

# **Proteolytische Prozessierung von Urotensin-II**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

**Doctor rerum naturalium**

**Dr. rer. nat.**

**eingereicht am**

**Fachbereich Chemie, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,**

**Universität Hamburg**

**Raphael Schuster**

**September 2021**

1. Gutachterin: Dr. Maria Riedner

2. Gutachter: Prof. Dr. Ralph Holl

Datum der Disputation: 03.12.2021

Datum der Druckfreigabe: 03.12.2021

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2015 bis September 2021 unter der Anleitung von Frau Dr. Maria Riedner und unter der Co-Betreuung von Herrn Prof. Dr. Sascha Rohn am Institut für Organische Chemie des Fachbereichs Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg verfasst.

## Publikationen

### Zeitschriftenbeiträge

M. Galchenko, R. Schuster, A. Black, M. Riedner, C. Klinke, Preparation of high-yield and ultra-pure Au<sub>25</sub> nanoclusters: towards their implementation in real-world applications, *Nanoscale*, 11, 1988-1994, **2019**.

A. Krutilin, S. Maier, R. Schuster, S. Kruber, M. Kwiatkowski, W. D. Robertson, N.-O. Hansen, R. J. D. Miller, H. Schlüter, Sampling of tissues with laser ablation for proteomics: Comparison of picosecond infrared laser and microsecond infrared laser, *Journal of Proteome Research*, 18, 1451-1457, **2019**.

S. Albers, B. Beckert, M. C. Matthies, C. S. Mandava, R. Schuster, C. Seuring, M. Riedner, S. Sanyal, A. E. Torda, D. N. Wilson, Z. Ignatova, Repurposing tRNAs for nonsense suppression, *Nature Communications*, 12, article number: 3850, **2021**.

### akzeptierte Zeitschriftenbeiträge

J. Wenzel, J. Lampe, H. Müller-Fielitz, R. Schuster, M. Zille, K. Müller, M. Krohn, Jakob Körbelin, L. Zhang, Ü. Özorhan, V. Neve, J. U. G. Wagner, D. Bojkova, M. Shumliakivska, Y. Jiang, A. Fähnrich, F. Ott, V. Sencio, C. Robil, S. Pfefferle, F. Sauve, C. Coelho, J. Franz, F. Spiecker, B. Lembrich, S. Binder, N. Feller, P. König, H. Busch, L. Collin, R. Villaseñor, O. Jöhren, H. C. Altmeppen, M. Pasparakis, S. Dimmeler, J. Cinatl, K. Püschel, M. Zelic, D. Ofengeim, C. Stadelmann, F. Trottein, R. Nogueiras, R. Hilgenfeld, M. Glatzel, V. Prevot, M. Schwaninger, The SARS-CoV-2 main protease Mpro causes microvascular brain pathology by cleaving NEMO in brain endothelial cells, *Nature Neuroscience*, **2021**.

### Zeitschriftenbeiträge in Revision

R. Schuster, P. Steffen, B. Dreyer, S. Rohn, H. Schlüter, M. Riedner, Identifying circulating urotensin II and urotensin II-related peptide generating enzymes in the human plasma fraction Cohn IV-4, *Journal of Proteome Research*, **2021**.

1 Zusammenfassung.....	1
2 Abstract .....	3
3 Einleitung.....	5
3.1 Urotensin-II und Urotensin-II-related peptide .....	5
3.2 Urotensin-II-Rezeptor .....	7
3.3 Biologische Funktion des U-II und URP .....	9
3.4 Proteolytische Prozessierung von U-II und URP .....	12
3.5 Plasma-Kallikrein als U-II- und URP-generierendes Enzym .....	15
4 Problemstellung .....	17
5 Material und Methoden .....	18
5.1 Chemikalien .....	18
5.2 Biomaterialien .....	19
5.3 Geräte und Materialien .....	19
5.4 Software und Datenbanken.....	21
5.5 Pufferlösungen .....	21
5.6 Zellaufschluss zur Generierung von Zellextrakten der Zelllinien HEK-293T, T98G und HeLa .....	21
5.7 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten.....	22
5.8 Massenspektrometrie-basierter Enzymassay zur Detektion proteolytischer Aktivitäten von Enzymen und Proteinfractionen.....	22
5.8.1 Immobilisierung von Enzymen und Proteinfractionen.....	23
5.8.1.1 Immobilisierung der Cohn-Fraktion IV-4 sowie von Sub-Fractionen der Cohn-Fraktion IV-4.....	23
5.8.1.2 Immobilisierung von Enzymen.....	24
5.8.1.3 Immobilisierung der Zellextrakte HEK-293T, T98G und HeLa sowie von Fractionen eines HEK-293T-Zellextraktes .....	24
5.8.2 Inkubation immobilisierter Enzyme und Proteinfractionen mit reaktionsspezifischen Peptidsubstraten .....	24

5.8.3 Inkubation immobilisierter Enzyme und Proteinfractionen mit UCE-S und URP-S in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren .....	25
5.9 Untersuchung der U-II/URP-generierenden Aktivität der Proprotein-Convertase 1 .....	25
5.10 Entsalzung von Inkubationslösungen .....	26
5.11 Fraktionierung der Cohn-Fraktion IV-4 zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen .....	26
5.12 Fraktionierung der Cohn-Fraktion IV-4 zur Identifizierung von URP-generierenden Enzymen .....	27
5.13 Fraktionierung eines HEK-293T-Zellextraktes zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen .....	28
5.14 Trypsinierung von Enzymen und Proteinfractionen.....	29
5.14.1 Trypsinierung von Sub-Fractionen der Cohn-Fraktion IV-4 zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen.....	29
5.14.2 Trypsinierung von Sub-Fractionen der Cohn-Fraktion IV-4 zur Identifizierung von URP-generierenden Enzymen.....	30
5.14.3 Trypsinierung von Sub-Fractionen eines HEK-293T-Zellextraktes zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen.....	30
5.14.4 Trypsinierung der Enzyme Koagulationsfaktor XIa, Koagulationsfaktor XIIa, Thrombin, Plasmin und Plasma-Kallikrein zur Reinheitsbestimmung.....	31
5.14.5 Entsalzung von Inkubationslösungen der Trypsinierungen mittels C18-Festphasenextraktion .....	31
5.15 MALDI-TOF-MS .....	32
5.16 LC-ESI-TOF-MS .....	32
5.17 LC-ESI-Orbitrap-MS.....	34
5.18 Datenprozessierung und Datenbankabgleich zur Proteinidentifizierung .....	38
6 Ergebnisse.....	39
6.1 Untersuchung der U-II-generierenden Aktivität innerhalb der Blutzirkulation anhand der Cohn-Fraktion IV-4.....	39
6.1.1 Proteolytische Prozessierung von U-II durch die Cohn-Fraktion IV-4 .....	39

6.1.2 Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 .....	42
6.1.2.1 Proteinidentifizierung in Sub-Fractionen der Cohn-Fraktion IV-4 mittels Trypsinierung und LC-MS/MS .....	44
6.1.3 Validierung potentieller U-II-generierender Enzyme .....	50
6.1.4 Physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins für die Bildung von U-II .....	59
6.1.5 Proteolytische Prozessierung von UCE-S durch den Koagulationsfaktor XIa .....	62
6.2 Untersuchung der URP-generierenden Aktivität innerhalb der Blutzirkulation anhand der Cohn-Fraktion IV-4.....	66
6.2.1 Proteolytische Prozessierung von URP durch die Cohn-Fraktion IV-4 .....	67
6.2.2 Anreicherung der URP-generierenden Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 und Identifizierung korrespondierender Enzyme .....	72
6.2.3 Validierung potentieller URP-generierender Enzyme .....	77
6.2.4 Physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins für die Bildung von URP .....	82
6.3 Untersuchung der intrazellulären U-II- und URP-generierenden Aktivität .....	85
6.3.1 Proteolytische Prozessierung von U-II und URP durch Zellextrakte der Zelllinien HEK- 293T, T98G und HeLa.....	85
6.3.2 Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität eines HEK-293T-Zellextraktes und Identifizierung korrespondierender Enzyme .....	91
6.3.4 Validierung potentieller intrazellulärer U-II- und URP-generierender Enzyme .....	96
7 Diskussion .....	102
8 Literaturliste .....	121
9 Anhang.....	133
9.1 LC-ESI-TOF-MS- und MALDI-TOF-MS-Spektren, Chromatogramme, relative Quantifizierung von U-II und Tabellen .....	133
9.2 Gefahrstoffinformationen .....	147
9.3 Informationen zum Umgang mit KMR-Substanzen.....	148
10 Danksagungen .....	149
11 Eidesstattliche Versicherung .....	150

## Abkürzungsverzeichnis

---

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym ( <i>angiotensin-converting enzyme</i> )
ACN	Acetonitril
AS	Aminosäure
BPC	Basispeakchromatogramm
C1INH	C1-Esterase-Inhibitor
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure ( <i>complementary DNA</i> )
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation ( <i>collision-induced dissociation</i> )
DDA	datenabhängige Messung ( <i>data dependent acquisition</i> )
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIC	extrahiertes Ionenchromatogramm
ESI	Elektrospray-Ionisation
GPR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
FA	Ameisensäure
FXIa	aktivierter Koagulationsfaktor XI
FXIIa	aktivierter Koagulationsfaktor XII
HCD	kollisionsinduzierte Dissoziation höherer Energie ( <i>higher-energy collisional dissociation</i> )
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IAA	Iodacetamid
IEX	Ionenaustauschchromatographie
LC	Flüssigkeitschromatographie
LIT	lineare Ionenfalle ( <i>linear ion trap</i> )
MALDI	Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisation
MeOH	Methanol
MES	Massenspektrometrie-basiertes Enzymscreening-System
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger RNA</i> )
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NCE	normalisierte Kollisionsenergie ( <i>normalized collision energy</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

