

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, ein Urotensin-II-generierendes Enzym (UCE) im menschlichen Plasma nachzuweisen, zu reinigen und zu identifizieren. Zu Beginn dieser Arbeit musste deshalb ein Nachweisverfahren für die UCE-Aktivität etabliert werden. Als Nachweismethode wurde das von Schlüter et al. entwickelte Massenspektrometrie-basierte Enzym-Screening-System (MES-System) gewählt (Schlüter et al., 2003). Das Prinzip des MES-Systems beinhaltet die Immobilisierung von Proteinen an Affinitätsbeads und anschließender Inkubation der immobilisierten Proteine mit einem Reaktions-spezifischen Substrat, gefolgt von massenspektrometrischen Analysen der Reaktionslösung nach definierten Zeitpunkten. Das MES-System wurde als Nachweismethode gewählt, da sie eine schnelle, empfindliche und reproduzierbare Alternative im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren zur Detektion von Enzymaktivitäten darstellt. Bisherige Verfahren zum Nachweis einer Enzymaktivität messen die Änderung der Fluoreszenz sowie Lumineszenzemission oder der Lichtabsorption im sichtbaren oder UV-Bereich während der Enzymreaktion, was häufig ein Derivatisieren der Substrate mit Chromophoren und Fluorophoren erfordert. Durch die chemisch veränderte Struktur von Substraten, kann es bei Enzymen mit hoher Substratspezifität zu einer verminderten Enzymaktivität kommen. Der MES-Assay ist von gelabelten Substraten unabhängig, sodass dieser Einfluss gemindert werden kann. Radioisotopen-gelabelte Substrate besitzen wie die Substrate des MES-Assays eine identische Struktur mit dem endogenen Substrat, bedürfen aufgrund ihres radioaktiven Abfalls, jedoch einer speziellen Entsorgung.

Für den Nachweis einer UCE-Aktivität mit dem MES-UCE-Assay wurde ausgehend von der 124 AS-langen Präpro-Ull Variante des Menschen (Abb. 29) eine 20 AS lange Peptidsequenz, Position 105-124 des Präpro-Ull als Reaktions-spezifisches Substrat (UCE-S) synthetisiert. UCE-S enthält wie das *in vivo* Substrat die UCE-Spaltstelle mit den Aminosäuren Arginin (113) und Glutaminsäure (114). Ebenso wie seine Präpro-Variante enthält das UCE-S ein zyklisches Motiv, das durch die Disulfidbrücke der beiden Cysteine entsteht und für die biologische Aktivität des Ull erforderlich ist (McMaster et al., 1986; Kinney et al., 2002; Flohr et al., 2002; Brkovic et al., 2003).

Da das UCE-S nur eine verkürzte Variante des Präpro-Ull ist, kann keine Aussage über die *in vivo*-Prozessierung gemacht werden. Denkbar wäre die Ull-Generierung

über den Weg einer Zwischenstufe, vergleichbar dem Angiotensinsystem. Ausgehend vom Angiotensinogen entsteht durch proteolytische Spaltung das Angiotensin-I, in einem zweiten Schritt wird das vasoaktive Angiotensin-II gebildet (Inagami et al., 1986). Wenn es ein Enzym gibt, das eine Zwischenstufe des UII generiert, deren Schnittstelle nicht im UCE-S liegt, wird es die Aufgabe weiterer Experimente sein, dies heraus zu finden.

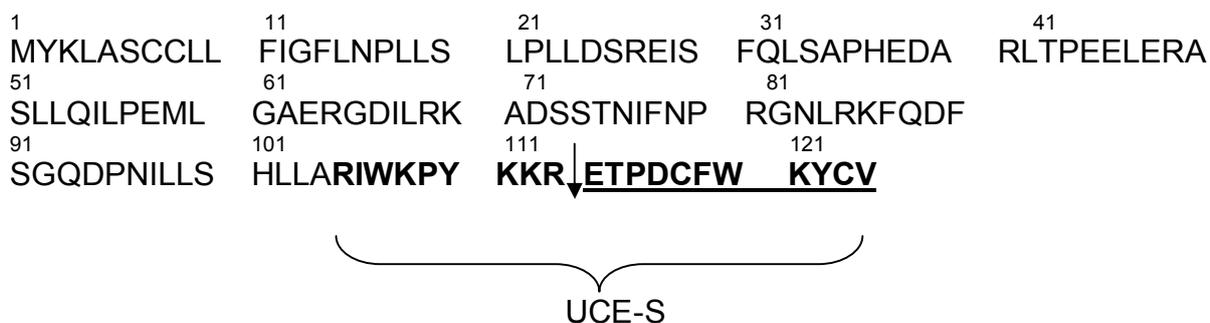


Abb. 29: Aminosäuresequenz des Präpro-UII mit AS-Sequenz des UCE-Substrats und dessen Schnittstelle (Pfeil markiert die UCE-Schnittstelle). Unterstrichen: Sequenz von UII.

Nach Etablierung des MES-UCE-Assays wurde eine geeignete Quelle für die Aufreinigung des UCE gesucht. Russell et al. konnte eine Trypsin-ähnliche UCE-Aktivität in humanem Plasma zeigen und auch Totsune et al. wies UII im Plasma nach (Totsune et al. 2001; Russell et al., 2004). Deshalb wurde als erstes überprüft, ob sich in humanem Plasma mit dem MES-UCE-Assay eine UCE-Aktivität beobachten lässt. Die Massenspektren des Versuchs (Abb.8) zeigen nach einer Inkubationszeit von 4h ein deutliches UII-Signal. Um eine ausreichend große Menge für die Reinigung des UCE zu finden, wurden Cohn-Plasma-Fractionen auf ihre Urotensin-II-generierenden Aktivitäten geprüft. Das nach Cohn benannte Verfahren zur Blutplasmafraktionierung erfolgt durch schrittweise Ausfällung von Plasmaproteinen mit Hilfe von Ethanol in der Kälte (Cohn et al., 1944). Die für diese Versuche verwendeten Cohn-Fractionen umfassten die Cohn II/III-Fraktion mit den Hauptbestandteilen Plasminogen, Lipoprotein und Prothrombin, die Cohn γ -Globulinreiche II/III- γ Fraktion und die Cohn-IV-Fraktion mit α - und β -Globulinen. Die höchste UCE-Aktivität konnte in der Cohn-IV-Fraktion nachgewiesen werden (Abb.10) und wurde als Ausgangsmaterial für die Reinigung des UCE gewählt.

