabolisierenden Enzyms selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift