

**Untersuchung der proteolytischen
Prozessierung von humanen
Urotensin-Peptiden**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
eingereicht am
Department Chemie
Universität Hamburg

von

Maria Trusch

aus Berlin

Hamburg, Juni 2010

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christian Betzel
Prof. Dr. Hartmut Schlüter

Tag der Disputation: 27. August 2010

Diese Arbeit wurde in der Zeit von September 2007 bis August 2008 an der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Klinik für Nephrologie und in der Zeit von September 2008 bis Juni 2010 am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Institut für Klinische Chemie im Arbeitskreis Massenspektrometrische Proteomanalytik unter Anleitung von Prof. Dr. Hartmut Schlüter angefertigt. Die Arbeit wurde zudem von Prof. Dr. Dr. Christian Betzel vom Department Chemie der Universität Hamburg betreut.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
1.1	Urotensin-II.....	5
1.1.1	Generierung von humanem Urotensin-II	6
1.1.2	Urotensin-II-Rezeptor	7
1.1.3	Physiologische und pathophysiologische Funktion von UII	8
1.2	Das Komplementsystem.....	10
1.3	Komplementfaktor I (CFI).....	13
1.3.1	Mutationen des Komplementfaktor I.....	14
1.4	Problemstellung	16
2	MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1	Aufreinigung des Komplementfaktor I	17
2.1.1	Lysin-Sepharose-Säule zur Abreicherung von Plasmin und Plasminogen	18
2.1.2	Antikörper-Affinitätschromatographie zur Abreicherung unspezifisch bindender Proteine ...	18
2.1.3	CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie	19
2.1.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen mit der Methode nach Bradford.....	19
2.1.5	Nachweis des CFI per PAGE Western Blot	19
2.2	Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen einer Proteinfraction	20
2.2.1	Tryptischer Verdau von Proteinen	20
2.2.2	Probenvorbereitung mit Reversed Phase-Chromatographie/ Mikroextraktion.....	20
2.2.3	Massenspektrometrische Analyse der tryptischen Peptide.....	21
2.2.4	Identifizierung der Proteine mittels Datenbankabfrage	21
2.3	Immobilisierung von Proteinen.....	23
2.3.1	Immobilisierung von Proteinfractionen	23
2.3.2	Immobilisierung von Proteinen aus humanem Plasma	23
2.3.3	Immobilisierung von Antikörpern	24

Inhaltsverzeichnis

2.4	Massenspektrometrie-basierter-Enzymassay zur Detektion von Urotensin-II-generierender sowie C3b-abbauender Aktivität.....	25
2.4.1	Quantifizierung von Peptiden über LC-MS-SRM.....	26
2.4.1.1	Massenspektrometrische Parameter zur Quantifizierung von UII mit der SRM-Methode mittels ESI-IT-MS	26
2.4.1.2	Chromatographieparameter für die Quantifizierung von UII mittels ESI-IT-MS	27
2.4.1.3	Massenspektrometrische Parameter zur Quantifizierung von UII mit der SRM-Methode mittels ESI-QQQ-MS	28
2.4.1.4	Chromatographieparameter für die Quantifizierung von UII mittels ESI-IT-MS	28
2.4.1.5	Bestimmung der massenspektrometrischen Parameter zur Quantifizierung von C3b-R mit der SRM-Methode mittels ESI-IT-MS	29
2.4.1.6	Chromatographieparameter für die Quantifizierung von C3b-R mittels ESI-IT-MS	30
2.4.2	Analyse der MES-Reaktionsprodukte mittels MALDI-TOF-MS.....	30
2.4.3	Zyklisierung und Aufreinigung des UII_21-124 und des UII_95-124.....	31
2.4.4	Bestimmung der Enzymaktivitäten immobilisierter Proteine	32
2.4.4.1	Bestimmung der Enzymaktivitäten immobilisierter Proteine mit ESI-IT-SRM.....	32
2.4.4.2	Bestimmung der Enzymaktivitäten immobilisierter Proteine mit ESI-QQQ-SRM.....	32
2.4.4.3	Bestimmung der Enzymaktivitäten immobilisierter Proteine mit MALDI-TOF-MS	32
2.4.4.4	Bestimmung von Enzymaktivitäten in Anwesenheit des Inhibitors PK 15.....	33
2.4.5	Bestimmung der Enzymaktivität von rekombinant exprimiertem CFI.....	33
2.5	Versuche zur Identifizierung möglicher Urotensin-Vorläuferpeptide	34
2.5.1	Inkubation des UII_21-104 mit Plasmaproteinen	34
2.5.2	Inkubation des UII_85-105 mit Plasmaproteinen	35
2.6	MS-unabhängige Verfahren zur Bestimmung von Enzymaktivitäten	35
2.6.1	Bestimmung der C3b-abbauenden Aktivität des CFI	35
2.6.1.1	Gelelektrophorese und Western Blot zum Nachweis der Spaltung des C3b.....	36
2.6.2	Fluoreszenz-basierter Assay zur Bestimmung der Enzymaktivität des CFI	36
2.7	Bestimmung der UII-Konzentration in humanem Plasma	37
2.8	Material	38
2.8.1	Geräte.....	38
2.8.2	Chemikalien	39
2.8.3	Biomaterialien	40
2.8.4	Software.....	41

Inhaltsverzeichnis

3	ERGEBNISSE	42
3.1	Reinigung des Komplementfaktor I über eine Antikörper-Affinitätschromatographie	42
3.1.1	Reinigung des Komplementfaktor I aus humanem Plasma	42
3.1.2	Nachweis der proteolytischen Aktivitäten der Komplementfaktor I-haltigen Fraktion aus humanem Plasma.....	46
3.1.3	Reinigung des Komplementfaktor I aus der humanen Cohn-Fraktion IV-4	48
3.1.4	Nachweis der proteolytischen Aktivitäten der Komplementfaktor I-haltigen Fraktion aus der humanen Cohn-Fraktion IV-4	52
3.1.5	Identifizierung von Proteinen mit LC/MS	56
3.2	Nachweis der proteolytischen Aktivitäten von rekombinant exprimiertem Komplementfaktor I	61
3.3	Nachweis proteolytischer Aktivitäten in humanen Plasmaproben	64
3.3.1	Nachweis von Urotensin-II-generierender und C3b-abbauender Aktivität im Plasma Dialysepflichtiger Patienten	64
3.3.2	Nachweis von Urotensin-II-generierender Aktivität im Plasma von Patienten mit diabetischer Nephropathie	67
3.4	Nachweis der Urotensin-II-generierenden Aktivität im Plasma von Komplementfaktor I-defizienten Patienten	68
3.5	Untersuchung der Prozessierung des Urotensin-II-Vorläuferpeptids	71
3.6	Urotensin-II-generierende Aktivität von Plasma-Kallikrein	80
3.6.1	Inhibition der Urotensin-II-generierenden-Aktivität mit einem Plasma-Kallikrein-Inhibitor	85
4	DISKUSSION	89
5	LITERATUR	109
6	ANHANG	125
6.1	Chromatogramme und Tabellen	125
6.2	Gefahrstoffinformationen	132
6.3	Abkürzungsverzeichnis	133

Inhaltsverzeichnis

7	ZUSAMMENFASSUNG	135
8	SUMMARY.....	137
	CURRICULUM VITAE	139
	PUBLIKATIONEN	141
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	143
	DANKSAGUNG.....	144

1 Einleitung

1.1 Urotensin-II

Urotensin-II (UII) ist ein zyklisches Peptidhormon des neurosekretorischen sowie des kardiovaskulären Systems. Es wurde erstmals 1980 aus dem Rückenmark von Knochenfischen [1] und kurz darauf auch aus vielen weiteren Fisch-Arten [2, 3] isoliert. Später wurde Urotensin-II auch in Tetrapoden wie Fröschen [4], Mäusen und Ratten [5] sowie dem Schwein [6] nachgewiesen. Die Isolierung von Urotensin-II aus menschlichem Gewebe erfolgte erstmals 1998 [7]. Die Länge von aktivem humanen UII beträgt 11 Aminosäuren (AS). Es enthält eine evolutionsgeschichtlich stark konservierte Region am C-Terminus, welche über eine Disulfidbrücke an zwei Cysteinresten zu einer Ringstruktur geformt ist (Abbildung 1.1) [1].

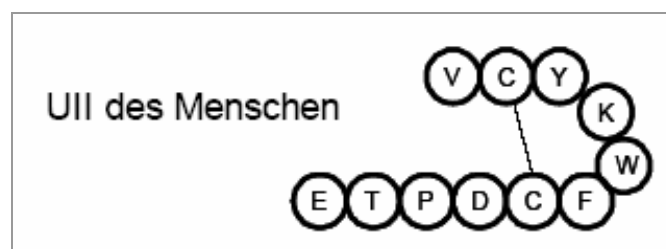


Abbildung 1.1: Aminosäuresequenz von humanem Urotensin-II. Zwei Cysteinreste sind über eine Disulfidbrücke verknüpft [8].

Diese Ringstruktur ist essenziell für die biologische Aktivität des Peptidhormons, die reduzierte, nicht-zyklische Form zeigt keine Aktivität [3]. Anders als die Sequenz des C-Terminus scheinen die Aminosäuren am N-Terminus des Peptids für die biologische Aktivität nicht relevant zu sein [9], sie variieren je nach Spezies in Sequenz und Länge [10, 11].

Sugo *et al.* entdeckten 2003 ein weiteres Peptid der Urotensin-II-Familie, das Urotensin-related Peptid (URP). Ursprünglich aus dem Gehirn der Ratte isoliert, konnte die cDNA des URP auch im Menschen nachgewiesen werden. Während die Sequenzen der Vorläufer-Proteine von UII und URP nur mäßige Homologie aufweisen, sind die Sequenzen der sieben C-terminalen Aminosäuren der Peptide identisch, auch URP bildet die für Urotensin-II typische Ringstruktur aus [12].

1.1.1 Generierung von humanem Urotensin-II

Humanes UII (hUll) wird aus einem inaktiven Vorläufer, dem Prepro-Ull gespalten. Es sind zwei Proteinspezies dieses Vorläufers bekannt, welche 124 bzw. 139 AS lang sind und durch alternatives Splicing entstehen [13]. Ull-mRNA wurde unter anderen im Gewebe von Herz, Aorta, Gefäßendothelzellen, Leukozyten, Gehirn, Rückenmark, Niere, Lunge, Leber, Nebenniere, Hypophyse, Milz, Dünndarm, Dickdarm und Plazenta nachgewiesen [12, 14-17]. Eine 20 Aminosäuren lange Sequenz wurde als N-terminales Signalpeptid für die Sekretion des Proteins annotiert [18].

Über die weitere Prozessierung des 104 Aminosäuren langen Urotensin-Precursorproteins (Ull₂₁₋₁₂₄) ist bisher wenig publiziert. Takahashi *et al.* konnten im Überstand von Karzinomzellen aus der Nebenniere nach einer Reversed Phase-Chromatographie drei Fraktionen mit Ull-ähnlicher Immunreaktivität nachweisen, sodass hier vermutlich mindestens drei verschiedene molekulare Formen von Ull-ähnlichen Molekülen vorliegen [19]. Dabei muss es sich aber nicht zwingend um Vorläuferpeptide des aktiven Ull handeln, auch das URP zeigt eine Ull-ähnliche Immunreaktivität, wird also in einem Antikörper-basierten Ull-Assay erkannt. Das URP wurde jedoch erst nach der Arbeit von Takahashi *et al.* identifiziert [12].

Seidah *et al.* postulierten die Prozessierung von bioaktiven Proteinen und Peptiden durch Vorläufer-Konvertasen (Precursor Convertases, PC), welche nach einzelnen oder doppelten basischen Aminosäureresten spalten [20]. Daraufhin überprüften Chartrel *et al.* die Existenz von 16 bzw. 19 Aminosäuren langen Urotensin-II-Vorläuferpeptiden in humanem Gewebe des Hirnstamms und Rückenmarks, ausgehend von der Spaltung hinter den Aminosäuren Arg⁸⁵ und Lys⁸⁸ des Urotensin-Precursors [21]. Obwohl der Aminosäurerest Arg⁸⁵ hoch konserviert ist [5-7, 22] und einzelne Lysin-Reste in die Prozessierung vieler biologisch aktiven Peptide involviert sind [23], konnten beide Schnittstellen in diesem experimentellen Ansatz nicht bestätigt werden. Die Autoren postulierten daraufhin, dass die dibasischen Sequenzen RK⁵⁰ und RK⁶⁶ als Spaltstelle fungieren könnten. Diese Annahme konnte jedoch bisher nicht experimentell bestätigt werden.

Auch das Urotensin-II-generierende Enzym (Urotensin-converting enzyme, UCE), welches das aktive, 11 Aminosäuren lange Peptid aus einem inaktiven Vorläuferpeptid durch proteolytische Spaltung generiert, ist nur wenig untersucht. Russel *et al.* beschreiben eine solche Aktivität als Furin-ähnliches Enzym. Die Autoren konnten

zeigen, dass die rekombinant exprimierten Proteasen Furin und Trypsin aus dem Ull-Vorläufer das aktive Ull generieren können. Des Weiteren fanden sie eine UCE-Aktivität sowohl intrazellulär in humanen Zellen als auch in humanem Blut, jedoch nur sehr geringe Aktivität auf der Zelloberfläche. Die UCE-Aktivität im Blut ließ sich durch den Serinprotease-Inhibitor Aprotinin hemmen [24]. Thiemann identifizierte in einer zur nahen Homogenität gereinigten Ull-generierenden Fraktion aus dem Nierengewebe des Schweins die Proteindisulfidomerase A3 als Urotensin-generierende Protease [8]. Kurzawski isolierte und identifizierte aus einer humanen Plasmaprotein-Fraktion den Komplementfaktor I (Complement factor I, CFI) als UCE, bisher konnte seine physiologische Relevanz jedoch nicht gezeigt werden [25].

1.1.2 Urotensin-II-Rezeptor

Urotensin-II aktiviert den Urotensin-II-Rezeptor (UTR), einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor mit 7 Transmembrandomänen [13, 26]. Struktur-Funktions-Analysen am Urotensin-II der Knochenfische zeigten, dass die Interaktion zwischen Ull und dem UTR von dem Lysin-Rest des Ull ausgeht, welches sich einem Asparagin-Rest der Transmembrandomäne 3 des UTR nähert. Auch die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin des zyklischen Motivs des Ull sind essentiell für die Bindung des Ull an den UTR [9]. Ull interagiert mit den extrazellulären Loops II und III des humanen UTR, nicht jedoch mit dem Loop I [27]. Die Bindung von Ull an den UTR wird als pseudo-irreversibel beschrieben, da Ull und UTR nur sehr langsam dissoziieren [28-30].

Der UTR wird in neuronalem Gewebe, aber auch in peripheren Geweben wie Gefäßen, Herz, Leber, Lunge, Niere und Skelettmuskulatur exprimiert [15, 31, 32]. Neben Ull ist das URP ein weiterer endogener Ligand des UTR [12].

Seit der Entdeckung des UTR ist die Entwicklung von Agonisten und Antagonisten ein wichtiges Feld der Pharmakologie geworden, als besonders vielversprechend erwiesen sich hierbei die UTR-Antagonisten (siehe Review [33]) wie Palosuran (Actelion Pharmaceuticals Ltd.). Dieser nicht-peptidische, kompetitive Inhibitor war der erste Ull-Antagonist, der am Menschen getestet wurde [34, 35]. In Tierversuchen bewirkte er eine verbesserte Durchblutung der Niere sowie die Verzögerung von Komplikationen bei Diabetes wie Nierenschädigungen und der Entwicklung einer Proteinurie [34, 35]. In ersten klinischen Studien zeigte Palosuran bei gesunden männlichen Probanden eine gute Verträglichkeit, eine Veränderung der untersuchten klinischen Parameter

(Ausscheidung von Natrium- und Kaliumionen) konnte jedoch ebenfalls nicht beobachtet werden [36].

1.1.3 Physiologische und pathophysiologische Funktion von UII

UII stimuliert die Vasokonstriktion sowie die Vasodilatation in Abhängigkeit vom vaskulären Bett und vom Zustand des Endotheliums [37]. In *in vitro*-Studien mit humanen Blutgefäßen verursachte UII je nach Versuchsaufbau eine Vasokonstriktion, eine Vasodilatation oder auch keine signifikante Veränderung [38-40].

Die Bindung von UII an den Urotensin-II-Rezeptor (UTR) löst einen Phospholipase-C-abhängigen Anstieg von Inositolphosphaten und an einen Anstieg von intrazellulären Kalziumionen (Ca^{2+}) aus [13, 41]. Die erhöhte zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration führt zur Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen. Außerdem aktiviert UII die GTPase RhoA und damit die RhoA-Kinase und induziert so die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen [42].

Bei Studien am Menschen zeigte UII verschiedene zum Teil widersprüchliche Effekte. Maguire *et al.* konnten durch hUII induzierte Kontraktion humaner, vom Endothel befreiter Venen und Arterien schon beim Einsatz sehr geringer UII-Konzentrationen nachweisen. Der maximale kontraktile Effekt war dabei geringer als der des starken Vasokonstriktors Endothelin-1 [43]. Bennett *et al.* konnten dagegen in pulmonären Arterien unabhängig vom vaskulären Bett keine Kontraktion beobachten [44]. Nach der Inhibition der NO-Synthase durch den NO-Synthaseantagonisten L-NAME (N-nitro-L-argininmethylester) fanden MacLean *et al.* eine Kontraktion bei 30 % der untersuchten humanen pulmonären Arterien [45]. Stirrat *et al.* berichten von einem vasodilatatorischen Effekt von hUII in humanen pulmonären Arterien, die zuvor mit 5-Hydroxytryptamin kontrahiert wurden [40].

Auch bei *in vivo*-Versuchen am Menschen zeigen sich große Varianzen. Böhm *et al.* konnten nach Infusion von UII in die Oberarm-Arterie eine dosisabhängige Verringerung des Blutflusses im Oberarm von bis zu 30 %, jedoch keine systemischen Wirkungen wie eine Veränderung der Herzfrequenz oder eine Verringerung des Blutflusses im anderen Arm beobachten [46]. Sie führten dieses Ergebnis auf eine durch UII bedingte, starke lokale Vasokonstriktion zurück. Affolter *et al.* hingegen konnten bei intravenöser Injektion keine Änderung der hämodynamischen Parameter inklusive des Blutdrucks feststellen [47]. Die Autoren postulierten, dass UII im Menschen keine entscheidende Rolle in der

Blutdruckregulation einnimmt. Es blieb jedoch zunächst unklar, ob die beobachteten Unterschiede zwischen den Studien durch den jeweiligen Versuchsaufbau und verschiedene Patientengruppen verursacht wurden. Um dieser Frage nachzugehen, veröffentlichte die Gruppe um Wilkinson im Jahr 2009 eine weitere *in vivo*-Studie, bei der das Alter der Patientengruppen an die der Veröffentlichung von Böhm *et al.* angeglichen wurde und die Infusion von UII ebenfalls in die Oberarm-Arterie erfolgte [48]. Die Autoren konnten keine Veränderung des Blutflusses im Unterarm feststellen. Sie beobachteten dagegen einen signifikanten Anstieg des systolischen Blutdrucks und einen leichten Anstieg der Herzfrequenz, der allerdings bei Infusion des UII-Antagonisten Urantide [49] auftrat, weshalb diese Veränderungen der hämodynamischen Parameter wohl nicht auf eine UII-bedingte Modulation des UTR zurückzuführen ist.

Erhöhte Urotensin-II-Immunreaktivitäten im Blutplasma wurden bei Patienten mit verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet. Dazu gehören unter anderem Herzversagen [50-52], Bluthochdruck [53, 54], renale Dysfunktion [17] und Diabetes mellitus [16].

Andere Studien konnten eine erhöhte Expression von UII in einigen Geweben belegen. Während gesunde koronare Arterien negativ für UII-Immunreaktivität waren, konnte eine Färbung bei Endothelzellen und arteriosklerotischen koronaren Arterien nachgewiesen werden [55, 56]. Bei Kardiomyozyten von gesunden Probanden fanden Douglas *et al.* nur leichte Immunreaktivitäten, während diese bei Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz deutlich erhöht waren [57].

Obwohl die Konzentration von UII im Plasma bei verschiedenen Krankheitszuständen erhöht ist, wird auch eine kardioprotektive Wirkung von UII diskutiert. Hohe UII-Level korrelieren beispielsweise mit besseren Überlebensraten bei akutem Myokardialinfarkten [58] und chronischen Nierenkrankheiten [59]. Die Mechanismen dieser protektiven Wirkung sind nicht bekannt. Es wird vermutet, dass die vasodilatatorischen Eigenschaften des UII in Gefäßen mit geschädigtem Endothel nach Organschädigung eine kardioprotektive Wirkung entfalten [59].

Inflammatorische Zellen scheinen ebenfalls eine Quelle für die UII-Expression zu sein. So wurde in Lymphozyten eine hohe mRNA-Expression gefunden, während Monozyten, Macrophagen und Schaumzellen deutlich geringere Expressionslevel aufweisen [14]. Eine positive immunreaktive Färbung wurde außerdem in inflammatorischen Zellen bei arteriosklerotischen Läsionen der Aorta und der koronaren Arterien gefunden [55]. Die

Expression des UTR ist in Lymphozyten deutlich geringer als in Monozyten oder Macrophagen [14]. Die Tatsache, dass Lymphozyten hohe Expressionslevel sowohl für Ull als auch für den UTR aufweist, deutet auf eine autokrine und/oder parakrine Wirkungsweise des Ull hin.

1.2 Das Komplementsystem

Der Komplementfaktor I (CFI) wurde von Kurzawski als Urotensin-generierendes Enzym (UCE) beschrieben [25]. Der CFI ist Teil des Komplementsystems, einer Gruppe von etwa 35 löslichen und Zelloberflächen-Proteinen, welche interagieren, um eindringende Mikroorganismen oder veränderte Wirtszellen (z.B. apoptotische oder nekrotische Zellen) zu erkennen, zu opsonieren und zu beseitigen [60]. Das Komplementsystem erkennt Targets durch multiple schwache Interaktionen zwischen Erkennungsproteinen des Komplements und Ladungen oder Kohlenhydraten auf der Targetoberfläche. Für diese Erkennung werden drei überlappende Erkennungswege benutzt (siehe Abbildung 1.2).

Der klassische Weg des Komplementsystems (Abbildung 1.2) wird durch eine Aktivierung des Komplementfaktors C1 gestartet. C1 besteht aus drei Untereinheiten: C1q, C1s und C1r, wobei C1q eine spezifische Bindungsdomäne für den Fc-Teil der Immunglobuline (Ig) enthält. Diese ist spezifisch für gebundene, nicht aber frei zirkulierende IgM und IgG, sodass C1 nur durch Antigen-gekoppelte Antikörper aktiviert wird. Die Bindung eines Antikörpers bewirkt eine Aktivierung der Untereinheit C1r, welche dann C1s proteolytisch zu einer aktiven Protease spaltet. Aktives C1s bewirkt eine Spaltung von C2 in C2a und C2b sowie C4 in C4a und C4b. C2a und C4b lagern sich zusammen und bilden den Komplex C4b2a, welcher als C3-Konvertase des klassischen Weges fungiert und C3 zu C3a und C3b spalten kann [61].

Einleitung

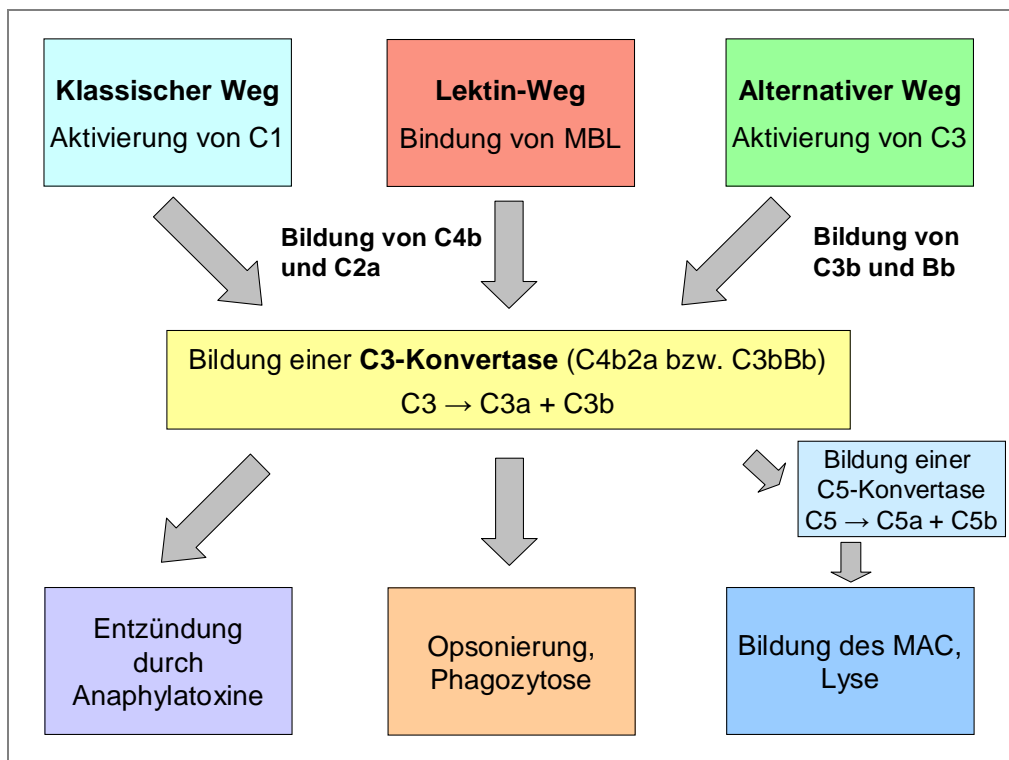


Abbildung 1.2: Allgemeine Übersicht der Aktivierungswege und der Effekte des Komplementsystems. Verwendete Abürzungen: MBL: Mannose-bindendes Lektin; C1, C2a, C3, C3a, C3b, C4b, C5, C5a, C5b: Komplementkomponenten, Bb: aktivierter Faktor B.

Im Lektin-Weg (Abbildung 1.2) bindet das Mannose-bindende Lektin (MBL) an Kohlenhydratstrukturen auf den Oberflächen von Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilzen [62, 63] und aktiviert dann die Mannose-assoziierte Serin-Protease MASP2 [64], welche die Spaltung von C2 und C4 katalysiert [65, 66]. Es entsteht wie im klassischen Weg der Komplex C4b2a. Es wurden die zu MASP2 homologen Proteasen MASP1 [67] und MASP3 [68] identifiziert, ihre genaue Funktion ist jedoch noch unklar.

Der alternative Weg (Abbildung 1.2) unterscheidet sich stark von den anderen beiden Aktivierungswegen. Hier wird C3 nach der Hydrolyse seines internen Thioesters zu C3i (oder C3[H₂O]). C3i bildet einen Komplex mit Faktor B und wird zu C3iB. In diesem Komplex wird Faktor B (FB) von Faktor D (FD) unter Bildung von C3iBb gespalten. Das im Komplex verbleibende Fragment des FB enthält eine Serinprotease und spaltet C3 zu C3a und C3b. C3b bindet zufällig an in der Nähe befindliche Oberflächen. Ist C3b kovalent auf der Targetoberfläche gebunden, kann es weitere Moleküle des FB binden. Es entsteht der Komplex C3bBb, die C3-Konvertase des alternativen Weges, welche durch Properdin [69] stabilisiert wird. Die C3-Konvertase bildet wiederum neues C3b,

wodurch die Zelloberfläche des pathogenen Organismus schnell stark opsoniert wird [70].

Am Ende aller drei Wege steht die Aktivierung einer C3-Konvertase, die C3 in C3a und C3b umsetzt. C3b hat für das Komplementsystem eine zentrale Rolle. Einerseits bewirkt es eine positive Rückkopplung des alternativen Weges, bei dem die bereits erwähnte Opsonierung der fremden Zellen eine Phagozytose einleitet. Andererseits kann C3b an die C3-Konvertase binden und so die trimolekularen Komplexe C4b2a3b oder C3Bb3b bilden. Diese wirken als C5-Konvertase welche C5 zu C5a und C5b umsetzt. Das Spaltprodukt C5b leitet die Bildung eines Membranangriffkomplexes (MAC) ein, welcher die Zielzelle durch Porenbildung attackiert und zu einer Lyse führt.

Die Spaltprodukte C3a, C2b, C4a und C5a wirken als Anaphylatoxine und chemotaktische Faktoren zur Anlockung von neutrophilen Granulozyten, welche ihrerseits in der Lage sind, Mikroorganismen durch Phagozytose zu zerstören [70].

Die Bildung von C3b-Clustern und MACs darf jedoch nur auf fremden oder krankhaften Strukturen erfolgen, um gesunde Zellen des Wirtsorganismus nicht zu schädigen. Auf dessen Oberflächen bildet C3b Komplexe mit Faktor H. Dieser Komplex wird durch den Faktor I (Complement factor I, CFI) unter Entlassung von Faktor H (FH) gespalten [71]. Bindet Faktor H statt Faktor B, kommt es nicht zu einer Bildung von C3b-Clustern auf der Targetoberfläche oder einer Verstärkung der Bildung von C3b durch C3bBb. Auch C4b kann durch CFI zu C4c und C4d gespalten werden, hierfür dient das C4-bindende Protein (C4bBP) als Cofaktor [72]. Für die Spaltung von C3b und C4b dienen zusätzlich die Membranproteine MCP (membrane cofactor protein) und DAF (decay acceleration factor) als Cofaktoren. DAF bewirkt den Zerfall der Komplexe C4b2a bzw. C3bBb, MCP bindet das freie Molekül C3b oder C4b und ermöglicht die Spaltung durch CFI.

1.3 Komplementfaktor I (CFI)

Der CFI ist ein Regulator des Komplementsystems. Durch die Inaktivierung der C3-Konvertasen verhindert CFI den permanenten Abbau von C3 zu C3b. Er ist eine von sieben Serinproteasen des Komplementsystems [73, 74] und wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert [75]. Im Gegensatz zu anderen Plasmaproteasen wurde *in vitro* kein zirkulierendes Zymogen beobachtet. Die zirkulierende, aktive Form des CFI ist 565 Aminosäuren lang und besteht aus einer schweren (50 kDa) und einer leichten (38 kDa) Untereinheit, welche durch eine Disulfidbrücke zwischen den Aminosäureresten 309 und 435 kovalent verbunden sind (vgl. Abbildung 1.3) [76-78].

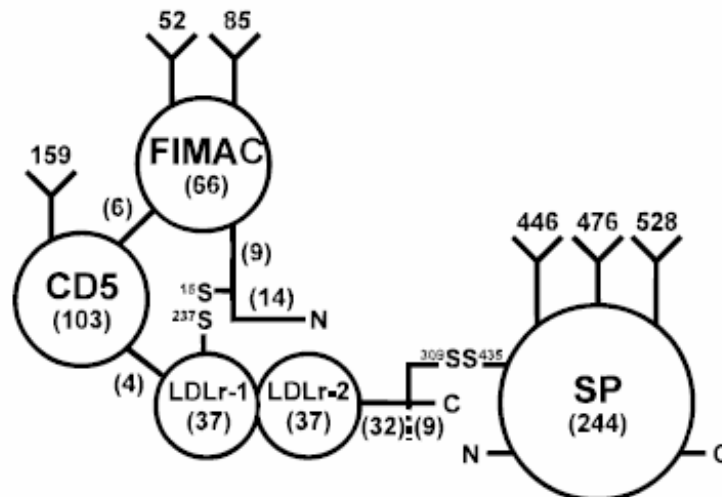


Abbildung 1.3: Struktur des CFI und seiner 5 Domänen (in Kreisen). Die Anzahl der Aminosäuren der jeweiligen Domäne oder des Linkers, der die Domänen verbindet, ist in durch die Zahlen in Klammern angegeben. Die N- und C-Termini der beiden Ketten sind durch ein „N“ bzw. „C“, Disulfidbrücken durch ein „SS“ indiziert. Y: Potentielle N-Glykosylierungs-Site mit Angabe des Aminosäurerests. (aus [83])

Die leichte Untereinheit enthält die Serinproteasedomäne (SP) mit einer sehr begrenzten Schnittspezifität nach zwei Argininresten des C3b [79] bzw. C4b [72] in Anwesenheit der oben beschriebenen Cofaktoren. Tsiftoglou *et al.* konnten zeigen, dass der CFI kleine synthetische Substrate auch in Abwesenheit von Cofaktoren spalten kann [80]. Für diese Spaltung ist die gereinigte leichte Kette des Proteins ausreichend. Die Spaltung des natürlichen Substrats jedoch verläuft in Abwesenheit der schweren Kette langsamer, weniger spezifisch und unabhängig vom FH, was auf eine Interaktion der großen

Untereinheit mit dem Cofactor und dem Substrat sowie eine Funktion in der Ausrichtung der kleinen Untereinheit zur Schnittstelle im C3b hindeutet [80]. Die schwere Kette enthält mehrere Domänen (vgl. Abbildung 1.3): die N-terminale FIMAC-Domäne (factor I membrane attack complex domain), eine CD5-Domäne, sowie zwei LDLr-Domänen (lowdensity lipoprotein receptor, LDLr-1 und -2) [81]. Insbesondere die FIMAC-Domäne scheint bei der Substraterkennung und -bindung eine entscheidende Rolle zu spielen [82].

Beide Ketten des CFI enthalten je drei potentielle N-Glykosylierungspositionen an den Resten der Aminosäure Asparagin an den Positionen 52, 85 und 159 der schweren sowie an den Positionen 446, 476 und 528 der leichten Kette [77]. Die Differenz zwischen dem per SDS-PAGE bestimmten Molekulargewicht (MW) von etwa 88 kDa und dem aus der Aminosäuresequenz berechneten MW von etwa 63 kDa lässt auf eine Glykosylierung aller 6 potentiellen Sites schließen [84].

Der CFI enthält überwiegend komplexe biantennäre, stark sialysierte Glykane [85, 86]. Eine komplette Deglykosylierung bewirkt eine starke Verringerung der Löslichkeit des Proteins, was auf eine Funktion der Glykane bei der Ausbildung einer Hydrathülle hinweist [86]. Die Glykane haben jedoch keinen Einfluss auf die Funktionalität des CFIs, die proteolytischen Aktivitäten des glykosylierten sowie des teilweise deglykosylierten Proteins unterscheiden sich nicht wesentlich [86].

1.3.1 Mutationen des Komplementfaktor I

Homozygote Mutationen des CFI-Gens sind äußerst selten. Weltweit sind nur etwa 35 Fälle aus 24 Familien mit einer Defizienz des CFI bekannt [87]. Patienten mit diesem erblich bedingten, autosomal rezessiv vererbten Mangel an CFI zeigen eine deutlich erhöhte Anfälligkeit für Krankheiten, insbesondere durch pyogene Bakterien.

Durch den Mangel an CFI können C3b und C4b nicht gespalten werden, wodurch die Regulierung der C3-Konvertasen gestört ist. Die dauerhafte Aktivität von C3-Konvertasen führt zu einem ständigen Verbrauch von C3. Hierdurch entsteht ein Mangel an zirkulierendem C3, welches dann zur Opsonierung fremder Oberflächen fehlt.

Die Folgen dieses erworbenen C3-Mangels entsprechen denen der angeborenen C3-Defizienz, wiederkehrende Infektionen der Atemwege, des Darms, der Haut und anderer Organe sind die Regel. Ohne prophylaktische Behandlung mit Breitband-Antibiotika

sterben die Patienten oft noch vor dem Eintritt in das Erwachsenenalter. Durch eine entsprechende Behandlung erhöht sich die Lebenserwartung beträchtlich [88, 89].

Weiterhin ist bei CFI-defizienten Patienten eine atypische Form des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) beschrieben. Bei HUS handelt es sich um eine seltene Krankheit, deren Symptome mikroangiopathische hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und Nierenversagen sind, der Auslöser sind meist bakterielle Toxine [90, 91]. Von einem atypischen HUS wird ausgegangen, wenn die Ursachen der Krankheit nicht auf bakterielle Toxine zurückzuführen sind. Bei Mutationen in verschiedenen regulatorischen Komplementproteinen ist ein Zusammenhang mit dem aHUS beschrieben [92]. Die unregulierte Komplementaktivierung führt zu einem koagulationsförderndem Milieu an Endothelzellen, was die Bildung von Fibrin und Mikrothromben bewirkt [93].

Es gibt jedoch auch Patienten mit homozygoter Defizienz des CFI, die nicht die charakteristischen Symptome wie wiederkehrende Infektionen oder aHUS ausbilden [94]. Bei diesen Patienten wird die CFI-Defizienz nur durch die enge Verwandtschaft zu CFI-defizienten Patienten mit Symptomen erkannt.

Die molekularen Ursachen für die Defizienz des CFI sind vielfältig. Beschrieben sind Mutationen in verschiedenen Domänen des Proteins mit entsprechend unterschiedlichen Folgen. Diese reichen von gestörter Expression und Sekretion des Proteins bis hin zur funktionellen Defizienz der Proteaseaktivität, bei welcher die Spaltung der Substrate C3b und C4b trotz eines normal exprimierten und sekretierten Proteins nicht stattfindet [95].

1.4 Problemstellung

Die Ziele dieser Arbeit waren die Validierung der Urotensin-II-generierenden Aktivität des Komplementfaktor I sowie die Überprüfung der physiologischen Relevanz dieser Aktivität. Des Weiteren sollte die Frage geklärt werden, ob das 104 Aminosäuren lange Prohormon von Ull das Substrat für CFI darstellt, aus dem das Peptid Ull direkt hydrolysiert wird oder ob ein Peptidfragment, das aus dem Prohormon von einer anderen Protease proteolytisch freigesetzt wird, das eigentliche Substrat des CFI ist.

2 Material und Methoden

2.1 Aufreinigung des Komplementfaktor I

Die Aufreinigung des CFI erfolgte über eine Antikörper-Affinitäts-Chromatographie nach Sim *et al.* [96]. Als Ausgangsmaterial wurde humanes Plasma bzw. Proteine der Cohn-Fraktion IV-4 verwendet. Über eine Lysin-Sepharose-Säule sollten zunächst Plasmin und Plasminogen aus dem Plasma abgereichert werden. Dieser Schritt ist bei der Reinigung des CFI aus der Cohn-Fraktion IV-4 nicht erforderlich, da bei der Herstellung dieser Plasmaproteinfraktion Plasmin und Plasminogen quantitativ entfernt werden. Es folgte eine Chromatographie mit einem unspezifischen Antikörper zur Entfernung von Komponenten, die unspezifisch an Antikörper binden. Im letzten Schritt erfolgte eine CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie, um spezifisch CFI anzureichern.

Eine Übersicht der Arbeitsschritte ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

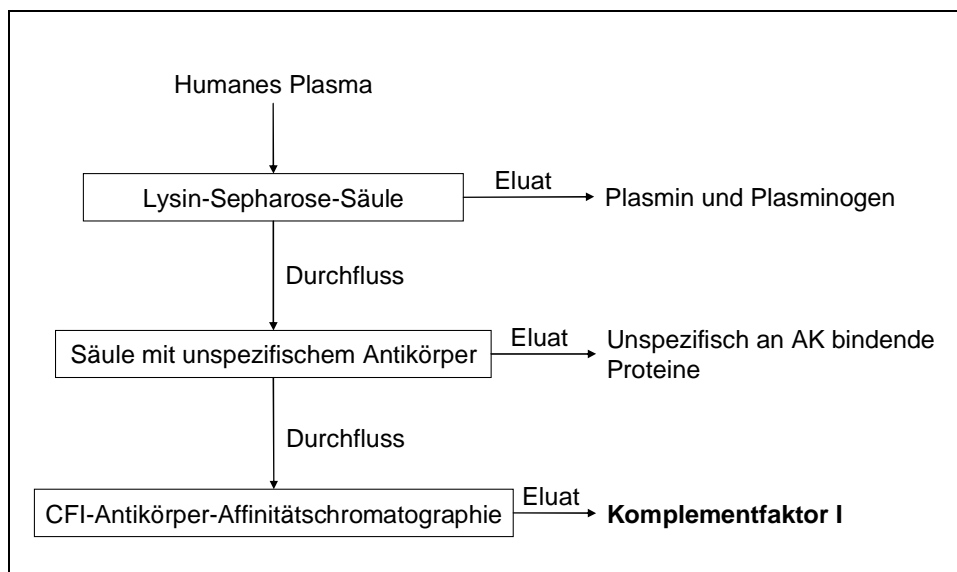


Abbildung 2.1: Schema zur Aufreinigung des CFI aus humanem Plasma.

Für Aufreinigung des CFI aus Plasma wurden rund 210 ml humanes Plasma von drei gesunden Probanden (ein weiblicher und zwei männliche Probanden, Alter zwischen 25 und 62 Jahren) gepoolt. Die Proben wurden nach dem Auftauen für 15 Minuten bei 4000 xg und 4 °C zentrifugiert, um ausgefallene Proteine abzutrennen, und auf 0,5 mM Pefabloc eingestellt.

Für die Aufreinigung des CFI aus der Cohn-Fraktion IV-4 wurden 5 g der lyophilisierten Proteinfraction in 200 ml des Laufpuffers der Antikörper-Affinitätschromatographie (25 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, pH 7,4) gelöst. Es folgte eine Zentrifugation bei 4000 xg für 15 Minuten sowie eine Filtration durch Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm zur Entfernung unlöslicher Proteine.

2.1.1 Lysin-Sepharose-Säule zur Abreicherung von Plasmin und Plasminogen

Für die Lysin-Sepharose-Säule wurden 35 ml Lysin-Sepharose in destilliertem Wasser gequollen. Anschließend wurde das Chromatographiematerial in das Säulengehäuse XK 26 gepackt. Die Säule wurde mit dem Laufpuffer A (100 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, 15 mM EDTA, pH 7,4) äquilibriert.

Das humane Plasma wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min über die Säule gepumpt. Der Durchfluss wurde aufgefangen und für die weitere Aufreinigung verwendet.

An die Säule gebundene Proteine wurden mit Puffer B (200 mM ε-Aminocapronsäure, 100 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,4) eluiert.

2.1.2 Antikörper-Affinitätschromatographie zur Abreicherung unspezifisch bindender Proteine

Der Durchfluss der Lysin-Sepharose-Säule wurde in Ultrafiltrationseinheiten (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, Cutoff 10 kDa) auf den Laufpuffer C (25 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, pH 7,4) durch mehrfaches Zentrifugieren bei 4000 xg und 4 °C umgepuffert.

Das Chromatographiematerial wurde wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben vorbereitet und in das Säulengehäuse XK-16/20 gepackt. Die Säule wurde mit dem Laufpuffer C äquilibriert. Der Probenauftrag erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit Puffer D (3 M MgCl₂) bei einer Flussrate von 1,5 ml/min. Der Durchfluss wurde aufgefangen und für die weitere Aufreinigung verwendet.

2.1.3 CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie

Das Chromatographiematerial wurde wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben vorbereitet und in das Säulengehäuse XK-16/20 gepackt. Die Säule wurde mit dem Laufpuffer C äquilibriert.

Der Durchfluss der Antikörper-Affinitätschromatographie wurde mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die CFI-Antikörper-Affinitätssäule aufgetragen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit Puffer D (3 M MgCl₂) in einem Gradienten von 0 auf 100 % Puffer B in 5 Minuten bei einer Flussrate von 1,5 ml/min. Der Durchfluss wurde aufgefangen.

Im Anschluss an die Elution der gebundenen Proteine wurde die Säule mit Laufpuffer C äquilibriert und der Durchfluss der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie erneut auf die Säule aufgetragen, um eventuell noch enthaltenes CFI an die Säule zu binden. Die Elution erfolgte wie oben beschrieben.

2.1.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mit der Methode nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford [97] erfolgte mit dem Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay Kit. Hierfür wurden jeweils 10 µl Probenlösung mit 300 µl des Coomassie Plus (Bradford) Assay Reagent gemischt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei der Wellenlänge 595 nm gemessen. Es wurde eine BSA-Standardkurve mit den BSA-Konzentrationen 0, 100, 200, 300, 500, 750 und 1000 µg/ml erstellt. Die Eluatfraktionen der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie wurden ohne Verdünnung vermessen. Für alle weiteren Fraktionen erfolgte aufgrund der hohen Proteinkonzentration eine Verdünnung von eins zu einhundert.

2.1.5 Nachweis des CFI per PAGE Western Blot

Die PAGE und der Western Blot zum Nachweis des CFI erfolgten wie in Kapitel 2.6.1.1 beschrieben, mit folgenden Änderungen: Es wurde ein 10 % Gel verwendet.

2.2 Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen einer Proteinfraktion

Die massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen erfolgte durch tryptischen Verdau der Proteine mit nachfolgender MS/MS-Messung auf einem nano-ESI-Ionenfallen-Massenspektrometer. Die Peptide wurden vor der massenspektrometrischen Analyse über eine Reversed-Phase-Flüssigkeitschromatographie getrennt.

2.2.1 Tryptischer Verdau von Proteinen

Die proteinhaltige Fraktion wurde in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet und anschließend in 50 µl 6 M Harnstoff (in HPLC-Wasser) gelöst. Nach Zugabe von 1,3 µl 100 mM DTT (in 100 mM NaHCO₃⁻ in HPLC-Wasser, pH 8,3) wurde die Lösung 10 min bei 60 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 300 mM Iodacetamid (in 100 mM NaHCO₃⁻ in HPLC-Wasser, pH 8,3) und die Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min. Anschließend wurde die Probe mit 425 µl 100 mM NaHCO₃⁻ in HPLC-Wasser, pH 8,3 verdünnt. Der tryptische Verdau wurde durch die Zugabe von Trypsin-Lösung (0,25 µg/µl in Trypsin-Resuspensionspuffer) gestartet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von Ameisensäure (formic acid, FA) mit einer Endkonzentration von 0,2 % gestoppt.

2.2.2 Probenvorbereitung mit Reversed Phase-Chromatographie/ Mikroextraktion

Zur Probenvorbereitung nach dem tryptischen Verdau wurden die Proben durch Reversed Phase-Chromatographie entsalzt. Es wurden Omix-Pipettenspitzen mit C18-Chromatographiematerial für die Mikroextraktion verwendet. In die Spitzen dieser Pipettenspitzen sind kleine Mengen des Reversed-Phase-Chromatographiematerials gepackt.

Das Chromatographiematerial wurde mit 60 % ACN (in HPLC-H₂O) konditioniert und mit 0,2 % FA (in HPLC-H₂O) äquilibriert. Anschließend erfolgte die Extraktion der Peptide aus 20 µl des Peptidgemischs des tryptischen Verdau. Nichtbindende Moleküle wurden

durch Waschen mit 0,2 % FA (in HPLC-H₂O) entfernt. Die Peptide wurden mit 60 % ACN (in HPLC-H₂O) eluiert.

2.2.3 Massenspektrometrische Analyse der tryptischen Peptide

Die entsalzten tryptischen Peptide wurden per Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert. Die Messung erfolgte an einem Ionenfallen-Massenspektrometer (1100 LC/MSD trap XCT Ultra) mit vorgeschalteter nano-HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, High Performance Liquid Chromatographie). Die Trennung der Peptide erfolgte auf einem HPLC-Chip in einem sogenannten ChipCube. Bei dem verwendeten Chip handelt es sich um einen HPLC-Chip mit einer 40 nl fassenden Vorsäule sowie einer Trennsäule mit einer Länge von 150 mm. Beide Säulen sind gefüllt mit dem Chromatographiematerial Zorbax C18 300 Å. Die Proben wurden bei diesem Verfahren mit einem Autosampler und einer Kapillarpumpe bei 98 % Lösungsmittel A (0,2 % Ameisensäure in HPLC-Wasser) und 2 % Lösungsmittel B (100 % ACN) in das HPLC-System injiziert und mit einem Fluss von 4 µl/min auf eine Vorsäule aufgetragen. Nichtbindende Moleküle wurden durch Waschen entfernt. Die Elution erfolgte durch einen Acetonitril-Gradienten der Nanopumpe nach Umschalten des Ventils am ChipCube, so dass eluierende Moleküle auf die Trennsäule gelangten. Der lineare Acetonitril-Gradient verlief von 2 auf 40 % Lösungsmittel B innerhalb von 40 min bei einer Flussrate von 0,4 µl/min. Die massenspektrometrische Messung erfolgte im positiven Ionenmodus, mit einer Spannung von -1,8 kV an der Elektrospray-Kapillare. Ein Stickstoff-Fluss von 4 l/min und eine Temperatur von 325 °C wurden angelegt, um die Moleküle zu desolvieren. Das Massenspektrometer akquirierte MS/MS-Spektren im datenabhängigen Modus, wobei die drei intensivsten Vorläuferionen automatisch für die MS/MS-Messung ausgewählt wurden. Zweifach geladene Ionen wurden bevorzugt fragmentiert. Nach drei Zyklen wurde ein Vorläufer-Ion aktiv für eine Minute von der Fragmentierung ausgeschlossen.

2.2.4 Identifizierung der Proteine mittels Datenbankabfrage

Die Peaklisten für die MS/MS-Datenbankabfrage wurden mit der Software „Data Analysis for 6300 Series Ion Trap LC/MS“ Version 3.4 erstellt. Die Identifizierung erfolgte über die Suchmaschine Mascot [98] mit einer Suche in der Datenbank der humanen Proteine. Die

Material und Methoden

Suchparameter beinhalteten Massenänderungen für die Carbamidomethylierung an Cystein-Resten als sichere Modifikation sowie die Oxidation der Methionin-Reste als potentielle Modifikation, eine potentiell fehlende Trypsin-Spaltstelle („missed cleavage“), eine Massentoleranz von $\pm 1,2$ Da für die Vorläuferionen und $\pm 0,6$ Da für die Fragmentationen.

2.3 Immobilisierung von Proteinen

Die Immobilisierung von Proteinen erfolgte an aktivierte Chromatographiepartikel (Bromcyan-aktivierte Sepharosebeads® 6MB Macrobeads). Etwa 1 ml der trockenen Chromatographiepartikel wurden in einem Eppendorfgefäß mit ca. 10 ml 1 mM HCl in Wasser für eine halbe Stunde auf dem Überkopfrotor inkubiert. Nach dem Entfernen der HCl-haltigen Lösung sowie dem Waschen der Partikel in Wasser und Kopplungspuffer (100 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, pH 8,3) erfolgte die Immobilisierung der Proteine an eine definierte Menge Chromatographiepartikel durch die zweistündige Inkubation der Chromatographiepartikel und Proteine in Kopplungspuffer bei Raumtemperatur auf dem Überkopfrotor.

Nach der Inkubation wurden der Überstand entfernt, die Chromatographiepartikel mit Wasser gewaschen und die verbliebenen freien Bindungsstellen der Chromatographiepartikel durch die Inkubation mit 250 µl Blockierungspuffer (100 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, 1 M Glycin, pH 8,3) durch zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Überkopfrotor abgesättigt.

2.3.1 Immobilisierung von Proteinfractionen

Die Immobilisierung von Proteinfractionen erfolgte wie im Abschnitt 2.3 beschrieben. Dabei wurden folgende Mengen an Protein immobilisiert. Plasma-Kallikrein: 1,3 µg je Inkubationsansatz, Komplementfaktor B: 5 µg je Inkubationsansatz, Eluatfraktion der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie: 100 µl je Fraktion und Inkubationsansatz, Proteine der Cohn-Fraktion IV-4: 100 µg je Inkubationsansatz.

2.3.2 Immobilisierung von Proteinen aus humanem Plasma

Da die Plasmaproben bei -80 °C gelagert waren, wurden zunächst die ausgefallenen Kryoproteine durch eine Zentrifugation (6000 xg für drei Minuten) aus der Lösung entfernt. Die Immobilisierung der Plasmaproteine erfolgte nach dem in Abschnitt 2.3 beschriebenen Protokoll. Anschließend wurden 30 µl Plasma in 240 µl Kopplungspuffer an ca. 50 µl gequollene Chromatographiepartikel immobilisiert.

Für die Negativkontrolle wurden die Chromatographiepartikel jeweils mit 30 µl Wasser und 220 µl Kopplungspuffer inkubiert.

2.3.3 Immobilisierung von Antikörpern

Die Immobilisierung von Antikörpern erfolgte ebenfalls an aktivierte Chromatographiepartikel.

Für die Immobilisierung wurden die trockenen Chromatographiepartikel wie in Abschnitt 2.3 vorbereitet. Die Immobilisierung des Antikörpers erfolgte durch die Inkubation der Chromatographiepartikel und des Antikörpers in Kopplungspuffer (50 mM K_2HPO_4 , 150 mM KCl, pH 7,2-7,5) für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Überkopfrotor.

Zur Immobilisierung wurden 30 mg des CFI-Antikörpers an ca. 6 ml Chromatographiepartikel gekoppelt. Zur Immobilisierung des unspezifischen Antikörpers wurden 50 mg IgG aus Kaninchenserum an 4,5 ml Chromatographiepartikel gekoppelt.

Nach der Inkubation wurden der Überstand entfernt, die Chromatographiepartikel mit Wasser gewaschen und die verbliebenen freien Bindungsstellen der Chromatographiepartikel durch die Inkubation mit Blockierungspuffer (100 mM Ethanolamin, 150 mM NaCl, pH 8,5) für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Überkopfrotor abgesättigt.

2.4 Massenspektrometrie-basierter-Enzymassay zur Detektion von Urotensin-II-generierender sowie C3b-abbauender Aktivität

Der Nachweis der enzymatischen Aktivität des Komplementfaktor I geschah über ein Massenspektrometrie-basiertes Enzymscreening-System (MES) [99]. Dieses System beinhaltet die Immobilisierung von Proteinfractionen an aktivierte Chromatographiepartikel, die Inkubation der immobilisierten Proteine mit einem Peptidsubstrat sowie die massenspektrometrische Analyse der Reaktionsprodukte nach definierten Zeitpunkten.

Die Analyse der Reaktionslösungen erfolgte entweder über eine Messung an einem Matrix-assistierten Laserdesorptions-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometer (Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight, MALDI-TOF-MS) oder über eine SRM (Selected Reaction Monitoring)-Messung an einem Elektrospray-Ionisations-Ionenfallen-Massenspektrometer (ESI-IT-MS) bzw. einem Elektrospray-Ionisations-Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (ESI-QQQ-MS).

Bei der SRM-Messung wird ein Elternion im Massenspektrometer isoliert, fragmentiert und die Signalintensität eines definierten Fragmentions gemessen. Dies ermöglicht eine hohe Selektivität sowie eine hohe Sensitivität. Die MALDI-TOF-Messung ermöglicht dagegen die Analyse aller Reaktionsprodukte einer Inkubation.

Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von CFI wurden ein MES-Assay zum Nachweis der Urotensin-II (UII)-generierenden Aktivität (nachfolgend UCE-Assay) sowie ein MES-Assay zum Nachweis der C3b-Umsetzung (nachfolgend CFI-Assay) entwickelt.

Im UCE-Assay wurde eine Proteinfraction mit dem synthetisch hergestellten Urotensin-Substrat (UII_105-124, UII_95-124 oder UII_21-124) inkubiert und die Bildung des Reaktionsprodukts UII verfolgt. Für den CFI-Assay erfolgte die Inkubation mit dem synthetisch hergestellten Substrat C3b. Dieses wird durch CFI zu dem Reaktionsprodukt C3b-R umgesetzt.

2.4.1 Quantifizierung von Peptiden über LC-MS-SRM

Die Reaktionsprodukte der Inkubationen wurden mit einer Reversed-Phase-Chromatographie entsalzt, getrennt und zum Nachweis der Peptide Ull und C3b-R über eine Selected-Reaction-Monitoring (SRM)-Analyse mit einem Elektrospray-Ionisations-Ionenfallen-Massenspektrometer (ESI-IT-MS) analysiert. Der SRM-Assay beinhaltet die Isolierung eines Elternions, seine anschließende Fragmentierung sowie die Detektion eines definierten Fragmentions. Die Signalintensitäten richten sich nach der Anzahl der Moleküle, die den Detektor erreichen. Die in Abhängigkeit der Zeit erfassten Messpunkte der Signalintensitäten werden zu einem Chromatogramm extrapoliert. Zur relativen Quantifizierung der gemessenen Peptide werden die Flächen der Signale der Chromatogramme integriert.

2.4.1.1 Massenspektrometrische Parameter zur Quantifizierung von Ull mit der SRM-Methode mittels ESI-IT-MS

Das synthetisierte Peptid Ull (Molare Masse: 1389,6 Da, Aminosäuresequenz: ETPDCFWKYCV) wurde in 0,2 % Ameisensäure gelöst. Für die Etablierung des Nachweises des Peptids mittels ESI-IT-MS wurde zunächst eine 10^{-5} M Lösung des Peptids über eine Hamilton-Spritzenpumpe mit einem Fluss von 3 μ l/min in die Elektrospraykammer des Ionenfallen-Massenspektrometers injiziert. Im Fullscan der ESI-IT-MS-Messung wurde der Peak des zweifach geladenen Ions von Ull bei einem Masse-Ladungsverhältnis von 694,9 als der Peak mit der höchsten Signalintensität identifiziert. Die Parameter der massenspektrometrischen Messung wurden auf dieses Masse-Ladungsverhältnis optimiert.

Tabelle 2.1 Tuning-Parameter für das Peptid Ull.

Sheath-Gas-Fluss	20
Temperatur an der Transferkapillare	320 °C
Sprayspannung	5 kV
Kollisionsenergie	50

Der Peak des Elternions (Massenfenster: 4,0 m/z-Einheiten) wurde in der Ionenfalle isoliert und unter Zufuhr einer Kollisionsenergie fragmentiert. Das Fragmentation mit der höchsten Signalintensität hatte einen m/z-Wert von 579,7 und war zweifach geladen.

2.4.1.2 Chromatographieparameter für die Quantifizierung von Ull mittels ESI-IT-MS

Die Reaktionslösungen der Inkubate wurden über die Reversed Phase-Säule PLRP-S 100Å 5µm; 2.1 mm x 100 mm der Firma Varian entsalzt und getrennt. Für die Optimierung der Chromatographieparameter wurde Ull in einer Konzentration von 0,2 % Ameisensäure gelöst. Die Probe wurde durch einen Autosampler in das HPLC-System (SpectraSystem, Thermo Finnigan) injiziert. Als Lösungsmittel wurden 0,2 % Ameisensäure in HPLC-Wasser (Lösungsmittel A) und 100 % Acetonitril (Lösungsmittel B) genutzt. Für die optimale Elution des Peptids von der Säule wurde der folgende Gradient verwendet:

Tabelle 2.2: Gradient zur Elution von Ull.

Zeit [min]	H2O [%]	ACN [%]
0	97	3
6	40	60
6,5	40	60
6,6	97	3
13	97	3

Die Flussrate lag konstant bei 0,3 ml/min. Die massenspektrometrische SRM-Analyse des Chromatographielaufs erfolgte in einem Segment unter Berücksichtigung der in Abschnitt 2.4.1.1 bestimmten Parameter.

2.4.1.3 Massenspektrometrische Parameter zur Quantifizierung von Ull mit der SRM-Methode mittels ESI-QQQ-MS

Die Optimierung der massenspektrometrischen Parameter am ESI-QQQ-MS erfolgte wie in Abschnitt 2.4.1.2 für die Messung am ESI-IT-MS beschrieben über die Injektion des Peptids mit einer Spritzenpumpe. Es wurde hier eine Flussrate von 0,4 µl/min angelegt. Es erfolgte auch hier das Tunen auf das zweifach geladene Vorläuferion mit $m/z = 694,9$ sowie das Fragmentation mit $m/z = 579,7$. Die Tuning-Parameter sind in Tabelle 2.3 angegeben.

Tabelle 2.3 Tuning-Parameter für das Peptid Ull.

Temperatur an der Transferkapillare	325 °C
Kapillarspannung	2 kV
Kollisionsenergie	17
Fragmentorspannung	200 V

2.4.1.4 Chromatographieparameter für die Quantifizierung von Ull mittels ESI-IT-MS

Die Reaktionslösungen der Inkubate wurden über eine Reversed Phase-Chromatographie auf einem HPLC-Chip getrennt. Als Chromatographiematerial wurde PLRP-S 100Å 5µm; 2,1 mm x 100 mm der Firma Varian verwendet. Für die Optimierung der Chromatographieparameter wurde Ull in einer Konzentration von 0,2 % Ameisensäure gelöst. Die Probe wurde durch einen Autosampler in das HPLC-Chip-System injiziert. Der Probenauftrag erfolgte durch die Kapillarpumpe bei einem konstanten Fluss von 5 µl/min. Die massenspektrometrische SRM-Analyse des Chromatographielaufs erfolgte in einem Segment unter Berücksichtigung der in Abschnitt 2.4.1.3 bestimmten Parameter.

Als Lösungsmittel zur Elution der Peptide wurden 0,2 % Ameisensäure in HPLC-Wasser (Lösungsmittel A) und 100 % Acetonitril (Lösungsmittel B) genutzt. Für die optimale Elution des Peptids von der Säule wurden eine Flussrate von 0,6 µl/min und der folgende Gradient verwendet:

Tabelle 2.4: Gradient zur Elution von UII.

Zeit [min]	H2O [%]	ACN [%]
0	97	3
2	80	20
10	60	40
12	30	70
12,5	30	70
13	97	3
14	97	3

2.4.1.5 Bestimmung der massenspektrometrischen Parameter zur Quantifizierung von C3b-R mit der SRM-Methode mittels ESI-IT-MS

Die Etablierung des SRM-Assays für C3b-R (Molare Masse: 1366,7 Da, Aminosäuresequenz: RIHWESASLLR) erfolgte wie in Abschnitt 2.4.1.1. Das ausgewählte Elternion hatte ein Masse-Ladungsverhältnis von 457 (Massenfenster: 4,0 m/z-Einheiten). Die optimierten Parameter für das Ion mit diesem Ladungsverhältnis sind in Tabelle 2.5 dargestellt.

Tabelle 2.5: Tuning-Parameter für das Peptid C3b-R.

Sheath-Gas-Fluss	20
Temperatur an der Transferkapillare	310 °C
Sprayspannung	7 kV
Kollisionsenergie	40

Der Peak des Elternions wurde in der Ionenfalle isoliert und unter Zufuhr einer Kollisionsenergie fragmentiert. Das Fragmention mit der höchsten Signalintensität hatte einen m/z-Wert von 407,3 und war dreifach geladen.

2.4.1.6 Chromatographieparameter für die Quantifizierung von C3b-R mittels ESI-IT-MS

Die Etablierung des LC-ESI-IT-SRM-Assays für C3b-R erfolgte wie in Abschnitt 2.4.1.2 beschrieben. Für die optimale Elution des Peptids von der Säule wurde der folgende Gradient gefunden:

Tabelle 2.6: Gradient zur Elution von C3b-R.

Zeit [min]	H2O [%]	ACN [%]
0	97	3
4	40	60
4,5	40	60
4,6	97	3
11,5	97	3

Die Flussrate lag konstant bei 0,3 ml/min. Die massenspektrometrische Analyse des Chromatographielaufs erfolgte in einem Segment unter Berücksichtigung der in Abschnitt 2.4.1.5 bestimmten Parameter.

2.4.2 Analyse der MES-Reaktionsprodukte mittels MALDI-TOF-MS

Zur qualitativen Analyse der Reaktionsprodukte der Inkubationen erfolgte die Messung an einem MALDI-Flugzeit-Massenspektrometer (Matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometer; MALDI-TOF-MS). Es handelte sich hierbei um das Reflex IV (Bruker Daltonics).

Die Messung von Peptiden erfolgte mit der Matrix 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB). Auf einen MALDI-Probenhalter (MTP AnchorChip 400/384) wurden 0,75 µl DHB-Matrix-Lösung (30 mg/ml DHB in 50% ACN / 50 % HPLC-Wasser) aufgetragen und eingetrocknet. Die zu definierten Reaktionszeiten abgenommenen Aliquots (Volumen: 0,75 µl) wurden direkt auf die vorpipettierten Matrix-Spots pipettiert.

Die Messung aller Proben erfolgte manuell und die Laserintensität sowie die Laserschussanzahl wurden in Abhängigkeit der Qualität der Spektren variiert. Die Analyse von Reaktionslösungen erfolgte daraufhin unter Verwendung der in Tabelle 2.7 angegebenen Parameter.

Tabelle 2.7: Optimierte Parameter des MALDI-TOF-MS für die Detektion von Peptiden bis 5 kDa.

Laserschüsse pro Einzelspektrum	20
Anzahl aufsummierter Spektren	60-100
Laserintensität	60 %
Reflektion	aus
Matrix-Suppressionsmodus	Deflektion bis 2000 Da
Polarität	Positiv
Spannung Ionenquelle 1	20 kV
Spannung Ionenquelle 2	17,5 kV
Linsenspannung	9,5 kV
Reflektorspannung	-

2.4.3 Zyklisierung und Aufreinigung des UII_21-124 und des UII_95-124

Zur Oxidierung der Disulfidbrücken wurden die Peptide UII_21-124 und UII_95-124 in einer Konzentration von 0,5 mg/ml in 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in Wasser (pH 7,6) gelöst. Die Zyklisierung erfolgte bei 4 °C für 16 Stunden.

Die Abtrennung des DMSO erfolgte über eine Reversed Phase-Chromatographie auf der SMART-HPLC-Anlage mit der Säule μ RPC C2/C18 SC 2.1/10. Die Lösung wurde mit Ameisensäure auf eine Konzentration von 0,2 % eingestellt.

Als Puffer A diente 0,2 % Ameisensäure in HPLC-Wasser. Die Flussrate betrug 100 μ l/min. Die Probe wurde mit einem Acetonitril-Gradienten von 0-30 % in 40 Minuten und 30-70 % in 10 Minuten von der Säule eluiert.

Nach der Elution wurde die Probe in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert.

2.4.4 Bestimmung der Enzymaktivitäten immobilisierter Proteine

2.4.4.1 Bestimmung der Enzymaktivitäten immobilisierter Proteine mit ESI-IT-SRM

Zur Messung der Enzymaktivitäten immobilisierter Proteinfraktionen mit der ESI-IT-SRM-Methode wurden diese jeweils mit einer 10^{-4} M Lösung eines Peptidsubstrats in 50 μ l PBS (9 mM CaCl_2 , 26,8 mM KCl, 14,7 mM KH_2PO_4 , 4,92 mM MgCl_2 , 137 mM NaCl, 80,57 mM Na_2HPO_4) auf dem Überkopfroter inkubiert.

Nach definierten Zeiten erfolgte die Abnahme von Aliquots (Volumen: 5 μ l), diese wurden mit 45 μ l 0,2% FA vermischt. Die Proben wurden sofort bei -20 °C eingefroren und bis zur SRM-Messung bei dieser Temperatur gelagert.

2.4.4.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten immobilisierter Proteine mit ESI-QQQ-SRM

Zur Messung der Enzymaktivitäten immobilisierter Proteinfraktionen mit ESI-QQQ-SRM-Methode wurden diese jeweils mit einer 10^{-5} M Lösung eines Peptidsubstrats in 40 μ l HPLC-Wasser auf dem Überkopfroter inkubiert.

Nach definierten Zeiten erfolgte die Abnahme von Aliquots (Volumen: 1 μ l), diese wurden mit 9 μ l 0,2% FA vermischt. Die Proben wurden sofort bei -20 °C eingefroren und bis zur SRM-Messung bei dieser Temperatur gelagert.

2.4.4.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten immobilisierter Proteine mit MALDI-TOF-MS

Zur Messung der Enzymaktivitäten immobilisierter Proteinfraktionen mit MALDI-TOF-MS wurden diese jeweils mit 50 μ l einer Lösung des verwendeten Peptidsubstrats in HPLC-Wasser auf dem Überkopfroter inkubiert. Die Inkubation erfolgte mit folgenden Konzentrationen der Peptide: UII_105-124 und UII_85-105: 10^{-5} M, UII_95-124 und UII_21-124: $5 \cdot 10^{-4}$ M.

Nach definierten Zeiten erfolgte die Abnahme von Aliquots. Für die Messung von Peptiden mit der Matrix DHB wurden Aliquots von 0,75 μ l direkt auf den vorbereiteten MALDI-Proben-teller pipettiert (vgl. Abschnitt 2.4.2).

2.4.4.4 Bestimmung von Enzymaktivitäten in Anwesenheit des Inhibitors PK 15

Zur Bestimmung der UCE-Aktivität von immobilisiertem Plasma-Kallikrein oder immobilisierten Plasmaproteinen in Anwesenheit des spezifischen Plasma-Kallikrein-Inhibitors PK 15 wurden die immobilisierten Proteine über Nacht mit einer Lösung des Inhibitors (gelöst in HPLC-Wasser) in der späteren Einsatzkonzentration des Inhibitors inkubiert. Die Proteine der Kontrolle ohne Inhibitor wurden mit Wasser inkubiert. Vor dem Start der Inkubation mit dem Peptidsubstrat wurde die Inhibitorlösung abgenommen.

Für die Inkubation mit dem Peptidsubstrat wurde zu den immobilisierten Proteinen eine Lösung pipettiert, die das Substrats Ull_105-124 in der Einsatzkonzentration von 10^{-5} M sowie den Inhibitor in der entsprechenden Einsatzkonzentration (gelöst in HPLC-Wasser) enthielt. Das Volumen dieser Lösung lag bei allen Ansätzen bei 30 μ l, die Inkubation erfolgte auf dem Überkopfrötor.

Nach definierten Zeiten erfolgte die Abnahme von Aliquots (Volumen: 1 μ l), diese wurden mit 9 μ l 0,2% FA vermischt. Die Proben wurden sofort bei -20 $^{\circ}$ C eingefroren und bis zur SRM-Messung auf dem ESI-QQQ-MS bei dieser Temperatur gelagert.

2.4.5 Bestimmung der Enzymaktivität von rekombinant exprimiertem CFI

Rekombinant exprimierter CFI (Wildtyp und Mutante D501N) wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. Atkinson, Washington University School of Medicine zur Verfügung gestellt. Zur Bestimmung der Enzymaktivität des rekombinant exprimierten CFI erfolgte die Inkubation von ca. 150 ng gereinigtem Protein (entspricht einem Volumen von 10 μ l) mit einer 10^{-4} M Lösung des Peptidsubstrates in PBS-Puffer (9 mM CaCl_2 , 26,8 mM KCl, 14,7 mM KH_2PO_4 , 4,92 mM MgCl_2 , 137 mM NaCl, 80,57 mM Na_2HPO_4 in HPLC-Wasser).

Nach definierten Zeiten erfolgte die Abnahme von Aliquots (Volumen: 5 μ l), diese wurden mit 45 μ l 0,2% FA vermischt. Die Proben wurden sofort bei -20 $^{\circ}$ C eingefroren und bis zur SRM-Messung auf dem ESI-IT-MS bei dieser Temperatur gelagert.

2.5 Versuche zur Identifizierung möglicher Urotensin-Vorläuferpeptide

2.5.1 Inkubation des UII_21-104 mit Plasmaproteinen

Der 104 Aminosäuren lange Urotensin-II-Vorläufer UII_21-124 wurde von der Firma Genscript synthetisiert. Nach der Zyklisierung und Aufreinigung (siehe Abschnitt 2.4.3) wurde das Peptid in Wasser gelöst.

Nach der Immobilisierung von Plasmaproteinen (Abschnitt 2.3.2) wurde das Peptid in einer Konzentration von 10^{-4} M (in HPLC-Wasser) zur den immobilisierten Proteinen gegeben. Nach definierten Inkubationszeiten wurden Aliquots abgenommen und bei -20 °C eingefroren. Die entstandenen Reaktionsprodukte wurden mit MALDI-TOF-MS untersucht. Für Peptide von einer Größe bis 5 kDa wurden die in Tabelle 2.7, für Peptide einer Größe von 5 bis 15 kDa die in Tabelle 2.8 angegebenen Parameter verwendet.

Tabelle 2.8: Optimierte Parameter für die MALDI-TOF-Messung von Peptiden einer Größe von 5 bis 15 kDa.

Laserschüsse pro Einzelspektrum	20
Anzahl aufsummierter Spektren	60-100
Laserintensität	60 %
Reflektion	an
Matrix-Suppressionsmodus	Deflektion bis 600 Da
Polarität	Positiv
Spannung Ionenquelle 1	20 kV
Spannung Ionenquelle 2	16,9 kV
Linsenspannung	8,6 kV
Reflektorspannung	23 kV

2.5.2 Inkubation des UII_85-105 mit Plasmaproteinen

Das 21 Aminosäuren lange Urotensin-II-Fragment UII_85-105 wurde von der Firma Genscript synthetisiert. Nach der Zyklisierung und Aufreinigung (siehe Abschnitt 2.4.3) wurde das Peptid in Wasser gelöst.

Nach der Immobilisierung von Plasmaproteinen (vgl. Abschnitt 2.3.2) wurde das Peptid in einer Konzentration von 10^{-4} M (in HPLC-Wasser) zu den immobilisierten Proteinen gegeben. Nach definierten Inkubationszeiten wurden Aliquots abgenommen und bei -20 °C eingefroren. Die entstandenen Reaktionsprodukte wurden mit MALDI-TOF-MS untersucht.

2.6 MS-unabhängige Verfahren zur Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.6.1 Bestimmung der C3b-abbauenden Aktivität des CFI

Die Bestimmung der C3b-abbauenden Aktivität des CFI erfolgte mit dem Cofaktor-Assays nach Kavanagh *et al.* [93]. Der Nachweis erfolgte durch die Inkubation der Komplementkomponente C3b mit CFI und dem Cofaktor Komplementfaktor H (FH).

Die Inkubation erfolgte in einem Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, pH 7,2), die Endkonzentration von C3b betrug 10 ng/ μ l, die Enkonzentration von CFI und FH 1 ng/ μ l. Für die Bestimmung der C3b-abbauenden Aktivität der Fraktionen aus der CFI-Aufreinigung (vergleiche Abschnitt 2.1.3) wurden je 30 μ l der Eluatfraktionen für den Assay eingesetzt. Das Endvolumen eines jeden Ansatzes betrug 100 μ l.

Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte bei 37 °C. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurden 15 μ l jeder Reaktionslösung abgenommen und die Reaktion durch die Zugabe von 15 μ l 4x-Probenpuffer und 1 μ l reduzierendem Agenz gestoppt.

Der Nachweis der Spaltung erfolgte anschließend über eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese und einen Western Blot.

2.6.1.1 Gelelektrophorese und Western Blot zum Nachweis der Spaltung des C3b

Die Auftrennung der Proteine aus den Reaktionsansätzen des Cofaktor-Assay erfolgte mit einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Es wurde ein Criterion Precast 4-12 % Bis-Tris-Gel mit XT MES-Laufpuffer verwendet. Das Auftrennen der Proben erfolgte zunächst für 15 Minuten bei 100 Volt, anschließend für 60 Minuten bei 200 Volt.

Die Proteine wurden nach der Auftrennung per PAGE auf eine PVDF-Membran gebロットet. Die Membran wurde zunächst in Methanol konditioniert. Anschließend wurden das proteinhaltige Gel und die Membran in Transferpuffer äquibriert. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte in Transferpuffer bei 400 mA für 100 Minuten.

Nach dem Transfer wurden die freien Bindungsstellen der Membran durch eine mindestens zweistündige Inkubation in 5 % Magermilchpulver in TBS mit 0,1 % Tween 20 (TBS-T) blockiert. Es folgte dreimaliges Waschen der Membran in TBS-T für je zehn Minuten. Der Erstantikörper Anti-C3 aus Ziege in einer Verdünnung von 1:1500 (in TBS-T) wurde für 1,5 Stunden mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde anschließend erneut drei Mal mit TBS-T gewaschen. Der Zweitantikörper Anti-Ziege konjugiert mit Alkalischer Phosphatase aus Kaninchen in einer Verdünnung von 1:5000 (in TBS-T) wurde für 1,5 Stunden mit der Membran inkubiert, gefolgt von erneutem Waschen der Membran.

Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte über eine Farbreaktion mit dem AP Conjugate Substrate Kit nach Herstellerangaben.

2.6.2 Fluoreszenz-basierter Assay zur Bestimmung der Enzymaktivität des CFI

Der Fluoreszenz-Assay zum Nachweis der Enzymaktivität erfolgte nach der Vorschrift von Tsiftoglou und Sim [80]. Es wurde das Fluoreszenzsubstrat Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-AMC verwendet in einer Endkonzentration von 30 μ M im Inkubationspuffer (25 mM Bicine, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, pH 8,5).

Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität des rekombinant exprimierten CFI (WT und Mutante D501N) wurden 10 μ l Proteinlösung (entspricht rund 150 ng Protein) mit der Substratlösung inkubiert. Das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 200 μ l. Die Inkubation erfolgte in einer schwarzen Mikrotiterplatte.

Die enzymatische Reaktion wurde über einen Zeitraum von 15 Stunden durch halbstündige Fluoreszenzmessungen verfolgt. Die Anregungswellenlänge betrug dabei 360 nm, die Emissionswellenlänge 465 nm.

2.7 Bestimmung der Ull-Konzentration in humanem Plasma

Die Messung der Ull-Konzentration im Plasma wurde freundlicherweise von der Gruppe von Prof. Leong L. Ng von der Universität Leicester durchgeführt. Das Plasma wurde dabei über eine Größenausschlusschromatographie fraktioniert und in den Fraktionen anschließend Ull über einen RIA (Radioimmuno-Assay) quantifiziert [50].

2.8 Material

2.8.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Äkta Explorer 100	GE Healthcare (Waukesha, USA)
Autosampler SpectraSystem AS3000	Thermo Finnigan (Thermo Fisher Scientific, Walham, USA)
Hamilton-Spritze 250 µl	GE Healthcare (Waukesha, USA)
Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific (Walham, USA)
HPLC-Anlage SpectraSystem SCM1000 und P4000	Thermo Finnigan (Thermo Fisher Scientific, Walham, USA)
InLab®422 Combination Semi-micro pH-Elektrode	METTLER TOLEDO (Columbus, USA)
LCQ DECA XP Plus (ESI-IT-MS)	Thermo Finnigan (Thermo Fisher Scientific, Walham, USA)
SMART HPLC-Anlage	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
MALDI-TOF Reflex IV	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
Überschlagsrotor Rotator Drive STR4	Stuart Scientific (Redhill, Großbritannien)
Spannungsquelle für Gelelektrophoresen	Biorad (Hercules, USA)
Criterion Gelsystem	Biorad (Hercules, USA)
Criterion Blotter	Biorad (Hercules, USA)
UV-Photometer Genios	Tecan (Männedorf, Schweiz)
nanoHPLC-Anlage 1100 Series bzw. 1200 Series	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
ChipCube-System	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Vakuumzentrifuge mit Kühlfalle	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Säulengehäuse XK-26	GE Healthcare (Waukesha, USA)
Säulengehäuse XK-16/20	GE Healthcare (Waukesha, USA)
1100 LC/MSD trap XCT Ultra	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland) / Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
6430 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Eppendorf-Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.8.2 Chemikalien

Chemikalie	Firma
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Acetonitril	Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ameisensäure	Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
AP Conjugate Substrate Kit	Biorad (Hercules, USA)
CNBr-aktivierte Sepharosebeads® 6MB	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay Kit	Pierce/Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Biorad (Hercules, USA)
epsilon-Aminocaprinsäure	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Ethanolamin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Harnstoff	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Magermilchpulver	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Methanol HPLC Gradient Grade	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Pefabloc-SC	Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Salzsäure 0,1 mol/l	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) 10x	Biorad (Hercules, USA)
Transferpuffer	Biorad (Hercules, USA)
Trifluoressigsäure	Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris-HCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin-Resuspensionspuffer	Promega (Madison, USA)
Tween 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Wasser HPLC Gradient Grade	Merck (Darmstadt, Deutschland)
XT MES Running Buffer 20x	Biorad (Hercules, USA)
XT Reducing Agent	Biorad (Hercules, USA)
XT Sample Buffer 4x	Biorad (Hercules, USA)

2.8.3 Biomaterialien

Materialien	Erhalten von
AP-konjugierter Antikörper gegen Schaf aus Kaninchen	Abcam (Cambridge, GB)
AP-konjugierter Antikörper gegen Ziege aus Kaninchen	Calbiochem/Merck (Darmstadt, Deutschland)
Peptid C3b-R, RIHWESASLLR	Synthetisiert von Dr. P. Henklein (Charité Berlin, Institut f. Biochemie)
Peptid C3b-S, RIHWESASLLRSEETK	Synthetisiert von Dr. P. Henklein (Charité Berlin, Institut f. Biochemie)
C3b-spezifischer Antikörper (polyclonal, aus Ziege)	Calbiochem/Merck (Darmstadt, Deutschland)
CFI (rekombinant exprimiert)	AG Prof. Dr. J. Atkinson (Washington University School of Medicine)
CFI-Mutante D501N (rekombinant exprimiert)	AG Prof. Dr. J. Atkinson (Washington University School of Medicine)
CFI-spezifischer Antikörper (polyclonal, aus Schaf)	Abcam (Cambridge, GB)
Cohn-Fraktion IV-4	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Fluoreszenzsubstrat Asp(Obzl)-Pro-Arg-AMC	Bachem (Bubendorf, Schweiz)
Humanes Plasma	Freiwillige Probanden
Humanes Plasma CFI-defizienter Patienten	AG Prof. Timothy Goodship (Universität Newcastle) / Dr. Margerita López-Trascasa (Universitätsklinikum La Paz, Madrid)
Humanes Plasma dialysepflichtiger Patienten	Dr. Martin Tepel (Charité Berlin, Institut f. Nephrologie)
Humanes Plasma von Patienten mit diabet. Nephropathie	Dr. Martin Tepel (Charité Berlin, Institut f. Nephrologie)
Komplementfaktor B	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Komplementfaktor H	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Komplementfaktor I	Calbiochem/Merck (Darmstadt, Deutschland)
Komplementkomponente C3b	Calbiochem/Merck (Darmstadt, Deutschland)
Plasma-Kallikrein	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Plasma-Kallikrein Inhibitor PK15	AG Sir Gregory Winter (University of Cambridge)
Proteinstandard für PAGE (Kaleidoscope Prestained Standards)	Biorad (Hercules, USA)
Trypsin	Promega (Madison, USA)
Peptid UII_105-124, RIWKPYKKRETPDCFWKYCV	Synthetisiert von Dr. P. Henklein (Charité Berlin, Institut f. Biochemie)
Peptid UII_85-105, RKFQDFSGQDPNILLSHLLAR	Synthetisiert von Dr. P. Henklein (Charité Berlin, Institut f. Biochemie)

Material und Methoden

Materialien	Erhalten von
Peptid UII_95-124 PNILLSHLLARIWKPYKKRETPDCFWKYCV)	Synthetisiert von Dr. P. Henklein (Charité Berlin, Institut f. Biochemie)
unspezifische Antikörper (IgG, aus Kaninchen)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Peptid Urotensin-II, ETPDCFWKYCV	Synthetisiert von Dr. P. Henklein (Charité Berlin, Institut f. Biochemie)
Urotensin-II-Vorläuferprotein (UII_21-124)	Firma Genscript (Piscataway, USA)

2.8.4 Software

Software	Hersteller
GraphPad Prism 4	GraphPad Software Inc. (La Jolla, USA)
LCQ DECA XP Plus: LCQ tune und Xcalibur	Thermo Finnigan (Thermo Fisher Scientific, USA)
Mascot Online-Version [98]	Matrix Science (Boston, USA)
nanoHPLC: ChemStation (Rev. B.01.03)	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Peptide Digester Software	AG Prof. Dr. Knut Reinert (Freie Universität Berlin)
Photometer GENios: Magellan 5.0	Tecan (Männedorf, Schweiz)
QQQ und nanoHPLC: MassHunter Aquisition (Version B.02.01) und Qualitative Analyse (Version B.02.00)	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Reflex IV: Flec Control und Flex Analysis	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
Swiss-Prot Datenbank Version 57.5	Uniprot Consortium [100, 101]
XCT-Plus: 6300 Series Trap Control (Version 6.1) Data Analysis LC/MSD Trap (Version 5.3)	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)

3 Ergebnisse

3.1 Reinigung des Komplementfaktor I über eine Antikörper-Affinitätschromatographie

3.1.1 Reinigung des Komplementfaktor I aus humanem Plasma

Die Reinigung des Komplementfaktor I (CFI) erfolgte auf Basis einer Antikörper-Affinitätschromatographie nach der Vorschrift von Sim *et al.* aus humanem Plasma [96]. Hierfür wurde das Plasma von drei gesunden Probanden gepoolt, es ergab sich ein Volumen von 210 ml.

Im ersten Reinigungsschritt wurden Plasmin und Plasminogen aus dem Plasma über eine Lysin-Sepharose-Säule abgereinigt, da dieses unspezifisch an Antikörper-Säulen bindet [96] (siehe Abbildung 3.1 A). Die Elution gebundener Proteine von der Lysin-Sepharose erfolgte durch 200 mM ϵ -Aminocaprinsäure.

Der Durchfluss, in welchem Plasmin und Plasminogen abgereichert waren, wurde im zweiten Reinigungsschritt nach einer Umpufferung auf eine CNBr-Sepharose-Säule mit immobilisierten Antikörpern (IgG) aus Kaninchenserum aufgetragen (Abbildung 3.1 B). Diese Chromatographie diente der Abreicherung von Proteinen, die unspezifisch an Antikörper oder das Säulenmaterial binden, wie beispielsweise die Proteine C1q und Fibronectin [96]. Es wurde wieder mit dem Durchfluss weitergearbeitet. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 3 M Magnesiumchlorid.

Der dritte Schritt der Reinigung bestand aus einer CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie. Zur Herstellung des Chromatographiematerials wurde der α -CFI-Antikörper aus Kaninchenserum kovalent an CNBr-aktivierte Sepharosepartikel immobilisiert. Der Durchfluss der vorangegangenen Chromatographie wurde auf die CFI-Antikörper-Säule aufgetragen (Abbildung 3.1 C und D). CFI wurde an den immobilisierten Antikörper gebunden werden. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte auch hier durch eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 3 M Magnesiumchlorid (Abbildung 3.1 D).

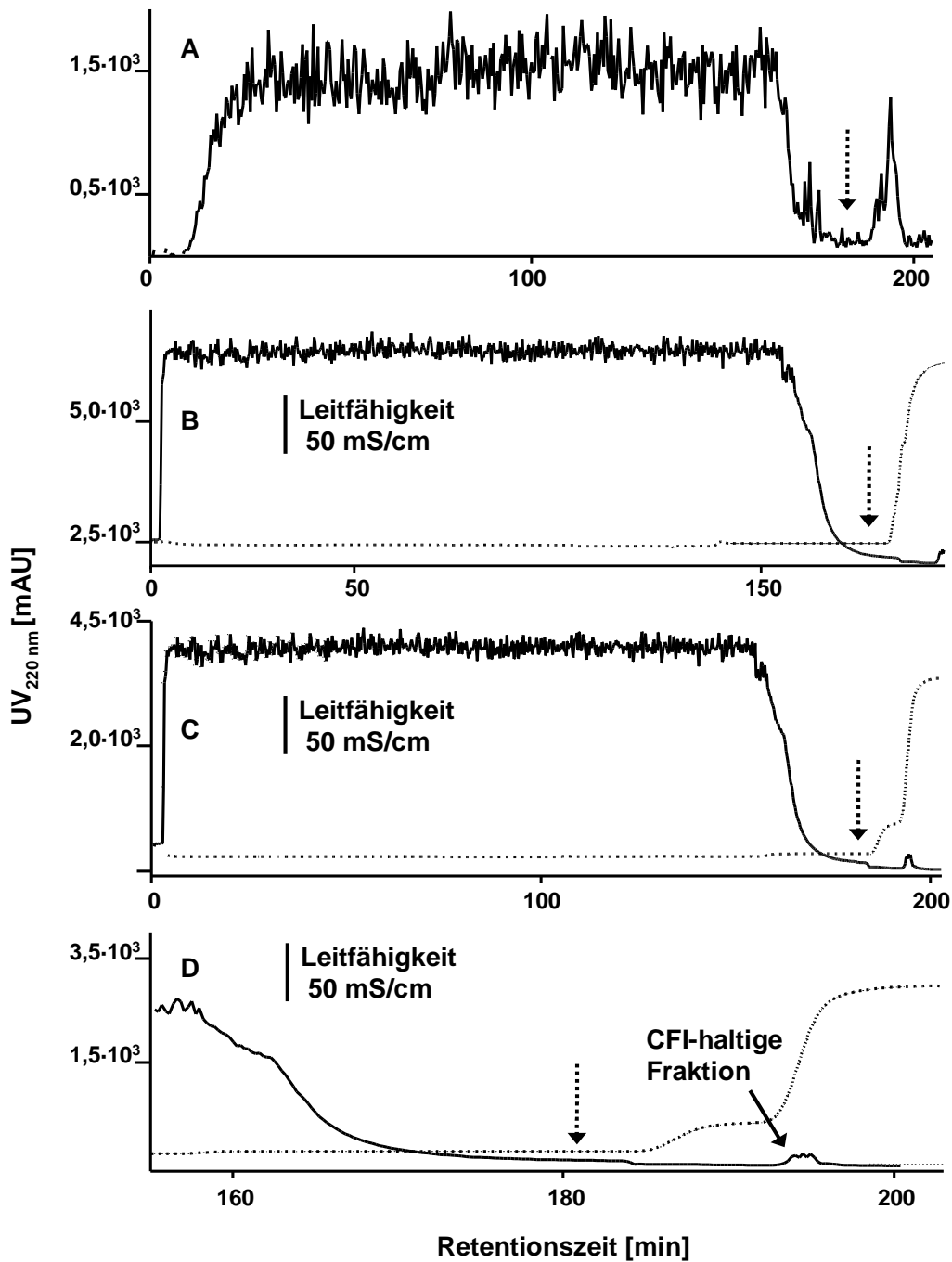


Abbildung 3.1 Chromatogramme der Aufreinigung des CFI aus Plasma. A: Chromatogramm der Affinitätschromatographie mit der Lysin-Sepharose-Säule, B: Chromatogramm der Antikörper-Affinitätschromatographie mit unspezifischem Antikörper, C: Chromatogramm der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie (erster Probenaufrag), D: wie C, Elution des gebundenen Proteins. Die gestrichelte Linie gibt jeweils den Verlauf der Leitfähigkeit an, der Beginn der Elution ist durch den gestrichelten Pfeil gekennzeichnet. Die CFI-enthaltende Fraktion ist mit einem Balken gekennzeichnet.

Ergebnisse

Im Anschluss an die Elution der Proteine wurde der Durchfluss der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie erneut auf dieser Säule chromatographiert, um eventuell im Durchfluss verbliebenes CFI zu gewinnen, das Chromatogramm ist im Anhang beigefügt.

Die Entwicklung der Gesamtproteinmengen während der Aufreinigungsstufen wurde durch eine Proteinbestimmung nach Bradford [97] verfolgt. Die Aufreinigung wurde mit 210 ml Plasma gestartet. Die Gesamtproteinmenge in dieser Ausgangsfraction lag bei rund 14,5 g, was einer Proteinkonzentration von 69 mg Protein je Milliliter Plasma entspricht und damit dem Referenzbereich der Gesamtplasmaproteinkonzentration bei Erwachsenen (64-83 mg/ml [102]) liegt. Die Gesamtproteinmenge nahm erwartungsgemäß in der Durchflussfraction der Lysin-Sepharosesäule nach Ultrafiltration ab, da hier Proteine wie Plasmin und das Vorläuferprotein Plasminogen auf dem Säulenmaterial angereichert wurden. Plasminogen liegt im Plasma mit einer Konzentration von 200 mg/l [103] vor, sodass sich die Verluste von knapp zwei Gramm Protein bei dieser Chromatographie nicht allein auf dessen Abreicherung zurückführen lassen. Möglicherweise wurden weitere, unspezifisch mit dem Chromatographiematerial interagierende Proteine abgereichert oder Proteine haben bei der nachfolgenden Umpufferung über Ultrafiltration an die Filtrationsmembran adsorbiert. Im Durchfluss der Antikörper-Affinitätschromatographie mit einem unspezifischen Antikörper stieg die ermittelte Protein-Gesamtmenge wieder leicht an, was sich entweder auf einen Messfehler oder aber auf einen Einfluss der Pufferumgebung auf die Bradford-Messung zurückführen lässt. Die Proteinmenge in den Durchflussfractionen der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographien sank wieder leicht um rund zwei bzw. ein Gramm im ersten bzw. zweiten Durchlauf. Eluiert wurden jedoch nur 0,46 Gramm Protein in der ersten und 0,14 Gramm Protein in der zweiten Chromatographie. Auch in diesen Schritten der Aufreinigung sind also deutliche Mengen an Protein über unspezifische Wechselwirkungen verloren gegangen. Die Gesamtmenge an eluierten Proteinen von der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie lag bei 0,6 Gramm. Der CFI liegt im Plasma in einer Konzentration von 20-46 mg/l [103] vor. Da 210 ml Plasma eingesetzt wurden, beträgt die maximale Ausbeute an CFI also 4,2-9,6 mg, es sind also massive

Ergebnisse

Proteinverunreinigungen in der Eluatfraktion zu erwarten, diese wurden jedoch hier nicht weiter untersucht.

Tabelle 3.1: Reinigungstabelle des CFI aus Plasma. Angegeben sind jeweils die Proteinkonzentration, das Volumen der Probe sowie die sich daraus ergebende Gesamtproteinmenge. Folgende Proben sind aufgetragen: 1 Plasma-Pool; 2 Durchfluss Lysin-Sepharose nach Umpufferung; 3 Durchfluss der Antikörper-Affinitätschromatographie mit unspezifischem Antikörper; 4 Durchfluss der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie (erster Probenauftrag); 5 Durchfluss der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie (zweiter Probenauftrag); 6 Eluat der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie (erster Probenauftrag); 7 Eluat der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie (zweiter Probenauftrag).

Probe	Konzentration [mg/ml]	Volumen [ml]	Gesamtproteinmenge [mg]
1	69,45	210	14585,47
2	47,21	270	12746,08
3	51,48	260	13384,25
4	42,58	260	11070,23
5	38,46	260	9999,08
6	0,09	5	0,46
7	0,14	1	0,14

3.1.2 Nachweis der proteolytischen Aktivitäten der Komplementfaktor I-haltigen Fraktion aus humanem Plasma

Das Eluat der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie wurde auf C3b-abbauende und Urotensin-II-generierende Aktivität getestet.

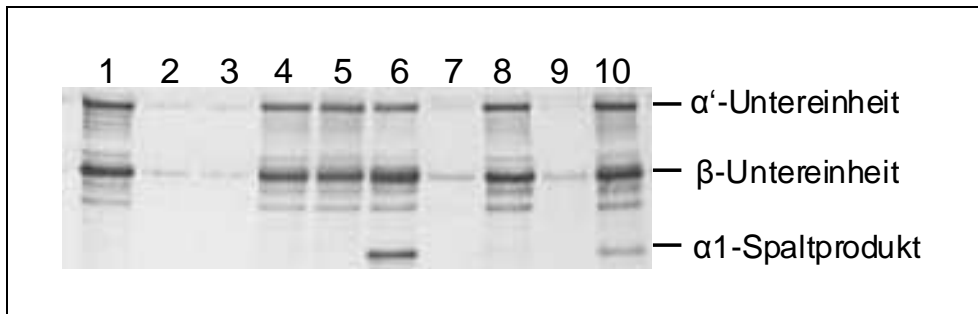


Abbildung 3.2 Nachweis der C3b-abbauenden Aktivität der Proteine der CFI-Fraktion aus der Antikörper-Affinitätschromatographie nach Reinigung aus Plasma. Western Blot mit polyclonalem Anti-C3-Erstantikörper aus Ziege und einem AP-konjugierten Zweitantikörper aus Kaninchen. Probenauftrag: 1 C3b, 2 kommerziell erworbener CFI, 3 Faktor H (FH), 4 C3b + kommerziell erworbener CFI, 5 C3b + FH, 6 C3b + kommerziell erworbener CFI + FH, 7 CFI-Fraktion, 8 C3b + CFI-Fraktion, 9 CFI-Fraktion + FH, 10 C3b + CFI-Fraktion + FH. Aufgetragen wurde ein Volumen von 15 μ l je Inkubationsansatz.

Der Nachweis der C3b-abbauenden Aktivität erfolgte nach der Vorschrift von Kavanagh *et al.* [93] Hierbei wird das Substrat, die Komplementkomponente C3b, mit CFI bzw. der CFI-haltigen Fraktion sowie dem Cofaktor, Faktor H, bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proteine über eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt und C3b und seine Abbauprodukte per Immunoblotting mit einem polyclonalen α -C3b-Antikörper nachgewiesen. Abbildung 3.2 zeigt das Ergebnis eines solchen Nachweises. In Spur 1 wurde das Substrat C3b allein aufgetragen. C3b besteht aus zwei Untereinheiten, der α' - sowie der β -Untereinheit, welche durch eine Disulfidbrücke kovalent verbunden sind. Durch die Reduktion der Disulfidbrücke nach Zugabe des PAGE-Probenpuffers entstehen die beiden charakteristischen Banden bei 104 kDa (α' -Untereinheit) sowie 71 kDa (β -Untereinheit, vgl. Abbildung 3.2, Spur 1). Da ein polyclonaler Antikörper verwendet wurde, sind beide Untereinheiten auf dem Western Blot zu erkennen. Die α' -Untereinheit des C3b wird durch den CFI in Anwesenheit des Faktor H gespalten, wodurch das Fragment α 1 entsteht, das im

Ergebnisse

Western Blot bei einer Höhe von etwa 43 kDa sichtbar ist (vgl. Abbildung 3.2, Spur 6). Der CFI und der Faktor H zeigten im Western Blot leichte Banden auf Höhe der α' - und der β -Untereinheit (Spur 2 und 3), welche vermutlich durch Verunreinigungen der Fraktionen mit C3b während der Reinigung dieser kommerziell erworbenen Enzyme entstanden. Durch alleinige Inkubation des CFI oder des Faktor H mit dem C3b entstand kein Abbauprodukt (Spur 4 und 5), da der Faktor H selbst keine proteolytische Aktivität besitzt und der CFI ohne Cofaktor nicht in der Lage ist, das Substrat umzusetzen [104]. Die Eluatfraktion der CFI-Antikörper-Chromatographie zeigte ebenfalls leichte C3b-Verunreinigungen (Spur 7), jedoch weder bei alleiniger Inkubation mit dem Substrat C3b (Spur 8) noch dem Faktor H (Spur 9) eine erkennbare Bande auf Höhe des α 1-Spaltprodukts. Lediglich bei Inkubation der CFI-haltigen Fraktion mit dem Substrat und dem Cofaktor Faktor H entsteht auch hier die typische Bande des Abbauprodukts. Es konnte mit diesem Assay gezeigt werden, dass die Eluatfraktion spezifische C3b-abbauende Aktivität aufweist.

Die Fraktion wurde anschließend mit dem Massenspektrometrie-unterstützten Enzym Assay (MES)-Assay auf Urotensin-II-generierende Aktivität getestet. Die Fraktion wurde hierfür an CNBr-aktivierte Sepharosebeads immobilisiert und mit einem 20 Aminosäuren langen Peptidsubstrat inkubiert. Dieses Peptid besteht aus der Sequenz der 20 C-terminalen Aminosäuren des Urotensin-Vorläuferproteins und ist damit ein um einige Aminosäuren verlängertes Urotensin-II, das nachfolgend als UII_105-124 bezeichnet wird (Sequenz: RIWKPYKKRETPDCFWKYCV). Nach definierten Inkubationszeiten erfolgten die Abnahme von Aliquots und die Messung des Reaktionsprodukts mit der Selected-Reaction Monitoring (SRM) Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS-SRM).

Das Ergebnis der SRM-Messung nach 24 und 72 Stunden Inkubationszeit ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Abgebildet sind die Flächeninhalte der Signale des Urotensin-II (UII) in den SRM-Chromatogrammen. Die Abbildung zeigt, dass das SRM-Signal für UII in der CFI-haltigen Fraktion deutlich größer war als in der Negativkontrolle, bei der das Substrat mit Glycin-derivatisierten Chromatographiepartikeln ohne immobilisiertes Protein inkubiert wurde. Zudem ist ein Anstieg des Signals mit zunehmender Inkubationszeit zu erkennen.

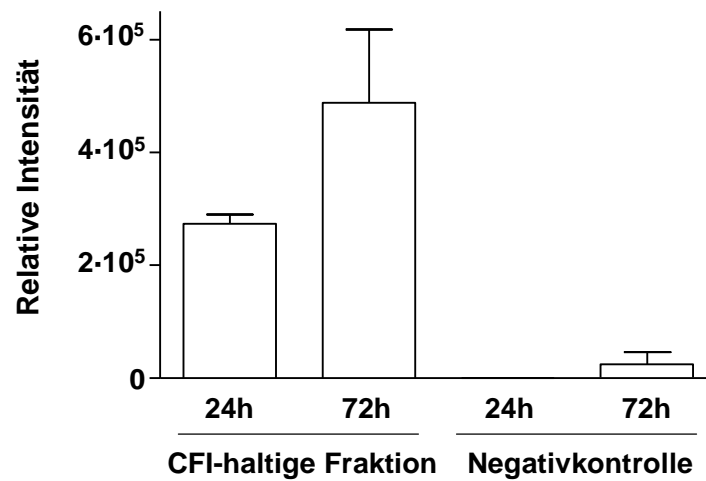


Abbildung 3.3 Signalintensität von UII in den SRM-Chromatogrammen nach Inkubation immobilisierter Proteine der CFI-Fraktion aus der Antikörper-Affinitätschromatographie nach Reinigung aus Plasma. Negativkontrolle: Glycin-derivatisierte Chromatographiepartikel ohne immobilisiertes Protein. Die Inkubation erfolgte mit einer 10^{-4} M UII₁₀₅₋₁₂₄-Lösung, die Messung des Reaktionsprodukts erfolgte nach definierten Inkubationszeiten mit ESI-IT-SRM.

3.1.3 Reinigung des Komplementfaktor I aus der humanen Cohn-Fraktion IV-4

Die Reinigung von größeren Mengen des CFI aus humanem Plasma ist problematisch, da große Mengen an Blut bzw. Plasma verwendet werden müssen, um ausreichende Mengen an Zielprotein zu erhalten. Aus vorangegangenen Untersuchungen war bekannt, dass die humane Cohn-Fraktion IV-4 den CFI enthält [25, 105]. Bei den Cohn-Fractionen handelt es sich um Plasmaprotein-Fractionen, die nach dem Verfahren von Edward J. Cohn und Mitarbeitern durch Ausfällung der Proteine am isoelektrischen Punkt bei gleichzeitiger Verringerung der Löslichkeit durch Alkoholzusatz hergestellt werden [106]. So enthält beispielsweise die Fraktion IV Proteine, die bei steigenden Ethanol-Konzentrationen von 18 bis 40 % und einem pH-Gradienten von 5,2 bis 5,8 präzipitieren.

Ergebnisse

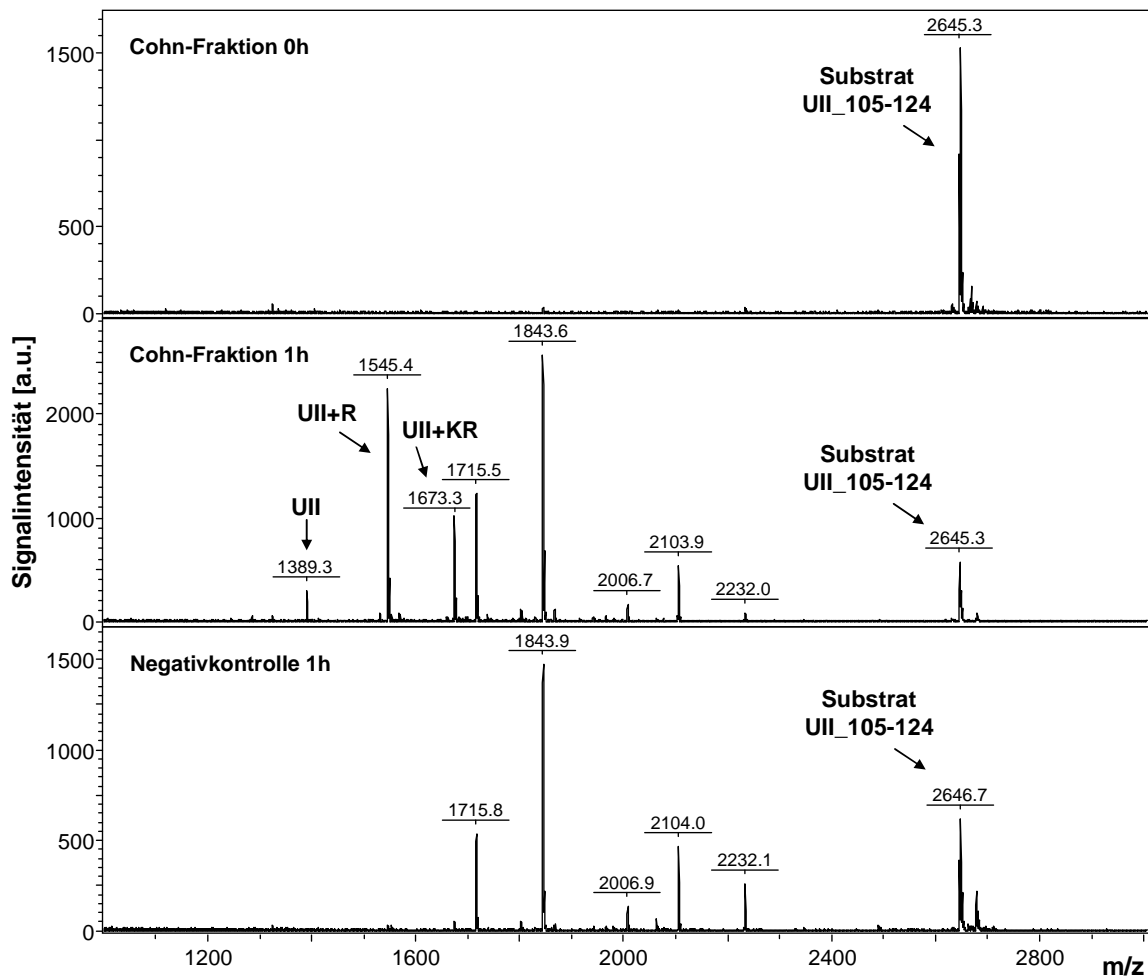


Abbildung 3.4: UCE-Aktivität der immobilisierten Proteine der Cohn-Fraktion IV-4. Negativkontrolle: Glycin-derivatisierte Chromatographiepartikel ohne immobilisiertes Protein. Die Inkubation erfolgte mit einer 10^{-5} M UII_105-124-Lösung, die Messung der Reaktionsprodukte erfolgte nach definierten Inkubationszeiten mit MALDI-TOF-MS.

Vor Beginn der Reinigung des CFI aus der Cohn-Fraktion wurde diese mit einem MES-Assay auf ihre Urotensin-II-generierende Aktivität getestet. Die abgenommenen Aliquots aus der Reaktionslösung wurden direkt auf den MALDI-Proben-teller aufgetragen, auf welchem bereits die MALDI-Matrix 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) vorgespottet und getrocknet war. Die Messung erfolgte an einem MALDI-TOF-Massenspektrometer, das Ergebnis ist in Abbildung 3.4 zu sehen. Zu Beginn der Inkubation (Zeitpunkt $t=0$ h) war das Signal bei $m/z = 2645$ das einzige Signal mit signifikanter Signalintensität. Es handelt sich hierbei um das Substrat UII_105-124. Nach einer Stunde Inkubation entstanden im Inkubationsansatz der immobilisierten Proteine der Cohn-Fraktion viele weitere Peaks, darunter auch der des Urotensin-II

Ergebnisse

(UII_114-124 bei $m/z = 1389$), der des UII+R (UII_113-124 bei $m/z=1545$) sowie der des UII+KR (UII_112-124 bei $m/z = 1673$). Es handelt sich dabei um die jeweils N-terminal um eine Aminosäure verlängerten Urotensin-Peptide. Alle weiteren prominenten Signale, die im Inkubationsansatz der immobilisierten Proteine vorhanden waren, entstanden auch in der Negativkontrolle, sodass es sich hierbei um Produkte unspezifischer Reaktionen handelt, die von den Chromatographiematerialien katalysiert werden.

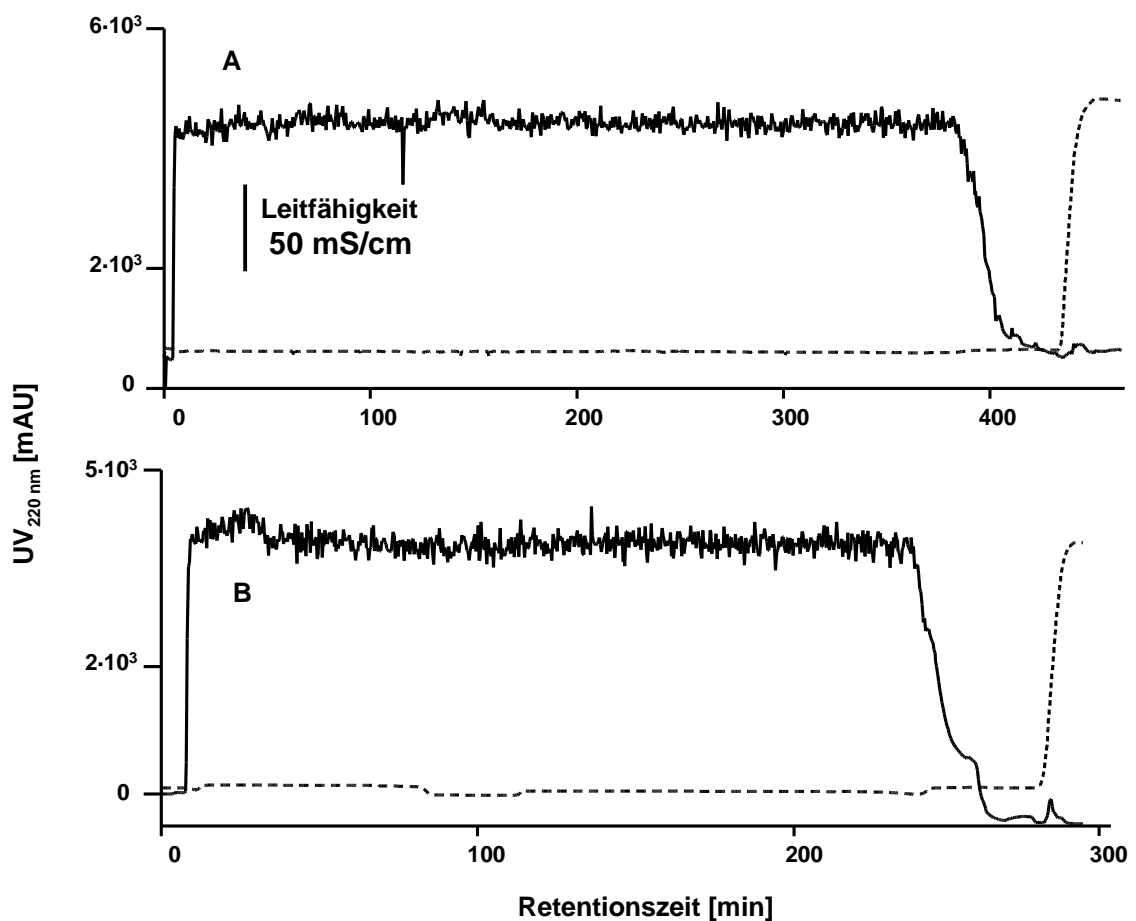


Abbildung 3.5: Chromatogramme der Aufreinigung des CFI aus der Cohn-Fraktion IV-4. A: Chromatogramm der Antikörper-Affinitätschromatographie mit unspezifischem Antikörper, B: Chromatogramm der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie (erster Probenauftrag). Die gestrichelte Linie gibt jeweils den Verlauf der Leitfähigkeit an, der Beginn der Elution ist durch den gestrichelten Pfeil gekennzeichnet.

Ergebnisse

Da in der Cohn-Fraktion IV-4 die Proteine Plasmin und Plasminogen bereits abgereichert sind [25, 105], entfiel bei der Reinigung des CFI aus dieser Fraktion der erste chromatographische Schritt, die Lysin-Sepharose-Säule. Stattdessen wurde die Aufreinigung direkt mit der Säule mit Antikörpern (IgG) aus Kaninchenserum begonnen (Abbildung 3.5 A). Es folgte wie zuvor die Anreicherung des CFI über eine CFI-Affinitätschromatographie mit dem an Sepharosebeads immobilisierten α -CFI-Antikörper (Abbildung 3.5 B). Der Durchfluss wurde erneut aufgefangen und ein zweites Mal über die CFI-Affinitätschromatographie chromatographiert, um eventuell beim ersten Probenauftrag nicht gebundenen CFI in dieser zweiten Chromatographie anzureichern (Chromatogramm siehe Anhang).

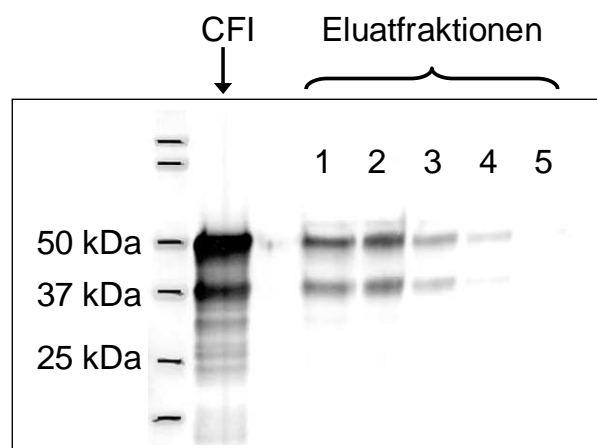


Abbildung 3.6: Western Blot-Analyse des CFI in den Eluat-Fractionen nach Reinigung aus der Cohn-Fraktion IV-4 mit der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie. Aufgetragen sind 5 μ g kommerziell erworbenes CFI sowie je 15 μ l der Eluatfraktionen 1 bis 5 aus der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie (erster Probenauftrag), detektiert wurde mit einem polyclonalen anti-CFI-Erstantikörper aus Schaf und einem AP-konjugierten Zweitantikörper aus Kaninchen.

Die Eluatfraktionen wurden zum Nachweis von CFI mit einem Immunoblot analysiert (Abbildung 3.6). Neben dem kommerziell erworbenen CFI als Kontrolle sind die Eluatfraktionen 1 bis 4 aufgetragen. Der CFI besteht aus zwei Untereinheiten, einer kleinen (27 kDa) und einer großen (35 kDa) Untereinheit. Die beiden Untereinheiten laufen jedoch auf der PAGE bei etwa 37 und 50 kDa (vgl. kommerzielle CFI-Fraktion). Der Grund hierfür ist die starke Glykosylierung, beide Untereinheiten enthalten je drei Glykosylierungssites, welche vermutlich komplett glykosyliert vorliegen [84]. Die

Fraktionen eins bis vier zeigten auf dem Western Blot die typischen Banden des CFI in abnehmender Konzentration. Die fünfte Eluatfraktion enthielt keine nachweisbaren Mengen des CFI. Die Fraktionen eins bis vier sowie die CFI-haltigen Eluatfraktionen des zweiten Probenauftrags wurden daraufhin gepoolt und für die weiterführenden Versuche verwendet. Eine Bestimmung der Gesamtproteinmenge ergab eine Proteinmenge von 0,81 mg. Für die Reinigung eingesetzt wurden fünf Gramm lyophilisierte Proteine der Cohn-Fraktion.

Zur Ermittlung der Gesamtproteinmenge in den Eluaten der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Es ergab sich eine Konzentration von 0,37 mg/ml bei einem Probenvolumen von 2,2 ml. Das entspricht einer Gesamtproteinmenge von 0,81 mg.

3.1.4 Nachweis der proteolytischen Aktivitäten der Komplementfaktor I-haltigen Fraktion aus der humanen Cohn-Fraktion IV-4

Der Nachweis der proteolytischen Aktivitäten der CFI-haltigen Fraktion aus der Reinigung aus der Cohn-Fraktion erfolgte zunächst über einen Fluoreszenz-Assay nach Tsiftoglou und Sim [80]. Die CFI-Fraktion wurde hier mit dem Fluoreszenzsubstrat Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-AMC bei 37 °C inkubiert. Alle 30 Minuten erfolgte die Fluoreszenzmessung bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 465 nm. Das Ergebnis in Abbildung 3.7 zeigt einen deutlichen Anstieg der Emission bei 465 nm in der Eluatfraktion der CFI-Affinitätschromatographie im Vergleich mit der proteinfreien Kontrolle, was auf eine deutliche proteolytische Aktivität hinweist.

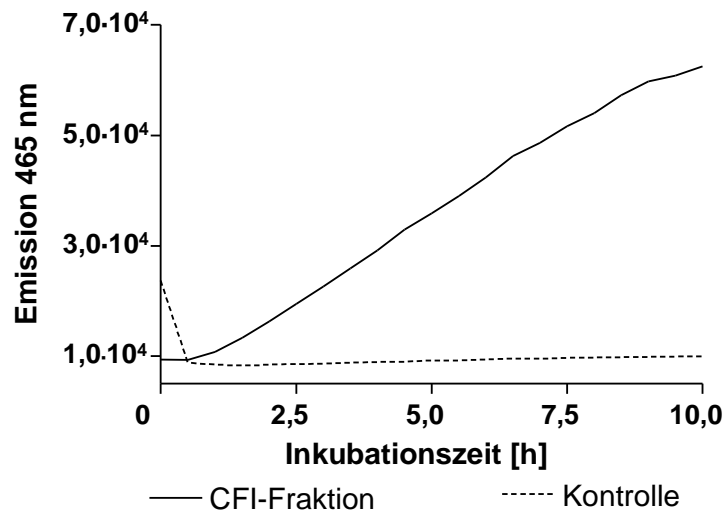


Abbildung 3.7: Nachweis der proteolytischen Aktivität der CFI-haltigen Fraktion per Fluoreszenz-Assay. Inkubation der Eluatfraktion aus der Antikörper-Affinitätschromatographie mit dem Fluoreszenzsubstrat Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-AMC. Die Messung erfolgte alle 30 Minuten bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 465 nm. Als Kontrolle wurde das Fluoreszenzsubstrat in proteinfreier Pufferlösung inkubiert.

Der Nachweis der Urotensin-II-generierenden Aktivität erfolgte mit dem MES-Assay in Verbindung mit der Auswertung an einem MALDI-TOF-Massenspektrometer. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.8 dargestellt. Während zu Beginn der Inkubationszeit fast nur das Signal des Substrats bei $m/z = 2645$ im Spektrum zu sehen war, erschienen nach 8 bzw. 24 Stunden Inkubation der immobilisierten Proteine einige weitere Peaks, unter anderem die Signale der Peptide Urotensin-II, der des UII+R sowie der des UII+KR. Es war also Urotensin-II-generierende Aktivität in der Fraktion nachweisbar.

Ergebnisse

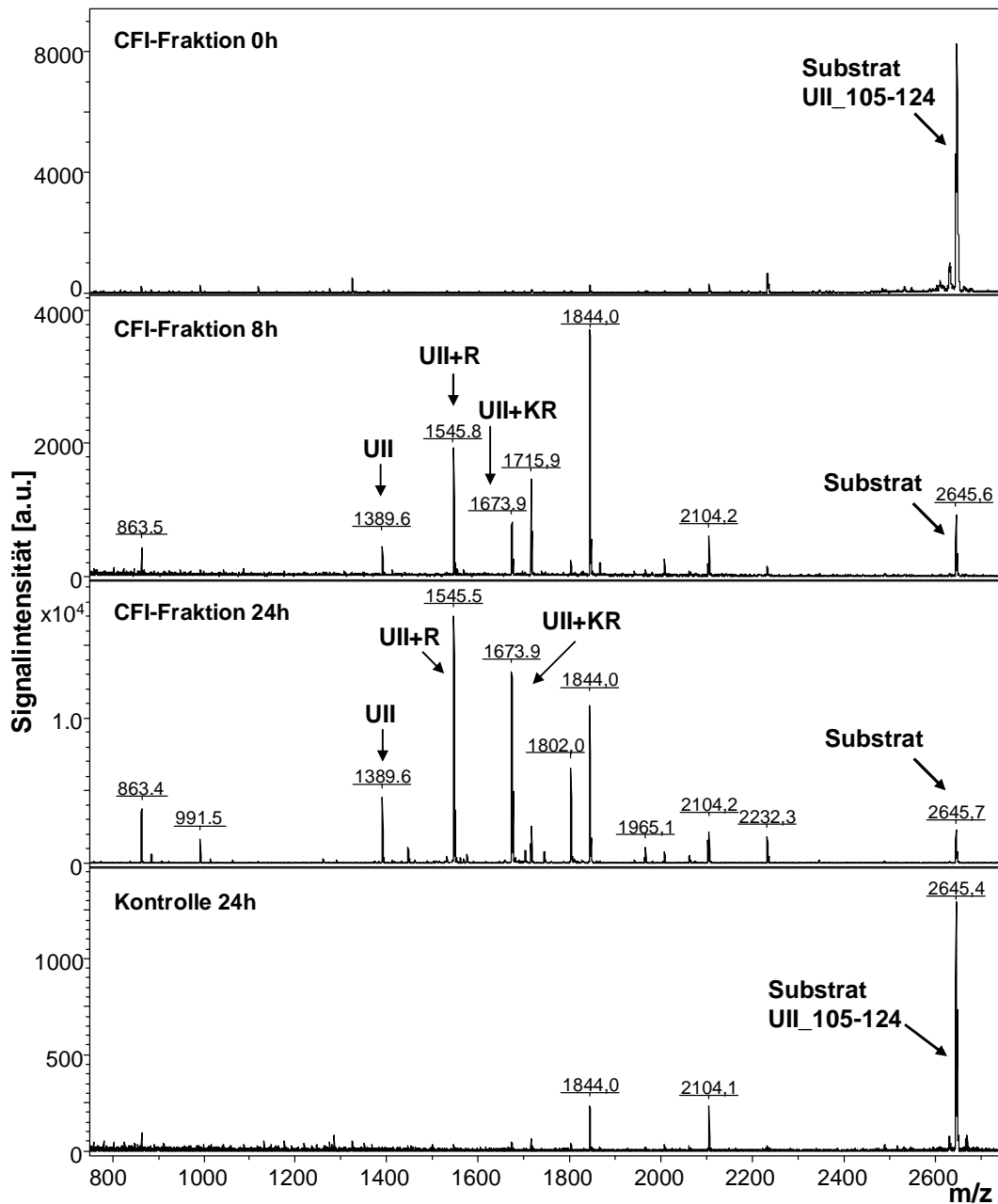


Abbildung 3.8: Inkubation der immobilisierten Proteine der Eluatfraktion aus der Antikörper-Affinitätschromatographie mit dem UII_105-124 nach Reinigung aus der Cohn-Fraktion IV-4. Negativkontrolle: Glycin-derivatisierte Chromatographiepartikel ohne immobilisiertes Protein. Die Inkubation erfolgte mit einer 10^{-5} M UII_105-124-Lösung, die Messung der Reaktionsprodukte erfolgte nach definierten Inkubationszeiten mit MALDI-TOF-MS mit der Matrix DHB.

Ergebnisse

Tabelle 3.2: Proteolyseprodukte der Inkubation der immobilisierten Proteine der Eluatfraktion aus der Antikörper-Affinitätschromatographie mit dem UII_105-124 nach Reinigung aus der Cohn-Fraktion IV-4. Aufgetragen sind der m/z-Wert aus dem MALDI-TOF-Spektrum sowie die dazu identifizierte Peptidsequenz.

m/z-Wert	Identifizierte Sequenz	Kürzel	Theoretische Masse [M+H] ⁺
863,4	RIWKPY	UII_105-110	882,5
991,3	RIWKPYK	UII_105-111	990,6
1389,4	ETPDCFWKYCV (UII)	UII_114-124	1388,6
1545,5	RETPDCFWKYCV (UII+R)	UII_113-124	1544,7
1673,6	KRETPDCFWKYCV (UII+KR)	UII_112-124	1672,6
1802,0	KKRETPDCFWKYCV	UII_111-124	1800,6
1965,1	YKKRETPDCFWKYCV	UII_110-124	1963,9
2232,3	Unbekannt		-

Es entstanden zudem weitere Peaks. Entstandene Signale, die nur im Inkubationsansatz der immobilisierten Proteine, nicht jedoch in der Negativkontrolle ohne immobilisiertes Protein vorhanden waren, sind in Tabelle 3.2 aufgelistet. Die zusätzlich entstandenen Peptide sind ein Hinweis auf weitere Proteasen, die neben dem Urotensin-generierenden Enzym die Fraktion verunreinigen. Um diese zu identifizieren, wurden die Proteine tryptisch verdaut und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

3.1.5 Identifizierung von Proteinen mit LC/MS

Die Identifizierung der Proteine der Eluatfraktionen der Antikörper-Affinitätschromatographie erfolgte mit Hilfe eines tryptischen Verdauung mit anschließender Flüssigkeitschromatographie-(liquid chromatography, LC) gekoppelter Massenspektrometrie (LC-MS).

Die proteinhaltige Probe wurde dabei zunächst mit denaturierenden und reduzierenden Reagenzien behandelt, um die dreidimensionale Struktur der Proteine aufzulösen und Disulfidbrücken aufzubrechen. Anschließend erfolgte die kovalente Modifikation der Cystein-Reste mit Iodacetamid, was einer Carbamidomethylierung der Cysteine bewirkt. Dann wurden die Proteine mit der Protease Trypsin proteolytisch verdaut. Die entstandenen Proteolyseprodukte, die sogenannten tryptischen Peptide, wurden über eine Reversed-Phase-Chromatographie nach ihrer Hydrophobizität getrennt. Die eluierenden Peptide wurden direkt in einer ESI-Ionenquelle ionisiert und desorbiert und anschließend massenspektrometrisch vermessen. Die Messung erfolgte hier an einem Chip-Cube-Ionenfallen-Massenspektrometer (Agilent Technologies).

Das Ergebnis eines solchen LC-MS-Laufs wird in Abbildung 3.9 A gezeigt. Es handelt sich hierbei um das Totalionenstrom-Chromatogramm des LC-MS-Laufs. Als Totalionenstrom (total ion current, TIC) bezeichnet man die Summe der Ströme, die von den Ionen aller m/z -Werte im Spektrum erzeugt wird.

Informationen zur Identifizierung der Proteine enthält man aus dem Chromatogramm nicht, dazu müssen zunächst die MS- und MS/MS-Spektren aus dem Chromatogramm extrahiert werden. Das m/z -Verhältnis eines Peptids, ermittelt aus dem MS-Spektrum, zusammen mit den Fragmenten aus den b- und y-Ionenserien, die im zugehörigen MS/MS-Spektrum identifiziert werden können, ergeben die Information über die Identität des untersuchten Peptids.

Ergebnisse

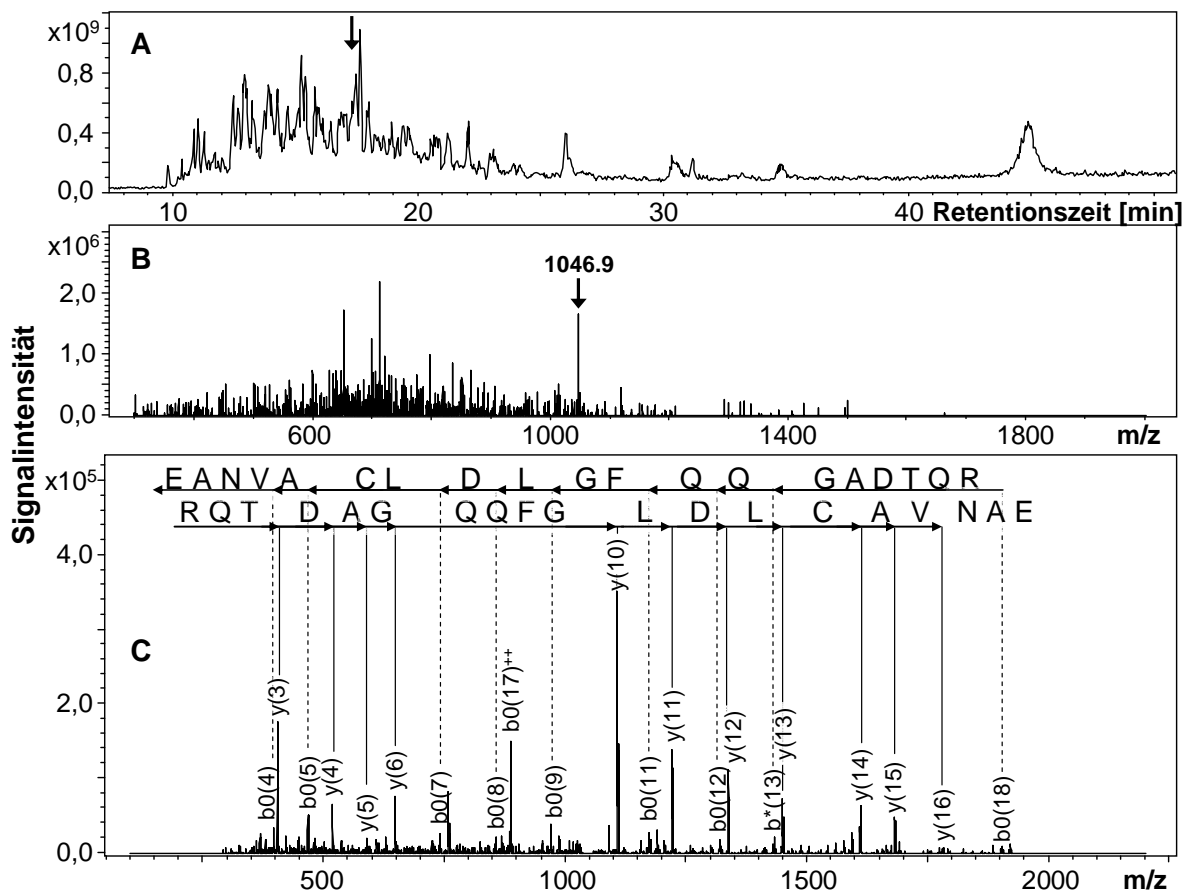


Abbildung 3.9: LC/MS-Lauf zur Identifizierung der Proteine aus der Eluatfraktion der Antikörper-Affinitätschromatographie. A: TIC-Chromatogramm des LC/MS-Laufs. B: MS-Fullscan-Spektrum zum Zeitpunkt $t=17,3$ min. C: MS/MS-Spektrum der Komponente mit $m/z = 1046,9$ aus Abbildung 3.9 B. Dargestellt sind die b-Ionenserien (gestrichelte Linien) und y-Ionenserien (durchgezogene Linien) sowie die dazugehörige identifizierte Sequenz des Peptids EANVA CL DLGF QQ GADTQR (Aminosäuren 149 bis 167 des CFI). Die Fragmentierung erfolgte mit CID.

Abbildung 3.9 B und Abbildung 3.9 C zeigen das MS- und MS/MS-Spektrum eines identifizierten Peptids. MS/MS- oder Fragment-Spektren erhält man durch die Fragmentierung der Peptide. Diese erfolgte durch Zufuhr eines Kollisionsgases. Dadurch tritt eine kollisionsinduzierte Dissoziation (collision induced dissociation, CID) der Peptide auf, welche die Entstehung von b- und y-Ionenserien begünstigt [107, 108]. Die zugeordneten b- bzw. y-Ionen sind in der Abbildung markiert und wurden der Peptidsequenz zugeordnet. Das m/z -Verhältnis eines Peptids, ermittelt aus dem MS-Spektrum, zusammen mit den Fragmenten aus den b- und y-Ionenserien, die im

zugehörigen MS/MS-Spektrum identifiziert werden können, ergeben die Information über die Identität des untersuchten Peptids. Es handelt sich im dargestellten Spektrum um das tryptische Peptid mit der Sequenz EANVACLDLGFQQGADTQR (Aminosäuren 149 bis 167 des CFI). Die Masse dieses Peptids liegt bei 2034,9 Da. Durch die Oxidation und Carbamidomethylierung des in diesem tryptischen Peptid enthaltenen Cystein-Rests (Massendifferenz von +57 Da) sowie die 2-fache Ladung ergibt sich einen m/z-Wert von 1046,9 (Abbildung 3.9 B).

Die Identifizierung der Proteine eines LC-MS-Laufs erfolgt per Datenbankabgleich über die Software Mascot [98]. Das Peptid wurde mit einem Mascot-Score von 106 identifiziert. Zusätzlich wurden in dieser Fraktion 12 weitere Peptide des CFI identifiziert, was zu einer Sequenzabdeckung von 40 % und einem Mascot-Proteinscore von 538 führte. Der Mascot-Score gibt die Wahrscheinlichkeit der richtigen Identifizierung an, je größer der Score, desto wahrscheinlicher ist die richtige Identifizierung des Proteins. Mascot-Scores größer als 65 werden typischerweise als signifikant angesehen [109THRESHOLDS, 2010 #125]. Der CFI konnte somit sicher identifiziert werden. Die Identifizierung des CFI mit einem so hohen Score spricht für eine deutliche Anreicherung des Proteins durch die Aufreinigung über die CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie.

Neben dem CFI konnten viele weitere Proteine identifiziert werden. Eine Übersicht der identifizierten Proteine ist in Tabelle 3.3 gegeben. Neben dem Proteinnamen ist in dieser Tabelle der jeweils höchste Mascot-Proteinscore angegeben, den das Protein durch die Analyse der verschiedenen Eluatfraktionen erzielte. Bei den identifizierten Proteinen handelt es sich um Plasmaproteine, die zum Teil als sehr abundante Proteine zirkulieren. Dazu gehören beispielweise Serotransferrin und Serumalbumin [110]. Beide Proteine wurden mit einem sehr hohen Score identifiziert. Der Mascot-Score gibt keine direkte Relation zur Proteinmenge, da sich dieser Wert aus den Scores der identifizierten Peptide und damit sowohl aus der Anzahl der identifizierten Peptide als auch der Qualität der MS/MS-Spektren zusammensetzt. Die Qualität der MS/MS-Spektren nimmt jedoch mit steigender Peptidkonzentration zu, sodass ein hoher Mascot-Score zumindest als Hinweis auf eine hohe Proteinkonzentration angesehen werden kann. Es ist also davon auszugehen, dass neben dem CFI auch weitere Proteine in hohen Konzentrationen vorliegen. Es ist also nicht gelungen, über die zweistufige Reinigung eine homogene CFI-Fraktion zu erhalten.

Ergebnisse

Tabelle 3.3: Identifizierte Proteine der Eluatfraktionen aus der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie. Angegeben sind die Namen der Proteine, der MASCOT-Score, mit dem die Proteine identifiziert wurden sowie Angaben über eine Protease- oder inhibitorische Aktivität.

Identifizierte Proteine	Score	Protease-/Inhibitor-Aktivität
Serotransferrin	995	
Serum albumin	543	
Complement factor I (CFI)	538	Serinprotease
Haptoglobin	511	Protease-homolog, keine enzymatische Aktivität
Apolipoprotein A-II	299	
Haptoglobin-related protein	279	Protease-homolog, keine enzymatische Aktivität
Alpha-1-antitrypsin	246	Protease-Inhibitor (Serinproteasen)
Ig alpha-1 chain C region	237	
Ig kappa chain C region	220	
Alpha-2-macroglobulin	219	Protease-Inhibitor (Serinproteasen)
Hemoglobin subunit beta	219	
Ig alpha-2 chain C region	147	
Ig gamma-2 chain C region	120	
Ig gamma-4 chain C region	114	
Clusterin	112	
Vitamin D-binding protein	111	
Ig gamma-3 chain C region	110	
Angiotensinogen	106	
Complement factor B	100	Serinprotease
Pigment epithelium-derived factor	83	
Ceruloplasmin	82	
Hemopexin	79	
Alpha-1B-glycoprotein	78	
Ig gamma-1 chain C region	78	
Vitronectin	78	
Antithrombin-III	75	Protease-Inhibitor (Serinproteasen)
Ig heavy chain V-III region BRO	75	
Ig lambda chain C regions	73	
Transthyretin	73	
Histidine-rich glycoprotein	70	
Alpha-1-antichymotrypsin	68	Protease-Inhibitor (Serinproteasen)
Plasma kallikrein	67	Serinprotease
Complement C4-A	54	
Kininogen-1	54	Protease-Inhibitor (Thiol-Proteasen)
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	51	Protease-Inhibitor (Serinproteasen)
Complement C3	42	
Beta-2-glycoprotein 1	40	

Ergebnisse

Verunreinigungen durch begleitende Proteine sind für die Untersuchungen der proteolytischen Aktivität unproblematisch, solange sie darauf keinen Einfluss nehmen. Daher wurden die Proteine in einer Literaturrecherche auf ihre Protease- oder inhibitorische Aktivität hin analysiert. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Tatsächlich wurden mit Haptoglobulin und dem Haptoglobulin related Protein zwei Protease-homologe Proteine identifiziert, die jedoch keine proteolytische Aktivität besitzen. Des Weiteren wurden mit Alpha-1-Antitrypsin, Alpha-2-Macroglobulin, Antithrombin-III, Alpha-1-Antichymotrypsin, dem Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor und Kininogen-1 fünf Serinproteaseinhibitoren und ein Thiolproteaseinhibitor identifiziert. Die Protease- bzw inhibitorische Aktivitäten der identifizierten Proteine sind ebenfalls in Tabelle 3.3 angegeben. Bei allen identifizierten Proteasen (CFI, Komplementfaktor B, Kallikrein) handelt es sich um stark glycosylierte Serinproteasen. In der Literatur sind jeweils die für Trypsin-ähnliche Proteasen typische Schnittspezifitäten nach Arginin (CFI und Komplementfaktor B) bzw. Arginin und Lysin (Kallikrein) beschrieben [111]. Eine Übersicht der Eigenschaften aller identifizierten Proteasen liefert Tabelle 3.4.

Tabelle 3.4: Übersicht der Eigenschaften der in den Eluatfraktionen der Antikörper-Affinitätschromatographie identifizierten Proteasen.

Protease	MW	Glycosylierung	De-Glycosylierung beeinflusst Aktivität?	pI [112]	Schnittspezifität [111]
Komplementfaktor I	63 kDa	6 N-Glycosylierungen (GlcNAc) [86]	nein [86]	6,49	Nach R
Komplementfaktor B	83 kDa	4 N-Glycosylierungen (GlcNAc) [113]	unbekannt	6,66	Nach R
Plasma-Kallikrein	64 kDa	5 N-Glycosylierungen (GlcNAc) [114]	nein [115]	8,57	Nach R, K

3.2 Nachweis der proteolytischen Aktivitäten von rekombinant exprimiertem Komplementfaktor I

Die Reinigung des CFI aus humanem Plasma oder Plasmafraktionen wie den Cohn-Fraktionen ist eine mögliche Quelle für die Reinigung eines zirkulierenden Zielproteins, gleichzeitig birgt dieser Weg jedoch das Problem der Verunreinigung durch begleitende Proteine. Eine alternative Quelle für Proteine liegt in der rekombinanten Expression *in vitro*. Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. John P. Atkinson der Washington University School of Medicine stellte rekombinant in HEK-293T-Zellen (Humane embryonale Nierenzellen, Human Embryonic Kidney, HEK) synthetisiertes CFI zur Verfügung. Dabei handelte es sich neben dem CFI-Wildtyp (WT) auch um die Mutante D501N. Bei dieser Mutante ist die Aminosäure Asparaginsäure an Position 501 des aktiven Proteins gegen die Aminosäure Asparagin ausgetauscht.

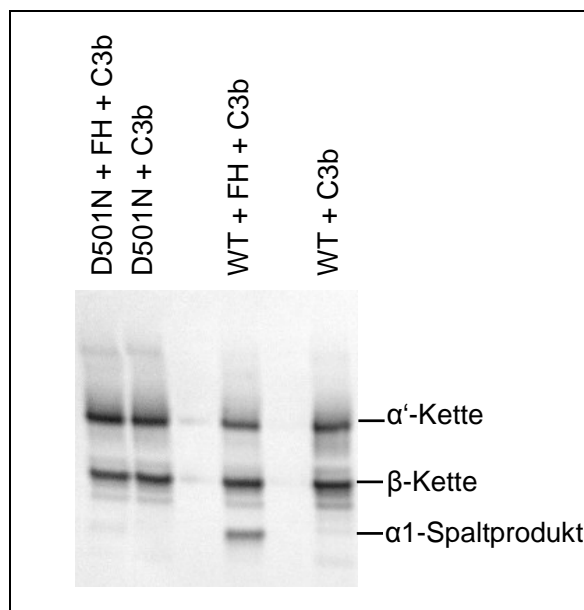


Abbildung 3.10: Nachweis der C3b-abbauenden Aktivität des rekombinant exprimierten CFI (Wildtyp und Mutante). Western Blot mit polyclonalem anti-C3-Erstantikörper aus Ziege und einem AP-konjugierten Zweitantikörper aus Kaninchen. Probenauftrag: 1 C3b, 2 kommerziell erworbenes CFI, 3 FH, 4 C3b + kommerziell erworbenes CFI, 5 C3b + FH, 6 C3b + kommerziell erworbenes CFI + FH, 7 CFI-Fraktion, 8 C3b + CFI-Fraktion, 9 CFI-Fraktion + FH, 10 C3b + CFI-Fraktion + FH. Aufgetragen wurde ein Volumen von 15 µl je Inkubationsansatz.

Ergebnisse

Die rekombinanten exprimierten CFI-Fraktionen wurden zunächst mit dem physiologischen Substrat auf C3b-abbauende Aktivität getestet. Das Ergebnis ist als Western Blot in Abbildung 3.10 dargestellt. Werden der rekombinante CFI und C3b zusammen inkubiert, wird das Substrat C3b nicht gespalten. Bei der Inkubation von C3b mit FH und dem CFI-WT entsteht die typische Bande des α 1-Spaltprodukts. Bei der Inkubation des CFI D501N mit C3b und dem FH entsteht auf dieser Höhe nur eine sehr schwache Bande.

Das Ergebnis des Nachweises der proteolytischen CFI-Aktivität mit dem Fluoreszenzsubstrat Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-AMC ist in Abbildung 3.11 gezeigt. Sowohl der CFI-WT als auch die Mutante D501N zeigen einen deutlichen Anstieg der Emission bei 465 nm. Beide Proteine waren demnach in der Lage, das kurze Fluoreszenzsubstrat zu spalten, die proteolytischen Aktivitäten unterschieden sich hierbei kaum.

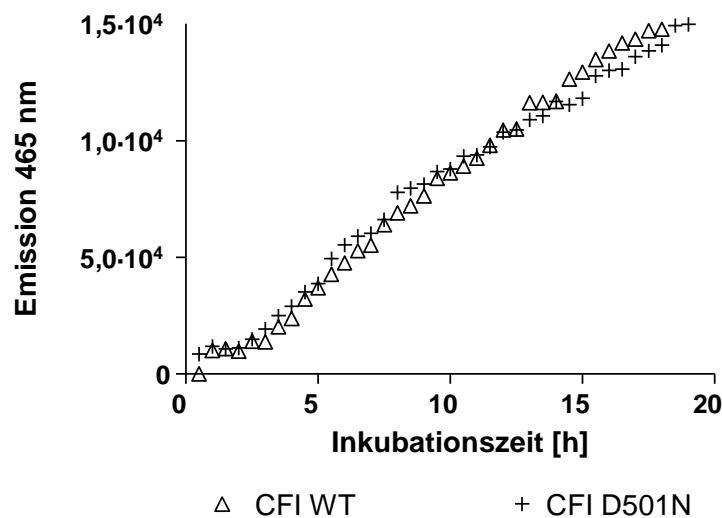


Abbildung 3.11 Nachweis der proteolytischen Aktivität der CFI-WT und der Mutante D501N per Fluoreszenz-Assay. Inkubation des CFI-WT und der CFI-Mutante D501N mit dem Fluoreszenzsubstrat Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-AMC. Die Messung erfolgte alle 30 Minuten bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 465 nm.

Ergebnisse

Die Urotensin-II-generierende Aktivität wurde durch Inkubation der CFI-Fractionen mit dem UCE-S getestet. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der C3b-abbauenden Aktivitäten mit dem C3b-Peptidsubstrat C3b-S. Aufgrund der geringen Proteinmengen erfolgten die Inkubationen in Lösung, die Proteine wurden nicht immobilisiert. Nach Abnahme von Aliquots zu definierten Inkubationszeiten erfolgte die Messung des Reaktionsprodukts (Urotensin-II bzw. C3b-R) mit ESI-IT-SRM.

Das Ergebnis dieser Messungen nach 24 Stunden Reaktionszeit ist in Abbildung 3.12 dargestellt. Es wird ersichtlich, dass die CFI-Mutante sowohl in der C3b-abbauenden, als auch in der Urotensin-II-generierenden Aktivität gegenüber dem CFI-WT deutlich reduzierte proteolytische Aktivität aufwies. Die Mutante war jedoch nicht vollständig inaktiv, in den Inkubationen wurde sowohl C3b-R als auch Urotensin-II gebildet.

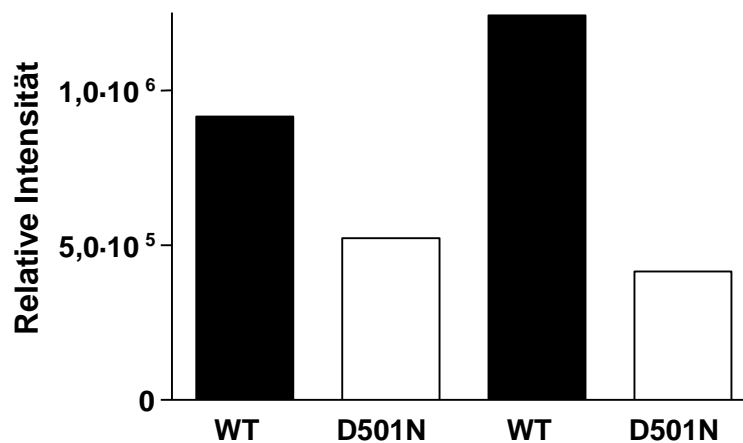


Abbildung 3.12: Signalintensitäten von C3b-R und UII nach Inkubation der Proteine der CFI-Fraktion aus der Antikörper-Affinitätschromatographie nach Reinigung aus Plasma. Die Inkubation erfolgte mit einer 10^{-4} M C3b-S- bzw. UII₁₀₅₋₁₂₄-Lösung, die Messung der Reaktionsprodukte erfolgte nach 24 Stunden Inkubationszeit mit ESI-IT-SRM.

3.3 Nachweis proteolytischer Aktivitäten in humanen Plasmaproben

Bei verschiedenen Krankheiten wurden erhöhte Urotensin-II-Plasmalevel beschrieben. Diese erhöhten Level könnten ein Hinweis auf eine erhöhte UCE-Aktivität und damit auch einer erhöhten CFI-Aktivität sein. Plasmaproben ausgewählter Patientengruppen wurden daher mit MES-Assays auf ihre proteolytische Aktivität getestet.

3.3.1 Nachweis von Urotensin-II-generierender und C3b-abbauender Aktivität im Plasma Dialysepflichtiger Patienten

Die Hämodialyse führt durch Bioinkompatibilität zu einer Aktivierung des Komplementsystems [116] und somit möglicherweise auch zu einer Aktivierung des CFI, welche sich in einem Anstieg der UII-generierenden und C3b-abbauenden Aktivität äußern müsste. Um diese These zu überprüfen, wurden die UII-generierenden und C3b-abbauenden Aktivitäten im Plasma dialysepflichtiger Patienten vor und nach Dialyse getestet. Dazu wurde diesen Patienten (bezeichnet als 1 bis 9) vor Beginn sowie 4 Stunden nach Beginn der Dialyse Blut entnommen. Die Plasmaproteine dieser Proben wurden immobilisiert und mit den Substraten UII₁₀₅₋₁₂₄ bzw. C3b-S inkubiert. Die Messung der Reaktionsprodukte UII und C3b-R erfolgte mit ESI-IT-SRM.

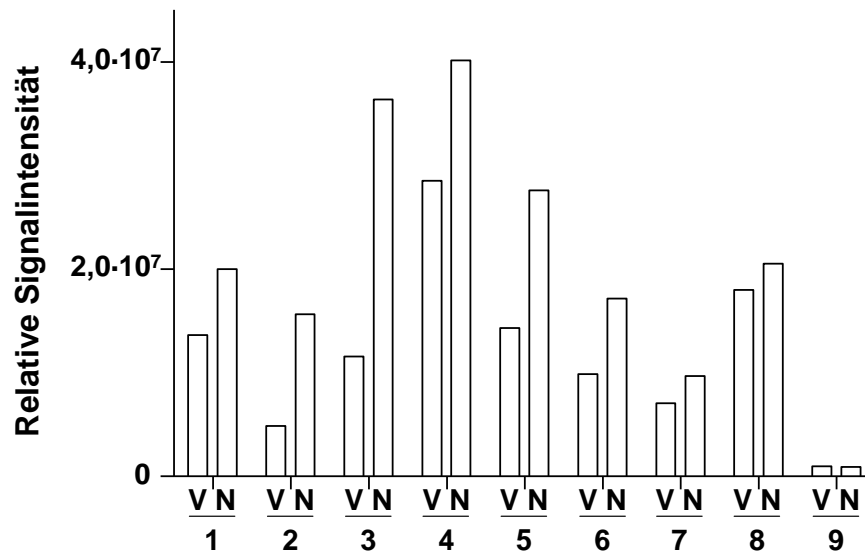


Abbildung 3.13: Signalintensitäten von Ull nach Inkubation von immobilisierten Plasmaproteinen dialysepflichtiger Patienten vor (V) und nach (N) Dialyse. Die immobilisierten Plasmaproteine wurden mit einer 10^{-4} M Ull₁₀₅₋₁₂₄-Lösung inkubiert, die Messung des Reaktionsprodukts Urotensin-II erfolgte nach 24 Stunden Inkubationszeit mit ESI-IT-SRM.

Das Ergebnis der Messung der UCE-Aktivität wird in Abbildung 3.13 gezeigt. Bei acht der neun untersuchten Patienten war die Signalintensität von Ull vor der Dialyse (V) niedriger als nach der Dialyse (N). Lediglich die Proben des neunten Patienten unterschieden sich kaum, die Signalintensitäten von Ull waren in beiden Inkubationen (V und N) deutlich niedriger als bei den anderen acht Patienten. Der P-Wert, der eine Aussage über die Signifikanz des Unterschiedes zwischen den Wertepaaren V und N treffen soll, liegt bei 0,0475. Ein P-Wert von 0,05 gilt Schwellenwert für Signifikanz. Der Unterschied zwischen den beiden Probengruppen ist also statistisch signifikant.

Ergebnisse

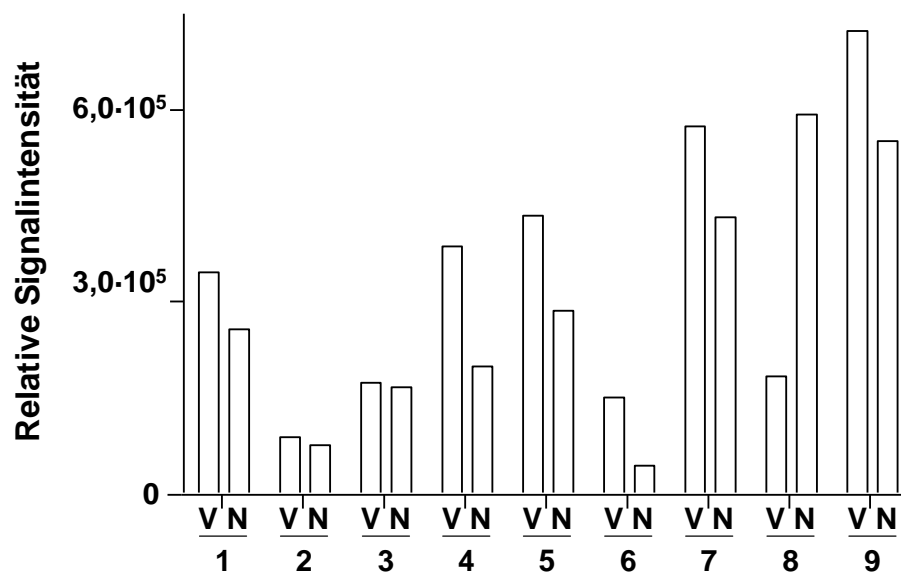


Abbildung 3.14: Signalintensitäten von C3b-R nach Inkubation von immobilisierten Plasmaproteinen dialysepflichtiger Patienten vor (V) und nach (N) Dialyse. Die immobilisierten Plasmaproteine wurden mit einer 10^{-4} M C3b-S-Lösung inkubiert, die Messung des Reaktionsprodukts C3b-R erfolgte nach 6 Stunden Inkubationszeit mit ESI-IT-SRM.

Abbildung 3.14 zeigt das Ergebnis der Messung der C3b-abbauenden Aktivität der Plasmaproteine der dialysepflichtigen Patienten. Die Signalintensität des C3b-R war bei acht der neun Patienten vor der Dialyse höher als nach der Dialyse. Lediglich ein Patient (Patient 8) wies vor der Dialyse niedrigere C3b-abbauende Aktivität auf als nach der Dialyse. Der P-Wert zwischen den Werten der Patientengruppen V und N lag hier bei 0,0515. Der Unterschied ist also nicht statistisch relevant, es lassen sich lediglich Trends ablesen.

3.3.2 Nachweis von Urotensin-II-generierender Aktivität im Plasma von Patienten mit diabetischer Nephropathie

Eine weitere getestete Patientengruppe ist die der Patienten mit diabetischer Nephropathie. Hierbei wurden die Plasmaproben von neun Patienten mit dieser Erkrankung auf ihre UCE-Aktivität getestet. Dazu erfolgte die Messung einer Probe eines gesunden Probanden. Die Messung des Reaktionsprodukts UII erfolgte mit ESI-IT-SRM, die Ergebnisse der Messung nach 24 Stunden Inkubationszeit sind in Abbildung 3.15 gezeigt. Die Signalintensitäten von UII waren bei allen neun Patientenproben (1-9) deutlich höher als bei der gesunden Kontrollprobe (10).

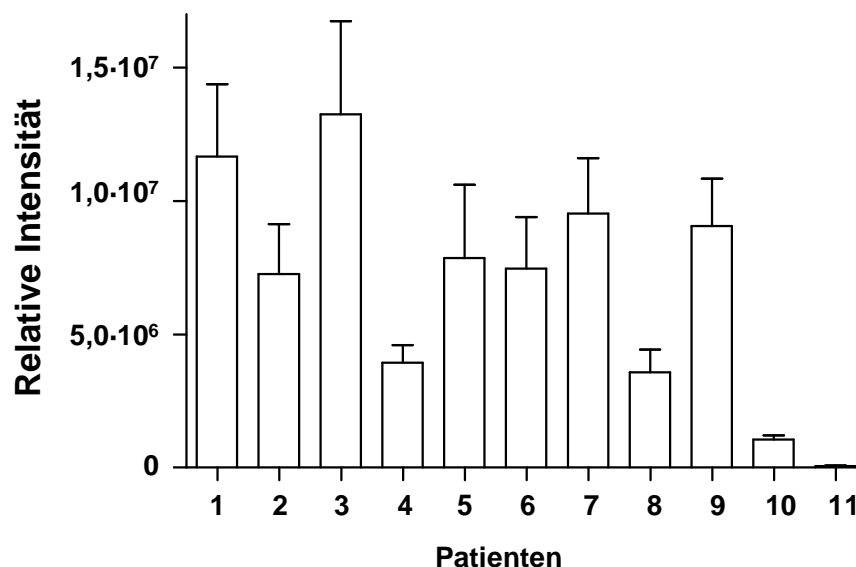


Abbildung 3.15: Signalintensitäten von UII nach Inkubation von immobilisierten Plasmaproteinen von Patienten mit diabetischer Nephropathie. Die immobilisierten Plasmaproteine wurden mit einer 10^{-4} M UII₁₀₅₋₁₂₄-Lösung inkubiert, die Messung des Reaktionsprodukts Urotensin-II erfolgte nach 24 Stunden Inkubationszeit mit einer Dreifachmessung mit ESI-IT-SRM. Referenz (10): immobilisierte Plasmaproteine eines gesunden Probanden. Negativkontrolle (11): Glycin-derivatisierte Chromatographiepartikel ohne immobilisiertes Protein.

3.4 Nachweis der Urotensin-II-generierenden Aktivität im Plasma von Komplementfaktor I-defizienten Patienten

In der Literatur sind verschiedene Mutationen des CFI beschrieben [94, 117, 118], die mit einem Verlust der proteolytischen Aktivität einhergehen können oder dazu führen, dass CFI nicht mehr sezerniert wird. Beides resultiert in einem erhöhten Umsatz von C3 zu C3b im Plasma dieser Patienten.

Das Plasma von acht CFI-defizienten Probanden wurde auf UCE-Aktivität getestet. Tabelle 3.5 liefert eine Übersicht der Mutationen der untersuchten Patienten sowie der physiologischen Konsequenzen dieser Mutationen.

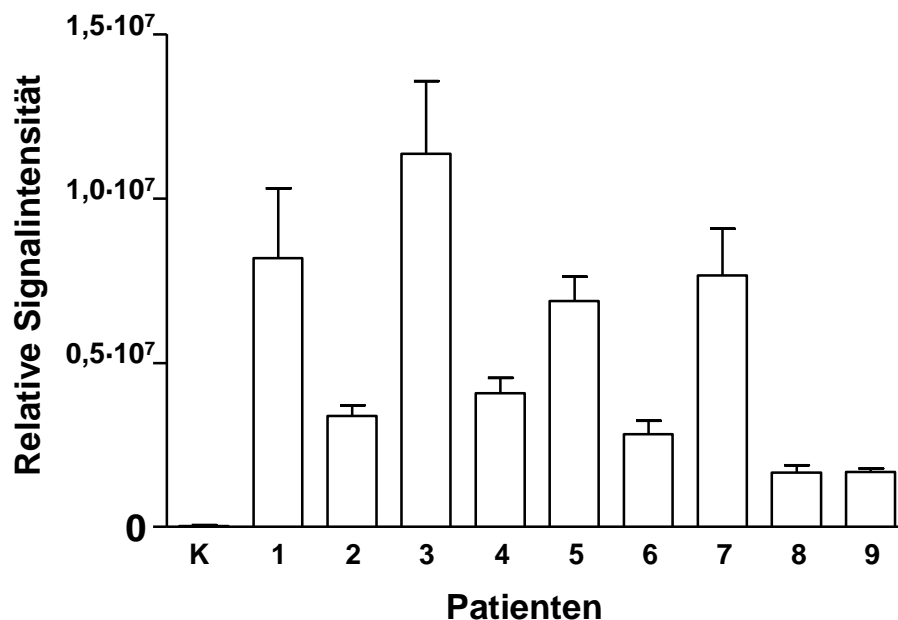


Abbildung 3.16: Signalintensitäten von UII nach Inkubation von immobilisierten Plasmaproteinen von Patienten (Patient 1-8) mit Mutationen im CFI-Gen. Die immobilisierten Plasmaproteine wurden mit einer 10^{-4} M UII₁₀₅₋₁₂₄-Lösung inkubiert, die Dreifachmessung des Reaktionsprodukts Urotensin-II erfolgte nach 20 Stunden Inkubationszeit mit ESI-IT-SRM. Referenz (9): immobilisierte Plasmaproteine eines gesunden Probanden. Negativkontrolle (K): Glycin-derivatisierte Chromatographiepartikel ohne immobilisiertes Protein.

Zum Nachweis der UCE-Aktivitäten im Plasma der CFI-defizienten Patienten wurden Plasmaproteine dieser Proben immobilisiert und mit dem Substrat UII₁₀₅₋₁₂₄ inkubiert. Die Messung des Reaktionsprodukts UII erfolgte mit ESI-IT-SRM. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.16 dargestellt. In den Fraktionen der Inkubation der Plasmaproteine aller CFI-defizienten Patienten (Balken 1 bis 8) entstehen hohe SRM-Signale für Urotensin-II, die auf eine deutliche UCE-Aktivität hinweisen. Die Signalintensität von Urotensin-II in der Inkubation der Plasmaproteine der gesunden Kontrolle (Balken 9) liegt im unteren Bereich der gemessenen Intensitäten.

Zusätzlich wurde die Konzentration von UII im Plasma dieser Probanden bestimmt. Die Messung wurde freundlicherweise von Prof. Leong Ng von der Universität Leicester durchgeführt. Das Plasma wurde dabei über eine Größenausschlusschromatographie fraktioniert und in den Fraktionen anschließend UII über einen RIA quantifiziert [50]. Neben UII können dabei auch längere UII-Fragmente (UIIc) quantifiziert werden (vgl. Tabelle 3.5). Die UII-Konzentration des Probanden 8 konnte aufgrund einer zu geringen Menge an Plasma nicht bestimmt werden.

Ergebnisse

Tabelle 3.5: Übersicht der CFI-defizienten Patienten [87, 94, 119]. Angegeben sind die Patientenummern von 1 bis 9 entsprechend der Nummerierung aus Abbildung 3.16, eventuelle Verwandtschaftsverhältnisse/sonstige Bemerkungen, bekannte Erkrankungen im Zusammenhang mit der CFI-Defizienz, die Plasmalevel von CFI und C3 soweit bekannt, von Ull und Ullc (bestimmt mit RIA) sowie den Ort der Mutation. *: Polymorphismus; **: Referenzbereich CFI: 38-58 mg/ml; ***Referenzbereich C3: 730-1400 mg/ml

Nr.	Bemerkung	Physiologische Effekte	Plasmalevel CFI und C3 [mg/ml] und Ull und Ullc [fmol/ml]				Mutation in		
			CFI**	C3***	Ull	Ullc	Nukleotid	AS	Domäne
1	Schwester von 2 und 3	bakterielle Meningitis, Pneumokokken-Infektion	Nicht nachweisbar	Niedrig	9,56	2,86	c.804G>A*	S268S	Intron 7 / LDLr2
					1,96	0			
3	Bruder von 1 und 2	Eitrige Otitis			2,20	0			
4	Schwester von 5	bakterielle Meningitis	Nicht nachweisbar	Niedrig	4,18	0	c.739T>G	C247G	Exon 5 / LDLr1
					7,55	0			
5	Schwester von 4	Symptomfrei							
6		HUS, wiederkehrende Infektionen	29,2	870	0,47	0	c.463G>A	W145Stop	CD-5
7	Vater von 6	Symptomfrei	33,7	1400	16,71	0			
8		HUS	29	0,3	-	-	c.893delC	C293	LDLr2
9	Gesunde Kontrolle	Symptomfrei			8,47	0			

3.5 Untersuchung der Prozessierung des Urotensin-II-Vorläuferpeptids

Das aktive Peptidhormon Urotensin-II besteht aus den 11 C-terminal-ständigen Aminosäuren des 124 Aminosäuren langen Transkripts des UTS-Gens. Es ist eine N-terminale Sequenz von 20 Aminosäuren Länge annotiert, welche als Signalsequenz abgespalten wird [18]. Das verbleibende Vorläuferpeptid hat eine Länge von 104 Aminosäuren, welches nachfolgend als UII_21-124 bezeichnet wird. Über eine weitere Prozessierung dieses Vorläufers lagen bisher keine Ergebnisse vor, so dass nicht bekannt war, ob UII direkt aus dem Vorläufer-Peptid gespalten wird oder ob es weitere inaktive Zwischenstufen gibt. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde das UII_21-124 mit immobilisierten Plasmaproteinen inkubiert, zu definierten Inkubationszeiten Aliquots abgenommen und diese mit der MALDI-TOF-MS analysiert.

Das 104 Aminosäuren lange Substrat hat eine Größe von rund 12 kDa. Für Peptide, die kleiner als etwa 5 kDa sind, ist die Messung im Reflektor-Modus des verwendeten MALDI-TOF-MS sehr gut geeignet. Durch den Reflektor wird die Auflösung stark erhöht, sie ist jedoch für den größeren Massenbereich oftmals nicht geeignet. Für den Bereich ab 4,5 kDa wurde daher im linearen Modus gemessen, um gute Signale zu erhalten.

Die Massenspektren der Messungen der Aliquots nach 2 bzw. 20 Stunden Inkubationszeit im Größenbereich von 4,5 bis 13 kDa sind in Abbildung 3.17 dargestellt. Es konnten in diesem Größenbereich nur zwei Signale identifiziert werden, die nicht auf das Substrat oder unspezifische Peaks, die auch in der Kontrolle vorkommen, zurückzuführen sind. Bei den Signalen des Substrats handelt es um den Peak des einfach geladenen Ions bei 12060 kDa und des zweifach geladenen bei rund 6030 kDa. Die beiden zusätzlich gemessenen Signale und die zugeordneten Sequenzen sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Durch die niedrige Auflösung sind die Massenabweichungen recht groß, wie beispielsweise in den Abweichungen der Massen des Substratpeaks zwischen der Inkubation mit Plasmaproteinen und der Negativkontrolle (Abbildung 3.17) ersichtlich wird. Diese Abweichungen erschweren die Identifizierung der Signale.

Ergebnisse

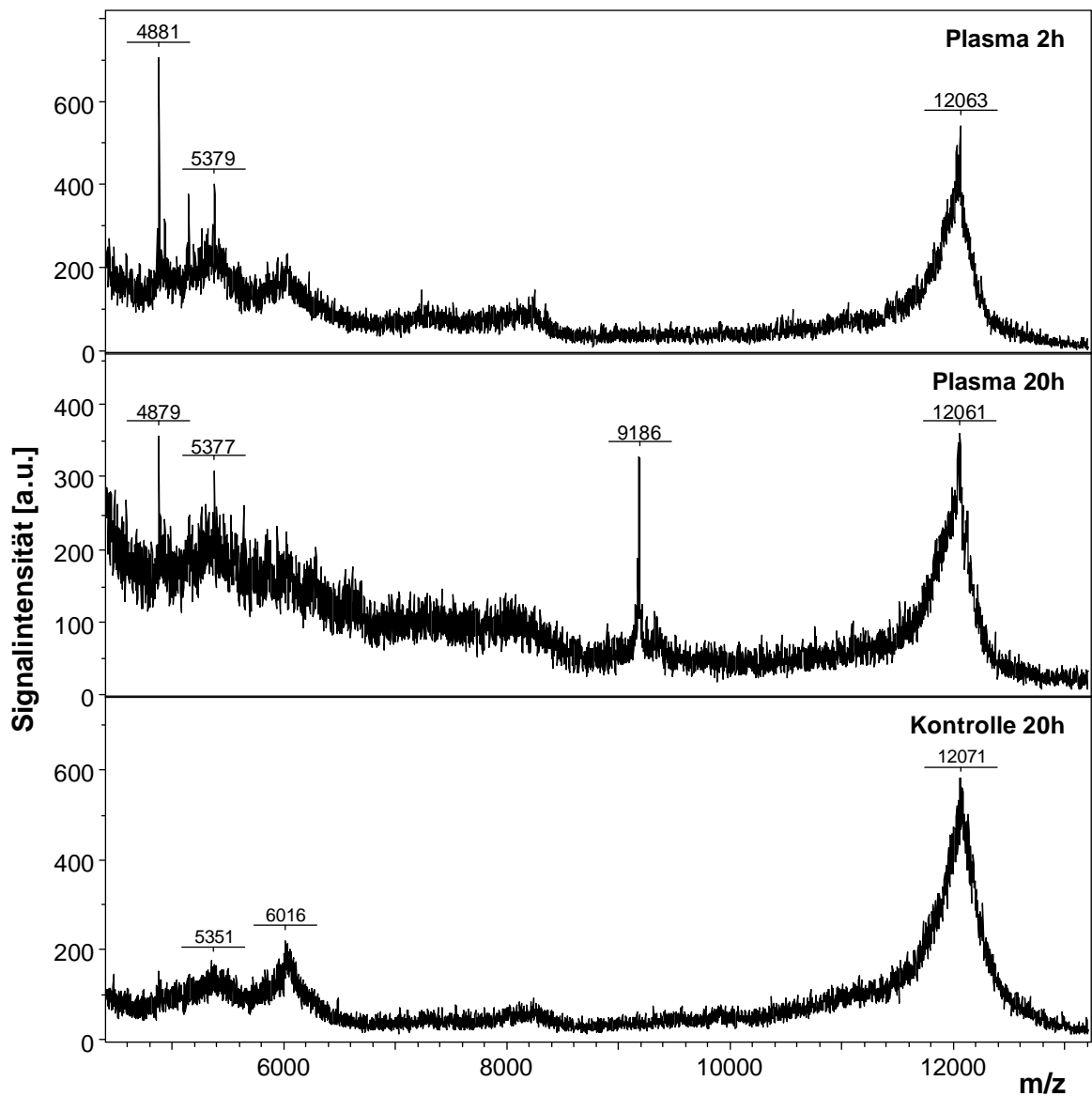


Abbildung 3.17: Inkubation immobilisierter Plasmaproteine mit dem UII₂₁₋₁₂₄. Die Inkubation erfolgte mit $5 \cdot 10^{-4}$ M Substratlösung, die Messung der Reaktionsprodukte erfolgte nach definierten Inkubationszeiten mit MALDI-TOF-MS mit der Matrix DHB, abgebildet ist die Messung für den Größenbereich von 4500 bis 13000 Da. Negativkontrolle: Glycin-derivatisierte Chromatographiepartikel ohne immobilisiertes Protein. Identifizierte Peptide sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tabelle 3.6: Ergebnisse der Inkubation immobilisierter Plasmaproteine mit dem UII_21-124 nach 2 Stunden Inkubationszeit. Aufgetragen sind Signale, die im Massenspektrum der Inkubation von Plasmaproteinen mit dem Substrat deutlich unterschiedlich waren im Vergleich zur Kontrolle. Es ist der gemessene m/z-Wert angegeben, dazu die Sequenzen der Peptide, die diesen m/z-Werten zugeordnet werden konnten und die theoretische Masse dieser Peptide.

Gemessenes m/z	Mögliche Sequenz	Kürzel	Theoret. Masse
4880	GAERGDILRKADSSTNIFNPRGNLRKFQDFSGQDPNILLSHLLA	UII_61-104	4881,6
	ILRKADSSTNIFNPRGNLRKFQDFSGQDPNILLSHLLARIWK	UII_67-108	4880,5
9186	ISFQLSAPHEDARLTPEELERASLLQILPEMLGAERGDILRKADSSTNIFNPRGNLRKFQDFSGQDPNILLSHLLARIWKP	UII_29-109	9188

Die Massenspektren der Messungen der Aliquots nach 2 bzw. 20 Stunden Inkubationszeit im Größenbereich bis 4,5 kDa sind in Abbildung 3.18 dargestellt. Sowohl in den Spektren der Inkubation der immobilisierten Plasmaproteine als auch in den proteinfreien Kontrollproben sind zu beiden Inkubationszeiten viele Signale zu erkennen. Zur Auswertung wurden lediglich jene Signale herangezogen, die ausschließlich in den Spektren der Inkubation der immobilisierten Plasmaproteine vorhanden waren oder zumindest deutlich höhere Signalintensitäten aufwiesen als in der Kontrollprobe. Signale, die mit signifikanten Intensitäten auch in der Kontrollprobe gemessen werden konnten, gehen nicht auf die proteolytische Aktivität der Plasmaproteine zurück und wurden daher nicht in die Auswertung einbezogen. Die m/z-Werte dieser Signale wurden mit den Massen aller theoretisch möglichen Reaktionsprodukte verglichen, um den Signalen Peptidsequenzen zuordnen zu können. Die identifizierten Peptide sind in Tabelle 3.7 für den Inkubationszeitpunkt t=2 Stunden und Tabelle 3.8 für den Inkubationspunkt t=20 Stunden aufgelistet. Die vollständige Liste aller m/z-Werte befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

Ergebnisse

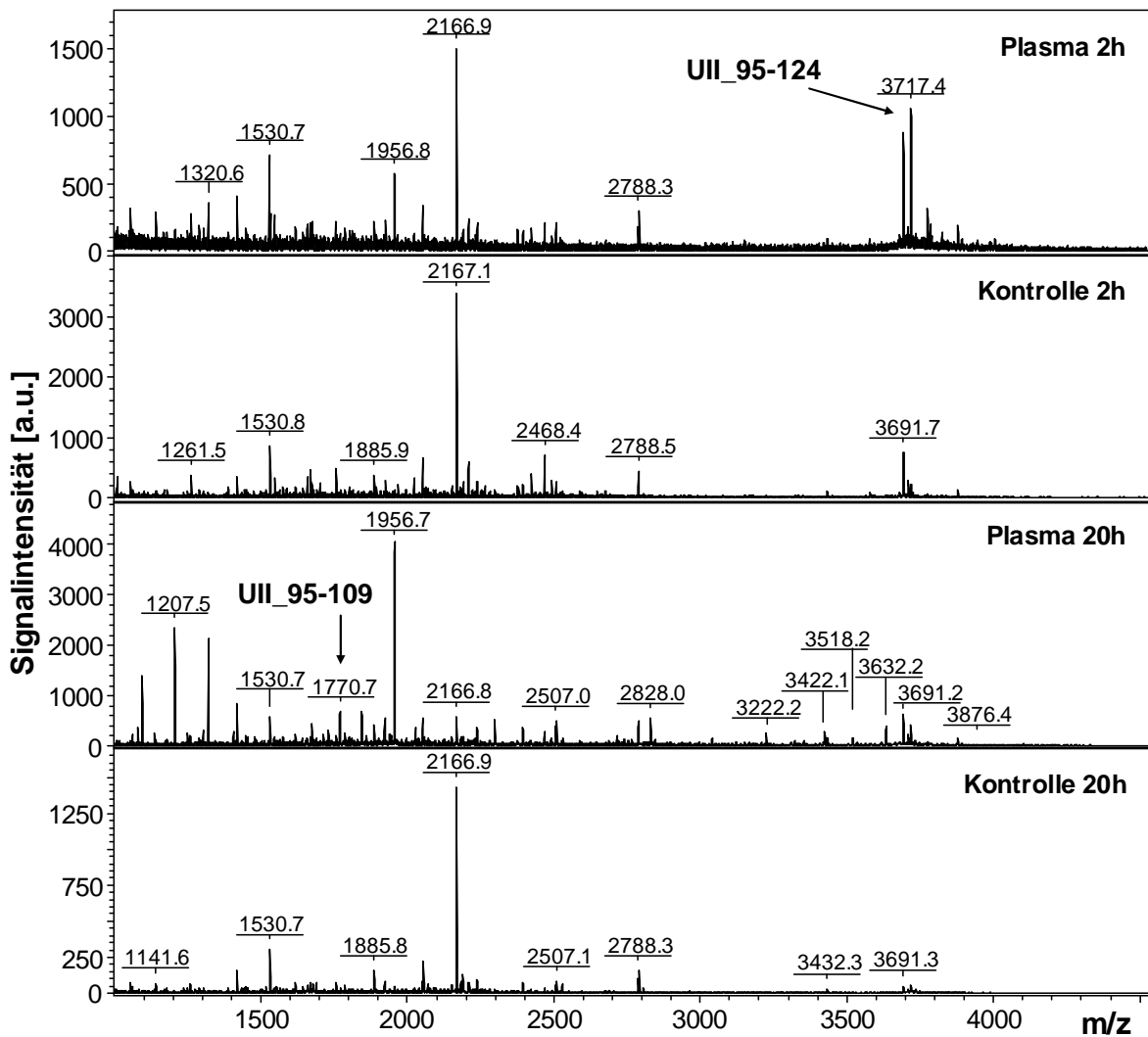


Abbildung 3.18: Inkubation immobilisierter Plasmaproteine mit dem Ull_21-124. Die Inkubation erfolgte mit $5 \cdot 10^{-4}$ M Substratlösung, die Messung der Reaktionsprodukte erfolgte nach definierten Inkubationszeiten mit MALDI-TOF-MS mit der Matrix DHB, abgebildet ist die Messung für den Größenbereich von 1000 bis 4500 Da. Negativkontrolle: Glycin-derivatisierte Chromatographiepartikel ohne immobilisiertes Protein. Identifizierte Peptide sind in Tabelle 3.7 und Tabelle 3.8 zusammengefasst.

Nach zwei Stunden Inkubation konnten zwei Peptide identifiziert werden. Dabei handelt es sich einerseits um das Peptid mit der Sequenz DSREISFQLSAPHEDAR, das aus den Aminosäuren 5 bis 21 des Urotensin-Vorläufers besteht. Das zweite identifizierte Peptid besteht aus den letzten 30 Aminosäuren des C-terminalen Teils des Peptids (Aminosäuren 95 bis 124).

Ergebnisse

Tabelle 3.7: Ergebnisse der Inkubation immobilisierter Plasmaproteine mit dem UII_21-124 nach 2 Stunden Inkubationszeit. Aufgetragen sind Signale, die im Massenspektrum der Inkubation von Plasmaproteinen mit dem Substrat deutlich unterschiedlich waren im Vergleich zur Kontrolle. Es ist der gemessene m/z-Wert angegeben, dazu die Sequenzen der Peptide, die diesen m/z-Werten zugeordnet werden konnten und die theoretische Masse dieser Peptide. Eine vollständige Liste aller Peaks befindet sich im Anhang.

Gemessenes m/z	Mögliche Sequenz	Kürzel	Theoret. Masse
1956,8	DSREISFQLSAPHEDAR	UII_25-41	1956,9
3717,4	PNILLSHLLARIWKPYKKRETPDCFWKYCV	UII_95-124	3717,0

Tabelle 3.8: Ergebnisse der Inkubation immobilisierter Plasmaproteine mit dem UII_21-124 nach 20 Stunden Inkubationszeit. Der Inhalt dieser Tabelle entspricht dem von Tabelle 3.7.

Gemessenes m/z	Mögliche Sequenz	Kürzel	Theoret. Masse
1770,7	PNILLSHLLARIWKP	UII_95-109	1770,1
1956,8	DSREISFQLSAPHEDAR	UII_25-41	1956,9
2828,0	QLSAPHEDARLTPEELERASLLQIL	UII_32-56	2828,5
3222,2	LLDSREISFQLSAPHEDARLTPEELERA	UII_23-50	3221,6
3422,2	GAERGDILRKADSSTNIFNPRGNLRKFQDF	UII_61-90	3421,8
	LLDSREISFQLSAPHEDARLTPEELERASL	UII_23-52	3421,7
	LDSREISFQLSAPHEDARLTPEELERASLL	UII_24-53	3421,7
3518,2	LPLLDREISFQLSAPHEDARLTPEELERAS	UII_21-51	3518,8
	PLLDREISFQLSAPHEDARLTPEELERASL	UII_22-52	3518,8
3632,2	LPLLDREISFQLSAPHEDARLTPEELERASL	UII_21-52	3631,9
	PLLDREISFQLSAPHEDARLTPEELERASLL	UII_22-53	3631,9
	DARLTPEELERASLLQILPEMLGAERGDILRK	UII_39-70	3632,0
	RLTPEELERASLLQILPEMLGAERGDILRKAD	UII_41-72	3632,0
3876,4	RGDILRKADSSTNIFNPRGNLRKFQDFSGQDPNI	UII_64-97	3876,0

Nach 20 Stunden Inkubationszeit entstanden eine Reihe weiterer Peptide, die meisten davon waren Peptide, die einen Teil der Sequenz der ersten 33 Aminosäuren des Vorläufer-Peptids beinhalten, also Abbauprodukte des Peptids mit der N-terminalen Sequenz LPLLDREISFQLSAPHEDARLTPEELERASLL. Zudem entstanden einige weitere Peptide, darunter auch das Peptid mit der Sequenz PNILLSHLLARIWKP, das durch die proteolytische Spaltung nach der Aminosäure an Position 94 entsteht. Diese Spaltung führt auch zu dem nach 2 Stunden Inkubationszeit beobachteten 30 Aminosäuren langen Peptid.

Um diese proteolytische Reaktion genauer zu untersuchen, wurde ein Peptid synthetisiert, welches die Schnittstelle zwischen den Aminosäuren 94 und 95 enthält. Es handelte sich hierbei um ein 21 Aminosäuren langes Peptid mit der Sequenz RKFQDFSGQDPNILLSHLLAR, also den Aminosäuren 85-105 des Vorläufer-Peptids. Es wird daher nachfolgend als UII_85-105 bezeichnet. Die proteolytische Spaltung nach Position 94 sollte durch eine Inkubation immobilisierter Plasmaproteine mit UII_85-105 überprüft werden. Die zu definierten Reaktionszeiten abgenommenen Aliquots wurden mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer analysiert.

Abbildung 3.19 zeigt das Ergebnis dieser Inkubation. Während nach null Stunden nur die Signale des Substrats, sowohl als einfach als auch als zweifach geladenes Ion, messbar waren, war der Peak des Substrats nach einer Stunde Inkubation mit den immobilisierten Plasmaproteinen kaum noch sichtbar. Er ist nach zwei Stunden Inkubationszeit komplett verschwunden. Es entstand ein neuer Peak mit dem m/z-Verhältnis von 2298, dabei handelte es sich um das Substrat verkürzt um die C-terminale Aminosäure Arginin. Des Weiteren waren nach einer Stunde Inkubationszeit Signale mit den m/z-Werten von 1091 und 1228 messbar. Hierbei handelte es sich um die Peptide RKFQDFSGQD und PNILLSHLLA, also um die Aminosäuren 85-94 und 95-86 des Urotensin-Vorläuferpeptids, welche durch die proteolytische Aktivität einer Endoprotease entstehen. Zudem entstanden nach längeren Inkubationszeiten weitere Peptide mit größeren m/z-Werten als Ergebnis eines aminoterminalen Abbaus. Eine Übersicht der entstehenden Peptide und dem Inkubationszeitpunkt, an welchem diese gemessen werden konnten, liefert Tabelle 3.9.

Ergebnisse

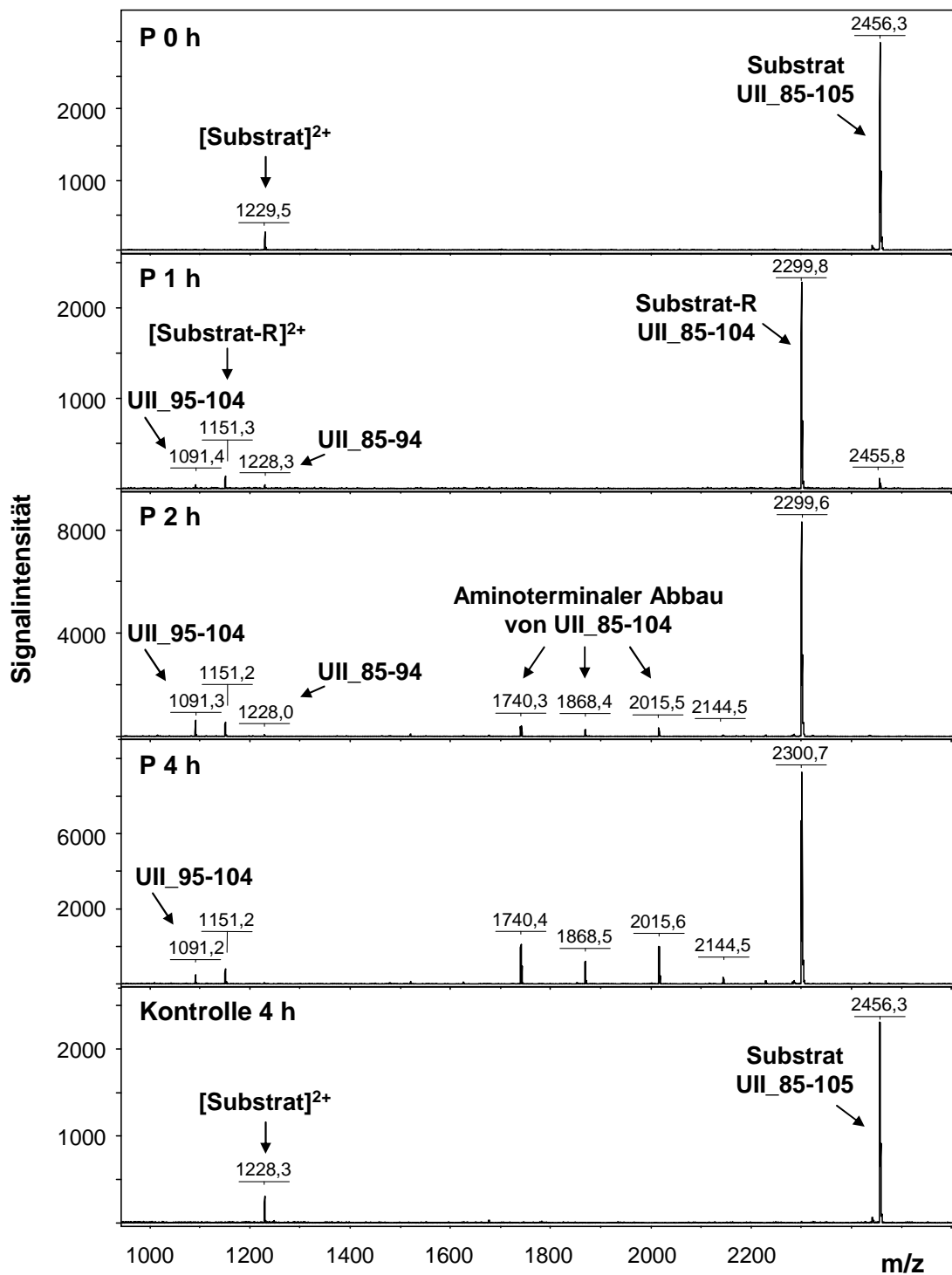


Abbildung 3.19: Inkubation immobilisierter Plasmaproteine (P) mit dem UII_85-105. Negativkontrolle: Glycin-derivatisierte Chromatographiepartikel ohne immobilisiertes Protein. Die Inkubation erfolgte mit $1 \cdot 10^{-4}$ M Substratlösung, die Messung der Reaktionsprodukte erfolgte nach definierten Inkubationszeiten mit MALDI-TOF-MS mit der Matrix DHB.

Ergebnisse

Tabelle 3.9: Per MALDI-TOF-Messung identifizierte Proteolyseprodukte der Inkubation von Ull_85-105 (RKFQDFSGQDPNILLSHLLAR) mit immobilisierten Plasma-Proteinen nach definierten Inkubationszeiten. Angegeben ist jeweils das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) eines identifizierten Peptids, die dazugehörige Sequenz sowie die durch ein x indizierte Angabe, zu welchen Inkubationszeitpunkten das jeweilige Peptid detektiert werden konnte.

Gemessenes m/z	Sequenz	0h	1h	2h	4h
1091,4	PNILLSHLLA		x	x	x
1228,3	RKFQDFSGQD		x	x	x
1740,3	DFSGQDPNILLSHLLA			x	x
1868,4	QDFSGQDPNILLSHLLA			x	x
2015,5	FQDFSGQDPNILLSHLLA			x	x
2144,5	KFQDFSGQDPNILLSHLLA			x	x
2299,8	RKFQDFSGQDPNILLSHLLA		x	x	x
2456,3	RKFQDFSGQDPNILLSHLLAR	x	x		

Durch eine Inkubation der immobilisierten Proteine der Eluatfraktion der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie mit dem 30 Aminosäuren langen Ull_95-124 sollte überprüft werden, ob CFI in der Lage ist, auch aus diesem Substrat das Ull zu generieren. Die Ergebnisse dieser Inkubation sind in Abbildung 3.20 gezeigt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit entstanden dabei die drei typischen Signale für Urotensin-II (m/z = 1389), der des Ull+R (m/z=1545) sowie der des Ull+KR (m/z = 1673). Das Substrat war nicht mehr messbar. In der Kontrollinkubation des Substrats ohne immobilisierte Proteine mit den derivatisierten Sepharosebeads tauchten im Massenspektrum nur unspezifische Signale mit niedriger Signalintensität auf. Das Substrat war auch hier nicht mehr messbar. Die nachlassende Signalintensität des Substrats war jedoch nicht auf einen proteolytischen Abbau zurückzuführen. Die Konzentration des verwendeten Peptidsubstrats nimmt bei Inkubation dieser Art stetig ab, was vermutlich durch elektrostatische Wechselwirkungen des Peptids mit dem Reaktionsgefäß und den Sepharosebeads verursacht wird [120].

Die CFI-haltige Fraktion war demnach in der Lage, Ull aus dem 30 Aminosäuren langen Substrat zu generieren. Dies geschah jedoch erst nach relativ langen Inkubationszeiten.

Ergebnisse

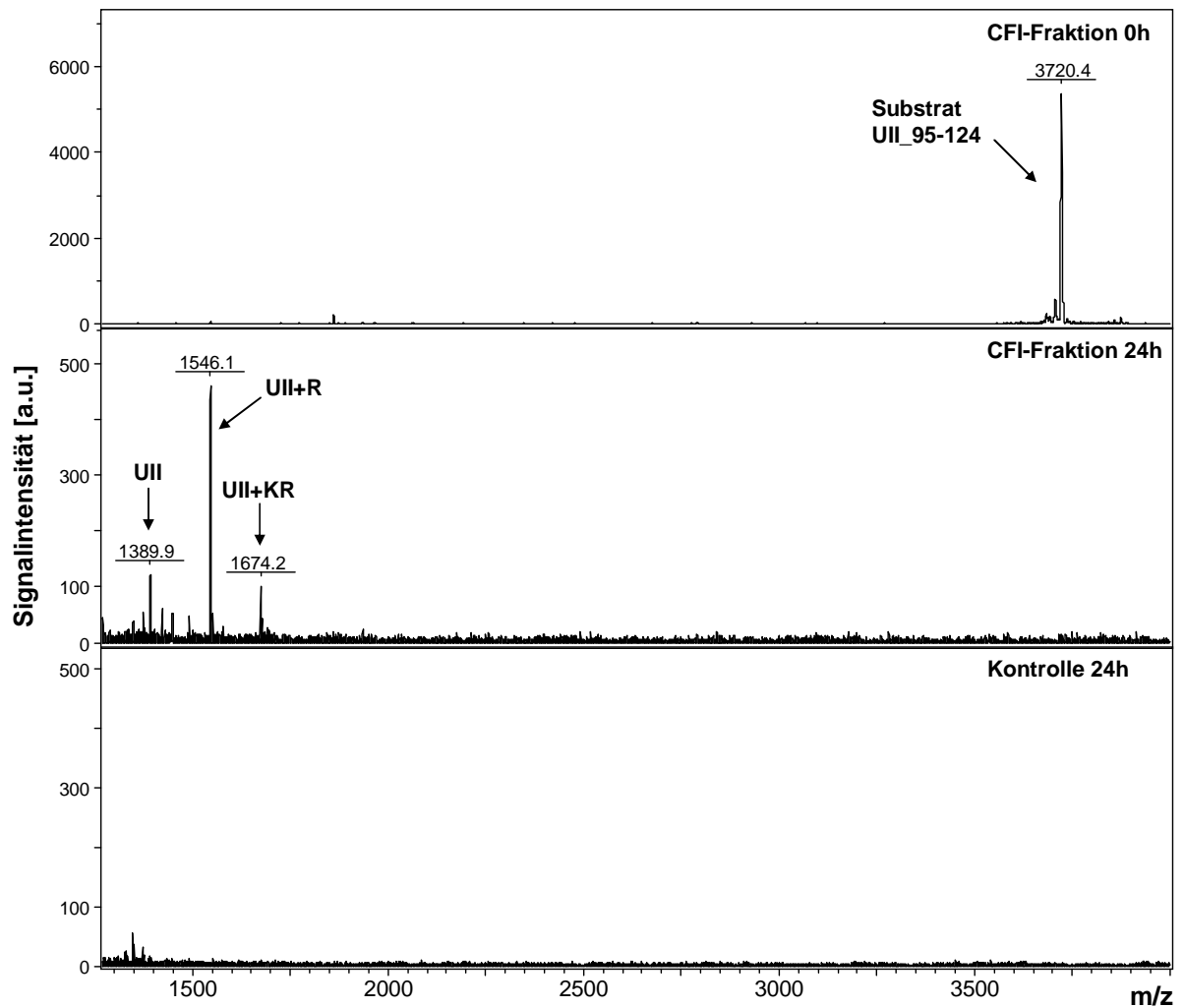


Abbildung 3.20: Inkubation der immobilisierten CFI-Fraktion mit UII_95-124. Negativkontrolle: Glycin-derivatisierte Chromatographiepartikel ohne immobilisiertes Protein. Die Inkubation erfolgte mit 10^{-4} M Substratlösung, die Messung der Reaktionsprodukte erfolgte mit MALDI-TOF-MS mit der Matrix DHB.

3.6 Urotensin-II-generierende Aktivität von Plasma-Kallikrein

Durch tryptischen Verdau der Proteine aus den Eluatfraktionen der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie und anschließender LC/MS-Messung konnten neben dem CFI zwei weitere Proteasen in der Eluatfraktion identifiziert werden. Dabei handelte es sich um Plasma-Kallikrein sowie den Komplementfaktor B (vgl. Abschnitt 3.1.5). Beide Proteine wurden käuflich erworben und nach Immobilisierung auf ihre Urotensin-II-generierende Aktivität überprüft. Als Substrat diente UII₉₅₋₁₂₄ (Sequenz: PNILLSHLLARIWKPYKKRETPDCFWKYCV). Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mit MALDI-TOF-MS.

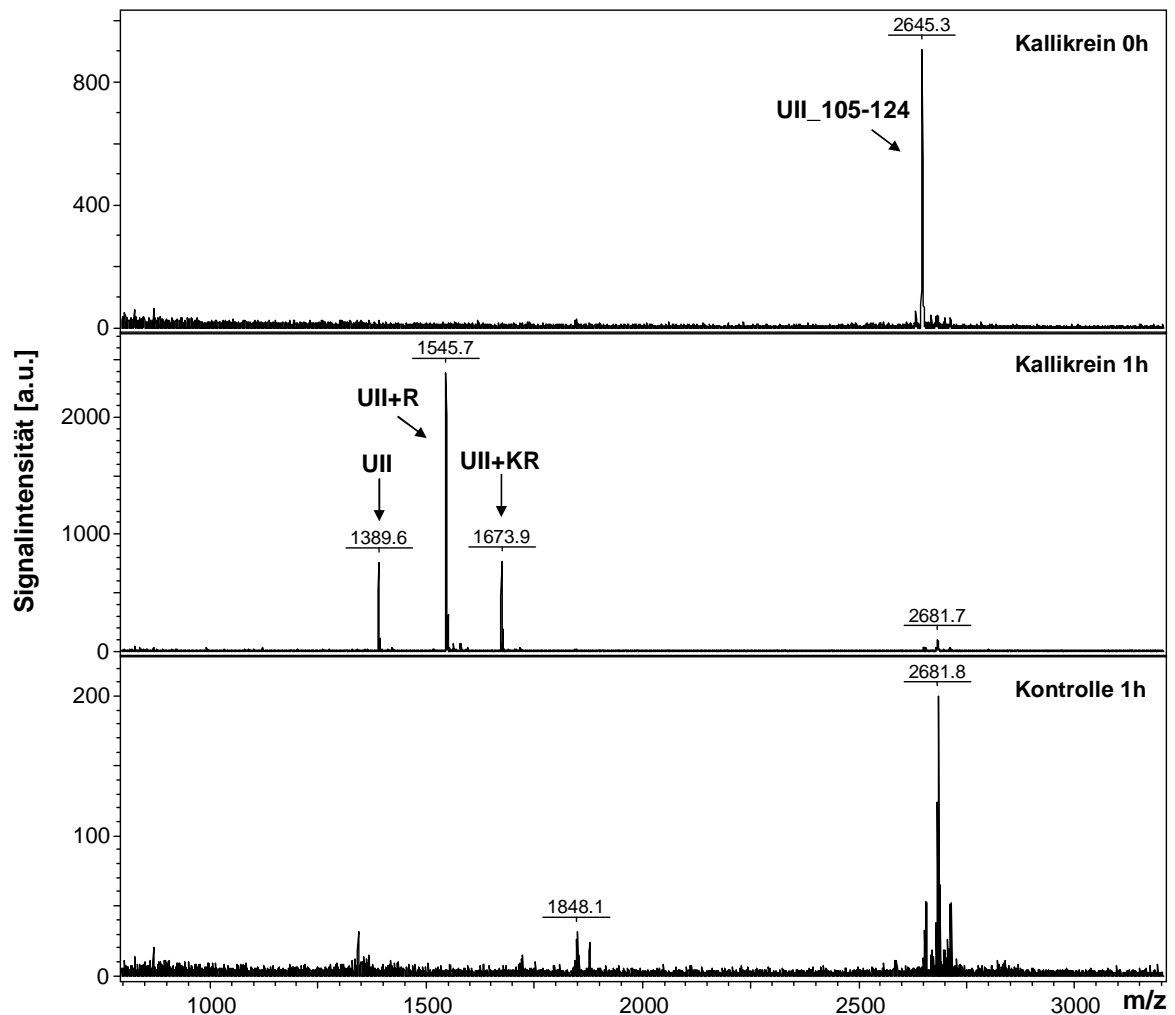


Abbildung 3.21: Inkubation von immobilisiertem Plasma-Kallikrein mit UII₁₀₅₋₁₂₄. Negativkontrolle: Glycin-derivatisierte Chromatographiepartikel ohne immobilisiertes Protein. Die Inkubation erfolgte mit 10^{-5} M Substratlösung, die Messung der Reaktionsprodukte erfolgte mit MALDI-TOF-MS mit der Matrix DHB.

Ergebnisse

Bei der Inkubation des Komplementfaktor B mit dem Peptidsubstrat UII_105-124 entstand kein Urotensin-II (Abbildung siehe Anhang).

Bei der Inkubation von Kallikrein mit dem Substrat UII_95-124 (Abbildung 3.21) entstanden hingegen bereits nach sehr kurzen Reaktionszeiten die Peptide Urotensin-II (UII_114-124), UII+R (UII_113-124) und UII+KR (UII_112-124). Die Protease weist demnach offenbar eine deutliche UCE-Aktivität auf.

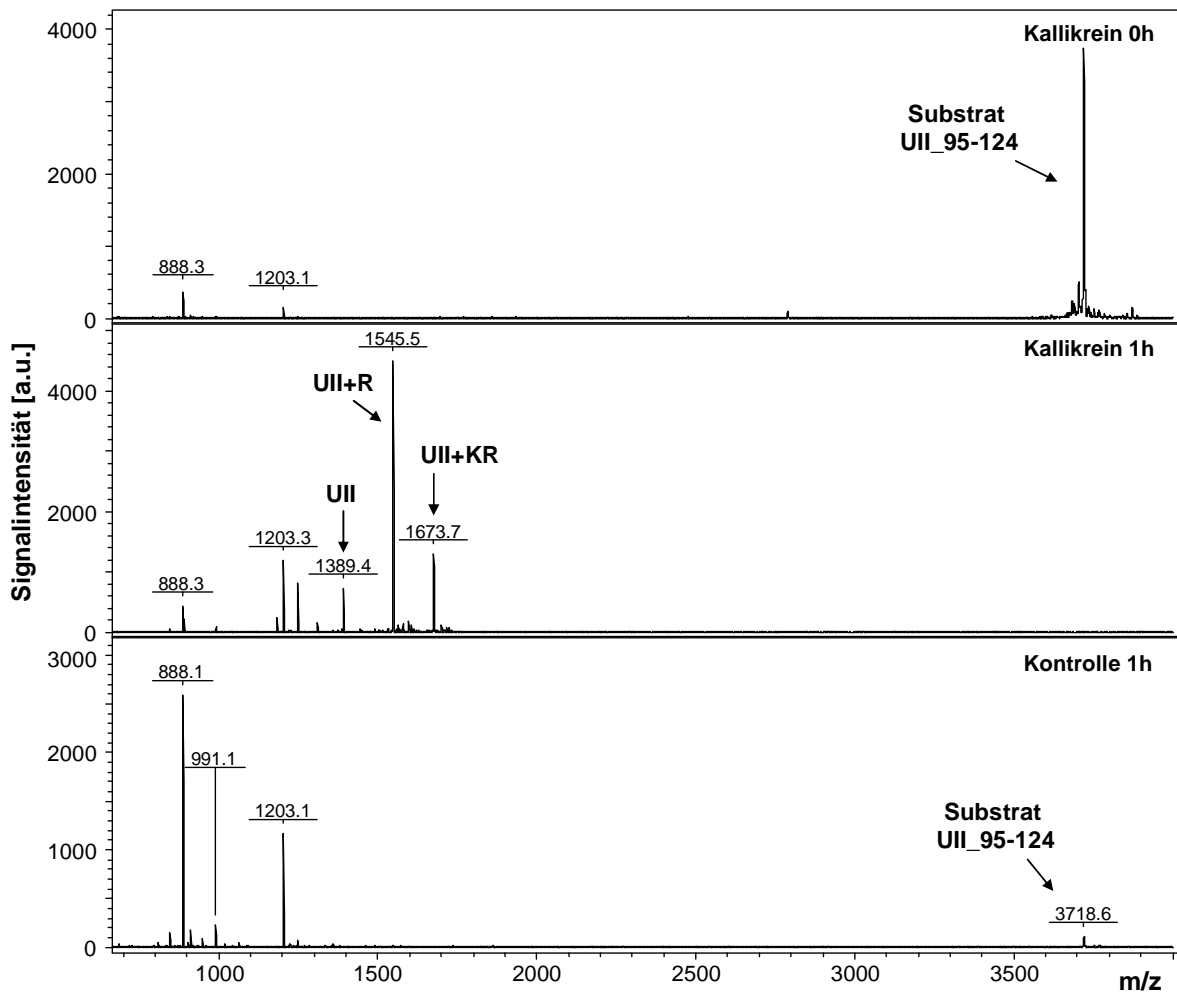


Abbildung 3.22: Inkubation von immobilisiertem Plasma-Kallikrein mit UII_95-124. Negativkontrolle: Glycin-derivatisierte Chromatographiepartikel ohne immobilisiertes Protein. Die Inkubation erfolgte mit 10^{-4} M Substratlösung, die Messung der Reaktionsprodukte erfolgte mit MALDI-TOF-MS mit der Matrix DHB.

Ergebnisse

Um diese Aktivität weiter zu überprüfen, wurde Kallikrein auch mit dem 30 Aminosäuren langen Substrat UII₉₅₋₁₂₄ inkubiert. Auch bei dieser Inkubation entstanden die drei typischen Peptide UII, UII+R und UII+KR, der Substratpeak verschwand völlig. Die in der Kontrollprobe entstandenen Signale sind auf Verunreinigungen der Substratlösung oder unspezifischen Abbau des Substrats zurückzuführen. Sie tauchten auch in den Massenspektren der Inkubation des Kallikreins mit dem Substrat auf, wurden jedoch zum Teil von den starken Signalen von UII, UII+R und UII+KR überlagert und sind daher nicht in der Abbildung zu erkennen. Weitere Signale, die auf weitere Peptide neben den beschriebenen UII, UII+R und UII+KR zurückzuführen sind, wurden nicht beobachtet.

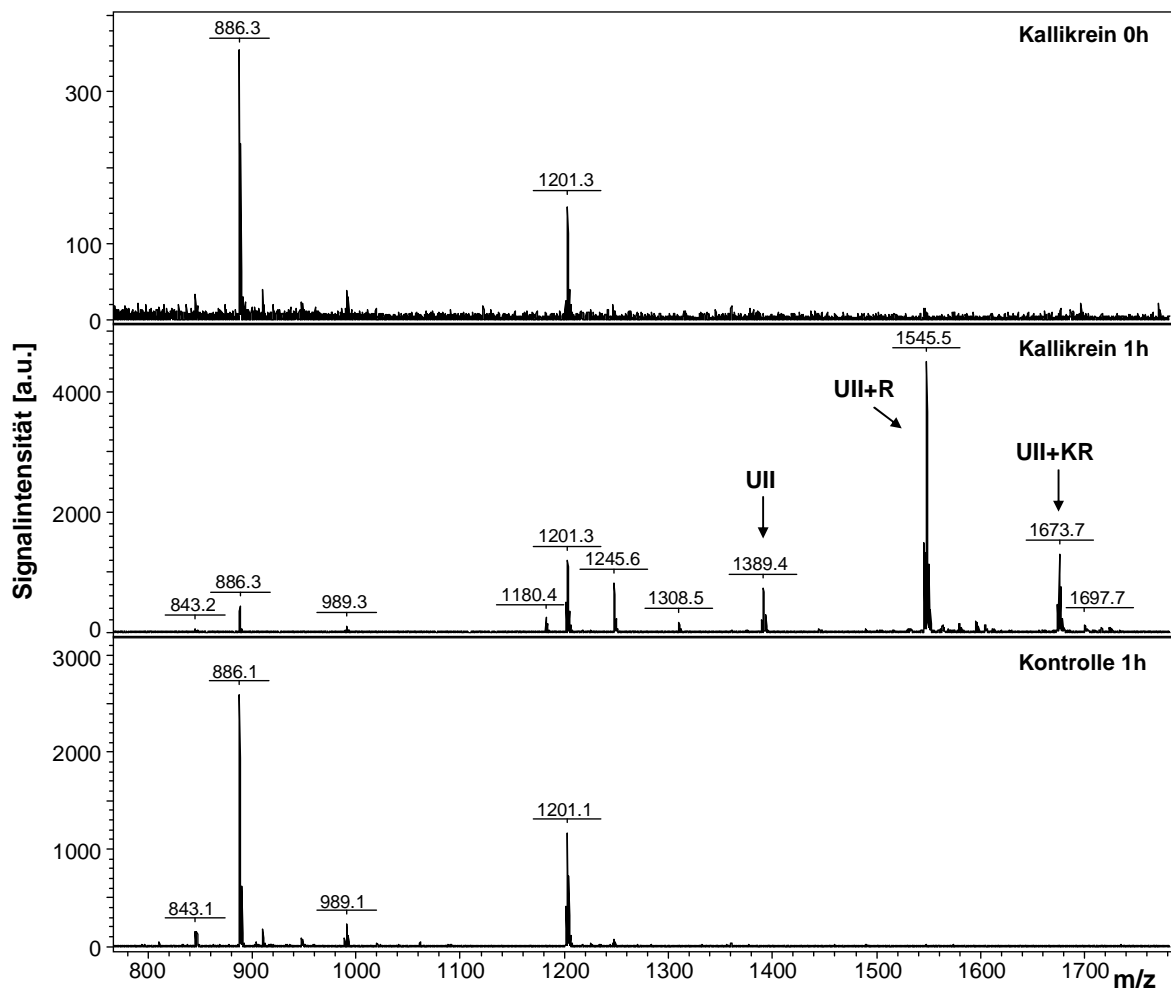


Abbildung 3.23: Inkubation von immobilisiertem Plasma-Kallikrein UII₉₅₋₁₂₄. Negativkontrolle: Glycin-derivatisierte Chromatographiepartikel ohne immobilisiertes Protein. Die Inkubation erfolgte mit 10^{-4} M Substratlösung, die Messung der Reaktionsprodukte erfolgte mit MALDI-TOF-MS mit der Matrix DHB, abgebildet ist der Massenbereich von 800 – 1800 Da.

Ergebnisse

Zur besseren Übersicht ist in Abbildung 3.23 eine Zoomansicht des Massenspektrums für den Größenbereich 800 bis 1800 Da gezeigt. Zur Auswertung dieser Spektren wurden jene Signale herangezogen, die in den Spektren ausschließlich in der der Inkubation des Kallikreins vorhanden waren. Die m/z-Werte dieser Signale wurden mit den Massen aller theoretisch möglichen Reaktionsprodukte verglichen, um den Signalen Peptidsequenzen zuordnen zu können. Die identifizierten Peptide sind in Tabelle 3.10 für den Inkubationszeitpunkt t=1 Stunde aufgelistet.

Tabelle 3.10: Ergebnisse der Inkubation von immobilisiertem Plasma-Kallikrein mit dem UII_95-124 nach einer Stunde Inkubationszeit. Aufgetragen sind Signale, die im Massenspektrum der Inkubation von Plasma-Kallikrein mit dem Substrat deutlich unterschiedlich waren im Vergleich zur Kontrolle. Es ist der gemessene m/z-Wert angegeben, dazu die Sequenzen der Peptide, die diesen m/z-Werten zugeordnet werden konnten und die monoisotopische Masse M dieser Peptide.

m/z	Mögliche Sequenz	Kürzel	M
989,3	RIWKPYK	UII_105-111	989,6
1180,4	KRETPDCFV	UII_112-120	1180,5
	RETPDCFVK	UII_113-121	1180,5
1245,6	PNILLSHLLAR	UII_95-105	1245,8
1308,5	KKRETPDCFV	UII_111-120	1308,6
	KRETPDCFVK	UII_112-121	1308,6
1389,4	ETPDCFWKYCV	UII (114-124)	1389,6
1545,5	PNILLSHLLARIW	UII_95-107	1544,9
	RETPDCFWKYCV	UII+R (113-124)	1545,7
1673,7	KRETPDCFWKYCV	UII+KR (112-124)	1673,8
1697,7	WKPYKKRETPDCF	UII_107-119	1696,8
	KPYKKRETPDCFV	UII_108-120	1696,8
	PYKKRETPDCFVK	UII_109-121	1696,8

Ergebnisse

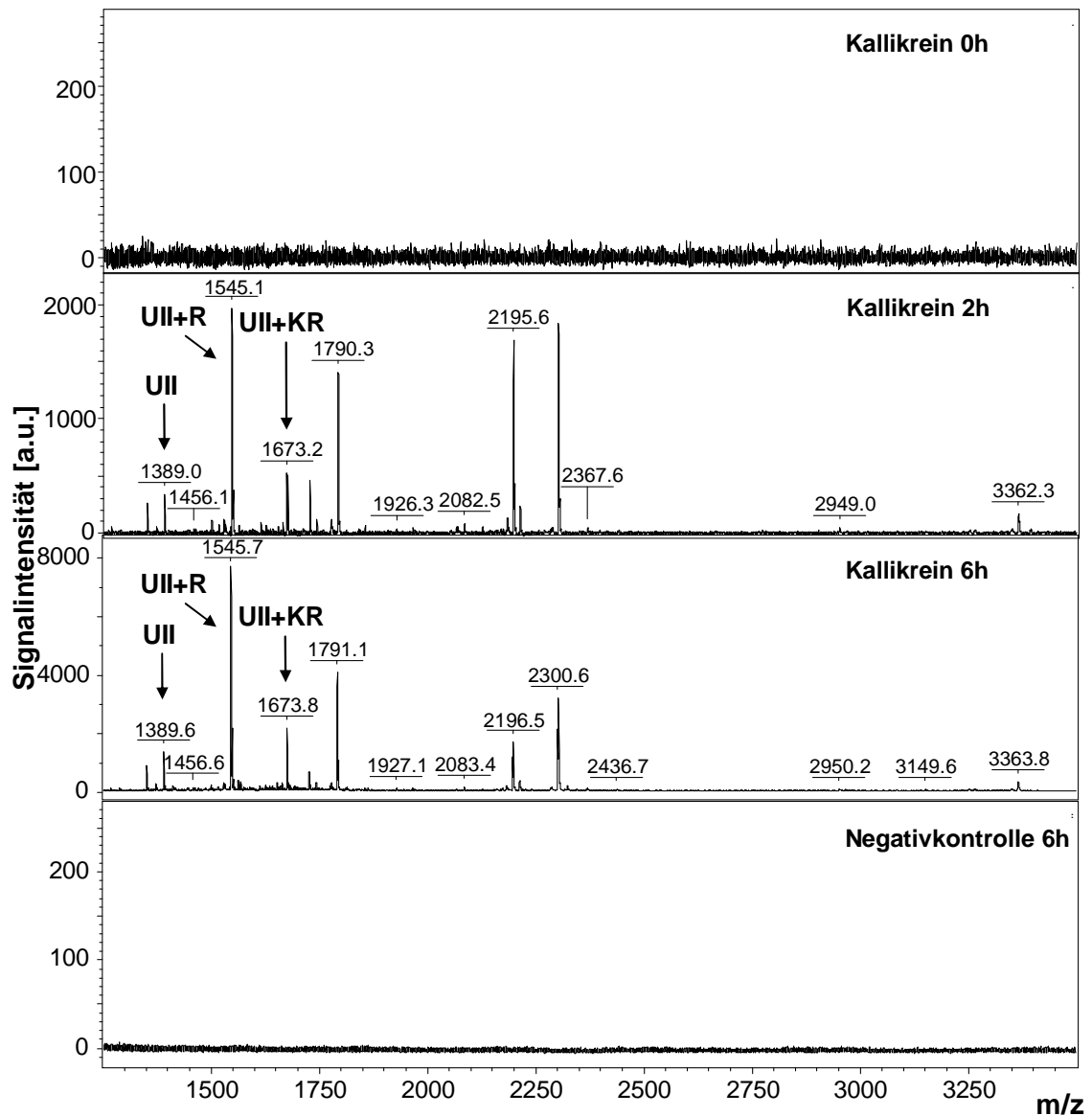


Abbildung 3.24: Inkubation von immobilisiertem Plasma-Kallikrein UII_21-124. Negativkontrolle: Glycin-derivatisierte Chromatographiepartikel ohne immobilisiertes Protein. Die Inkubation erfolgte mit 10^{-4} M Substratlösung, die Messung der Reaktionsprodukte erfolgte mit MALDI-TOF-MS mit der Matrix DHB, abgebildet ist der Massenbereich von 1250 – 3300 Da.

Um zu überprüfen, ob Kallikrein auch in der Lage ist, das Vorläuferpeptid zu spalten, wurde eine Inkubation mit immobilisiertem Kallikrein und dem UII_21-124 als Substrat angesetzt. Die zu definierten Reaktionszeiten abgenommenen Aliquots wurden mit MALDI-TOF-MS analysiert. Für die Analyse der kleineren Reaktionsprodukte wurde DHB als Matrix verwendet. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 3.24

gezeigt. In dem Inkubationsansatz des Kallikrein entstanden einige Signale bereits nach zwei Stunden Inkubationszeit, darunter auch die Signale des Urotensin-II, des Ull+R sowie des Ull+KR. Eine tabellarische Übersicht aller identifizierten Peptide ist im Anhang gegeben. Reaktionsprodukte mit m/z über 3300 Da konnten nicht identifiziert werden.

3.6.1 Inhibition der Urotensin-II-generierenden-Aktivität mit einem Plasma-Kallikrein-Inhibitor

Die physiologische Relevanz der Ull-generierenden Aktivität des Kallikreins sollte mit einem Inhibitor untersucht werden. Hierfür wurde der spezifische Plasma-Kallikrein-Inhibitor PK 15 eingesetzt, der freundlicherweise von der Gruppe um Sir G. Winter von der Universität Cambridge zur Verfügung gestellt wurde.

Um die Inhibition der UCE-Aktivität des Kallikreins zu testen und die optimale Einsatzkonzentration des Inhibitors innerhalb des MES-Assays zu bestimmen, wurde zunächst immobilisiertes Kallikrein mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen von null bis 320 nM und dem Substrat Ull_105-124 inkubiert und die gebildete Menge an Ull über eine SRM-Messung relativ quantifiziert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.25 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen die deutliche Generierung des Ull bereits nach 30 Minuten Inkubationszeit in der Inkubation des Kallikreins ohne Inhibitor. Die gemessene Ull-Menge nahm bei der niedrigsten Inhibitorkonzentration (80 nM) leicht zu. Dabei handelte es sich vermutlich um Abweichungen, die durch Schwankungen des Assays, Pipettier- oder Messfehler entstanden sind. Bei einer Inhibitorkonzentration von 160 nM nahm die gebildete Menge an Ull leicht und bei 320 nM stark ab gegenüber der gebildeten Menge an Ull in der Inkubationslösung ohne Inhibitor. Auch in der höchsten eingesetzten Konzentration war jedoch noch Ull messbar, von 320 nM liegt die Signalintensität des Ull nur noch bei etwa einem Drittel der Signalintensität der Inkubation ohne Inhibitor, die UCE-Aktivität der Proteinfraction war nicht vollständig inhibiert. Die notwendige Menge an Inhibitor in dem verwendeten Assay überstieg also deutlich die in der Literatur beschriebene Konzentration von 20 nM [121]. Die Ursachen sind vermutlich in der Verwendung der Sepharosebeads zu suchen, der

Ergebnisse

Inhibitor könnte ähnlich wie auch die Peptide UII_95-124 und UII_105-124 zumindest teilweise an die Sepharosebeads adsorbieren. Es konnte aber gezeigt werden, dass die durch den Einsatz des spezifischen Kallikrein-Inhibitors PK 15 die UCE-Aktivität der Fraktion deutlich abnahm.

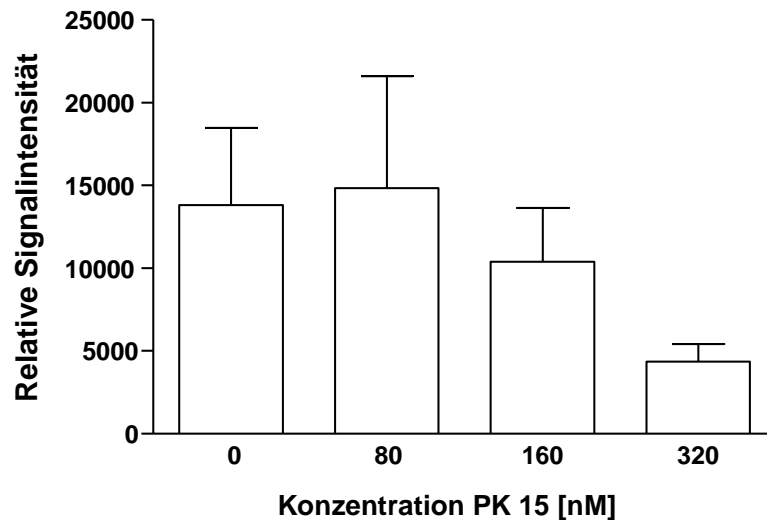


Abbildung 3.25: Signalintensitäten von UII nach Inkubation von immobilisiertem Plasma-Kallikrein mit dem Plasma-Kallikrein-Inhibitor PK 15. Das immobilisierte Plasma-Kallikrein wurde mit verschiedenen Konzentrationen von PK 15 und einer 10^{-5} M UII_105-124-Lösung inkubiert, die Doppelbestimmung des Reaktionsprodukts Urotensin-II erfolgte nach 30 Minuten Inkubationszeit mit ESI-QQQ-SRM.

Der Kallikrein-Inhibitor wurde anschließend für eine Inkubation von immobilisierten Plasmaproteinen mit dem Substrat UII_105-124 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 0 nM, 500 nM und 1000 nM PK 15-Konzentration mit den Plasmaproteinen von zwei gesunden Probanden, einer kommerziellen Plasma-Kallikrein-Fraktion und einer Negativkontrolle mit Glycin-derivatisierten Chromatographiepartikeln ohne immobilisiertes Protein.

Ergebnisse

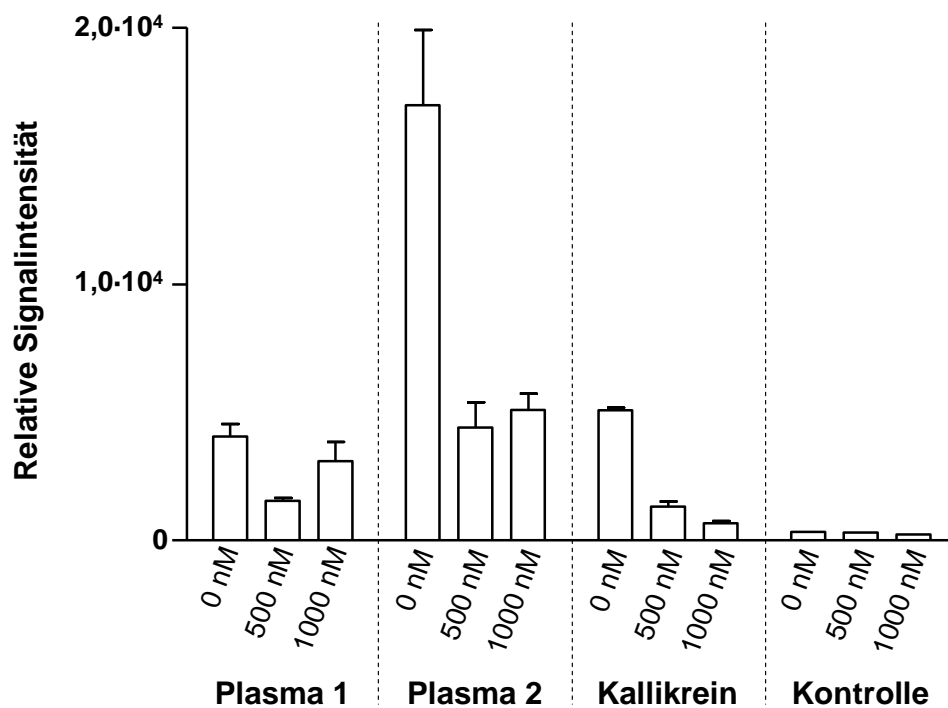


Abbildung 3.26: Signalintensitäten von UII nach Inkubation von immobilisierten Plasmaproteinen und Plasma-Kallikrein mit dem Plasma-Kallikrein-Inhibitor PK 15. Die immobilisierten Plasmaproteine von zwei gesunden Probanden und das immobilisierte Plasma-Kallikrein wurden mit einer 10^{-5} M UII₁₀₅₋₁₂₄-Lösung und verschiedenen Konzentrationen von PK 15 (angegeben auf der X-Achse) inkubiert, die Doppelbestimmung des Reaktionsprodukts Urotensin-II erfolgte nach 16 Stunden Inkubationszeit mit ESI-QQQ-SRM. Kontrolle: Glycin-derivatisierte Chromatographiepartikel ohne immobilisiertes Protein.

Abbildung 3.26 zeigt die Ergebnisse der SRM-Messung des Reaktionsprodukts Urotensin-II. Die Signalintensität von UII in der Inkubation der Plasma-Kallikrein-Fraktion mit dem Substrat nahm mit Zugabe von 500 nM PK 15 um den Faktor 3,8 ab gegenüber der Inkubation ohne Inhibitor. Bei 1000 nM PK 15-Konzentration sank sie noch einmal, die Signalintensität war um Faktor 7,5 gegenüber der Inkubation ohne Inhibitor verringert. Im Plasma des ersten Probanden entstanden während der Inkubation der Plasmaproteine mit dem Substrat UII₁₀₅₋₁₂₄ deutliche Mengen an UII. Bei zusätzlicher Inkubation mit 500 nM Inhibitor lag die UII-Menge deutlich niedriger (Verringerung um Faktor 2,6), stieg jedoch bei einer Inhibitor-Konzentration von 1000 nM wieder an (Verringerung um Faktor 1,3 gegenüber der Inkubation ohne Inhibitor). Bei der Inkubation der Plasmaproteine des zweiten Probanden lag die gebildete Menge an UII ohne Inhibitor deutlich höher als beim ersten Probanden, fiel

Ergebnisse

bei 500 nM PK 15 deutlich ab (Verringerung um Faktor 3,9) und stieg bei 1000 nM PK 15 nur leicht wieder an (Verringerung um Faktor 3,3 gegenüber der Inkubation ohne Inhibitor). In der Negativkontrolle ohne immobilisiertes Protein wurden nur geringe Mengen an UII gemessen. Tabelle 3.11 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 3.11: Zusammenfassung der Ergebnisse der Inkubation des Inhibitors PK 15 mit den immobilisierten Plasmaproteinen von zwei Probanden sowie immobilisiertem Kallikrein. Es sind die Mittelwerte der Signalintensitäten des UII in den SRM-Messungen für die Inkubation der Proteinfractionen mit den verschiedenen Inhibitorkonzentrationen angegeben sowie der Faktor, um welchen sich die Signalintensitäten bei Zugabe des Inhibitors gegenüber der Inkubation ohne Inhibitor verringerten.

Probe	Inhibitorkonzentration	Mittelwert der SRM-Messung	Verringerung der Signalintensität um Faktor
Proband 1	0 nM	4066	
	500 nM	1536	2,6
	1000 nM	3095	1,3
Proband 2	0 nM	16977,5	
	500 nM	4406,5	3,9
	1000 nM	5089,5	3,3
Kallikrein	0 nM	5074,5	
	500 nM	1323,5	3,8
	1000 nM	678,5	7,5

4 Diskussion

Die Protease Komplementfaktor I (CFI) wurde vor kurzem von Kurzawski als Ull-generierendes Enzym identifiziert, was im Rahmen meiner Diplomarbeit bestätigt werden konnte [120]. Ein Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung der physiologischen Relevanz der Urotensin-II-generierenden Aktivität des Komplementfaktor I. Um dessen proteolytische Aktivität zu untersuchen, sollte dieser aus einer geeigneten Quelle aufgereinigt werden. Bei dem CFI handelt es sich um eine zirkulierende Serinprotease [77], es kann mit einer dreistufigen Reinigung nach einer Vorschrift von Sim *et al.* aus humanem Plasma [96], bzw. mit einer angepassten zweistufigen Reinigung aus der humanen Cohn-Fraktion IV-4 gereinigt werden. In den erhaltenen Eluatfraktionen konnten mit verschiedenen Methoden proteolytische Aktivitäten gemessen werden. So wiesen die CFI-haltigen Fraktionen sowohl C3b-abbauende als auch Ull-generierende Aktivitäten auf. Die zum Teil sehr langen Inkubationszeiten wiesen jedoch auf eine eher geringe UCE-Aktivität hin. Zudem entstanden weitere Reaktionsprodukte, die auf proteolytische Aktivitäten anderer Proteasen als CFI zurückzuführen sind, welche durch die Affinitätschromatographie nicht vollständig abgereichert wurden. Zur Charakterisierung wurden die Proteine der Eluatfraktionen der Antikörper-Affinitätschromatographie der Reinigung des CFI aus der Cohn-Fraktion IV-4 tryptisch verdaut und anschließend massenspektrometrisch identifiziert. Dabei wurden mit Alpha-1-Antitrypsin, Alpha-2-Macroglobulin, Antithrombin-III, Alpha-1-Antichymotrypsin, dem Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor und Kininogen-1 fünf Serinproteaseinhibitoren und ein Thiolproteaseinhibitor identifiziert. Da es sich bei der Ull-generierenden Protease vermutlich um eine Serinprotease handelt [24] und auch der CFI zu den Serinproteasen zählt, könnten die Serinproteaseinhibitoren also eine deutlich verringerte Aktivität dieser Proteinfraktion bewirken. Zudem wurden neben dem CFI zwei weitere Proteasen identifiziert, der Komplementfaktor B und Plasma-Kallikrein (nachfolgend auch Kallikrein), beides zirkulierende Serinproteasen. Der Komplementfaktor B wird nach Aktivierung durch den Komplementfaktor D und Bindung der Komplementkomponente C3b als C3- oder C5-Konvertase [122] (vgl. auch Abschnitt 1.2). Plasma-Kallikrein ist eine Protease des Kinin-Kallikrein-Systems (KKS). Die Aktivierung von Faktor XII zu Faktor XIIa kann über geladene Oberflächen geschehen [123], es ist jedoch unklar, ob dies *in vivo* von Bedeutung ist [124]. Der Faktor XIIa aktiviert Plasma-Kallikrein durch proteolytische Freisetzung aus dem

inaktiven Vorläuferprotein Präkallikrein. Kallikrein kann seinerseits auch Faktor XII zu XIIa aktivieren, wodurch eine Amplifikation der Aktivierung auftritt [125]. Auch durch Thromben kann Faktor XII aktiviert werden [126]. Aktiviertes Kallikrein kann dann aus dem Protein High-molecular-weight-Kininogen (HK) das vasoaktive Peptid Bradykinin spalten [127].

Das KKS interagiert zudem mit dem Renin-Angiotensin-System (RAS), da aktiviertes Plasma-Kallikrein Prorenin zu Renin spaltet, welches dann Angiotensinogen zu Angiotensin-I, Vorläufer des vasoaktiven Peptids Angiotensin-II, umwandeln kann [128]. Das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) inaktiviert seinerseits Bradykinin durch proteolytische Spaltung [129].

Eine Übersicht der biochemischen Eigenschaften der drei identifizierten Proteasen liefert Tabelle 3.4. In allen drei Fällen handelt es sich um zirkulierende Trypsin-ähnliche Serinproteasen. In der Literatur sind jeweils die für Trypsin-ähnliche Proteasen typischen Schnittspezifitäten C-terminal der Aminosäuren Arginin (für CFI und Komplementfaktor B) bzw. Arginin und Lysin (Kallikrein) beschrieben [111]. Der CFI und Kallikrein sind mit 63 bzw. 64 kDa etwa gleich groß, der Komplementfaktor B ist mit etwa 80 kDa deutlich größer, jedoch beziehen sich diese Angaben lediglich auf die reine Aminosäuresequenz ohne posttranslationale Modifikationen. Alle drei Proteasen sind stark N-glykosyliert, die Berechnung des isoelektrischen Punktes ergibt Werte um 6,5 für CFI und den Komplementfaktor B und 8,5 für Kallikrein [112]. Diese Werte sind jedoch wie das Molekulargewicht anhand der Aminosäuresequenz bestimmt und berücksichtigen weder posttranslationale Modifikationen noch die Tertiärstruktur der Proteine. Eine Trennung der drei Proteasen in einem einzigen Reinigungsschritt ist aufgrund der hohen Ähnlichkeit schwierig.

Um zu überprüfen, ob diese verunreinigenden Proteasen selbst Ull-generierende Aktivität besitzen, wurden diese Enzyme kommerziell erworben und auf mit dem MALDI-basierten MES-Assay auf ihre Aktivität getestet. Bei der Inkubation des Komplementfaktor B mit dem Substrat Ull₁₀₅₋₁₂₄ entstand kein Ull (vgl. Anhang Abbildung 6.4). Es konnte also keine UCE-Aktivität nachgewiesen werden. Aufgrund des sehr spezifischen physiologischen Hintergrundes des Komplementfaktor B im Kontext des Komplementsystems entspricht dies auch den Erwartungen, da der Komplementfaktor B seine proteolytische Aktivität nur nach Aktivierung und Bindung an andere Komplementkomponenten ausbildet. Ob der Komplementfaktor B

physiologisch nicht als UII-generierendes Enzym fungiert, kann mit diesen Experimenten aufgrund fehlender Kofaktoren zwar nicht endgültig geklärt werden, erscheint aber aufgrund der Ergebnisse und des Wissens über diese Protease als eher unwahrscheinlich.

Bei der Inkubation von Kallikrein mit dem Substrat UII₁₀₅₋₁₂₄ (Abbildung 3.21) entstanden hingegen bereits nach sehr kurzen Reaktionszeiten die Peptide für UII, UII+R und UII+KR. Die Kallikrein-Fraktion wies also eine deutliche UCE-Aktivität auf. Die in der Eluatfraktion der CFI-Antikörpersäule nachgewiesene UCE-Aktivität ging also möglicherweise nicht oder nur zum Teil auf die proteolytische Aktivität des CFI zurück.

Neben der Reinigung des CFI aus dem Plasma oder einer Plasmaproteinfraktion besteht auch die Möglichkeit, rekombinant exprimiertes Protein zum Nachweis von proteolytischen Aktivitäten einzusetzen. Hier besteht der Vorteil, dass keine abundanten Plasmaproteine die Proteinfraktion verunreinigen und dass das Protein durch einen Affinitätstag einfacher gereinigt werden kann. Auch das Kallikrein als Plasmaprotease mit UCE-Aktivität oder andere verunreinigende Proteasen können in einer solchen Fraktion nicht anwesend sein. Rekombinant exprimierter CFI wurde freundlicherweise von der Gruppe von Prof. Dr. John P. Atkinson der Washington University School of Medicine zur Verfügung gestellt. Dieses wurde in einer humanen Nierenzell-Kultur exprimiert und nach der Reinigung mit einer eindimensionalen SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung auf Verunreinigungen untersucht. Dabei wurden außer den beiden Banden der leichten und schweren Kette keine weiteren Banden gefunden. Die zur Verfügung gestellte Proteinfraktion wies demnach eine sehr hohe Homogentität auf und war also ideal geeignet um die CFI-Aktivität *in vitro* zu belegen. Neben dem Wildtyp-CFI (WT) wurde auch eine CFI-Fraktion mit einer Mutation zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um die Mutante D501N, bei der die Aminosäure Asparaginsäure (D) an Position 501 des aktiven Proteins gegen die Aminosäure Asparagin (N) ausgetauscht ist. Die dreidimensionale Struktur des CFI ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Darin sind in blau die drei Aminosäurereste des katalytischen Zentrums dargestellt: ein Histidinrest an Position 362, ein Asparaginsäurerest an Position 411 sowie ein Serinrest an Position 507. Die Position der Mutation D501N ist durch eine rote Kugel gekennzeichnet. Sie befindet sich nur sechs Aminosäuren vom Serinrest des aktiven Zentrums entfernt. In der Literatur wurde postuliert, dass diese Mutation an der Wand der Substratbindungstasche

lokalisiert ist [77], das Protein wird als minimal aktiv beschrieben [93]. Demnach sollte diese Fraktion im Gegensatz zu dem rekombinant exprimierten WT keine oder nur eine geringe UCE-Aktivität aufweisen.

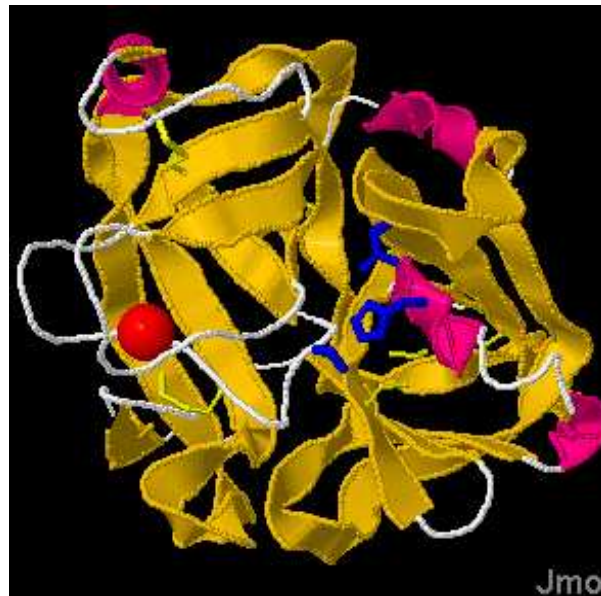


Abbildung 4.1: Dreidimensionale Struktur des CFI. Die Reste der Aminosäuren des aktiven Zentrums sind in blau dargestellt. Die Position der Mutation D501N ist durch eine rote Kugel markiert. Die Sekundärstrukturmotive alpha-Helices und beta-Faltblattstruktur sind in rosa bzw. goldfarben dargestellt. Abbildung aus [130].

Um die Aktivität der rekombinant exprimierten Proteinfractionen zu testen, wurden sie zunächst mit dem oben beschriebenen Assay nach Kananagh *et al.* auf C3b-abbauende Aktivität getestet. Das Ergebnis des Western Blots der Inkubationsansätze ist in Abbildung 3.10 gezeigt. Es zeigt in der Inkubation des WT-CFI mit dem C3b in Anwesenheit von Faktor H eine deutliche Bande des α 1-Spaltprodukts. Der CFI ist also proteolytisch aktiv und in der Lage, das Substrat umzusetzen. Die Spur des Inkubationsansatzes der Mutante D501N mit dem Substrat und dem Cofaktor zeigt auf dieser Höhe lediglich eine sehr schwach angefärbte Bande. Es war also deutlich weniger des α 1-Spaltprodukts entstanden, die Mutante ist erwartungsgemäß kaum aktiv. Um die proteolytische Aktivität genauer zu untersuchen, wurden die CFI-Fractionen auch mit dem Fluoreszenzsubstrat Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-AMC inkubiert. Abbildung 3.11 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. Sowohl die Fraktion des WT-CFI als auch die der Mutante zeigten eine deutliche proteolytische Aktivität in beiden

Proteinfractionen. Die Mutante D501N zeigte keine verlangsamte Kinetik gegenüber der Fraktion des WT-CFI. Die drei Aminosäuren des aktiven Zentrums sind nicht direkt von der Mutation betroffen, insofern ist die proteolytische Aktivität nicht zwingend verringert, was in diesem Experiment gezeigt werden konnte. In der Literatur wird postuliert, dass sich die Aminosäure 501 an der Wand der Bindungstasche befindet und an der Substratbindung beteiligt ist [77]. Das kleine Fluoreszenzsubstrat kann offenbar ohne die Hilfe der Aminosäure D501 in die Bindungstasche gelangen und gespalten werden.

Die Proteaseaktivität der beiden CFI-Fractionen wurde anschließend per MES-Assay auf ihre C3b-abbauende und Ull-generierende Aktivität getestet. Die Ergebnisse dieser Inkubationen sind in Abbildung 3.12 dargestellt. In den Inkubationen des Wildtyps mit den Peptidsubstraten entstanden deutliche Mengen der Reaktionsprodukte C3b-R und Urotensin-II. Das rekombinant exprimierte CFI war also in der Lage, ohne Cofaktor sowohl das peptidische C3b-Substrat als auch das 20 Aminosäuren lange Ull_105-124 zu spalten. Da es sich bei der Fraktion um eine sehr homogene Proteinfraction handelte, die noch dazu nicht auf dem bisher beschrittenen Weg der Isolierung des CFI aus Plasmaproteinfractionen isoliert wurde, ist dieses Ergebnis ein wichtiger Hinweis, dass es sich bei dem CFI tatsächlich um ein Ull-generierendes Enzym handelt, da die Anwesenheit von verunreinigenden Proteasen hier wenig wahrscheinlich war.

In beiden Inkubationen der Mutante D501N entstand dagegen deutlich weniger Reaktionsprodukt, die C3b-abbauende und Ull-generierende Aktivität war also deutlich verringert, aber nicht vollständig verschwunden. Die verminderte Aktivität der Proteinfraction gegenüber beiden Peptidsubstraten ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass der CFI UCE-Aktivität besitzt und diese nicht auf verunreinigenden Proteasen zurückzuführen war, da diese Proteasen aufgrund der gleichen Reinigungsprozedur mit hoher Wahrscheinlichkeit in beiden Fractionen anwesend gewesen sein müsste.

Die Größe der eingesetzten Peptidsubstrate liegt mit rund 20 Aminosäuren zwischen dem Fluoreszenzsubstrat, das nur drei Aminosäuren zuzüglich der chemischen Modifizierung groß ist und den natürlichen Substraten des CFI wie der α' -Kette des C3b mit mehreren hundert Aminosäuren Länge. Die natürlichen Substrate können in Abwesenheit des Cofaktors nicht gespalten werden, möglicherweise sind die

Cofaktoren für Substraterkennung und –ausrichtung mitverantwortlich [131]. Für kürzere Substrate in der Länge üblicher Fluoreszenzsubstrate benötigt der CFI jedoch keine Cofaktoren [80]. Auch die beiden eingesetzten Peptidsubstrate können vom CFI ohne Cofaktoren gespalten werden [25, 120]. Anders als für die Spaltung des Fluoreszenzsubstrates scheint hier jedoch eine Interaktion des Substrats mit der Wand der Bindungstasche vorteilhaft zu sein, was die deutlich verringerte Aktivität der Mutante D501N gegenüber den Peptidsubstraten erklären könnte.

Um Hinweise auf die physiologische Relevanz der UCE-Aktivität des CFI und des Kallikreins zu sammeln, wurden verschiedene Patientengruppen auf ihre UCE-Aktivität getestet. Zunächst wurde dabei die Gruppe der dialysepflichtigen Patienten untersucht. Die Hämodialyse führt durch Biokompatibilität zu einer Aktivierung des Komplementsystems [116] und somit wahrscheinlich auch zu einer Aktivierung des CFI, welche sich in einem Anstieg der UII-generierenden und C3b-abbauenden Aktivität äußern müsste. Um diese These zu prüfen, wurden die immobilisierten Plasmaproteine von neun dialysepflichtigen Patienten in einem MES-Assay mit den Substraten UII_105-124 und dem peptidischen C3b-S inkubiert. Die nach einer definierten Reaktionszeit gebildeten Mengen an UII und C3b-R wurden mit einer SRM-Messung relativ quantifiziert. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 3.13 und Abbildung 3.14 gezeigt. Bei den Patienten 1 bis 8 lagen die Signalintensitäten von UII nach Inkubation mit den Plasmaproteinen abgenommen vor der Dialyse deutlich unter denen der Plasmaproben, die nach der Dialyse abgenommen wurde. Lediglich bei dem Probanden 9 war die generierte Menge an UII nach der Dialyse etwas niedriger. Die Signalintensitäten, die nach der Inkubation der Plasmaproteine dieses Patienten entstanden, waren insgesamt deutlich niedriger als die der anderen Patienten, so dass hier möglicherweise eine weitere Anomalie vorliegt. Denkbar wäre eine Beeinflussung der UCE-Aktivität durch Defekte des Urotensin-II-generierenden Enzyms oder möglicher Cofaktoren, aber auch ein besonders schneller Abbau des gebildeten UII durch andere Plasmaproteasen. Da der P-Wert, der eine Aussage über die Signifikanz des Unterschiedes zwischen den beiden Probengruppen (vor bzw. nach Dialyse) treffen sollte, unter 0,05 lag, war die Abweichung der Messungen statistisch signifikant. Die UCE-Aktivität der Patientengruppe wurde also durch die Hämodialyse erhöht. Diese Ergebnisse sind konform zu der in der Literatur beschriebenen Aktivierung des KKS durch die

Hämodialyse [132], welche im Extremfall zu hypersensitiven und anaphylaktischen Reaktionen führen kann, welche mit einer Erhöhung der Bradykinin-Konzentration in Zusammenhang gebracht wurden [133]. Diese tritt insbesondere bei Patienten auf, die eine Medikation mit ACE-Inhibitoren erhalten, da ACE an der Metabolisierung des Bradykinins beteiligt ist [134]. Auch im Krankheitsbild der diabetischen Nephropathie wird eine Beteiligung des KKS und des RAS diskutiert. Die Gabe von ACE-Inhibitoren hat einen protektiven Effekt, der einerseits auf die Reduzierung der konstriktorischen Wirkung des durch das ACE generierten Angiotensin-II und andererseits auf eine Erhöhung der vasodilatatorischen Effekte des Bradykinins durch verminderten Abbau verursacht werden könnten [135-137].

Die Quantifizierung des C3b-R ergab ein anderes Bild. Hier waren die Signalintensitäten des Reaktionsproduktes bei acht der neun Patienten bei der Inkubation mit dem Plasma abgenommen nach der Dialyse niedriger als der Inkubation mit dem Plasma abgenommen vor der Dialyse. Die Abweichungen waren dabei zum Teil sehr klein, beispielsweise bei den Patienten 2 und 3. Lediglich der Patient 8 wies nach Dialyse deutlich höhere Mengen an generiertem C3b-R auf als vor der Dialyse. Der P-Wert der beiden Gruppen lag leicht über dem Grenzwert von 0,05, es kann also nicht von statistischer Signifikanz gesprochen werden. Es war jedoch ein klarer Trend zu beobachten. Die Hämodialyse scheint die UCE-Aktivität zu erniedrigen oder die Aktivität einer C3b-R-abbauenden Protease deutlich zu erhöhen. Zu bemerken ist außerdem, dass der Proband neun, dessen UII-generierende Aktivität im Plasma sehr schwach war, die höchsten C3b-S-abbauende Aktivität aufweist. Eine fehlende Aktivität des CFI kann also zumindest für dieses Substrat (C3b-S) ausgeschlossen werden. Möglich wäre eine reduzierte Aktivität des CFI gegenüber dem Substrat UII₁₀₅₋₁₂₄ beispielsweise durch eine Mutation einer Aminosäure außerhalb des aktiven Zentrums des CFI, die bei der Substraterkennung eine Rolle spielt. Insgesamt muss jedoch festgestellt werden, dass die Ergebnisse dieses Versuches die physiologische Relevanz der UCE-Aktivität des CFI nicht untermauern konnten.

Eine weitere untersuchte Patientengruppe war die der Patienten mit diabetischer Nephropathie. Dabei handelt es sich um eine chronische Nierenerkrankung aufgrund einer Angiopathie, also einer krankhaften Veränderung der Blutgefäße. Die diabetische Nephropathie zeichnet sich im Speziellen durch eine Angiopathie der Kapillargefäße der Nierenkörperchen aus, die insbesondere bei Patienten mit

Diabetes durch den erhöhten Blutzuckerspiegel auftritt. Die charakteristischen Merkmale der diabetischen Nephropathie sind eine Verdickung der Basalmembran an den Glomeruluskapillaren der Niere, sowie krankhafte Veränderungen im Bindegewebe der Nierenkörperchen (Verdickung und Vernarbung) [138]. Im Zusammenhang mit diabetischen Angiopathien wurde auch eine Aktivierung des Komplementsystems beobachtet [139, 140]. Der Mechanismus der Komplementaktivierung ist jedoch noch unklar. Diskutiert wurde dabei die Fehlregulierung von Komplementkomponenten durch Glykation, also nichtenzymatischer Glykosylierung durch den erhöhten Blutzuckerspiegel [141-143].

Langham *et al.* beobachteten eine erhöhte mRNA-Expression des Urotensin-II-Vorläufers im Nierengewebe von Patienten mit diabetischer Nephropathie, welche aufgrund der hohen UII-Immunreaktivität dieser Geweberegionen dem Epithelium zugeordnet wurde [144]. Ein Antagonist des Urotensin-Rezeptors als Medikament bei diabetischer Nephropathie konnte jedoch in ersten klinischen Studien nicht überzeugen [145].

Die Plasmaproteine von acht Patienten mit diabetischer Nephropathie sowie eines gesunden Probanden wurden auf ihre UCE-Aktivität getestet. Es konnten nach einer definierten Inkubationszeit bei allen acht Patienten deutlich höhere Mengen an UII verglichen mit der gesunden Kontrolle gemessen werden (vgl. Abbildung 3.15). Demnach wäre bei Patienten nicht nur die Expression von UII, sondern auch die UCE-Aktivität erhöht, was eine höhere Konzentration von zirkulierendem, aktivem UII zur Folge hätte. Es ist jedoch zu beachten, dass nur eine gesunde Kontrollprobe verwendet werden konnte und auch die Varianz der UCE-Aktivität beim Gesunden eine starke Varianz aufweist (vgl. Abbildung 3.26). Auch eine erhöhte Kallikrein-Konzentration im Plasma wird als Risikofaktor für die Ausbildung von vaskulären Erkrankungen bei Diabetes diskutiert [146], ohne dass die Gründe dafür aufgeklärt werden konnten. Im Zusammenhang mit den erhöhten UCE-Aktivitäten der Patienten mit diabetischer Nephropathie muss die Möglichkeit der vasokonstriktorischen Aktivität durch hohe UII-Konzentrationen in Betracht gezogen werden, die durch die UCE-Aktivität des Kallikreins auftreten könnten.

Auch bei anderen Krankheiten wurde eine Beteiligung des KKS beobachtet. Bei Lebererkrankungen wie der Leberzirrhose wurde eine verringerte Kallikrein-Konzentration durch verringerte Synthese, aber gleichzeitig eine verschlechterte

Clearance des Kallikreins beobachtet [147]. Andere Studien berichten von einer verstärkten Synthese, ausgelöst durch eine Akute-Phase-Reaktion [148, 149] und von erhöhten Bradykinin-Konzentrationen, was auf eine erhöhte Kallikrein-Aktivität bei diesen Patienten zurückzuführen sein könnte [150]. Der Kallikrein-Inhibitor Aprotinin verbessert die hämodynamischen und renalen Parameter von Patienten mit Leberzirrhose [151, 152]. Auch die Ull-Level sind bei Patienten mit Leberzirrhose erhöht [153, 154], was auf einen Zusammenhang zwischen der Urotensin-Generierung und dem KKS hindeutet. Jedoch ist die Leberzirrhose ein pathologischer Vorgang mit starken Auswirkungen auf den Organismus, so dass viele Prozesse einer Veränderung unterliegen und damit die pathophysiologische Relevanz der UCE-Aktivität des Kallikreins nicht endgültig belegt werden kann.

Bei der dritten untersuchten Patientengruppe handelte es sich um Patienten mit einer Defizienz des CFI. In der Literatur sind verschiedene Mutationen des CFI beschrieben [87, 94, 117-119], die mit einem Verlust der proteolytischen Aktivität einhergehen können oder dazu führen, dass CFI nicht mehr sezerniert wird. Durch den Mangel an CFI können C3b und C4b nicht gespalten werden, wodurch die Regulierung der C3-Konvertasen gestört ist. Die dauerhafte Aktivität von C3-Konvertasen führt zu einem ständigen Verbrauch von C3. Hierdurch entsteht ein Mangel an zirkulierendem C3, welches dann zur Opsonierung fremder Oberflächen fehlt. Die Gruppen von Prof. Tim Goodship (Universität Newcastle) und Dr. Margerita López-Trascasa (Universitätsklinikum La Paz, Madrid) stellten freundlicherweise das Plasma von CFI-defizienten Patienten zur Verfügung. Die Mutationen der einzelnen Patienten und ihre physiologischen Auswirkungen sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Es handelt sich bei den Patienten 1 bis 3 um Geschwister mit einer Punktmutation, welche das Splicing der CFI-mRNA beeinflusst. Dadurch wird das Exon 5 des CFI nicht exprimiert. Diese Veränderung betrifft die Domäne LDLr1 der schweren Kette. Der CFI ist im Plasma dieser drei Patienten nicht nachweisbar, die C3-Level entsprechend sehr niedrig. Auch bei den Patienten 4 und 5, ebenfalls Geschwister, betrifft die Mutation diese Domäne mit denselben Folgen für die CFI- und C3-Plasmalevel. Die Patienten ohne nachweisbare Mengen von CFI in ihrem Plasma sollten bei hoher physiologischer Relevanz des CFI idealerweise sehr niedrige oder gar keine UCE-Aktivitäten aufweisen. Bei den Patienten 6 und 7 handelte es sich um eine Frau und deren Vater mit einer heterozygoten Punktmutation im Bereich der Domäne CD-5, durch welche ein Stop-Codon eingefügt wird und ein großer Teil des Proteins

inklusive der Serinprotease-Domäne nicht exprimiert wird. Die Probanden wiesen aufgrund der heterozygoten vorliegenden Mutation nur leicht verringerte CFI-Plasmalevel auf, die C3-Spiegel lagen im Normalbereich. Trotzdem entwickelte die Patientin das Hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), das bei CFI-defizienten Patienten häufig vorkommt [94, 117]. Der Vater dagegen war symptomfrei.

Der Patient 8 wies eine Deletion auf, bei der betroffenen Region handelte es sich um die LDLr2-Domäne. Die CFI-Plasmalevel lagen leicht unter dem Referenzbereich, der C3-Spiegel war sehr niedrig. Der CFI konnte also sezerniert werden, war aber nicht proteolytisch aktiv. Auch bei diesem Patienten sollte idealerweise keine oder nur sehr wenig UCE-Aktivität messbar sein.

Die Ergebnisse des MES-Assays (Abbildung 3.16) zeigten dagegen eine Erhöhung der UCE-Aktivität der CFI-defizienten Patienten gegenüber der Aktivität der Kontrollprobe (Proband 9). Bei den drei Geschwistern (Probanden 1 bis 3) waren die Aktivitäten sehr verschieden, Die Probanden 1 und 3 wiesen die höchsten Aktivitäten auf, während bei Proband 2 im Vergleich zu den anderen Inkubationen eher niedrige generierte Ull-Mengen entstanden. Auch bei den anderen verwandten Probanden (4 und 5 bzw. 6 und 7) waren die generierten Mengen an Ull sehr unterschiedlich. Ein Zusammenhang zwischen der Art der Mutation und der gebildeten Menge an Ull konnte in diesem Experiment nicht gefunden werden.

Zusätzlich wurde die Konzentration von Ull im Plasma dieser Probanden bestimmt. Die Messung wurde freundlicherweise von Prof. Leong Ng von der Universität Leicester durchgeführt, die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 aufgeführt. Die nachgewiesenen Konzentrationen an Ull schwanken zwischen 0,67 und 16,71 fmol/ml. In einer Gruppe von 220 gesunden Probanden wurden mit dieser Methode Ull-Plasmakonzentrationen von 3,1 bis 42,6 fmol/ml gemessen [50]. Die gemessenen Werte liegen bei drei der gemessenen Proben unter diesem Wert, jedoch vor allem bei Proband 6 (0,67 fmol/ml) deutlich erniedrigt. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den erhöhten UCE-Aktivitäten, was auf eine komplexe Regulierung des Ull im Plasma hindeutet.

Neben der 11 Aminosäuren langen Form konnte bei einem der Probanden auch eine längere Form des Ull (Ullc) beobachtet werden. Dies ist ein Hinweis auf einen zirkulierenden, inaktiven Vorläufer des Ull, auf diese Möglichkeit soll an späterer Stelle dieser Arbeit eingegangen werden.

Die Tatsache, dass die CFI-defizienten Patienten vergleichsweise hohe UCE-Aktivitäten im Plasma aufweisen, kann auf verschiedene Tatsachen zurückzuführen sein. Eine Möglichkeit ist die Redundanz der UII-Generierung. Aus anderen Systemen wie dem Renin-Angiotensin-System (RAS) oder dem Endothelin-System ist bekannt, dass die proteolytische Generierung der zugehörigen aktiven Peptidhormone *in vivo* von mehreren verschiedenen Proteasen katalysiert werden kann [155, 156]. Eine UII-generierende Protease wie das Plasma-Kallikrein könnte also den Ausfall der proteolytischen Aktivität der CFI-defizienten Patienten kompensieren. Als weitere Möglichkeit muss jedoch auch in Betracht gezogen werden, dass CFI für die Generierung des UII *in vivo* nicht relevant ist. Die erhöhten UCE-Aktivitäten der CFI-defizienten Patienten könnten durch eine Aktivierung des Kallikreins durch die überschießende Komplementaktivierung verursacht sein. Belege für eine direkte Aktivierung des Kallikreins durch die Komplementaktivierung konnten in der Literatur jedoch nicht gefunden werden. Eine erhöhte Kallikrein-Aktivität durch verringerte Konzentrationen des Kallikrein-Inhibitors C1-Inhibitors, welcher auch den klassischen Weg der Komplementaktivierung reguliert, scheint unwahrscheinlich, da die CFI-defizienten Patienten keine verringerten C1-Inhibitor-Konzentrationen aufweisen [119].

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der proteolytischen Prozessierung des Urotensin-II-Prohormons. Es wird als 124 Aminosäuren langes Protein synthetisiert, eine 20 Aminosäuren lange Sequenz wurde als N-terminales Signalpeptid für die Sekretion des Proteins annotiert [18]. Über die weitere Prozessierung des 104 Aminosäuren langen Urotensin-Vorläuferproteins (UII₂₁₋₁₂₄) ist jedoch wenig beschrieben. Die Gruppe von Prof. Ng konnte in den Plasmaproben der CFI-defizienten Patienten längere Formen des UII nachweisen (vgl. Tabelle 3.5). Takahashi *et al.* fanden im Überstand von Karzinomzellen aus der Nebenniere nach einer Reversed Phase-Chromatographie mehrere Fraktionen mit UII-Immunität [19]. Chartrel *et al.* fanden keine Hinweise für die Existenz eines 16 oder 19 Aminosäuren langen Vorläuferpeptids, welche durch die Spaltung nach den basischen Aminosäuren R¹⁰⁵ bzw. K¹⁰⁸ entstehen würden [21]. Die Autoren vermuten, dass die dibasischen Sequenzen RK⁵⁰ und RK⁶⁶ als Spaltstelle fungieren könnten, da Seidah *et al.* die Prozessierung bioaktiver Proteine und Peptide durch nach einzelnen oder

doppelten basischen Aminosäureresten spaltenden Vorläufer-Konvertasen (Precursor Convertases, PC) postulieren [20].

Die proteolytische Prozessierung inaktiver Vorläuferproteine oder –peptide dient bei Peptidhormonen als wichtiges regulatorisches Element. So wird beispielsweise das vasoaktive Peptidhormon Angiotensin-II aus dem inaktiven Vorläuferprotein Angiotensinogen zunächst durch die Protease Renin gespalten, wobei das 11 Aminosäuren lange und ebenfalls nicht vasoaktive Peptid Angiotensin-I entsteht. Dieses wird beispielsweise durch die Protease Angiotensin-konvertierendes Enzym (Angiotensin converting enzyme, ACE) zu Angiotensin-II prozessiert [157].

Um die Prozessierung des 104 Aminosäuren langen UII₂₁₋₁₂₄ zu untersuchen, wurde das synthetisierte Protein mit immobilisierten Plasmaproteinen inkubiert (vgl. Abbildung 3.17 und Abbildung 3.18). In einem Größenbereich von 4,5 kDa bis 13 kDa (vgl. Abbildung 3.17) konnten zwei größere Fragmente des Substrats gemessen werden. Es könnte sich bei dem Signal bei $m/z = 9186$ um das Fragment UII₂₉₋₁₀₉, also ein Peptid, das aus den Aminosäuren 29 bis 109 des unprozessierten Urotensin-II-Proteins besteht, handeln. Das Signal bei $m/z = 4880$ könnte auf die Fragmente UII₆₁₋₁₀₄ oder UII₆₇₋₁₀₈ zurückgehen. Dabei fällt auf, dass UII₂₉₋₁₀₉ und UII₆₇₋₁₀₈ C-terminal ähnliche Sequenzen aufweisen, es findet eine Spaltung zwischen einer sauren Aminosäure (Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure) und Isoleucin (bei beiden Peptiden) statt. Diese Schnittspezifität kann jedoch keiner definierten Protease zugeordnet werden, in der Datenbank MEROPS [158] finden sich viele Proteasen, die diese Spezifität aufweisen. Die Schnitte könnten also durch dieselbe Protease entstanden sein. C-terminal unterscheiden sich die beiden Peptide nur um eine Aminosäure, dabei könnte es sich um einen Abbau durch eine Carboxypeptidase handeln.

Im Größenbereich bis 4,5 kDa (vgl. Abbildung 3.18) entstanden sowohl in der Inkubation des Substrats mit den immobilisierten Plasmaproteinen als auch bei der Negativkontrolle, der Inkubation des Substrats mit Glycin-derivatisierten Sepharosebeads ohne immobilisiertes Protein viele Signale. Nach zwei Stunden Inkubationszeit konnten zwei Peptide identifiziert werden (vgl. Tabelle 3.7). Es handelt sich dabei um das UII₂₅₋₄₁, sowie das Peptid UII₉₅₋₁₂₄, die 30 C-terminalen Aminosäuren des Urotensin-II. Die Schnittstelle nach Aminosäure 41 passt dabei in das Konzept von Seidah *et al.*, da es sich bei dieser Aminosäure mit Arginin um eine

basische Aminosäure handelt. Die N-terminalen Schnittstellen beider Peptide passen mit dem Schnitt hinter den Aminosäureresten Leucin+Leucin (UII_25-41) bzw. Glutamin+Asparaginsäure (UII_95-124) nicht in dieses Schema. Für die Schnittstelle nach dem Aminosäurerest 24 konnte in der Protease-Datenbank MEROPS keine zirkulierende Protease identifiziert werden. Für die Schnittstelle zwischen den Aminosäureresten 94 und 95 kommt laut MEROPS nur die Protease Granzym B in Frage. Es handelt sich dabei um eine Serinprotease, die in der Immunantwort durch die Einleitung der Apoptose von körperfremden Zielzellen eine wichtige Rolle spielt [159]. Da Granzym B intrazellulär vorkommt, sollte dieses Enzym für die identifizierte proteolytische Aktivität jedoch nicht verantwortlich sein.

Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden konnten weitere Peptide identifiziert werden (vgl. Tabelle 3.8). Darunter ist das UII_95-109, das also wie das UII_95-124 durch eine Spaltung nach der Aminosäure 94 entsteht, jedoch nur 14 Aminosäuren lang ist sowie UII_25-41, das auch nach zwei Stunden Inkubationszeit identifiziert werden konnte. Des Weiteren entstanden einige Peptide, die aus Teilen der 33 Aminosäuren langen, N-terminalen Sequenz des Substrats bestehen. Diese Peptide könnten durch eine initiale Spaltung von Endoproteasen nach Position 53 und anschließende Prozessierung durch Amino- und Carboxypeptidasen sein. Die initiale Spaltung könnte jedoch auch nach der Position 51 oder 52 erfolgt sein. Da jeweils zwei Leucinreste an den Positionen 23 und 24 sowie 52 und 53 vorkommen, entstehen durch Spaltung in dieser Region isobare Reaktionsprodukte, welche mit einer MS-Messung nicht differenziert werden können. Unter den identifizierten Sequenzen handelt es sich nur bei dem Peptid UII_39-70 um eines, das hinter einer dibasischen Sequenz (RK⁷⁰) gespalten wird.

Die proteolytische Spaltung nach der Aminosäure 94 erschien besonders interessant, da es sich hierbei um einen Schnitt handelte, der mehrfach identifiziert werden konnte und ein Fragment produziert, welches ein Vorläufer des C-terminal-ständigen aktiven UII darstellt. Um die proteolytische Spaltung zu verifizieren, wurde ein 21 Aminosäuren langes Peptid synthetisiert, das diese Schnittstelle beinhaltet. Es handelte sich dabei um das Peptid UII_85-105. Auch dieses Peptid wurde mit immobilisierten Plasmaproteinen inkubiert, die Reaktionsprodukte anschließend mit MALDI-TOF-MS untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.19 und Tabelle 3.8 zusammengefasst. Bei der Inkubation entstand bereits nach kurzen Inkubationszeiten ein Proteolyseprodukt, das um die C-terminale Aminosäure Arginin verkürzt war.

Diese wurde vermutlich durch eine Carboxypeptidase abgespalten. Der Abgleich dieser Schnittspezifität mit der Enzymdatenbank MEROPS ergab als einzigen Treffer die Carboxypeptidase N. Da es sich hierbei um ein Plasmaprotein handelt [160], könnte diese Peptidase für die Reaktion verantwortlich gewesen sein. Des Weiteren entstanden aus dem um eine Aminosäure verkürzten Substrat die Reaktionsprodukte RKFQDFSGQD (UII_85-94) und PNILLSHLLA (UII_95-104), was dem Endopeptidase-Schnitt zwischen den Aminosäuren 94 und 95 des Urotensin-II-Vorläuferproteins entspricht. Alle weiteren identifizierten Fragmente sind Leiterpeptide, die durch die Aktivität einer oder mehrerer Aminopeptidasen entstanden sind.

Es gibt also im Plasma eine Protease mit einer Schnittspezifität für das Urotensin-II-Vorläuferprotein nach dem Aminosäurerest an Position 94. Es konnte mit diesem Versuch jedoch nicht belegt werden, ob das 30 Aminosäuren lange, C-terminale Fragment des UII physiologisch von Bedeutung ist. Neben der Prozessierung durch eine zirkulierende Plasmaprotease besteht auch die Möglichkeit, dass das Urotensin-Vorläuferprotein durch eine membranständige Protease oder auch einer intrazellulären Protease prozessiert wird. Diese Möglichkeiten wurden innerhalb dieser Arbeit nicht untersucht. Diesem Thema könnte man sich beispielsweise durch die Inkubation mit entsprechenden Proteinfractionen (z.B. Membranproteinfraction, cytosolische Fraktion) nähern.

Um zu klären, ob der CFI in der Lage ist, aus diesem 30 Aminosäuren langen Vorläufer das aktive UII zu generieren, wurde die Eluatfraktion der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie mit dem UII_95-124 inkubiert (Abbildung 3.20). Dabei entstanden die drei Peptide UII, UII+R und UII+KR, jedoch erst nach relativ langen Inkubationszeiten. Aus dem kürzeren Fragment UII_105-124 wurde das UII schon nach deutlich kürzeren Inkubationszeiten generiert (Abbildung 3.8), was dafür spricht, dass die Enzymaktivität gegenüber dem längeren Peptid deutlich verlangsamt ist. Dafür spricht, dass das CFI große Substrate wie das C3b nur in Anwesenheit eines Cofaktors spalten kann, während für kleine Substrate kein Cofaktor nötig ist. Mit dem 30 Aminosäuren langen Substrat befindet man sich möglicherweise etwa an der Grenze dessen, was der CFI ohne Cofaktor umsetzen kann.

Auch Kallikrein wurde auf seine Aktivität gegenüber dem Substrat UII₉₅₋₁₂₄ getestet. Abbildung 3.22 zeigt die Ergebnisse dieser Inkubation. Wie schon bei der Inkubation des Kallikreins mit dem Substrat UII₁₀₅₋₁₂₄ entstanden auch bei dieser Inkubation bereits nach sehr kurzen Inkubationszeiten die Reaktionsprodukte UII, UII+R und UII+KR. Zusätzlich zu den drei identifizierten Urotensin-Peptiden entstanden bei der Inkubation des Kallikreins mit dem Substrat weitere Signale, die identifizierten Peptiden sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst. Zum Teil konnten diese Signale nicht eindeutig zugeordnet werden, da Peptide mit gleicher Masse entstanden sein können. Diese können mit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie nicht unterschieden werden. Vermutlich wurde das Substrat neben den drei proteolytischen Schnitten an den Positionen K¹¹¹, K¹¹² und R¹¹³ zur Generierung von UII, UII+R und UII+KR zusätzlich hinter den Aminosäuren R¹⁰⁵, K¹⁰⁸ und K¹²¹ prozessiert. Dafür spricht, dass es sich dabei in allen Fällen um eine Schnittspezifität hinter Arginin oder Lysin handelt und dass somit eine einzelne Protease, in diesem Fall also Kallikrein, für alle Schnitte verantwortlich gewesen sein könnte. Daneben ist es natürlich auch möglich, dass eine die Fraktion verunreinigende Protease für diese Schnitte verantwortlich war.

Nachdem die UCE-Aktivität des Kallikreins mit dem 30 Aminosäuren langen UII₉₅₋₁₂₄ gezeigt werden konnte, wurde auch das Urotensin-II-Vorläuferprotein (UII₂₁₋₁₂₄) mit dem immobilisierten Kallikrein inkubiert um zu testen, ob Kallikrein das UII auch aus dem 104 Aminosäuren langen Vorläufer generieren kann (Abbildung 3.23) gezeigt. Es entstanden bei der Inkubation des Kallikreins mit dem Substrat UII₂₁₋₁₂₄ bereits nach kurzen Inkubationszeiten einige Peaks, darunter auch die drei typischen Signale der Peptide UII, UII+R und UII+KR. Alle identifizierten Peptidsequenzen sind im Anhang zusammengefasst. Bei einigen, jedoch nicht bei allen identifizierten Peptiden handelte es sich dabei um Schnitte hinter den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Es musste also auch weiterhin die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass neben Kallikrein weitere Proteasen in der Proteinfraction vorhanden waren. In der Kontrollinkubation des Substrats ohne immobilisierte Proteine mit den derivatisierten Sepharosebeads entstanden keine Reaktionsprodukte.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass immobilisiertes Plasma-Kallikrein in der Lage ist, aus verschiedenen langen Vorläuferpeptiden bzw. -proteinen das Ull zu generieren und dass die Reaktionsprodukte dabei das typische Muster der drei Peptide von Ull, Ull+R und Ull+KR aufweisen. Es kann anhand dieser Versuche jedoch nicht festgestellt werden, ob die beobachtete UCE-Aktivität des Kallikreins physiologisch relevant ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurde in der Literatur nach einem Inhibitor des Kallikreins gesucht. Tatsächlich ist ein solcher Inhibitor von klinischem Interesse, mit dem Medikament KALBITOR[®] der Firma Dyax ist im Dezember 2009 ein Plasma-Kallikrein-Inhibitor als Wirkstoff gegen das hereditäre Angioödem in den USA zugelassen [161, 162]. Bei dieser Krankheit handelt es sich um eine seltene Erbkrankheit, bei der es zu einem Mangel an dem Protein Plasmaprotease-C1-Inhibitor kommt. Dieser inhibiert unter anderem Kallikrein, die fehlende Regulation führt zu einer übermäßigen Ausschüttung an Bradykinin. Unbehandelt führt die Krankheit zur Ausbildung von Ödemen, die je nach Lokalisation im Körper lebensbedrohlich werden können [163]. Da KALBITOR[®] von der Firma jedoch nicht zur Verfügung gestellt werden konnte, musste weiter nach einem passenden Inhibitor gesucht werden. Dieser Inhibitor sollte hoch spezifisch sein, bekannte Plasma-Kallikrein-Inhibitoren wie Aprotinin sind nicht spezifisch genug, da von solchen Inhibitoren auch andere Serinproteasen wie beispielsweise der CFI inhibiert werden. Eine Aussage über den Anteil des Kallikreins an der Ull-Generierung ist damit nicht möglich. Die Gruppe von Sir Greg Winter konnte einen solchen spezifischen Plasma-Kallikrein-Inhibitor durch die Erstellung einer kombinatorischen Bibliothek von polyzyklischen Peptiden in Bakteriophagen produzieren. Bei dem potentesten identifizierten Inhibitor, PK 15, handelt es sich um ein bizyklisches Peptid [121]. Die chemische Struktur von PK 15 ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Der Inhibitor wurde von der Gruppe auf seine Selektivität getestet, indem er mit den homologen Plasmaproteasen Plasma-Kallikrein aus Maus (79% Sequenzhomologie), Faktor Xla (human, 63% Homologie) und Thrombin (human, 36% Homologie) inkubiert wurde. Er inhibierte keine dieser Proteasen in der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 mM. Die mittlere inhibitorische Konzentration des Inhibitors gegenüber humanem Plasma-Kallikrein betrug 20 nM.

124 und UII_105-124 zumindest teilweise an die Sepharosebeads adsorbieren. Es konnte aber gezeigt werden, dass durch den Einsatz des spezifischen Kallikrein-Inhibitors PK 15 die UCE-Aktivität der Fraktion deutlich abnahm. Das sichert die bisherigen Ergebnisse der UCE-Aktivität des Kallikreins ab, die Möglichkeit der Generierung des UII durch eine Verunreinigung der Kallikrein-Fraktion erscheint aufgrund der hohen Spezifität des Inhibitors dagegen wenig wahrscheinlich.

Nachdem die Wirksamkeit des Inhibitors im verwendeten Assay belegt werden konnte, sollte anschließend die physiologische Relevanz der UCE-Aktivität des Kallikreins überprüft werden. Dies sollte durch eine Inkubation immobilisierter Plasmaproteine mit dem Inhibitor und dem Substrat UII_105-124 erfolgen. Um die Kallikrein-Aktivität im Plasma möglichst vollständig zu inhibieren, wurde PK 15 in den Konzentrationen 0,5 μM und 1 μM eingesetzt. Zusätzlich wurde auch Kallikrein mit diesen Inhibitorkonzentrationen inkubiert. Die eingesetzte Kallikreinmenge (1,4 μg Protein) lag dabei bei im Bereich der Kallikreinmenge, die der durchschnittlichen Menge an Präkallikrein im eingesetzten Volumen an Plasma entspricht [103]. Präkallikrein wird durch Kälte aktiviert [103]. Die Plasmaproben wurden bei -80 $^{\circ}\text{C}$ gelagert, so dass durch das Einfrieren der Plasmaproben das Kallikrein zumindest zum Teil aktiviert wurde. Die Ergebnisse dieser Inkubation sind in Abbildung 3.26 und Tabelle 3.11 zusammengefasst. Die gebildete Menge an UII in der Inkubation des Kallikreins mit 0,5 μM Inhibitor ging deutlich zurück und nahm auch bei der Inkubation mit 1 μM PK 15 noch weiter ab. Bei dem Plasma beider Probanden nahm die gebildete Menge an UII bei der Inkubation mit 0,5 μM PK 15 gegenüber der Inkubation ohne Inhibitor deutlich ab. Die Verringerung lag bei Proband 2 in der gleichen Größenordnung wie bei der Inkubation von Kallikrein bei dieser Inhibitorkonzentration. Bei Proband 2 war die Verringerung der gebildeten UII-Menge etwas weniger stark. Jedoch war auch die gebildete Menge an UII bei der Inkubation ohne Inhibitor deutlich niedriger als bei Proband 1 und Kallikrein. Bei der Inkubation des Kallikreins sank die gebildete Menge an UII bei höheren Inhibitorkonzentrationen weiter ab, dagegen nahm sie bei beiden Plasmaproben wieder zu. Diese Beobachtung geht vermutlich auf die hohe Komplexität der Plasmaproben zurück. Bei der Inkubation von Kallikrein mit dem Inhibitor ist lediglich die proteolytische Aktivität des Kallikreins selbst zu berücksichtigen. Wird diese inhibiert, sinkt die gebildete Menge an UII entsprechend der Inhibitorkonzentration. Beim Plasma jedoch müssen durch die hohe Komplexität weitere Effekte berücksichtigt werden. So kann der

spezifische oder unspezifische Abbau des UII nach seiner Generierung durch weitere anwesende Plasmaproteasen die Kinetik der UII-Generierung beeinflussen. Wird eine solche Protease durch den Inhibitor bei höheren Konzentrationen unspezifisch gehemmt, steigt die Menge an UII in der Reaktionslösung, weil das gebildete UII langsamer abgebaut wird als in der Vergleichsprobe ohne PK 15.

Es konnte also gezeigt werden, dass sowohl der CFI als auch Kallikrein *in vitro* in der Lage sind, das Urotensin-II aus verschiedenen langen Vorläuferpeptiden zu generieren. Das Kallikrein weist dabei eine deutlich höhere Aktivität auf als der CFI, die verwendeten Substrate UII_95-124 und UII_105-124 können vom Kallikrein deutlich schneller umgesetzt werden als vom CFI. Kallikrein ist anders als der CFI auch in der Lage, das 104 Aminosäuren lange Vorläuferprotein zu UII zu spalten. Die physiologische Relevanz der UCE-Aktivität des CFI konnte nicht weiter untermauert werden. Insbesondere die Versuche mit CFI-defizienten Patienten zeigen, dass das CFI nicht das einzige Urotensin-II-generierende Enzym ist, sondern dass es mit hoher Wahrscheinlichkeit ein anderes UCE ist, das *in vivo* den höheren Anteil an der UII-Generierung hat. Es konnte dagegen durch die Versuche mit dem spezifischen Kallikrein-Inhibitor gezeigt werden, dass das Kallikrein im Plasma einen deutlichen Anteil an der UII-Generierung trägt. Diese Tatsache sowie die Ergebnisse der UCE-Aktivitäten im Plasma von Patienten mit diabetischer Nephropathie bzw. vor und nach Hämodialyse untermauern die physiologische Relevanz dieser proteolytischen Aktivität.

Der Nachweis der UCE-Aktivität des Kallikreins erweitert das Wissen über diese Protease, die bereits aus dem Kontext von zwei gegensätzlich wirksamen Peptidhormon-Systemen bekannt ist. Während sie im KKS-System durch die Generierung des Bradykinins eine vasodilatatorische Aktivität verursacht, bewirkt die Aktivierung des RAS durch Kallikrein einen gegensätzlichen, da vasokonstriktorischen Effekt. Die UCE-Aktivität des Kallikreins erweitert das Wirkungsspektrum des Kallikreins auf ein drittes, ebenfalls sehr komplexes Peptidhormon-System. So kann die UII-Generierung in Abhängigkeit des vaskulären Bettes sowohl eine starke Vasokonstriktion als auch eine Vasodilatation verursachen, beides Aktivitäten, die auch im KKS- und RAS-System durch das Kallikrein induziert werden. Es bleibt dabei

zu untersuchen, ob die UCE-Aktivität des Kallikreins in beiden Kontexten von Bedeutung ist.

Die Ergebnisse bedeuten einen großen Fortschritt in der Urotensin-Forschung, da mit dem Wissen um die Generierung auch die bisher schwer zu fassende physiologische Bedeutung des Ull besser untersucht werden kann.

5 Literatur

- [1] Pearson, D., Shively, J.E., Clark, B.R., Geschwind, I.I., Barkley, M., Nishioka, R.S., Bern, A. (1980) Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 5021-4.
- [2] Ichikawa, T., Lederis, K., Kobayashi, H. (1984) Primary structures of multiple forms of urotensin II in the urophysis of the carp, *Cyprinus carpio*. *Gen Comp Endocrinol* **55**: 133-41.
- [3] McMaster, D., Lederis, K. (1983) Isolation and amino acid sequence of two urotensin II peptides from *Catostomus commersoni* urophyses. *Peptides* **4**: 367-73.
- [4] Conlon, J.M., O'Harte, F., Smith, D.D., Tonon, M.C., Vaudry, H. (1992) Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*. *Biochem Biophys Res Commun* **188**: 578-83.
- [5] Coulouarn, Y., Jégou, S., Tostivint, H., Vaudry, H., Lihmann, I. (1999) Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. *FEBS Lett.* **457**: 28-32.
- [6] Mori, M., Sugo, T., Abe, M., Shimomura, Y., Kurihara, M., Kitada, C., Kikuchi, K., Shintani, Y., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M. (1999) Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochem Biophys Res Commun.* **265**: 123-9.
- [7] Coulouarn, Y., Lihmann, I., Jegou, S., Anouar, Y., Tostivint, H., Beauvillain, J.C., Conlon, J.M., Bern, H.A., H., V. (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**: 15803-8.
- [8] Thiemann, J.: Dissertation Thesis, Freien Universität Berlin, 2006.
- [9] Kinney, W.A., Almond Jr, H.R., Qi, J., Smith, C.E., Santulli, R.J., de Garavilla, L., Andrade-Gordon, P., Cho, D.S., Everson, A.M., Feinstein, M.A., Leung, P.A., Maryanoff, B.E. (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.
- [10] Itoh, H., McMaster, D., Lederis, K. (1988) Functional receptors for fish neuropeptide urotensin II in major rat arteries. *Eur J Pharmacol.* **149**: 61-6.

- [11] 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.
- [12] 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**: 860-8.
- [13] Ames, S., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Willette, R.N., Aiyar, N.V., Romanic, A.M., Loudon, C.S., Foley, J.J., Sauermelch, C.F., Coatney, R.W., Ao, Z., Disa, J., Holmes, S.D., Stadel, J.M., Martin, J.D., Liu, W.S., Glover, G.I., Wilson, S., McNulty, D.E., Ellis, C.E., Elshourbagy, N.A., Shabon, U., Trill, J.J., Hay, D.W., Ohlstein, E.H., Bergsma, D.J., Douglas, S.A. (1999) Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* **401**: 282-6.
- [14] Bousette, N., Patel, L., Douglas, S.A., Ohlstein, E.H., Giaid, A. (2004) Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Atherosclerosis* **176**: 117-23.
- [15] Matsushita, M., Shichiri, M., Imai, T., Iwashina, M., Tanaka, H., Takasu, N., Hirata, Y. (2001) Co-expression of urotensin II and its receptor (GPR14) in human cardiovascular and renal tissues. *J Hypertens* **19**: 2185-90.
- [16] 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**: 1-5.
- [17] 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**: 810-1.
- [18] Zhang, Z., Henzel, W.J. (2004) Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites. *Protein Sci.* **13**: 2819-24.
- [19] Takahashi, K., Totsune, K., Murakami, O., Shibahara, S. (2001) Expression of urotensin II and urotensin II receptor mRNAs in various human tumor cell lines and secretion of urotensin II-like immunoreactivity by SW-13 adrenocortical carcinoma cells. *Peptides* **22**: 1175-9.

- [20] Seidah, N.G., Day, R., Marcinkiewicz, M., Chrétien, M. (1998) Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann N Y Acad Sci* **839**: 9-24.
- [21] Chartrel, N., Leprince, J., Dujardin, C., Chatenet, D., Tollemer, H., Baroncini, M., Balment, R.J., Beauvillain, J.C., Vaudry, H. (2004) Biochemical characterization and immunohistochemical localization of urotensin II in the human brainstem and spinal cord. *J Neurochem* **91**: 110-8.
- [22] Elshourbagy, N.A., Douglas, S.A., Shabon, U., Harrison, S., Duddy, G., Sechler, J.L., Ao, Z., Maleeff, B.E., Naselsky, D., Disa, J., Aiyar, N.V. (2002) Molecular and pharmacological characterization of genes encoding urotensin- II peptides and their cognate G-protein-coupled receptors from mouse and monkey. *Br J Pharmacol* **136**: 9-22.
- [23] Viereck, J.C., Beinfeld, M.C. (1992) Characterization of a cholecystokinin 8-generating endoprotease purified from rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* **267**: 19475-81.
- [24] Russell, F.D., 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.
- [25] Kurzawski, S.: Dissertation Thesis, Freie Universität Berlin, 2007.
- [26] Nothacker, H.P., Wang, Z., McNeill, A.M., Saito, Y., Merten, S., O'Dowd, B., Duckles, S.P., 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.
- [27] Boivin, S., Guilhaudis, L., Milazzo, I., Oulyadi, H., Davoust, D., Fournier, A. (2006) Characterization of urotensin-II receptor structural domains involved in the recognition of U-II, URP, and urantide. *Biochemistry* **45**: 5993-6002.
- [28] Douglas, S.A., Naselsky, D., Ao, Z., Disa, J., Herold, C.L., Lynch, F., Aiyar, N.V. (2004) Identification and pharmacological characterization of native, functional human urotensin-II receptors in rhabdomyosarcoma cell lines. *Br J Pharmacol* **142**: 921-32.

- [29] Qi, J.S., Minor, L.K., Smith, C., Hu, B., Yang, J., Andrade-Gordon, P., Damiano, B. (2005) Characterization of functional urotensin II receptors in human skeletal muscle myoblasts: comparison with angiotensin II receptors. *Peptides* **26**: 683-90.
- [30] Song, W., McDonald, J., Camarda, V., Calo, G., Guerrini, R., Marzola, E., Thompson, J.P., Rowbotham, D.J., Lambert, D.G. (2006) Cell and tissue responses of a range of Urotensin II analogs at cloned and native urotensin II receptors. Evidence for coupling promiscuity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **373**: 148-57.
- [31] Jegou, S., Cartier, D., Dubessy, C., Gonzalez, B.J., Chatenet, D., Tostivint, H., Scalbert, E., Leprince, J., Vaudry, H., Lihmann, I. (2006) Localization of the urotensin II receptor in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **495**: 21-6.
- [32] Maguire, J.J., Kuc, R.E., Kleinz, M.J., Davenport, A.P. (2008) Immunocytochemical localization of the urotensin-II receptor, UT, to rat and human tissues: relevance to function. *Peptides* **29**: 735-42.
- [33] Maryanoff, B.E., Kinney, W.A. (2010) Urotensin-II receptor modulators as potential drugs. *J Med Chem* **53**: 2695-708.
- [34] Clozel, M., Binkert, C., Birker-Robaczewska, M., Boukhadra, C., Ding, S.S., Fischli, W., Hess, P., Mathys, B., Morrison, K., Müller, C., Müller, C., Nayler, O., Qiu, C., Rey, M., Scherz, M.W., Velker, J., Weller, T., Xi, J.F., Ziltener, P. (2004) Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin System. *J Pharmacol Exp Ther* **311**: 204-12.
- [35] Clozel, M., Hess, P., Qiu, C., Ding, S.S., Rey, M. (2006) The urotensin-II receptor antagonist palosuran improves pancreatic and renal function in diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* **316**: 1115-21.
- [36] Sidharta, P.N., van Giersbergen, P.L., Dingemans, J. (2009) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the urotensin-II receptor antagonist palosuran in healthy male subjects. *J Clin Pharmacol* **49**: 1168-75.
- [37] Douglas, S.A., Dhanak, D., Johns, D.G. (2004) From "gills to pills": urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends Pharmacol Sci* **25**: 76-85.

- [38] Abdelrahman, A.M., Pang, C.C.Y. (2002) Involvement of the nitric oxide/L-arginine and sympathetic nervous systems on the vasodepressor action of human urotensin II in anesthetized rats. *Life Sci* **71**: 819-25.
- [39] Hillier, C., Berry, C., Petrie, M.C., O'Dwyer, P.J., Hamilton, C., Brown, A., McMurray, J. (2001) Effects of urotensin II in human arteries and veins of varying caliber. *Circ* **103**: 1378-81.
- [40] Stirrat, A., Gallagher, M., Douglas, S.A., Ohlstein, E.H., Berry, C., Kirk, A., Richardson, M., Maclean, M.R. (2001) Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**: H925-8.
- [41] Saetrum Opgaard, O., Nothacker, H., Ehlert, F.J., Krause, D.N. (2000) Human urotensin II mediates vasoconstriction via an increase in inositol phosphates. *Eur J Pharmacol*. **406**: 265-71.
- [42] 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 Rho-kinase. *Circ Res* **88**: 1102-4.
- [43] Maguire, J.J., Kuc, R.E., Davenport, A.P. (2000) Orphan-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1. *Br J Pharmacol* **131**: 441-6.
- [44] Bennett, R.T., Jones, R.D., Morice, A.H., Smith, C.F., Cowen, M.E. (2004) Vasoconstrictive effects of endothelin-1, endothelin-3, and urotensin II in isolated perfused human lungs and isolated human pulmonary arteries. *Thorax* **59**: 401-7.
- [45] MacLean, M.R., Alexander, D., Stirrat, A., Gallagher, M., Douglas, S.A., Ohlstein, E.H., 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**: 201-4.
- [46] Böhm, F., Pernow, J. (2002) Urotensin II evokes potent vasoconstriction in humans in vivo. *Br J Pharmacol* **135**: 25-7.
- [47] Affolter, J.T., Newby, D.E., Wilkinson, I.B., Winter, M.J., Balment, R.J., Webb, D.J. (2002) No effect on central or peripheral blood pressure of systemic urotensin II infusion in humans. *Br J Clin Pharmacol* **54**: 617-21.

- [48] Cheriyan, J., Burton, T.J., Bradley, T.J., Wallace, S.M., Mäki-Petäjä, K.M., Mackenzie, I.S., McEniery, C.M., Brown, J., Wilkinson, I.B. (2009) The effects of urotensin II and urantide on forearm blood flow and systemic haemodynamics in humans. *Br J Clin Pharmacol* **68**: 518-23.
- [49] Patacchini, R., Santicioli, P., Giuliani, S., Grieco, P., Novellino, E., Rovero, P., Maggi, C.A. (2003) Urantide: an ultrapotent urotensin II antagonist peptide in the rat aorta. *Br J Pharmacol* **140**: 1155-8.
- [50] Ng, L.L., Loke, I., O'Brien, R.J., Squire, I.B., Davies, J.E. (2002) Plasma urotensin in human systolic heart failure. *Circulation* **106**: 2877-80.
- [51] Richards, A.M., Nicholls, M.G., Lainchbury, J.G., Fisher, S., Yandle, T.G. (2002) Plasma urotensin II in heart failure. *Lancet* **360**: 545-6.
- [52] Russell, F.D., Meyers, D., Galbraith, A.J., Bett, N., Toth, I., Kearns, P., Molenaar, P. (2003) Elevated plasma levels of human urotensin-II immunoreactivity in congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**: H1576-81.
- [53] Cheung, B.M., Leung, R., Man, Y.B., Wong, L.Y. (2004) Plasma concentration of urotensin II is raised in hypertension. *J Hypertens* **22**: 1341-4.
- [54] Suguro, T., Watanabe, T., Ban, Y., Kodate, S., Misaki, A., Hirano, T., Miyazaki, A., Adachi, M. (2007) Increased human urotensin II levels are correlated with carotid atherosclerosis in essential hypertension. *Am J Hypertens* **20**: 211-17.
- [55] Hassan, G.S., Douglas, S.A., Ohlstein, E.H., Giaid, A. (2005) Expression of urotensin-II in human coronary atherosclerosis. *Peptides* **26**: 2464-72.
- [56] Maguire, J.J., Kuc, R.E., Wiley, K.E., Kleinz, M.J., Davenport, A.P. (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.
- [57] Douglas, S.A., Tayara, L., Ohlstein, E.H., Halawa, N., Giaid, A. (2002) Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet* **359**: 1990-7.
- [58] Khan, S.Q., Bhandari, S.S., Quinn, P., Davies, J.E., Ng, L.L. (2007) Urotensin II is raised in acute myocardial infarction and low levels predict risk of adverse clinical outcome in humans. *Int J Cardiol* **117**: 323-8.

- [59] Ravani, P., Tripepi, G., Pecchini, P., Mallamaci, F., Malberti, F., Zoccali, C. (2008) Urotensin II is an inverse predictor of death and fatal cardiovascular events in chronic kidney disease. *Kidney Int* **73**: 95-101.
- [60] Morley, B.J., Walport, M.J.: Complement Factsbook. Academic Press, London 1999.
- [61] Janeway, C.A., Travers, P., Walport, W.: Immunobiology. B&T 2005.
- [62] Drickamer, K. (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem* **263**: 9557-60.
- [63] Matsushita, M., Endo, Y., N., H., T. Fujita, T. (2001) Activation of the lectin complement pathway by ficolins. *Int Immunopharmacol* **1**: 359-63.
- [64] Thiel, S., Vorup-Jensen, T., Stover, C.M., Schwaebler, W., Laursen, S.B., Poulsen, K., Willis, A.C., Eggleton, P., Hansen, S., Holmskov, U., Reid, K.B., Jensenius, J.C. (1997) A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* **386**: 506-10.
- [65] Endo, Y., Takahashi, M., Nakao, M., Saiga, H., Sekine, H., Matsushita, M., Nonaka, M., Fujita, T. (1998) Two lineages of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP) in vertebrates. *J Immunol.* **161**: 4924-30.
- [66] Matsushita, M., Endo, Y., Nonaka, M., Fujita, T. (1998) Complement-related serine proteases in tunicates and vertebrates. *Curr Opin Immunol* **10**: 29-35.
- [67] Sato, T., Endo, Y., Matsushita, M., T. Fujita, T. (1994) Molecular characterization of a novel serine protease involved in activation of the complement system by mannose-binding protein. *Int Immunol* **6**: 665-9.
- [68] Dahl, M.R., Thiel, S., Matsushita, M., Fujita, T., Willis, A.C., Christensen, T., Vorup-Jensen, T., Jensenius, J.C. (2001) MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity* **15**: 127-35.
- [69] Pillemer, L., Blum, L., Lepow, I.H., Ross, O.A., Todd, E.W., Wardlaw, A.C. (1954) The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science* **120**: 279-85.
- [70] Male, D., Brostoff, J., Roth, D., Roitt, I.: Immunology 7th Edition. Elsevier 2006.

- [71] Pangburn, M.K., Schreiber, R.D., Müller-Eberhard, H.J. (1977) Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J Exp Med* **146**: 257-70.
- [72] Fujita, T., Gigli, I., Nussenzweig, V. (1978) Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator. *J Exp Med* **148**: 1044-51.
- [73] Law, S.K.A., Reid, K.B.M.: Complement. IRL Press Ltd, Oxford 1995.
- [74] Sim, R.B., Tsiftoglou, S.A. (2004) Proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* **32**: 21-7.
- [75] Terado, T., Nonaka, M.I., Nonaka, M., Kimura, H. (2002) Conservation of the modular structure of complement factor I through vertebrate evolution. *Dev Comp Immunol* **26**: 403-13.
- [76] Catterall, C.F., Lyons, A., Sim, R.B., Day, A.J., Harris, T.J. (1987) Characterization of primary amino acid sequence of human complement control protein factor I from an analysis of cDNA clones. *Biochem J* **242**: 849-56.
- [77] Tsiftoglou, S.A., Willis, A.C., Li, P., Chen, X., Mitchell, D.A., Rao, Z., Sim, R.B. (2005) The catalytically active serine protease domain of human complement factor I. *Biochemistry* **44**: 6239-49.
- [78] Wong, M.J., Goldberger, G., Isenman, D.E., Minta, J.O. (1995) Processing of human factor I in COS-1 cells co-transfected with factor I and paired basic amino acid cleaving enzyme (PACE) cDNA. *Mol Immunol* **32**: 379-87.
- [79] Davis, A.E.r., Harrison, R.A. (1982) Structural characterization of factor I mediated cleavage of the third component of complement. *Biochemistry* **21**: 5745-9.
- [80] Tsiftoglou, S.A., Sim, R.B. (2004) Human complement factor I does not require cofactors for cleavage of synthetic substrates. *J Immunol.* **173**: 367-75.
- [81] Ullman, C.G., Perkins, S.J. (1997) The Factor I and follistatin domain families: the return of a prodigal son. *Biochem J* **326**: 939-41.
- [82] Nilsson, S.C., Nita, I., Mansson, L., Groeneveld, T.W., Trouw, L.A., Villoutreix, B.O., Blom, A.M. (2009) Analysis of binding sites on complement factor I that are required for its activity. *J Biol Chem* **285**: 6235-45.

- [83] Chamberlain, D., Ullman, C.G., Perkins, S.J. (1998) Possible arrangement of the five domains in human complement factor I as determined by a combination of X-ray and neutron scattering and homology modeling. *Biochemistry* **37**: 13918-29.
- [84] Goldberger, G., Arnaout, M.A., Aden, D., Kay, R., Rits, M., Colten, H.R. (1984) Biosynthesis and postsynthetic processing of human C3b/C4b inactivator (factor I) in three hepatoma cell lines. *J Biol Chem* **259**: 6492-7.
- [85] Ritchie, G.E., Moffatt, B.E., Sim, R.B., Morgan, B.P., Dwek, R.A., Rudd, P.M. (2002) Glycosylation and the complement system. *Chem Rev* **102**: 305-19.
- [86] Tsiftoglou, S.A., Arnold, J.N., Roversi, P., Crispin, M.D., Radcliffe, C., Lea, S.M., Dwek, R.A., Rudd, P.M., Sim, R.B. (2006) Human complement factor I glycosylation: structural and functional characterisation of the N-linked oligosaccharides. *Biochim Biophys Acta*. **1764**: 1757-66.
- [87] Ponce-Castro, I.M., González-Rubio, C., Delgado-Cerviño, E.M., Abarategui-Garrido, C., Fontán, G., Sánchez-Corral, P., López-Trascasa, M. (2008) Molecular characterization of Complement Factor I deficiency in two Spanish families. *Mol Immunol* **45**: 2764-71.
- [88] Farhoudi, A., Bazargan, N., Pourpak, Z., Mahmoudi, M. (2003) Two related cases of primary complement deficiency. *Immunol Invest* **32**: 313-21.
- [89] Totan, M. (2002) Recurrent pneumococcal meningitis in homozygous C3 deficiency. *Indian J Pediatr* **69**: 625-6.
- [90] Richards, A., Buddles, M., Donne, R., Kaplan, B., Kirk, E., Venning, M., Tielemans, C., Goodship, J., Goodship, T.H. (2001) Factor H mutations in hemolytic uremic syndrome cluster in exons 18-20, a domain important for host cell recognition. *Am J Hum Genet* **68**: 485-90.
- [91] Scheiring, J., Rosales, A., Zimmerhackl, L.B. (2010) Clinical practice. Today's understanding of the haemolytic uraemic syndrome. *Eur J Pediatr*. **169**: 7-13.
- [92] Noris, M., Remuzzi, G. (2009) Atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* **361**: 1676-87.
- [93] Kavanagh, D., Richards, A., Noris, M., Hauhart, R., Liszewski, M.K., Karpman, D., Goodship, J.A., Fremeaux-Bacchi, V., Remuzzi, G., Goodship, T.H., Atkinson, J.P. (2008) Characterization of mutations in complement factor I (CFI) associated with hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol* **45**: 95-105.

- [94] Kavanagh, D., Kemp, E.J., Mayland, E., Winney, R.J., Duffield, J.S., Warwick, G., Richards, A., Ward, R., Goodship, J.A., Goodship, T.H. (2005) Mutations in complement factor I predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* **16**: 2150-5.
- [95] Nilsson, S.C., Trouw, L.A., Renault, N., Miteva, M.A., Genel, F., Zelazko, M., Marquart, H., Muller, K., Sjöholm, A.G., Truedsson, L., Villoutreix, B.O., Blom, A.M. (2009) Genetic, molecular and functional analyses of complement factor I deficiency. *Eur J Immunol* **39**: 310-23.
- [96] Sim, R.B., Day, A.J., Moffatt, B.E., Fontaine, M. (1993) Complement Factor I and Cofactors in Control of Complement System Convertase Enzymes. *Methods Enzymol.* **223**: 13-35.
- [97] Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- [98] Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell, J.S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**: 3551-67.
- [99] 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**: 1102-7.
- [100] Jain, E., Bairoch, A., Duvaud, S., Phan, I., Redaschi, N., Suzek, B., Martin, M.J., McGarvey, P., Gasteiger, E. (2009) Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinformatics* **10**: 136.
- [101] UniProt Consortium (2010) The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010. *Nucleic Acids Res.* **38**: D142-8.
- [102] Tietz, N.W.: Clinical guide to laboratory tests. Saunders, Philadelphia 1995.
- [103] Gressner, A.M., Arndt, T.: Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Band 1. Springer, Berlin 2006.
- [104] McAleer, M.A., Sim, R.B.: Activators and Inhibitors of Complement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1993.

- [105] Ahrends, R., Lichtner, B., Bertsch, A., Kohlbacher, O., Hildebrand, D., Trusch, M., Schlüter, H. (2010) Application of displacement chromatography for the proteome analysis of a human plasma protein fraction. *J Chromatogr A*. **1217**:3321-9.
- [106] Cohn, E.J., Oncley, J.L., Strong, L.E., Hughes, W.L., Armstrong, S.H. (1944) Chemical, clinical, and immunological studies on the products of human plasma fractionation. I. The characterization of the protein fractions of human plasma. *J Clin Invest*. **23**: 417-32.
- [107] Huang, E.C., Henion, J.D. (1990) LC/MS and LC/MS/MS Determination of Protein Tryptic Digests. *J Am Soc Mass Spectrom* **1**: 158-65.
- [108] Roepstorff, P., Fohlman, J. (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom*. **11**: 601.
- [109] http://www.matrixscience.com/help/interpretation_help.html#THRESHOLDS (2010).
- [110] Hortin, G.L., Sviridov, D., Anderson, N.L. (2008) High-abundance polypeptides of the human plasma proteome comprising the top 4 logs of polypeptide abundance. *Clin Chem* **54**: 1608-16.
- [111] Igarashi, Y., Heureux, E., Doctor, K.S., Talwar, P., Gramatikova, S., Gramatikoff, K., Zhang, Y., Blinov, M., Ibragimova, S.S., Boyd, S., Ratnikov, B., Cieplak, P., Godzik, A., Smith, J.W., Osterman, A.L., Eroshkin, A.M. (2009) PMAP: databases for analyzing proteolytic events and pathways. *Nucleic Acids Res*. **37**: D611-8.
- [112] Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. (2005): Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*. Ed. Walker, J.M., Humana Press.
- [113] Mole, J.E., Anderson, J.K., Davison, E.A., Woods, D.E. (1984) Complete primary structure for the zymogen of human complement factor B. *J Biol Chem* **259**: 3407-12.
- [114] Liu, T., Qian, W.J., Gritsenko, M.A., Camp, D.G., Monroe, M.E., Moore, R.J., Smith, R.D. (2005) Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry. *J Proteome Res*. **4**: 2070-80.

- [115] Tang, J., Yu, C.L., Williams, S.R., Springman, E., Jeffery, D., Sprengeler, P.A., Estevez, A., Sampang, J., Shrader, W., Spencer, J., Young, W., McGrath, M., Katz, B.A. (2005) Expression, crystallization, and three-dimensional structure of the catalytic domain of human plasma kallikrein. *J Biol Chem.* **280**: 41077-89.
- [116] Trouw, L.A., Seelen, M.A., Daha, M.R. (2003) Complement and renal disease. *Mol Immunol.* **40**: 125-34.
- [117] Fremeaux-Bacchi, V., Dragon-Durey, M.A., Blouin, J., Vigneau, C., Kuypers, D., Boudailliez, B., Loirat, C., Rondeau, E., Fridman, W.H. (2004) Complement factor I: a susceptibility gene for atypical haemolytic uraemic syndrome. *J Med Genet* **41**: e84.
- [118] Vyse, T.J., Morley, B.J., Bartok, I., Theodoridis, E.L., Davies, K.A., Webster, A.D., Walport, M.J. (1996) The molecular basis of hereditary complement factor I deficiency. *J Clin Invest.* **97**: 925-33.
- [119] González-Rubio, C., Ferreira-Cerdán, A., Ponce, I.M., Arpa, J., Fontán, G., López-Trascasa, M. (2001) Complement factor I deficiency associated with recurrent meningitis coinciding with menstruation. *Arch Neurol* **58**: 1923-8.
- [120] Trusch, M.: Freien Universität Berlin, 2007.
- [121] Heinis, C., Rutherford, T., Freund, S., Winter, G. (2009) Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides. *Nat Chem Biol* **5**: 502-7.
- [122] Law, S.K.A., Reid, K.B.M.: Complement: in Focus Series 2nd edn. IRL, Oxford 1995.
- [123] Ratnoff, O.D., J.E., C. (1955) A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. *J Clin Invest.* **34**: 602-13.
- [124] Gailani, D., Renné, T. (2007) The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? *J Thromb Haemost* **5**: 1106-12.
- [125] Fujikawa, K., Heimark, R.L., Kurachi, K., Davie, E.W. (1980) Activation of bovine factor XII (Hageman factor) by plasma kallikrein. *Biochemistry* **19**: 1322-30.
- [126] Renné, T., Pozgajová, M., Grüner, S., Schuh, K., Pauer, H.U., Burfeind, P., Gailani, D., Nieswandt, B. (2005) Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* **202**: 271-81.

- [127] Sainz, I.M., Pixley, R.A., Colman, R.W. (2007) Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. *Thromb Haemost* **98**: 77-83.
- [128] Sealey, J.E., Atlas, S.A., Laragh, J.H. (1978) Linking the kallikrein and renin systems via activation of inactive renin. New data and a hypothesis. *Am J Med* **65**: 994-1000.
- [129] Erdös, E.G., Yang, H.Y.T. (1967) An enzyme in microsomal fraction of kidney that inactivates bradykinin. *Life Sci* **6**: 569-74.
- [130] Saunders, R.E., Goodship, T.H., Zipfel, P.F., Perkins, S.J. (2006) An interactive web database of factor H-associated hemolytic uremic syndrome mutations: insights into the structural consequences of disease-associated mutations. *Hum Mutat* **27**: 21-30.
- [131] Soames, C.J., Sim, R.B. (1997) Interactions between human complement components factor H, factor I and C3b. *Biochem J* **326**: 553-61.
- [132] Renaux, J.L., Thomas, M., Crost, T., Loughraieb, N., Vantard, G. (1999) Activation of the kallikrein-kinin system in hemodialysis: role of membrane electronegativity, blood dilution, and pH. *Kidney Int* **55**: 1097-103.
- [133] Verresen, L., Fink, E., Lemke, H.D., Vanrenterghem, Y. (1994) Bradykinin is a mediator of anaphylactoid reactions during hemodialysis with AN69 membranes. *Kidney Int* **45**: 1497-503.
- [134] Tielemans, C., Madhoun, P., Lenaers, M., Schandene, L., Goldman, M., Vanherweghem, J.L. (1990) Anaphylactoid reactions during hemodialysis on AN69 membranes in patients receiving ACE inhibitors. *Kidney Int* **38**: 982-4.
- [135] Brenner, B.M., Cooper, M.E., de Zeeuw, D., Keane, W.F., Mitch, W.E., Parving, H.H., Remuzzi, G., Snapinn, S.M., Zhang, Z., Shahinfar, S. (2001) Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* **345**: 861-9.
- [136] Kon, V., Fogo, A., Ichikawa, I. (1993) Bradykinin causes selective efferent arteriolar dilation during ACE inhibition. *Kidney Int* **44**: 545-50.

- [137] Lewis, L.J., Hunsicker, L.G., Clarke, W.R., Berl, T., Pohl, M.A., Lewis, J.B., Ritz, E., Atkins, R.C., Rohde, R., Raz, I.f.t.C.S.G. (2001) Renoprotection effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* **345**: 851-60.
- [138] Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P.: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1999.
- [139] Hansen, T.K., Tarnow, L., Thiel, S., Steffensen, R., Stehouwer, C.D., Schalkwijk, C.G., Parving, H.H., Flyvbjerg, A. (2004) Association between mannose-binding lectin and vascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Care* **53**: 1570-6.
- [140] Pickup, J.C. (2004) Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* **27**: 813-23.
- [141] Garlick, R.L., Mazer, J.S., Chylack, L.T.J., Tung, W.H., Bunn, H.F. (1984) Nonenzymatic glycation of human lens crystallin. Effect of aging and diabetes mellitus. *J Clin Invest.* **74**: 1742-9.
- [142] Østergaard, J., Hansen, T.K., Thiel, S., Flyvbjerg, A. (2005) Complement activation and diabetic vascular complications. *Clin Chim Acta* **361**: 10-9.
- [143] Yatscoff, R.W., Tevaarwerk, G.J., MacDonald, J.C. (1984) Quantification of nonenzymically glycated albumin and total serum protein by affinity chromatography. *Clin Chem* **30**: 446-9.
- [144] Langham, R.G., Kelly, D.J., Gow, R.M., Zhang, Y., Dowling, J.K., Thomson, N.M., Gilbert, R.E. (2004) Increased expression of urotensin II and urotensin II receptor in human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* **44**: 826-31.
- [145] Vogt, L., Chiurchiu, C., Chadha-Boreham, H., Danaietash, P., Dingemans, J., Hadjadj, S., Krum, H., Navis, G., Neuhart, E., Parvanova, A., Ruggenenti, P., Woittiez, A.J., Zimlichman, R., Remuzzi, G., de Zeeuw, D. (2010) Effect of the Urotensin Receptor Antagonist Palosuran in Hypertensive Patients With Type 2 Diabetic Nephropathy. *Hypertension* **55**: 1206-9.
- [146] Jaffa, A.A., Durazo-Arvizu, R., Zheng, D., Lackland, D.T., Srikanth, S., Garvey, W.T., Schmaier, A.H. (2003) Plasma prekallikrein: a risk marker for hypertension and nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* **52**: 1215-21.

- [147] Zipser, R.D., Kerlin, P., Hoefs, J.C., Zia, P., Barg, A. (1981) Renal kallikrein excretion in alcoholic cirrhosis. Relationship to other vasoactive systems. *Am J Gastroenterol* **75**: 183-7.
- [148] Kouyoumdjian, M., Nagaoka, M.R., Borges, D.R. (2005) Kallikrein-kinin system in hepatic experimental models. *Peptides* **26**: 1301-7.
- [149] Toledo, C.F., Loureiro-Silva, M.R., Molina, H.M., Lanzoni, V.P., Kouyoumdjian, M., Borges, D.R. (1995) Plasma kallikrein clearance by the liver in experimental cirrhosis. *Rev Assoc Med Bras* **41**: 367-72.
- [150] Lukjan, H., Czokalo, M., Kiersnowska, B., Bielawiec, M. (1975) Studies of the plasma kinin-forming system in cirrhosis of the liver. *Acta Hepatogastroenterol* **22**: 89-92.
- [151] Cumming, A.D., Nimmo, G.R., Craig, K.J., McGilchrist, A., Hayes, P.C. (1992) Vasoactive effects of aprotinin. *Agents Actions Suppl* **38**: 211-8.
- [152] MacGilchrist, A., Craig, K.J., Hayes, P.C., Cumming, A.D. (1994) Effect of the serine protease inhibitor, aprotinin, on systemic haemodynamics and renal function in patients with hepatic cirrhosis and ascites. *Clin Sci (Lond)*. **87**: 329-35.
- [153] Heller, J., Schepke, M., Neef, M., Woitas, R., Rabe, C., Sauerbruch, T. (2002) Increased urotensin II plasma levels in patients with cirrhosis and portal hypertension. *J Hepatol* **37**: 767-72.
- [154] Kemp, W., Krum, H., Colman, J., Bailey, M., Yandle, T., Richards, M., Roberts, S. (2007) Urotensin II: a novel vasoactive mediator linked to chronic liver disease and portal hypertension. *Liver Int* **27**: 1232-9.
- [155] Barton, M., Yanagisawa, M. (2008) Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can J Physiol Pharmacol* **86**: 485-98.
- [156] Fyhrquist, F., Saijonmaa, O. (2008) Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* **264**: 224-36.
- [157] Skeggs, L.T., Kahn, J.R., Shumway, N.P. (1956) The preparation and function of the hypertensin converting enzyme. *J Exp Med* **103**: 295-9.
- [158] Rawlings, N.D., Morton, F.R., Kok, C.Y., Kong, J., A.J., B. (2008) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **36**: D320-5.

- [159] Bots, M., Medema, J.P. (2006) Granzymes at a glance. *J Cell Sci* **119**: 5011-4.
- [160] Gebhard, W., Schube, M., Eulitz, M. (1989) cDNA cloning and complete primary structure of the small, active subunit of human carboxypeptidase N (kininase 1). *Eur J Biochem* **178**: 603-7.
- [161] Bernstein, J.A., Qazi, M. (2010) Ecallantide: its pharmacology, pharmacokinetics, clinical efficacy and tolerability. *Expert Rev Clin Immunol* **6**: 29-39.
- [162] Williams, A., Baird, L.G. (2003) DX-88 and HAE: a developmental perspective. *Transfus Apher Sci* **29**: 255-8.
- [163] Kaplan, A.P., Joseph, K. (2010) The bradykinin-forming cascade and its role in hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol* **104**: 193-204.

6 Anhang

6.1 Chromatogramme und Tabellen

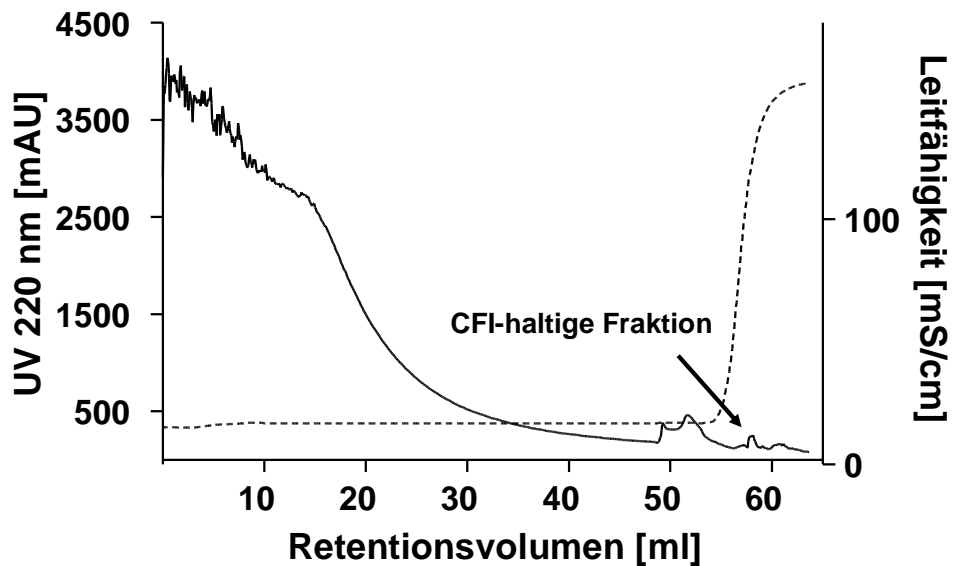


Abbildung 6.1: Chromatogramm der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie nach Reinigung aus humanem Plasma (erster Probenauftrag). Die durchgezogene Linie gibt den Verlauf der UV-Absorption bei 220 nm an, die gestrichelte Linie den Verlauf der Leitfähigkeit, die CFI-haltigen Eluatfraktionen sind durch den Pfeil gekennzeichnet.

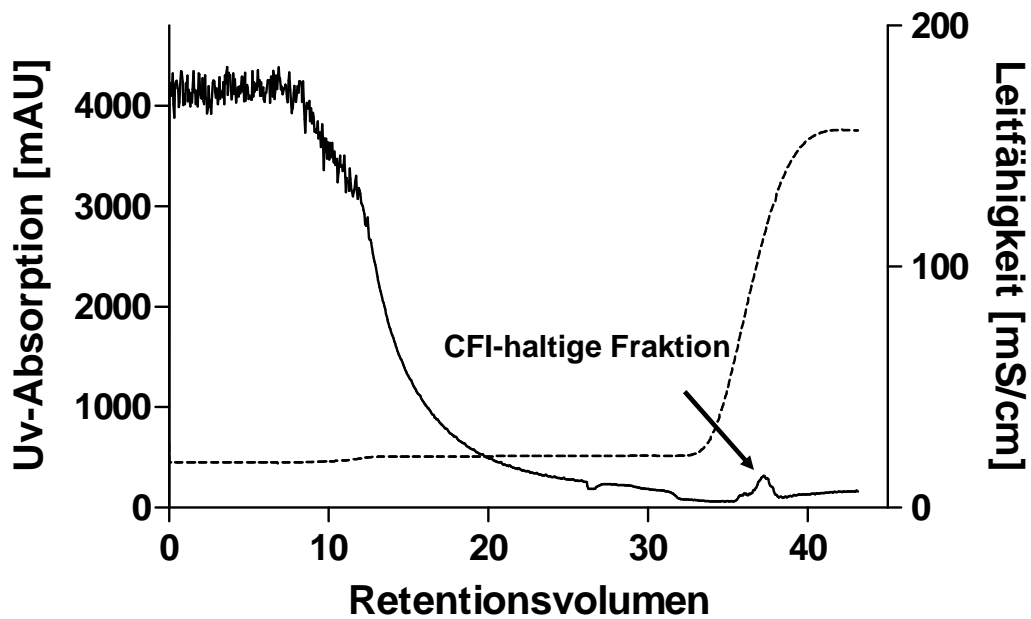


Abbildung 6.2: Chromatogramm der CFI-Antikörper-Affinitätschromatographie nach Reinigung aus der humanen Cohn-Fraktion IV-4 (erster Probenauftrag). Die durchgezogene Linie gibt den Verlauf der UV-Absorption bei 220 nm an, die gestrichelte Linie den Verlauf der Leitfähigkeit, die CFI-haltigen Eluatfraktionen sind durch den Pfeil gekennzeichnet.

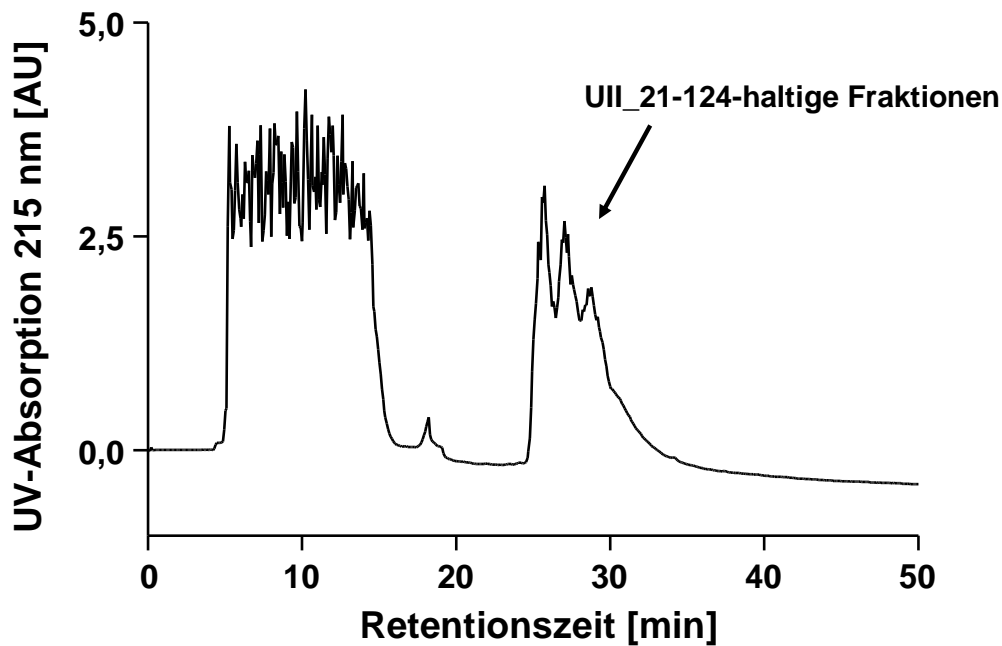


Abbildung 6.3: Chromatogramm der Reversed-Phase-Chromatographie zur Reinigung des Urotensin-Vorläufers UII_21-124 nach dessen Zyklisierung. Die durchgezogene Linie gibt den Verlauf der UV-Absorption bei 220 nm an.

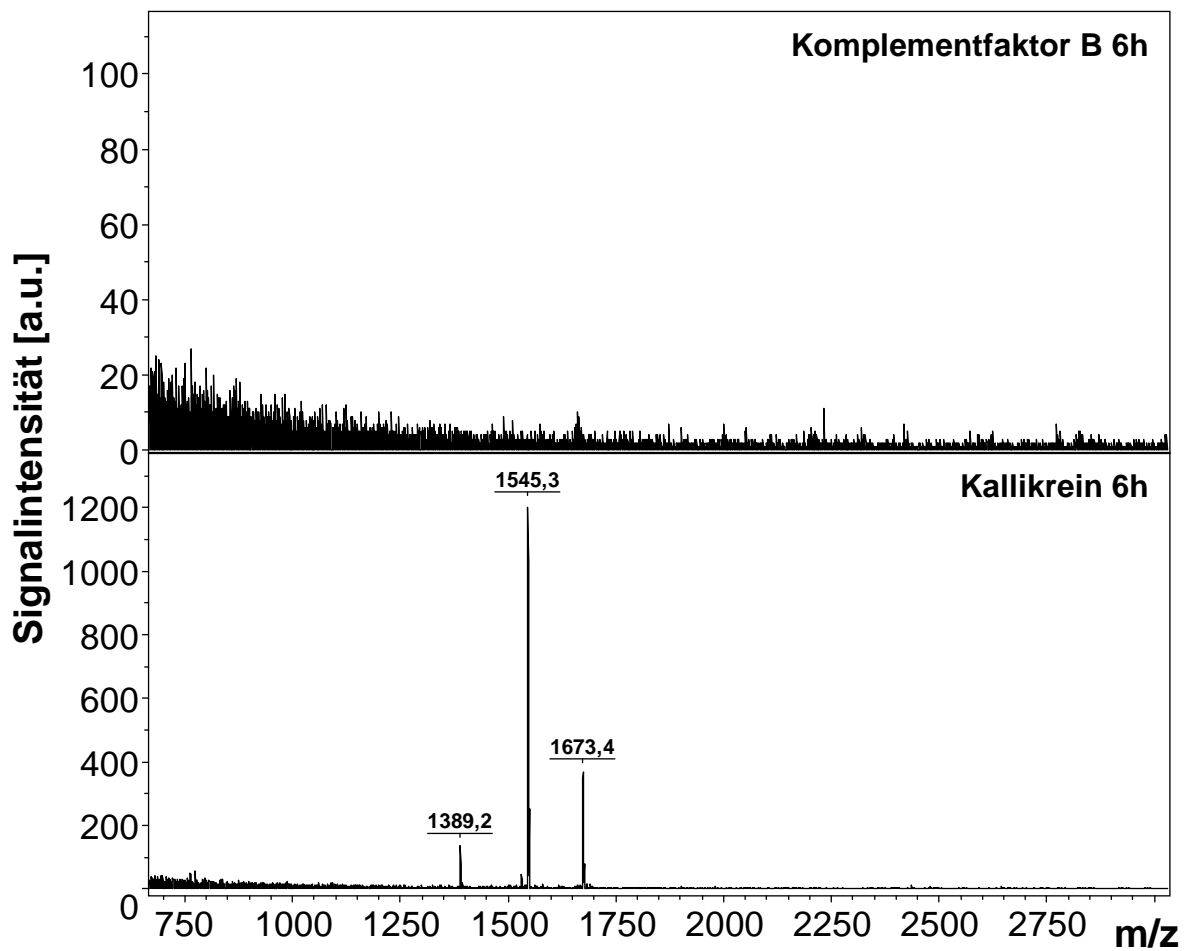


Abbildung 6.4: Inkubation von immobilisiertem Komplementfaktor B und Kallikrein mit dem Substrat Ull_105-124. Die Inkubation erfolgte mit $1 \cdot 10^{-4}$ M Substratlösung, die Messung der Reaktionsprodukte erfolgte nach definierten Inkubationszeiten mit MALDI-TOF-MS mit der Matrix DHB.

Anhang

Tabelle 6.1: Ergebnisse der Inkubation immobilisierter Plasmaproteine mit dem Substrat UII_21-124 nach 2 Stunden Inkubationszeit. Aufgetragen sind Signale, die im Massenspektrum der Inkubation von Plasmaproteinen mit dem Substrat deutlich unterschiedlich waren im Vergleich zur Kontrolle. Es ist der gemessene m/z-Wert angegeben, die jeweilige Signalintensität des Peaks sowie das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis (S/N), dazu die Sequenzen der Peptide, die diesen m/z-Werten zugeordnet werden konnten und die theoretische Masse (M) dieser Peptide.

m/z	Intensität	S/N	Mögliche Sequenz	Kürzel	Theoret. M
1956,8	489,7	20,6	DSREISFQLSAPHEDAR	UII_25-41	1956,9
3717,4	465,9	39,4	PNILLSHLLARIWKPYKKRETPDCFWKYCV	UII_95-124	3717,0
3773,4	92,2	8,1	-		

Tabelle 6.2: Ergebnisse der Inkubation immobilisierter Plasmaproteine mit dem Substrat UII_21-124 nach 20 Stunden Inkubationszeit. Der Inhalt dieser Tabelle entspricht dem von Tabelle 6.1.

m/z	Intensität	S/N	Mögliche Sequenz	Kürzel	Theoret. M
981,4	243,5	9,8	-		
1079,4	333,2	13,8	-		
1094,4	1418,3	59,8	-		
1136,4	231,6	10,1	-		
1207,5	2361,9	99,5	-		
1304,5	312,2	12,6	-		
1320,6	2103,7	84,5	-		
1406,6	212,4	8,7	-		
1616,7	195,8	6,9	-		
1672,6	392,3	13,5	-		
1730,7	227,4	8,1	-		
1770,7	616,0	20,6	PNILLSHLLARIWKP	UII_95-109	1770,1
1843,7	586,7	18,9	-		
1956,8	3847,3	139	DSREISFQLSAPHEDAR	UII_25-41	1956,9
2026,8	235,3	9,3	-		
2296,9	417,1	21,2	-		
2468,1	181,6	10,0	-		
2717,0	119,6	7,9	-		
2828,1	407,7	27,2	QLSAPHEDARLTPEELERASLLQIL	UII_32-56	2828,5
3222,2	125,3	12,0	LLDSREISFQLSAPHEDARLTPEELERA	UII_23-50	3221,6
3422,2	146,9	14,7	GAERGDILRKADSSTNIFNPRGNLRKFQDF	UII_61-90	3421,8
			LLDSREISFQLSAPHEDARLTPEELERASL	UII_23-52	3421,7
			LDSREISFQLSAPHEDARLTPEELERASLL	UII_24-53	3421,7

Anhang

m/z	Intensität	S/N	Mögliche Sequenz	Kürzel	Theoret. M
3518,2	65,3	7,1	LPL LDSREISFQLSAPHEDARLTPEELERAS	U11_20-51	3518,8
			PL LDSREISFQLSAPHEDARLTPEELERASL	U11_21-52	3518,8
3632,2	163,8	14,6	LPL LDSREISFQLSAPHEDARLTPEELERASL	U11_20-52	3631,9
			PL LDSREISFQLSAPHEDARLTPEELERASLL	U11_21-53	3631,9
			DARLTPEELERASLLQILPEMLGAERGDILRK	U11_39-70	36320
			RLTPEELERASLLQILPEMLGAERGDILRKAD	U11_41-72	36320
3715,3	180,8	17,3	-		
3876,5	50,3	7,5	RGDILRKADSSTNIFNPRGNLRKFQDFS GQDPNI	U11_64-97	3876,0

Tabelle 6.3: Ergebnisse der Inkubation von immobilisiertem Plasma-Kallikrein mit dem Substrat U11_21-124 nach 2 Stunden Inkubationszeit. Der Inhalt dieser Tabelle entspricht dem von Tabelle 6.1.

m/z	Intensität	S/N	Mögliche Sequenz	Kürzel	Theoret. M
1350,2	281,0	13,6	RKADSSTNIFNP	U11_69-80	1348,7
			KADSSTNIFNPR	U11_70-81	1348,7
			LLSHLLARIWK	U11_98-108	1348,8
1389,1	366,2	17,5	ETPDCFWKYCV	U11_114-124	1389,6
1545,2	2068,7	90,5	RETPDCFWKYCV	U11_113-124	1545,7
1673,2	555,8	23,9	KRETPDCFWKYCV	U11_112-124	1673,8
1725,4	473,8	21,0	FNPRGNLRKFQDFS	U11_78-91	1724,9
			ARLTPEELERASLLQ	U11_40-54	1724,9
1790,4	1460,4	66,9	STNIFNPRGNLRKFQ	U11_74-88	1791,0
2195,6	1395,5	86,3	DFSGQDPNILLSHLLARIW	U11_89-107	2194,2
			LTPEELERASLLQILPEML	U11_42-60	2194,2
			RASLLQILPEMLGAERGDIL	U11_49-68	2194,2
			ASLLQILPEMLGAERGDILR	U11_50-69	2194,2
			REISFQLSAPHEDARLTPE	U11_27-45	2195,1
2211,6	194,0	11,8	EDARLTPEELERASLLQIL	U11_38-56	2195,2
			TPEELERASLLQILPEMLGA	U11_43-62	2209,2
			LERASLLQILPEMLGAERGD	U11_47-66	2210,2
2299,6	1418,7	96,6	ERASLLQILPEMLGAERGDIL	U11_48-67	2210,2
			ILRKADSSTNIFNPRGNLRK	U11_67-86	2299,3

Anhang

Tabelle 6.4: Ergebnisse der Inkubation von immobilisiertem Plasma-Kallikrein mit dem Substrat UII_21-124 nach 6 Stunden Inkubationszeit. Der Inhalt dieser Tabelle entspricht dem von Tabelle 6.1.

m/z	Intensität	S/N	Mögliche Sequenz	Kürzel	Theoret. M
1350,6	496,3	26,7	RKADSSTNIFNP	UII_69-80	1348,7
			KADSSTNIFNPR	UII_70-81	1348,7
			LLSHLLARIWK	UII_98-108	1348,8
1389,4	819,4	44,1	ETPDCFWKYCV	UII_114-124	1389,6
1545,6	4324,3	214,3	RETPDCFWKYCV	UII_113-124	1545,7
1673,7	945,1	51,8	KRETPDCFWKYCV	UII_112-124	1673,8
1790,9	464,8	27,0	STNIFNPRGNLRKFQ	UII_74-88	1791,0
2196,3	139,8	10,5	DFSGQDPNILLSHLLARIW	UII_89-107	2194,2
			LTPEELERASLLQILPEML	UII_42-60	2194,2
			RASLLQILPEMLGAERGDIL	UII_49-68	2194,2
			ASLLQILPEMLGAERGDILR	UII_50-69	2194,2
			REISFQLSAPHEDARLTPE	UII_27-45	2195,1
			EDARLTPEELERASLLQIL	UII_38-56	2195,2
2300,3	349,2	27,2	ILRKADSSTNIFNPRGNLRK	UII_67-86	2299,3

Anhang

Tabelle 6.5: Ergebnisse der Inkubation von immobilisiertem Plasma-Kallikrein mit dem Substrat UII_21-124 nach 8 Stunden Inkubationszeit. Der Inhalt dieser Tabelle entspricht dem von Tabelle 6.1.

m/z	Intensität	S/N	Mögliche Sequenz	Kürzel	Theoret. M
1072,5	230,1	11,2	LPEMLGAERG	UII_56-65	1071,5
1247,9	375,1	18,0	PNILLSHLLAR	UII_95-105	1245,8
			IWKPYKKRE	UII_106-114	1246,7
1350,8	1846,3	82,3	RKADSSTNIFNP	UII_69-80	1348,7
			KADSSTNIFNPR	UII_70-81	1348,7
			LLSHLLARIWK	UII_98-108	1348,8
1389,7	859,4	35,8	ETPDCFWKYCV	UII_114-124	1389,6
1527,9	501,8	16,1	ILPEMLGAERGDIL	UII_55-68	1525,8
			RLTPEELERASLL	UII_41-53	1525,8
			REISFQLSAPHED	UII_27-39	1527,7
			EDARLTPEELERA	UII_38-50	1527,8
1545,9	6698,8	201,2	RETPDCFWKYCV	UII_113-124	1545,7
1561,9	465,9	13,2	ERGDILRKADSSTN	UII_63-76	1560,8
1674,0	1928,4	64,2	KRETPDCFWKYCV	UII_112-124	1673,8
1726,2	574,7	19,0	FNPRGNLRKFQDFS	UII_78-91	1724,9
			ARLTPEELERASLLQ	UII_40-54	1724,9
1791,2	1728,7	62,3	STNIFNPRGNLRKFQ	UII_74-88	1791,0
2172,4	272,7	11,7	DSREISFQLSAPHEDARLT	UII_25-43	2171,1
			ILRKADSSTNIFNPRGNLR	UII_67-85	2171,2
2196,5	2712,9	120,8	DFSGQDPNILLSHLLARIW	UII_89-107	2194,2
			LTPEELERASLLQILPEML	UII_42-60	2194,2
			RASLLQILPEMLGAERGDIL	UII_49-68	2194,2
			ASLLQILPEMLGAERGDILR	UII_50-69	2194,2
			REISFQLSAPHEDARLTPE	UII_27-45	2195,1
			EDARLTPEELERASLLQIL	UII_38-56	2195,2
2212,5	349,9	16,0	TPEELERASLLQILPEMLGA	UII_43-62	2209,2
			LERASLLQILPEMLGAERGD	UII_47-66	2210,2
			ERASLLQILPEMLGAERGDI	UII_48-67	2210,2
2285,5	416,2	19,5	SSTNIFNPRGNLRKFQDFS	UII_73-92	2284,1
			LDSREISFQLSAPHEDARLT	UII_24-43	2284,1
2300,6	7944,0	361,8	ILRKADSSTNIFNPRGNLRK	UII_67-86	2299,3
2367,6	301,3	13,4	-		
2453,7	214,0	12,3	ELERASLLQILPEMLGAERGDI	UII_46-67	2452,3
3363,4	414,7	36,0	TPEELERASLLQILPEMLGAERGDILRKAD	UII_43-72	3362,8

6.2 Gefahrstoffinformationen

Gefahrstoffsymbole:

E	Explosionsgefährlich	O	Brandfördernd
F+	Hochentzündlich	f	Leichtentzündlich
T+	Sehr giftig	T	Giftig
C	Ätzend	N	Umweltgefährlich
Xn	Gesundheitsschädlich	Xi	Reizend

Chemikalie	Gefahrstoffsymbol	R-Sätze	S-Sätze
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Xi	-	S 24/25
Acetonitril	F, Xn	R 11-20/21/22-36	S (1/2)-16-36/37
Ameisensäure	C	R 35	S (1/2)-23-26-45
AP Conjugate Substrate Kit	Xn, Xi	R 22-36	S 26-36-60
Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay Kit	C, F, T	R 11-23/24/25-34-39/23/24/25	S 24-26-35-37
Dithiothreitol (DTT)	Xn	R 20/21/22	-
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Xi	R 36	S (2)-26
Ethanolamin	C	R 20/21/22-34	S (1/2)-26-36/37/39-45
Magnesiumchlorid	Xi	R 36/37	-
Methanol	T, F	R 11-23/24/25-39/23/24/25	S (1/2)-7-16-36/37-45
Natriumphosphat	Xi	R 36/37/38	S 26
Pefabloc-SC / 4-(2-Aminoethyl)-benzonsulfonylfluorid	Xn	R 20/21/22	S 24/25-37/39
Kaleidoscope Prestained Protein Standard	Xn, Xi	R 20/22-36/37/38-42	S 60
Salzsäure 0,1 mol/l	C	R 34-37	S (1/2)-26-45
Transferpuffer	Xn, Xi	R 22-36	S 60
Trifluoressigsäure	C	R 20-35-52/53	S (1/2)-9-26-27-28-45-61
Tris-HCl	Xi	R 36/38	S 26
Trypsin	Xn	R 36/37/38-42	S 2-22-24-26-36/37-45
XT MES Running Buffer 20x	Xn, Xi	R 20/22-36/37/38-42	S 60
XT Reducing Agent	C, Xi	R 34-36/38	S 60
XT Sample Buffer 4x	Xn, Xi	R 22-36/38	S 60

6.3 Abkürzungsverzeichnis

a.u.	Absorptionseinheiten (Absorption Units)
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (Angiotensin Converting Enzyme)
ACN	Acetonitril
AP	Alkalische Phosphatase
Arg	Arginin
AS	Aminosäure(n)
bzw.	beziehungsweise
C1, C1q, C1r, C1s	Komplementkomponente C1 und ihre Untereinheiten
C3, C3a, C3b, C3i	Komplementkomponente C3 und ihre Spaltprodukte
C3b-R	Peptidisches C3b-Reaktionsprodukt
C3b-S	Peptidisches C3b-Substrat (Teilsequenz aus C3b)
C4, C4a, C4b	Komplementkomponente C4 und ihre Spaltprodukte
C5, C5a, C5b	Komplementkomponente C5 und ihre Spaltprodukte
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary DNA)
CFI	Komplementfaktor I
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation (Collision Induced Dissociation)
CNBr	Bromcyan
D501N	CFI-Mutante (Aminosäure 501 ausgetauscht)
DAC	Decay Acceleration Factor
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	und andere
FA	Ameisensäure
FB	Komplementfaktor B
FH	Komplementfaktor H
FIMAC-Domäne	Factor I Membrane Attack Complex Domain
HEK	Humane embryonale Nierenzellen (Human Embryonic Kidney)
HK	High-molecular-weight-Kininogen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
hUll	humanes Urotensin-II
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
IT	Ionenfalle (Ion Trap)
KKS	Kinin-Kallikrein-System
LC	Flüssigkeitschromatographie (Liquid Chromatography)
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie
LDLr-Domäne	Lowdensity Lipoprotein Receptor-Domäne
L-NAME	N-nitro-L-argininmethylester
Lys	Lysin
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis

Anhang

MAC	Membranangriffkomplex (Membrane Attack Complex)
MALDI	Matrix-assisted Laser-Desorption/Ionisation
MASP1, MASP2, MASP3	Mannose-assoziierte Serin-Protease 1, 2 bzw. 3
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MCP	Membrane Cofactor Protein
MES	Massenspektrometrie-basierter Enzymassay (Mass Spectrometry Assisted Enzyme Screening System)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
MS	Massenspektrometer/Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (Molecular Weight)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PC	Vorläufer-Konvertase (Precursor Convertase)
prepro-Ull	Urotensin-II-Vorläuferprotein (Precursor)
QQQ	Triple-Quadrupol
RAS	Renin-Angiotensin-System
RIA	Radioimmuno-Assay
S/N	Signal-zu-Rauschen-Verhältnis (Signal to Noise)
SP	Serinprotease(-domäne)
SRM	Selected Reaction Monitoring
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,1 % Tween 20
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	Totalionenstrom (Total Ion Current)
TOF	Flugzeit (Time of flight)
UCE	Urotensin-II-konvertierendes Enzym (Urotensin-II Converting Enzyme)
Ull	Urotensin-II
Ullc	hydrophobe Urotensin-II-Peptide
URP	Urotensin-related Peptide
UTR	Urotensin-II-Rezeptor
UTS	Genname des Urotensin-II-Gens
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp

7 Zusammenfassung

Die Ziele dieser Arbeit waren die Verifizierung der Urotensin-II-generierenden (UCE-) Aktivität des Komplementfaktor I (CFI), die Überprüfung deren physiologischer Relevanz sowie die Identifizierung möglicher inaktiver Vorläuferpeptide, die als physiologische Substrate dienen könnten. Innerhalb der Arbeit wurde zudem eine weitere Protease mit UCE-Aktivität, das Plasma-Kallikrein, identifiziert, auch diese Entdeckung wurde hinsichtlich ihrer physiologischen Relevanz hin untersucht.

Die UCE-Aktivität des CFI konnte in verschiedenen gereinigten Proteinfractionen gezeigt werden. Eine rekombinant exprimierte Mutante mit deutlich verringerter Aktivität gegenüber dem bekannten CFI-Substrat C3b zeigte auch gegenüber dem verwendeten Urotensin-Substrat eine deutlich niedrigere Aktivität, was die UCE-Aktivität des CFI *in vitro* untermauert. Auch das Plasma-Kallikrein zeigte eine deutliche UCE-Aktivität und zudem eine sehr schnelle Umsetzung des Substrats. Zur Überprüfung der physiologischen Relevanz wurden verschiedene Patientengruppen auf ihre UCE-Aktivität im Plasma untersucht, darunter CFI-defiziente Patienten, welche keine verringerte, sondern leicht erhöhte UCE-Aktivität aufwiesen. Das Plasma dialysepflichtiger Patienten zeigte nach der Dialyse erhöhte UCE- aber verringerte C3b-abbauende Aktivitäten. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass physiologisch neben dem CFI weitere Urotensin-II-generierende Proteasen wie beispielweise das Plasma-Kallikrein agieren und vermutlich den größeren Anteil an der UII-Generierung tragen. Der Anteil des Plasma-Kallikreins an der UII-Generierung im Plasma wurde über einen spezifischen Inhibitor getestet. Die UCE-Aktivität konnte in Anwesenheit dieses Inhibitors deutlich gesenkt werden, was für eine physiologische Relevanz der UCE-Aktivität des Plasma-Kallikreins spricht.

Des Weiteren konnte innerhalb dieser Arbeit ein 30 Aminosäuren langes Fragment des Urotensin-Vorläuferproteins als mögliches Vorläuferpeptid und Substrat für eine Urotensin-II-generierende Protease identifiziert werden. Sowohl der CFI als auch das Plasma-Kallikrein waren in der Lage, dieses Peptid ohne Cofaktoren zu Urotensin-II umzusetzen, wobei das Plasma-Kallikrein eine deutlich schnellere Kinetik aufwies.

Die gewonnenen Ergebnisse bestätigen die UCE-Aktivität des CFI *in vitro*, konnten jedoch keinen Aufschluss darüber geben, ob diese Aktivität auch von physiologischer Relevanz ist. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte UCE-Aktivität des Plasma-

Zusammenfassung

Kallikreins dagegen scheint auch physiologisch von Bedeutung. Damit gibt es neben den zwei bekannten Peptidhormon-Systemen, dem Kinin-Kallikrein-System und dem Renin-Angiotensin-System, eine weitere proteolytische Aktivität des Kallikreins, welche im Kontext der Blutdruckregulierung von Bedeutung ist.

8 Summary

The aims of this work were to validate the Urotensin-II converting (UCE-) activity of the complement factor I (CFI), to test the physiological relevance of this activity and to identify candidates for inactive precursor peptides that could serve as physiological substrates for the UCE. Within this work, a second protease with UCE activity, Plasma Kallikrein, was identified. This activity has subsequently also been evaluated towards its physiological relevance.

The UCE activity of CFI was shown in several protein fractions obtained by different purification strategies. A recombinantly expressed mutant with a decreased activity towards the well-known CFI substrate C3b also showed a decreased UCE activity which underlines the UCE activity of CFI *in vitro*. Plasma Kallikrein also showed a considerable UCE activity and furthermore a very fast turnover of the substrate. The blood plasma of several patient groups was tested towards their UCE activity, among them also patients with a functional CFI deficiency. CFI deficient patients did not show a decrease but a slight increase in their UCE activity. Plasma proteins of patients on hemodialysis showed an increase in their UCE activities after dialysis but a decrease in their C3b-degrading activities compared to the activities before hemodialysis. These results indicate that *in vivo* proteases other than CFI, e.g. Plasma Kallikrein, act as Urotensin-II generating proteases and might even be physiologically more important than the UCE activity of CFI. The contribution of Plasma Kallikrein to the generation of UII in plasma was tested using a specific inhibitor. In the presence of the inhibitor, the UCE activity was considerably reduced, indicating the physiological relevance of the UCE activity of Plasma Kallikrein.

Furthermore, within this work a 30 amino acid long fragment of the urotensin-II precursor protein was identified as a potential inactive precursor peptide and substrate for the Urotensin-II converting protease. Both CFI and Plasma Kallikrein were able to convert this peptide into Urotensin-II with Plasma Kallikrein showing a much faster kinetic.

The obtained results confirm the UCE activity of CFI *in vitro* but could not give an indication of its physiological relevance. In contrast, the newly identified UCE activity of Plasma Kallikrein seems to have a physiological relevance. Therefore an additional proteolytic activity of Plasma Kallikrein beside the two already known peptide hormone

Summary

systems, the Kinin-Kallikrein system and the Renin-Angiotensin system could be shown, being of vital importance in the regulation of blood pressure.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Maria Trusch
Geburtsdatum: 02.09.1983
Geburtsort: Berlin
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Beruflicher Werdegang

- 09/2008 – heute Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis Prof. Dr. Hartmut Schlüter, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Promotion mit dem Thema „Untersuchung der proteolytischen Prozessierung von humanen Urotensin-Peptiden“
- 09/2007 – 08/2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis Prof. Dr. Hartmut Schlüter, Charité - Universitätsmedizin Berlin
- 03/2007 Erteilung eines Lehrauftrags vom Fachbereich Chemie, Biologie, Pharmazie der Freien Universität Berlin zur Betreuung des Praktikums „Reinigung, Charakterisierung und Identifizierung regulatorischer Proteasen“ sowie zur Durchführung eines Teils der Vorlesung „Moderne Methoden der Bioanalytik“ für Biochemiker im Hauptstudium
- 01/2007 – 09/2007 Studentische Hilfskraft im Arbeitskreis von Prof. Dr. Hartmut Schlüter, Charité - Universitätsmedizin Berlin
- 04/2005 – 03/2007 Tutorin im Blockpraktikum Biochemie der Freien Universität Berlin, Blockteil Nukleinsäuren (betreut durch den Arbeitskreis von Prof. Dr. V. A. Erdmann)

Hochschulausbildung

2002 – 2007 Studium der Biochemie an der Freien Universität Berlin
Abschluss: Diplom Biochemie mit der Abschlussnote „sehr gut“ (1,0)
Diplomarbeit angefertigt in der AG Prof. Dr. Hartmut Schlüter,
Charité - Universitätsmedizin Berlin

Schulbildung

2000 – 2002 Rückert-Oberschule (Gymnasium), Berlin-Schöneberg
Abschluss: Abitur mit der Abschlussnote 1,6
Baccalauréat général en Scientifique (französisches Abitur mit dem Schwerpunkt der Naturwissenschaften) mit der Abschlussnote „très bien“ („sehr gut“, entspricht der Note 1,0)
1999 – 2000 Lycée François 1er, Le Havre, Frankreich
1995 – 1999 11. Gymnasium, Berlin-Marzahn
1990 – 1995 Marcana-Grundschule, Berlin-Marzahn

Praktika (Auszug)

07/2006 – 08/2006 Freie studentische Mitarbeit an der University of California, Irvine im Arbeitskreis von Prof. Dr. Bert L. Semler (Department of Microbiology and Molecular Genetics)
10/2004 – 12/2004 Freie studentische Mitarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in der AG PD Dr. Ulrike Nuber

Hamburg, 25. Juni 2010

Publikationen

Zeitschriftenbeiträge

Mass spectrometry for monitoring protease reactions.

Schlüter, H., Hildebrand, D., Gallin, C., Schulz, A., Thiemann, J., Trusch, M.

Anal Bioanal Chem. (2008) 392, 783-92. Review.

Application of displacement chromatography for the analysis of a lipid raft proteome.

Trusch, M., Böhlick, A., Hildebrand, D., Lichtner, B., Bertsch, A., Kohlbacher, O., Bachmann, S., Schlüter, H.

J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. (2010) 878, 309-14

Application of displacement chromatography for the proteome analysis of a human plasma protein fraction.

Ahrends, R., Lichtner, B., Bertsch, A., Kohlbacher, O., Hildebrand, D., Trusch, M., Schlüter, H.

J Chromatogr A. (2010) 1217, 3321-9.

Vorträge

Proteasen des menschlichen Genoms. Wo stehen wir?

Trusch, M.

Lise-Meitner-Kolloquium der Freien Universität Berlin, 8. Februar 2008, Berlin

From degradomes towards disease-associated proteases.

Trusch, M., Frochoux, V., Linscheid, M.W., Schlüter, H.

28th. *International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides*, 23. August 2008, Baden-Baden

Analysis of proteolytic activities by mass spectrometry.

Trusch, M.

Open-MS-Workshop, 26. Februar 2009, Berlin

Mass spectrometric measurement of protease activities with MALDI and ESI mass spectrometers.

Trusch, M., Hildebrand, D., Zhao, X. Linscheid, M.W., Schlüter, H.

43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 9. März 2010, Halle (Saale)

Application of selected reaction monitoring for the characterisation of the chromatographic separation of complex protein mixtures by liquid chromatography.

Trusch, M.

Bio-Mass-Spec-Net-North: Seminar on quantitative proteomics, 26. April 2010, Hamburg

Posterpräsentationen

From plasma peptides towards disease associated proteases.

Trusch, M., Frochoux, V., Zhao, X., Hildebrand, D., Schlüter, H.

Forschungstag des UKE, 6. September 2008, Hamburg

Mass spectrometry assisted enzyme screening (MES) with MALDI-MS & ESI-MS.

Trusch, M., Andrea Henze, A., Hildebrand, D., Kurzawski, S., Thiemann, J., Schlüter, H.

18th International Mass Spectrometry Conference, 30. August – 4. September 2009, Bremen

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die an der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Untersuchung der proteolytischen Prozessierung von humanen Urotensin-Peptiden

im Institut für Klinische Chemie, Abteilung Massenspektrometrische Proteomanalytik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hartmut Schlüter und der Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein für den Fachbereich Chemie ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner versichere ich, dass ich bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht und weder diese noch eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt habe.

Hamburg, Juni 2010

Maria Trusch

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Hartmut Schlüter für die Bereitstellung des überaus spannenden Themas, die intensive Betreuung und nicht zuletzt die freundliche und geduldige Unterstützung während der praktischen und theoretischen Arbeit an diesem Thema.

Ganz herzlich möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Dr. Christian Betzel für die Anfertigung des Zweitgutachtens danken.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. John Atkinson für das Bereitstellen der rekombinant exprimierten CFI-Fraktionen, Dr. Martin Tepel, Prof. Tim Goodship und Dr. Margerita López-Trascasa für die Plasmaproben der verschiedenen Patientengruppen, Prof. Leong Ng für die Quantifizierung des Urotensin-II und Sir Greg Winter für den Plasma-Kallikrein-Inhibitor.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für die beständige und liebevolle Unterstützung und insbesondere meiner Mutter Barbara Trusch, meiner Schwester Melanie Trusch und meinem Freund Marco Riedner für das fleißige Korrekturlesen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und meinen Freunden bedanken, insbesondere Simone Prömel und Diana Hildebrand, für die Unterstützung in allen biochemischen und nicht-biochemischen Lebenslagen.