Nachdem ein Nachweissystem etabliert und eine geeignete Quelle des UCE verfügbar war, mussten Methoden zur Reinigung gefunden werden. Die Reinigung des UCE erfolgte mittels chromatographischer Reinigungsmethoden, bei denen begleitende Biomoleküle vom UCE entfernt werden sollten. Um Verluste des

Zielproteins während der Reinigung zu minimieren, welche durch irreversibles Anbinden des Zielproteins an Oberflächen, wie den stationären Phasen der Chromatographie-Materialien, oder Denaturierung bzw. Ausfällung entstehen können, musste ein System gefunden werden, das mit wenigen Reinigungsschritten das Zielprotein bis zur nahen Homogenität aufreinigt. Mit den gewählten Parametern zur chromatographischen Reinigung sollte eine hohe spezifische Ausbeute des Zielproteins gewährleistet werden. Für das Finden der geeigneten Parameter zur chromatographischen Reinigung des UCE wurde das PPS-System (Thiemann et al., 2004) genutzt. Mit diesem automatisierten Screening-System basierend auf parallelen Batchchromatographien im 96-Well-Format, wurden unterschiedliche Chromatographiematerialien und pH-Werte auf ihre Eignung für die optimale Reinigung des Zielproteins getestet. Die Ergebnisse der ersten PPS-Experimente zeigten bei dem Parametersatz QAE 550C-Gel bei einem pH von 7 hohe spezifische UCE-Aktivitäten (Abb.12C). Anschließend wurde dieser Parametersatz auf eine Sample Displacement Chromatographie (SDC) im Batchmodus übertragen, da die Cohn-IV-Proteinlösung nicht frei von Partikeln war, und dies zur Verstopfung einer Chromatographiesäule geführt hätte. Das Ergebnis der Batch-SDC zeigte die höchste UCE-Aktivität in der Fraktion 1 (Abb.13). Die aktive Fraktion aus der SDC enthielt eine hohe NaCl-Konzentration. Um einen Umpufferungsschritt zu sparen - hierbei ist mit weiteren Ausbeuteverlusten zu rechnen - wurden für den nächsten Reinigungsschritt Chromatographie-Methoden gesucht, die ein Auftragen der Probe in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen zulässt. Dies ermöglichen die Hydrophobe Interaktions-Chromatographie und die Metallaffinitäts-Chromatographie, die auf die nächsten PPS-Experimente angewandt wurden. Da eine hohe spezifische Ull-generierende Aktivität mit dem t-Butyl-MacroPrep-Gel bei einem pH von 5 erreicht wurde (Abb.14D), erfolgte mit diesem Parametersatz eine Säulen-chromatographische Reinigung (Abb.15). Das Chromatogramm zeigt, dass eine hohe UV-Absorption außerhalb des Gradienten zu sehen ist, an deren Stelle auch UCE-Aktivitäten nachgewiesen werden konnten (Abb.15). Für die weitere chromatographische Trennung wurden Fraktionen zusammengefasst und mit Fraktion 2 bezeichnet, die eine hohe UCE-Aktivität zeigten. PPS-Experimente wurden mit der Fraktion 2 unter Variation verschiedener Kationenaustauscher-Materialien bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Die höchste Ull-generierende Aktivität ließ sich mit dem Parametersatz Unosphere-Gel und pH5

erreichen (Abb. 16), mit dem eine weitere Säulen-chromatographische Reinigung erfolgte. Das zugehörige Chromatogramm (Abb.17) zeigt eine UCE-Aktivität, die im Gradienten eluiert (Fraktion 3). Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Größenausschluss-Chromatographie der aktiven Fraktion 3 durchgeführt (Abb.19). Im Chromatogramm sind mehrere UV-Absorptionen zu sehen, denen im Aktivitätsprofil drei UCE-Aktivitäten zugeordnet werden konnten. Dabei könnte es sich entweder um unterschiedliche Enzyme oder um ein Enzym mit unterschiedlichen Modifikationen handeln. Für die Klärung dieses Sachverhalts wurden die Proteine der 3 Fraktionen (bezeichnet mit Fraktion 4, 5 und 6) identifiziert. Nur in der Fraktion 5 wurde eine Protease, der Komplement-Faktor-I, identifiziert. Im tryptischen Verdau der Fraktion 5 konnten insgesamt 9 Peptide dem Komplement-Faktor-I zugeordnet werden, was einer Sequenzabdeckung von 25% entspricht und einem Score von 392. Der Komplement-Faktor-I ist auch ein Bestandteil der Cohn-IV-Fraktion, was die Wahrscheinlichkeit der Richtigkeit erhöht. Zur weiteren Verifizierung der UCE-Identität wurde eine kommerziell erworbene Komplement-Faktor-I-Präparation mit UCE-S inkubiert und die Reaktionsprodukte massenspektrometrisch analysiert. Die Massenspektren der Reaktionsprodukte der Inkubation des Komplement-Faktors-I mit dem UCE-S zeigten deutlich das Signal von UII (Abb.23), sowie Signale, die den Peptiden KR-UII und R-UII zugeordnet werden konnten (Abb.23A). Die 3 Reaktionsprodukte UII, R-UII und KR-UII wurden auch in der Reaktionsmischung der Inkubation der gereinigten Fraktion 5 mit dem UCE-S detektiert (Abb.23B). Dies deutet darauf hin, dass der Komplement-Faktor-I, der in dieser Arbeit als UCE identifiziert werden konnte, die 3 Reaktionsprodukte generiert, was auch mit Versuchen zur Inhibition der UCE-Aktivität bestätigt werden konnte. Die Inkubation des Komplement-Faktors-I mit dem UCE-S in Anwesenheit von Serinprotease-Inhibitoren zeigte keine Generierung eines der 3 Reaktionsprodukte (Abb.27 und 28). Die Generierung der 3 Reaktionsprodukte (UII, R-UII und KR-UII) aus dem UCE-S lassen vermuten, dass der Komplement-Faktor-I eine Substratspezifität für die Aminosäurereste Arg-/Lys, Lys-/Lys besitzt. Der Vergleich der Schnittstellen der bekannten Komplement-Faktor-I Substrate zeigt eine bevorzugte Spaltung nach der Aminosäure Arginin (Abb. 30). Die zwei Spaltstellen des C3b-Proteins bestehen aus der Aminosäuresequenz Arg-/Ser (Abb.30). Für die Spaltung des Proteins C4b bestehen die Spaltstellen aus den Aminosäuren Arg-/Asn und Arg-/Thr.

Zusammenfassend erfolgt die Spaltung der Substrate des Komplement-Faktors-I (C3b, C4b und UCE-S) nach Arg-/Xaa und Lys-/Lys/Arg.

C3b (Position der Schnittstelle 1303-1304)	LPS R SSKI
C3b (Position der Schnittstelle 1320-1321)	SLL R SEET
C4b (Position der Schnittstelle 1330-1331)	STG R NGFK
C4b (Position der Schnittstelle 950-951)	HRG R TLEI
UCE-S (Position der Schnittstelle 7-8)	Y K KRETPD
UCE-S (Position der Schnittstelle 8-9)	Y KK RETPD
UCE-S (Position der Schnittstelle 9-10)	Y KKR ETPD

Abb.30: Ausschnitte von Aminosäuresequenzen von Komplement-Faktor-I Substraten.
Angegebene Schnittstellen sind fett gedruckt.

Versuche zur Substratspezifität des Komplement-Faktors-I mit Hilfe von Peptid-AMC-Derivaten, welche Lysin oder Arginin enthalten, hat Tsiftoglou et al. durchgeführt (Tsiftoglou et al., 2004). Die höchsten Komplement-Faktor-I Aktivitäten konnten mit den Substraten Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-AMC (Spaltprodukte: Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg + AMC), *N*- α -*tert*-Boc-Val-Pro-Arg-AMC (Spaltprodukte: *N*- α -*tert*-Boc-Val-Pro-Arg + AMC) und Z-Gly-Pro-Arg-AMC (Spaltprodukte: Z-Gly-Pro-Arg + AMC) erreicht werden. Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollte in einem weiteren Versuch überprüft werden, ob die aktive Fraktion 5 in der Lage ist, das typische Komplement-Faktor-I-Substrat Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-AMC mittels Fluoreszenz-basierten Enzymassay zu hydrolysieren. Das Ergebnis (Abb.24) zeigt die Hydrolyse eines typischen Komplement-Faktor-I-Substrats durch die aktive Fraktion 5 und deutet auf eine Protease mit Komplement-Faktor-I-Aktivität hin. Mit den Serinprotease-Inhibitoren Aprotinin und Pefabloc SC lässt sich die Komplement-Faktor-I-Aktivität hemmen (Tsiftoglou et al., 2004), ob sich mit ihnen auch die UCE-Aktivität hemmen lässt, sollten Inhibitionsversuche klären. Die Ergebnisse der Inhibitionsversuche beweisen eine vollständige Hemmung der UCE-Aktivität in der Fraktion 5 mit den gewählten Serinprotease-Inhibitoren (Abb.27 und 28). Die Massenspektren der Reaktionsprodukte der Inkubation des Komplement-Faktors-I in Gegenwart der Inhibitoren (Abb. 27B und 28B) zeigten ebenfalls kein UII-Signal.

Die Experimente zur Abschätzung des Molekulargewichts des UCE aus der Plasmafraktion mit Ultrafiltrationsmembranen ergaben (Abb.9), dass UCE größer als 50kDa sein muss. Anhand einer Größenausschlusschromatographie (Abb.19) konnte

das Molekulargewicht des UCE auf ca. 90 kDa geschätzt werden, was in der Größenordnung von dem Molekulargewicht des Komplement-Faktors-I (88 kDa) liegt. In der Literatur ist der Komplement-Faktor-I als ein Glykoprotein mit N-glykosidisch gebundenen Zuckerresten vom High-Mannose-Typ beschrieben (Goldberger et al. 1984, 1987; Bunkenborg et al., 2004; Ullman et al., 1998). Der Komplement-Faktor-I, der aus einer leichten und einer schweren Kette besteht, besitzt an jeder Kette jeweils 3 potentielle N-glykosidische Bindungsstellen. Der Zuckeranteil beträgt mit 24kDa 25-27% am Gesamtprotein, dass eine Gesamtgröße von 88kDa besitzt (Tsiftoglou et al., 2005, 2006). In der Literatur (Tsiftoglou et al., 2006) sind nur N-glykosidisch gebundene Zuckerreste des Komplement-Faktors-I charakterisiert, was mit den experimentellen Daten in dieser Arbeit auch übereinstimmt (Abb. 25).

Nach der Verifizierung der Identität des UCE als Komplement-Faktor-I stellte sich die Frage, in welchem physiologischen Zusammenhang die Ull-generierende Aktivität des Komplement-Faktors-I steht. Bisher wurde dem Komplement-Faktor-I eine wichtige Rolle bei der Regulation des Immunsystems zugesprochen, dessen Aufgabe im Schutz der körpereigenen Zellen vor der Komplementaktivierung besteht. Es gibt drei Arten der Komplementaktivierung, eine angeborene (alternativer Weg), eine adaptierte (klassischer Weg) und der Lektin-Weg, wahrscheinlich eine evolutionäre Zwischenstufe. Die Aufgabe aller drei Wege ist die Inaktivierung eingedrungener Fremdstoffe (z.B. Antigene). Diese erfolgt über mehrere Schritte (Abb.31 zeigt die wesentlichen Reaktionen des klassischen Wegs). Allen drei Wegen ist die Bildung einer Protease, der C3-Konvertase, gemein. Sie erzeugt durch proteolytische Spaltung die zwei wichtigsten Effektormoleküle, ein Opsonin (C3b) und einen kleinen Peptidmediator (C3a) der Entzündung. C3a stimuliert die Chemotaxis, die Aktivierung von Leukozyten und die Degranulation von Basophilen und Mastzellen. Die gebildeten C3b-Moleküle binden kovalent an benachbarte C3b-Moleküle auf der Pathogenoberfläche und wirken dort opsonierend. Binden aktivierte Komplementkomponenten an körpereigene Zellen anstatt der Pathogenoberfläche, müssen diese umgehend inaktiviert werden. Zu diesem Schutz wirken eine Reihe regulatorischer Proteine, an verschiedenen Stellen der Komplementkaskade (Abb. 31). Für die Ausschaltung der aktivierten Komponenten C3b und C4b, die an Körperzellen gebunden haben, wird durch Spaltung des Komplement-Faktors-I jedes C3b- bzw. C4b-Molekül in eine inaktive Form überführt. Für diese Spaltung müssen C3b und C4b an die Membranproteine CR1 und MCP, die Cofaktoraktivität besitzen,

gebunden werden. Ein weiterer Cofaktor, als Regulator in der flüssigen Phase, ist das C4b-bindende Protein (C4BP). Der Cofaktor H bindet C3b sowohl in der flüssigen Phase als auch an Zellmembranen (Janeway et., 2002).

Den Spaltungen der Arginyl-Bindungen der Substrate C3b und C4b geht die Bildung eines ternären Komplexes aus dem Komplement-Faktor-I mit dem Substrat und dem Cofaktor voraus (Arlaud et al., 1998; Pangburn et al., 1978; Soames and Sim, 1997).

Nach Bildung der C3-Konvertase, die allen drei Wegen gemein ist, laufen die Wege zusammen und es bilden sich die Haupteffektorfunktionen aus. Mit Bildung des membranangreifenden Komplexes, dem C5b-9-Komplex kommt es zur Lyse der Bakterienzelle.

Klassischer Weg des Komplementsystems

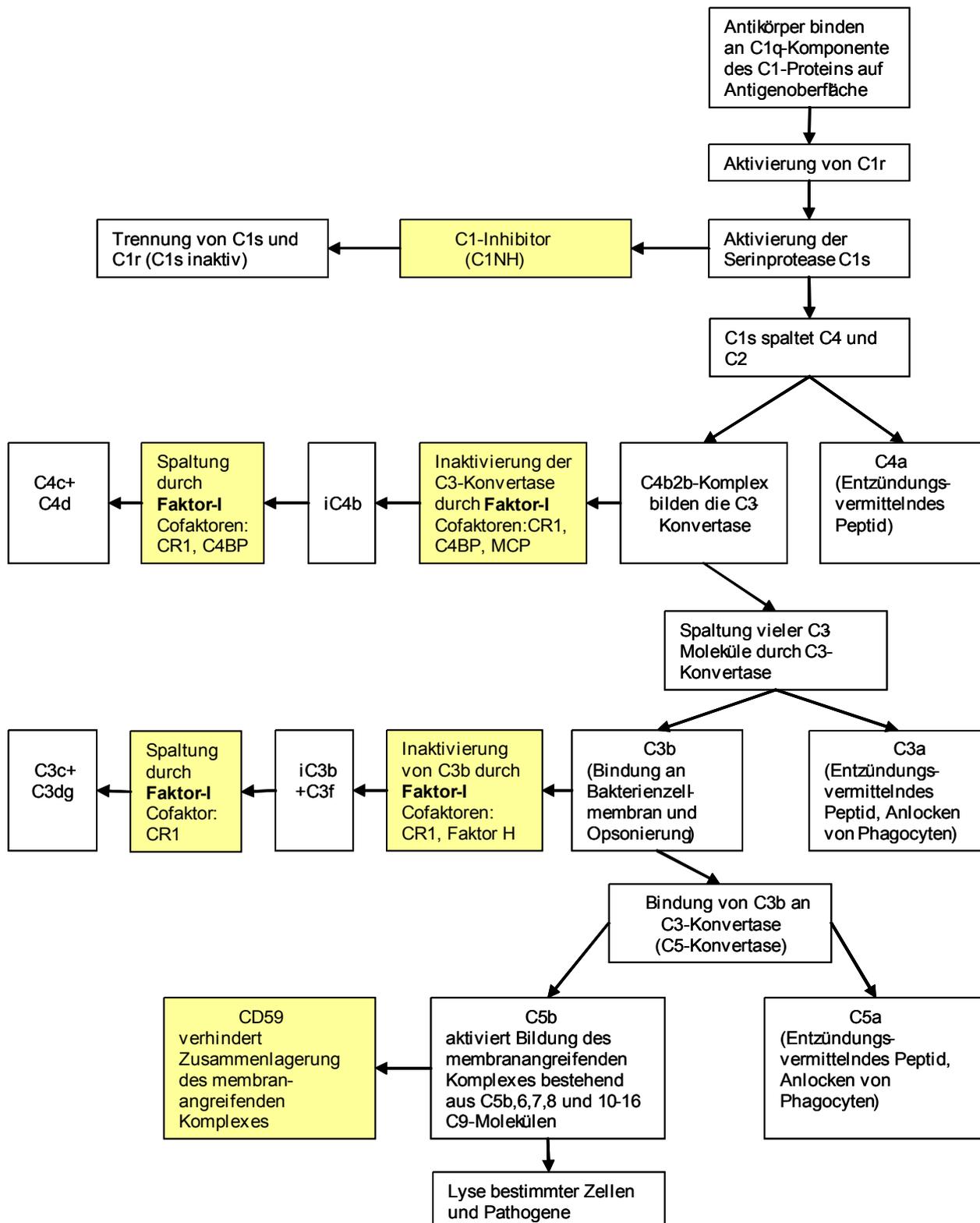


Abb.31: Klassischer Weg des Komplementsystems. Die Komplementaktivierung erfolgt über die Antikörperbindung an ein Antigen. Nach einer Reihe von Spaltreaktionen wird die C3-Konvertase gebildet, die C3-Moleküle in C3b und C3a spaltet. Binden aktivierte C3b-Moleküle auf der Oberfläche körpereigener Zellen, werden diese durch Spaltung durch den Komplement-Faktor-I (in Abb.31 Faktor-I) inaktiviert. Weitere Proteine, die die Komplementaktivierung regulieren, sind C1NH und CD59. Die späten Ereignisse der Komplementaktivierung werden durch die Bildung des membranangreifenden Komplexes ausgelöst, der die Membran einiger Erreger schädigt (Janeway, 2005).

Mittels dieser Arbeit konnte dem Komplement-Faktor-I neben seiner Aufgabe zur Regulation des Komplementsystems eine weitere Funktion, die Generierung von Ull, nachgewiesen werden. Am Beispiel eines weiteren Schutzproteins des Komplementsystems, dem C1-Inhibitor (C1NH) soll demonstriert werden, dass Proteine nicht nur eine Aufgabe übernehmen können. C1NH inaktiviert die Komplementkomponenten C1r und C1s des klassischen Wegs (Sim et al., 1979; Ziccardi, 1981) und die Protease MAPS2 des Lektinwegs (Abb. 31) (Ambrus et al., 2003; Matsushita et al., 2000a, b, 2001b). In den vergangenen Jahren konnte man Interaktionen des C1NH mit anderen Proteinen finden, die unabhängig von seiner Eigenschaft als Proteaseinhibitor sind. Seine Interaktionen mit Selektin P und E vermitteln eine Inhibition der Leukozytenmigration (Buerke et al., 1998; Horstick et al., 2001; Lehmann et al., 2000, 2004). Eine weitere Interaktion geht er mit dem C3b-Protein des Komplementsystems ein und verhindert dessen Bindung an Faktor B, was wiederum die Bildung der C3-Konvertase hemmt und die Regulation des alternativen Wegs zur Folge hat (Jiang et al., 2001). Interaktionen mit extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen Typ IV, Laminin und Fibrin führen zur Regulation des lokalen Komplementsystems (Patston and Schapira, 1997; Hauert et al., 2000; Schmidt et al., 1999a, b). Zusammenfassend besteht die Aufgabe des C1NH nicht nur in der Inhibition des Komplementsystems, sondern auch in der Inhibition der Kontaktsystemaktivierung. Ein Beispiel für das Zusammenspiel von Immunsystem und Blutdruckregulation, zeigen die vielfältigen Wirkungen des Entzündungsmediators Histamin. Es beeinflusst die Durchlässigkeit des Endothels für Entzündungszellen, ist an der Chemotaxis beteiligt und wird bei Gewebeschädigung, Entzündungen und allergischen Reaktionen aus Mastzellen und basophilen Granulozyten freigesetzt (Schmidt et al., 2005). Bindet Histamin an den H1-Rezeptor kommt es zu einer Vasokonstriktion großer Gefäße. Eine Vasodilatation wird durch Bindung an den H1- oder H2-Rezeptor vermittelt (Toda, 1987).

Anhand der Ergebnisse der Arbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass möglicherweise die durch den Komplement-Faktor-I verursachte Ull-Generierung im Zusammenhang mit den biologischen Effekten der Komplementaktivierung steht und Ull im Körper die Funktion eines Entzündungsmediators einnimmt. Zu diesen Effekten zählen die Zunahme der Gefäßpermeabilität, auch als Extravasation bezeichnet und die Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen (Maguire et al., 2000; Bennett et al., 2004; Russell et al., 2001 und Gendron et al., 2004). Die Kontraktion

der Gefäßmuskulatur vorallem Gefäße der Endstrombahn (Arteriolen, Venolen und Kapillaren) stellen die initiale Antwort des Gefäßsystems bei Entzündungen dar. Durch die Vasokonstriktion kommt es zu einer verminderten Durchblutung der terminalen Blutbahn für einige Sekunden bis Minuten (Freundenberg et al., 2002). Die Vasokonstriktion bewirkt die Verlangsamung der Blutzirkulation im betroffenen Gebiet und ist eine Voraussetzung für die Rekrutierung von Leukozyten. Die Leukozyten können infolge der Verlangsamung an endotheliale Adhäsionsmoleküle binden, um durch Extravasation von der Blutbahn ins Gewebe gelangen zu können (Ebnet and Vestweber, 1999). Ull wird als der stärkste bekannte Vasokonstriktor, der in der Lage ist, Gefäße in unterschiedlichen Spezies zu kontrahieren, beschrieben (Muramatsu et al. 1979; Gibson 1987; Itoh et al. 1987; Douglas et al. 2000; Camarda et al. 2002). Im Menschen konnte eine durch Ull ausgelöste Vasokonstriktion an isolierten Koronararterien, in Brustarterien, Radialarterien, Lungenarterien, Oberschenkelvenen und Nabelvenen *in vitro* gezeigt werden (Maguire et al., 2000; Bennett et al., 2004).

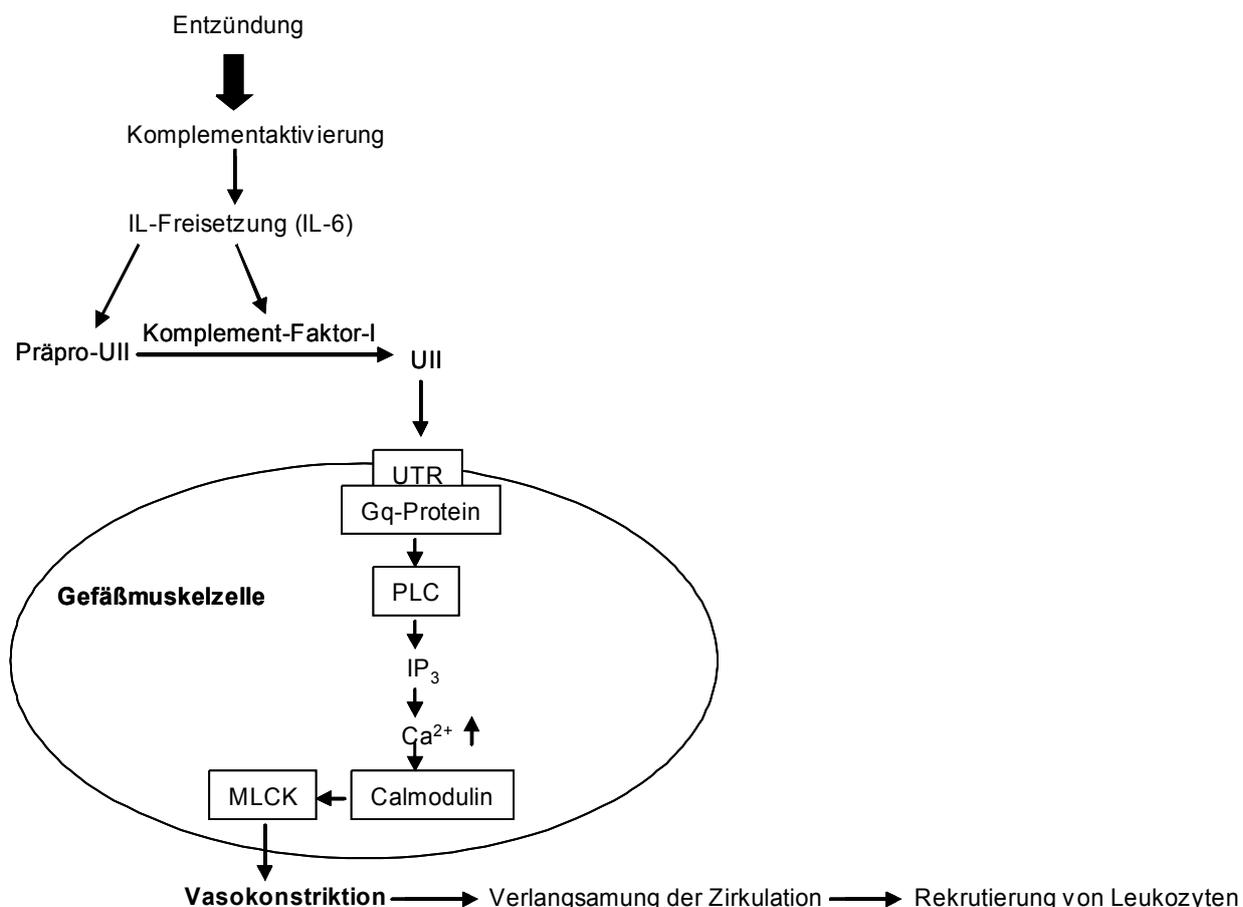


Abb.32: Modell einer Ull-abhängigen Vasokonstriktion als Antwort auf eine Entzündung. Der initiale Schritt bei einer Entzündung ist eine kurze Vasokonstriktion der Gefäße, die es zum Ziel hat, die Blutzirkulation zu verlangsamen. Dadurch kommt es zur Rekrutierung von Leukozyten und deren Bindung an Adhäsionsmoleküle (P- und E-Selektin) auf den Endothelzellen. Wahrscheinlich lösen Zytokine die Expression des Komplement-Faktors-I und des Präpro-Ull aus.

Gefolgt von der Vasokonstriktion kommt es bei der Komplementaktivierung zur Extravasation, einem vasodilatatorischen Prozess (Gendron et al., 2004), bei dem es zur Öffnung der Interzellularspalten des Endothels an den postkapillären Venulen kommt, woraufhin Proteine und Flüssigkeit ins Gewebe gelangen. Mehrere Daten sprechen für eine Beteiligung von U11 an diesem Prozess. Das U11 vasodilatatorische Eigenschaften vorrangig an kleinen Gefäßen besitzt, konnte in vergangenen Studien bereits gezeigt werden (Bottril et al., 2000; Ishihata et al., 2005; Stirrat et al., 2001; Zhang et al., 2003). Bei der U11-vermittelten Vasodilatation ist an U11 an der Freisetzung der vom Endothel produzierten gefäßerweiternden Faktoren wie NO, EDHF, Prostazykline und Prostaglandine beteiligt (Katano et al., 2000; Ishihata et al., 2005). Als effektives Agens für die Plasmaextravasation konnte U11 in unterschiedlichen Gefäßen und Organen wie der Leber, Niere, Milz und des Pankreas in der Maus nachgewiesen werden (Vergura et al., 2004). Gendron et al. zeigte eine durch U11 ausgelöste Extravasation in der Lungenarterie, dem Herzen, der Niere, dem Pankreas und dem Dünndarm von Wistar-Ratten (Gendron et al., 2004).

Einige Modelle über intrazelluläre Vorgänge, die von U11 vermittelt werden (Maguire und Davenport, 2002), nehmen an, dass U11 in der Endothelzelle generiert wird. Das in dieser Arbeit generierte Modell (Abb. 33) geht davon aus, dass wie es Russell et al. bereits beschrieb, Präpro-U11 im Plasma generiert wird (Russell et al., 2004), da der Komplement-Faktor-I ein im Plasma zirkulierendes Protein ist. Inwieweit eine U11-Generierung in der Endothelzelle durch den Komplement-Faktor-I möglich ist, kann nicht eingeschätzt werden.

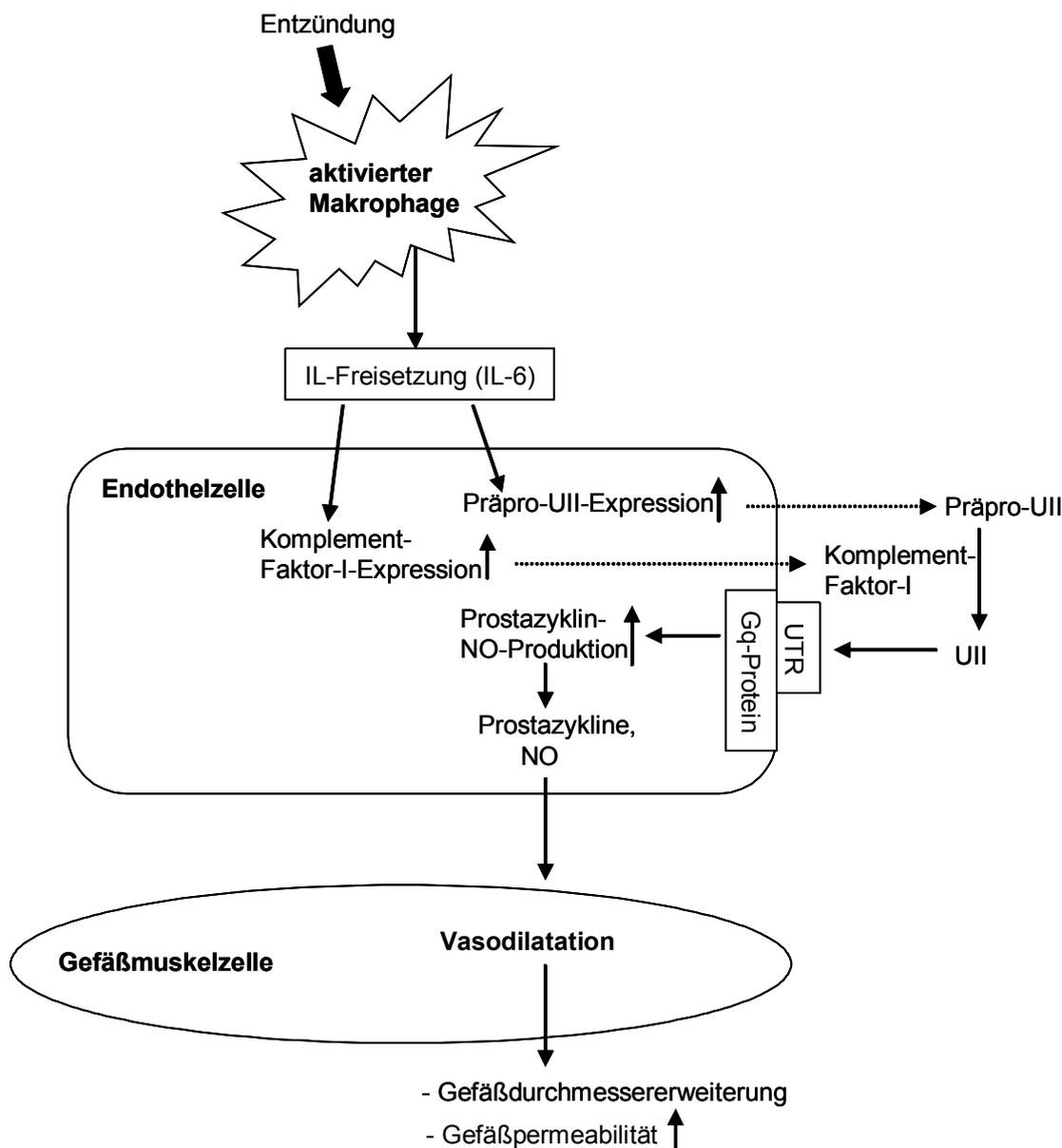


Abb.33: Entwicklung eines Modells zur Ull-vermittelten Extravasation bei einer Entzündung.

Kommt es zu einer Entzündung beispielsweise durch eine Infektion, werden Makrophagen aktiviert Zytokine zu synthetisieren. Die von den Makrophagen sezernierten Zytokine stimulieren Endothelzellen. Das Zytokin IL-6 beispielsweise bewirkt die Expression des Komplement-Faktors-I und des Präpro-Ull in den Endothelzellen. Der Komplement-Faktor-I, ein sekretorisches Protein zirkuliert im Plasma. Dort generiert es Ull, das an den UTR auf den Endothelzellen bindet und die Prostazyklin- und NO-Produktion anregt. NO diffundiert aus den Endothelzellen in die glatten Gefäßmuskulatur und bewirkt dort eine Vasodilatation. Dadurch kommt es zur Vergrößerung des Gefäßdurchmessers und die Fließgeschwindigkeit des Blutes wird verringert. Gleichzeitig wird die Gefäßpermeabilität für den Eintritt von Proteinen und Flüssigkeit ins Gewebe erhöht.

Die Extravasation ist ein vasodilatatorischer, am Endothel ablaufender Prozess. Kann es überhaupt eine Ull-Generierung durch den Komplement-Faktor-I am Endothel geben? Es gibt Hinweise, dass der Komplement-Faktor-I in Endothelzellen expremiert wird. Dies wurde anhand von Komplement-Faktor-I mRNA in HUVEC-Zellen nachgewiesen (Julen et al., 1992; Schlaf et al., 1999), gleichzeitig konnte Julen et al. zeigen, dass der Komplement-Faktor-I aus Endothelzellen sekretorisch

abgegeben wird. Präpro-Ull-mRNA konnte in Endothelzellen (Douglas et al., 2002; Totsune et al., 2003), endokardialen Endothelzellen (Douglas et al., 2002) und in Endothelzellenlinien aus Kapillaren and Arterien (Shenouda et al., 2002) nachgewiesen werden.

Wenn es einen Zusammenhang zwischen dem Immunsystem, Ull und dem Komplement-Faktor-I gibt, welche (gemeinsamen) Faktoren beeinflussen die Expression von beiden? Ein wichtiger Faktor des Immunsystems bildet das Zytokin IL-6. Es wird unter anderem von zahlreichen Zellen wie Makrophagen, Fibroblasten, T-Zellen und Endothelzellen gebildet. Eine der wichtigsten bekannten Aufgaben besteht im Auslösen der Akute-Phase-Reaktion. Dabei regt IL-6 die Synthese der Akute-Phase-Proteine wie das C-reaktive Protein, Fibrinogen, Serumamyloidprotein und mannanbindendes Lektin an (Bopst et al., 1998). Im Zusammenhang mit Ull kann IL-6 im Rattenmodell eine erhöhte Präpro-Ull-Expression auslösen (Johns et al., 2004). Schlaf et al. konnte zeigen, dass in unterschiedlichen Zelllinien von Ratten IL-6 zu einer erhöhten Expression des Komplement-Faktors-I führt (Schlaf et al., 2001).

Eine durch Legoedec et al. aufgestellte These geht davon aus, dass eine lokale Komplementexpression in muskuläre Entzündungen oder pathologische Prozesse eingebunden ist (Legoedec et al., 1995). Dem IL-6 und der Aktivierung des Komplementsystems wird eine entscheidende Rolle bei der Förderung der Herzinsuffizienz zugeschrieben (Tanner et al., 2007). Anhand der Level von C5b-9, dem terminalen Komplementkomplex, konnte Tanner et al. auf eine Komplementaktivierung bei der Herzinsuffizienz schließen. Inwieweit weitere Komplementkomponenten bei der Förderung der Herzinsuffizienz involviert sind, wurde nicht erwähnt. Eine Erklärung für die erhöhte Ull- und UT-Rezeptor-Expression in Herzmuskelzellen, Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen im Endstadium herzinsuffizienter Patienten (Douglas et al., 2002, Richards et al., 2002; Russel et al., 2003) könnte durch die IL-6-vermittelte erhöhte Expression des Komplement-Faktors-I und des Präpro-Ull verursacht sein.

Eine weitere mit Ull in Verbindung gebrachte Erkrankung ist die Hypertonie. Cheung et al. fand einen erhöhten Plasma-Ull-Level bei hypertonen Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen, der einen direkten Zusammenhang zum systolischen Blutdruck aufwies (Cheung et al., 2004). Gibt es einen Zusammenhang zwischen Ull, dem Komplement-Faktor-I und Hypertonie? Neuere Erkenntnisse sehen in der Hypertonie

einen entzündlichen Prozess (Boos und Lip, 2006). Pathophysiologische Prozesse der Hypertonie wie die Endothelschädigung führen zunächst zu einer nicht auffälligen Entzündung der Gefäße inklusive Komplementaktivierung. Das setzt einen Teufelskreis in Gang, denn es kommt zur weiteren Erhöhung des Blutdrucks und einer fortschreitenden Endothelschädigung, was wiederum die Entzündung aufrecht erhält. Engstrom et al. zeigte, dass Hypertonie in Beziehung zu low-grade Entzündungen steht. Die Komplementkomponenten C3 und C4 sind bei einer chronischen Entzündung erhöht und bei Männern mit erhöhtem C3-Level besteht ein erhöhtes Risiko, an Hypertonie zu erkranken unabhängig von anderen Risikofaktoren (Engstrom et al., 2006). Serumkonzentrationen an C3 stellen einen Risikofaktor für die Entwicklung eines Herzinfarkts (Muscarì et al., 1995) und Diabetes mellitus dar (Engstrom et al., 2005). Eine weitere entzündliche Erkrankung der Arterienwand, die Arteriosklerose, könnte ebenfalls mit dem Komplement-Faktor-I und Ull in Zusammenhang gebracht werden. Das primäre Ereignis dieser endothelialen Dysfunktion kann eine arterielle Hypertonie, Diabetes oder Hypercholesterinämie, alles Ull-assoziierte Krankheiten, sein (Totsune et al., 2003; Watanabe et al., 2001a). Hierbei kommt es zur Akkumulation von Lipiden und lipidspeichernden Makrophagen. Aber auch die Bildung einer kollagenreichen Bindegewebsmatrix gehören zum Krankheitsbild der Arteriosklerose, eine Eigenschaft die Ull bei der Hypertrophie einnimmt (Tzanidis et al., 2003). Bei der Entstehung einer Arteriosklerose wandern Monozyten durch das aktivierte Endothel in die Gefäßwand und transformieren unter Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu Makrophagen. Über Scavenger Rezeptoren nehmen diese Zellen große Mengen an Lipoproteinen, vor allem oxidiertes LDL auf und werden zu sogenannten Schaumzellen. Zusammen mit eingewanderten Lymphozyten und extrazellulär deponierten Cholesterin bilden sich subintimale Lipidablagerungen, aus denen sich im Laufe der Zeit ein Atherom bilden kann. Unter dem Einfluss von Chemokinen und Wachstumsfaktoren, freigesetzt aus Makrophagen, Endothelzellen und Thrombozyten, kommt es zur Einwanderung glatter Muskelzellen in die Subintima, dass zur Ausbildung eines fibrösen Plaques führt. Daraufhin folgt eine Einengung des Lumens, was zur koronaren Herzkrankheit führen kann (Schmidt et al., 2005). Zur Entstehung der Arteriosklerose schreibt Russell Ross in seiner „Response to injury“-Hypothese, die Initiierung des komplexen arteriosklerotischen Geschehens einer Verletzung der Arterienwand zu, ausgelöst durch die Schädigung bakterieller Toxine, Angriff von Viren oder Antigen-Antikörper-

Reaktionen. Der Schädigung der Arterienwand geht ein Angriff von Mikroorganismen voraus, für deren Bekämpfung das Komplementsystem aktiviert wird. Kommt es zu einer anhaltenden Komplementaktivierung, werden Entzündungsreaktionen eingeleitet und verstärkt (Oksjoki et al., 2003). In arteriosklerotischen Läsionen wurden eine Vielzahl unterschiedlicher Komplementkomponenten gefunden (Yasojima et al., 2001). Das durch den Komplement-Faktor-I inaktivierte iC3b, ein starkes Opsonin findet sich vor allem in verletzten und ruptierten arteriosklerotischen Plaques wieder (Laine et al., 2002). Eine erhöhte Expression an Ull und seinem Rezeptor hat man auch in humanen arteriosklerotischen Aorten gefunden. Bousette et al. konnte mittels mRNA-Analysen hohe Level an PräproUll- und UT-Rezeptor-mRNA in einem Aneurysma der Aorta abdominalis (Fehlbildung als Folge der Arteriosklerose) nachweisen. Erhöhte mRNA-Level von Ull fanden sich in Lymphozyten, während in Monozyten und Makrophagen der UT-Rezeptor vermehrt expremiert wurde (Bousette et al., 2004). Möglicherweise kommt es bei den entzündlichen Prozessen der Arteriosklerose unter den eventuellen Einfluss von Entzündungsmediatoren (z.B. IL-6) zu einer erhöhten Komplement-Faktor-I-Expression mit vermehrter Ull-Generierung.

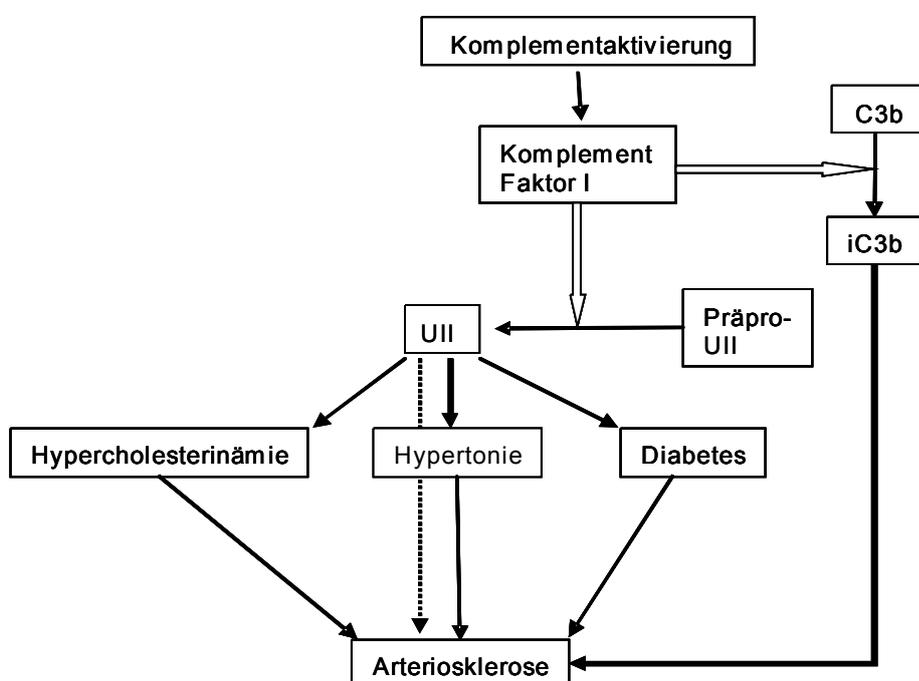


Abb.34: Modell zur Entstehung der Arteriosklerose mit Ull und dem Komplement-Faktor-I als möglichen Einflussfaktoren. In arteriosklerotischen Plaques hat man neben einer erhöhten Expression an Ull und seinem Rezeptor (Laine et al., 2002) auch vermehrt unterschiedliche Komplementkomponenten wie das iC3b, dass durch den Komplement-Faktor-I generiert wird, gefunden (Yasojima et al., 2001).

Eine weitere Fragestellung beschäftigte sich, Anhaltspunkte für Zusammenhänge zwischen Komplement-Faktor-I-Defekten und UII zu finden. Erkrankungen der Niere wie die Glomerulonephritis und das hämolytisch urämische Syndrom resultieren aus Komplement-Faktor-I-Defekten (Sadallah et al., 1999; Caprioli et al., 2006; Geelen et al., 2007). Es gibt zwei Klassen in die Komplement-Faktor-I-Defekte eingeteilt werden können: Typ 1 – das mutierte Protein ist nicht oder in geringen Mengen im Serum vorhanden, woraus ein quantitativer Effekt in der Komplementregulation resultiert. Typ 2 ist charakterisiert mit normalen Mengen an mutiertem Protein im Plasma jedoch mit funktionellem Defekt, was zum qualitativen Verlust der Komplementregulation führt. Bei dem hämolytisch urämischem Syndrom konnten Mutationen in der Serinprotease-Domäne (SP-Domäne), der CD5-Domäne (Scavenger Rezeptor Cysteinreiche Domäne) und der LDLr-Domäne (Low density Lipoprotein Rezeptor Klasse A1 und 2) gefunden werden. So haben einige Mutationen in der SP-Domäne (Mutation I322T, D501N und D506V) Einfluss auf die Funktionalität des Komplement-Faktors-I (Kavanagh et al., 2007). Die genannten Mutationen zählen zum Typ 2 und zeigen eine eingeschränkte Kontrolle der Komplement Kaskade (Kavanagh et al., 2007). Einige dieser Mutationen in der SP-Domäne (L466V+Q467G+W468X; D501N; D506V; I322T) gehen mit einer Hypertonie einher (Fremaux-Bacchi et al., 2004; Geelen et al., 2007; Kavanagh et al., 2007). Inwieweit die Mutationen einen Einfluss auf die UII-Generierung haben, müssen weitere Versuche zeigen.

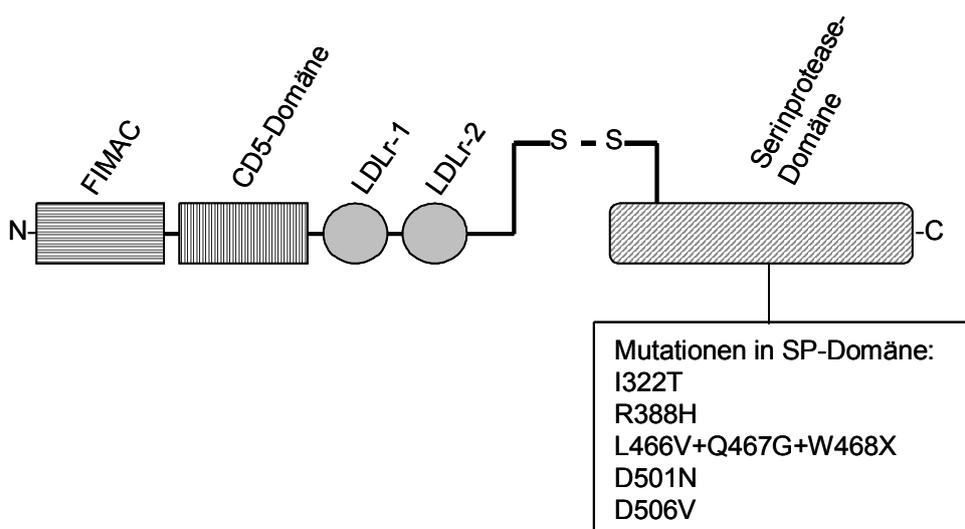


Abb.35: Domänenstruktur des Komplement-Faktors-I mit Mutationen in SP-Domäne. Die Komplement-Faktor-I-Proteine mit der Punktmutation (D501N, D506V, I322T) in der SP-Domäne werden normal exprimiert, weisen jedoch funktionelle Defekte auf. Das Protein mit der Mutation R388H ist vergleichbar mit dem Wildtyp-Protein. Die L466V+Q467G+W468X-Mutation bewirkt, dass der Komplement-Faktor-I nicht sekretorisch abgegeben werden kann (Kavanagh et al., 2007).

Neben dem hämolytisch urämisches Syndrom ist auch die Glomerulonephritis durch Hypertonie gekennzeichnet (Schettler und Greten, 1998). Genel et al. zeigte eine Komplement-Faktor-I-Defizienz, die mit einer Glomerulonephritis einherging (Genel et al., 2005). Mit Nierenerkrankungen wie der Glomerulonephritis ist auch UII assoziiert, wobei der genaue Einfluss bisher noch nicht vollständig geklärt ist (Totsune et al., 2001). Totsune et al. beschrieb zum ersten Mal bei Patienten mit Glomerulonephritis eine UII-Konzentration, die zwei- bis dreifach höher war, als die der Kontrollgruppen (Totsune et al., 2001). Erhöhte UII-Level bei diesen Erkrankungen, die auf Überproduktion oder fehlende Entfernung durch Nierenschädigung zurückgehen, könnte ein Grund für die Hypertonie bei diesen Erkrankungen sein.

In der Studie von Ames et al. fanden sich erhöhte UII-Werte bei Patienten mit chronischem Nierenversagen. Auch hier ist nicht geklärt, woraus die erhöhten UII-Werte resultieren (Ames et al., 1999). Zoccali et al. fand niedrige Konzentrationen von UII bei hohen Mengen an Plasma Fibrinogen, einem Akute Phase Protein in Patienten mit Niereninsuffizienz (Zoccali et al., 2006). Denkbar ist eine verminderte UII-Generierung resultierend aus einem Komplement-Faktor-I-Defekt. Theoretisch ist davon auszugehen, dass Komplement-Faktor-I-Defekte ohne Einfluss auf die SP-Domäne UII generieren können. Bei Defekten in der SP-Domäne müsste entweder eine geringere UII-Generierung erfolgen oder überhaupt keine. Diesen Sachverhalt werden geplante Experimente zeigen müssen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Hinweise, dass der Komplement-Faktor-I in der Lage ist, UII zu generieren. Bisher konnte dem UII keine eindeutige Funktion im Menschen zugeschrieben werden. Mit dieser Arbeit ist es gelungen, ihm eine Funktion als Mediator im Immunsystem zu zuweisen. UII kann die biologischen Effekte der Komplementaktivierung, die Extravasation und Vasokonstriktion, hervorrufen (Vergura et al., Gendron et al., 2004). Anhand der Ergebnisse der Arbeit ist davon auszugehen, dass der Komplement-Faktor-I das alleinige Enzym im Plasma ist, das für die UII-Generierung verantwortlich ist. Pathophysiologisch ist der Komplement-Faktor-I ebenso wie UII in entzündliche Erkrankungen wie Arteriosklerose (Laine et al., 2002; Yasojima et al., 2001) und Hypertonie (Cheung et al., 2004; Boos und Lip, Engstrom et al., 2006) involviert. Komplement-Faktor-I-Defekte sind assoziiert mit Erkrankungen der Niere, wie dem hämolytisch

urämischen Syndrom und der Glomerulonephritis, Erkrankungen mit einhergehender Hypertonie, die mit Ull assoziiert ist.

Abschließend konnte mit dieser Arbeit erfolgreich ein UCE, der Komplement-Faktor-I identifiziert und gleichzeitig eine Verbindung zwischen dem Komplementsystem als Teil des Immunsystems und Ull als vasoaktives Peptid aufgezeigt werden.