PCSK1	Proprotein-Convertase 1
PCSK4	Proprotein-Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6
pre-pro-U-II	Urotensin-II-Vorläuferprotein
pre-pro-URP	Urotensin-II-related peptide-Vorläuferprotein
PPK	Plasma-pre-Kallikrein
PK	Plasma-Kallikrein
PSM	zugeordnete Peptidspektren ( <i>peptide spectra matches</i> )
U-II	Urotensin-II
URP	Urotensin-II-related peptide
UTR	Urotensin-II-Rezeptor
UTS2	Urotensin-II-Gen
UTS2B	Urotensin-II-related peptide-Gen
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung ( <i>relative centrifugal force</i> )
REM	rasche Augenbewegung ( <i>rapid eye movement</i> )
RP	Umkehrphase ( <i>reversed phase</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
SPE	Festphasenextraktion ( <i>solid phase extraction</i> )
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TIC	Totalionenstrom ( <i>total ion current</i> )
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Flugzeit ( <i>time of flight</i> )
Q	Quadrupol

---

## Aminosäuren

---

<b>Aminosäure</b>	<b>Drei-Buchstaben-Code</b>	<b>Ein-Buchstaben-Code</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

---

## 1 Zusammenfassung

Urotensin-II (U-II) und Urotensin-II-related peptide (URP) sind kurze, Cystein-verbrückte Peptidhormone mit starken vasoaktiven Eigenschaften,<sup>[1,2]</sup> die mit pathologischen Störungen wie Bluthochdruck und Herzinsuffizienz in Zusammenhang stehen.<sup>[3-6]</sup> Sie verfügen über eine identische, vollständig unter den Arten konservierte zyklische Struktur mit der Sequenz CFWKYCV, die für die Aktivierung des Urotensin-II-Rezeptors (UTR) und die biologische Aktivität essentiell ist.<sup>[7-10]</sup> Die proteolytische Prozessierung aus den Vorläufern pre-pro-U-II und pre-pro-URP ist bisher nicht vollständig untersucht. Die Serinprotease Plasma-Kallikrein (PK) wurde zuvor als ein U-II-generierendes Enzym identifiziert und seine physiologische Relevanz in Inhibitionsversuchen demonstriert, wobei eine Restaktivität verblieb, die auf bisher unbekannte U-II-generierende Enzyme hindeutet.<sup>[11]</sup> URP-generierende Enzyme sind bisher unbekannt. U-II- und URP-generierende Enzyme könnten – in Anlehnung an das Renin-Angiotensin-System – als potentielle Targets zur Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen fungieren, weshalb ihre Identifizierung von großer Bedeutung ist. Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der proteolytischen Prozessierung von U-II und URP in der Blutzirkulation. Neben der Validierung der physiologischen Relevanz des PK zur Generierung von U-II, sollten alternative U-II-generierende Enzyme identifiziert werden. Zudem sollten URP-generierende Enzyme identifiziert werden. Ein weiteres Ziel war die Untersuchung einer potentiellen intrazellulären U-II- und URP-generierenden Aktivität und die Identifizierung korrespondierender Enzyme. Zur Untersuchung der proteolytischen Prozessierung von U-II und URP wurde ein Massenspektrometrie-basierter Enzymassay verwendet. In diesem wurde die Umwandlung der Peptidsubstrate UCE-S und URP-S, die aus den 20 C-terminalen Aminosäuren des pre-pro-U-II bzw. pre-pro-URP bestehen, zu aktivem U-II bzw. URP mittels MALDI-TOF- und LC-ESI-TOF-MS erfasst. Hinsichtlich U-II wurde die U-II-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4, einer Blutplasmafraktion, validiert, die im Anschluss als biologisches Ausgangsmaterial zur Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität und Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen verwendet wurde. Die proteolytische Prozessierung der Schnittstelle KKR<sup>113</sup> im UCE-S fand C-terminal des Lysinrestes K<sup>111</sup>, des Lysinrestes K<sup>112</sup> und des Argininrestes R<sup>113</sup> statt und führte zur Bildung von U-II sowie den N-terminal verlängerten Formen U-II+R und U-II+RK. Die Cohn-Fraktion IV-4 wurde durch Anionenaustauschchromatographie fraktioniert und die U-II-generierende Aktivität der resultierenden Fraktionen wurde bestimmt. Es folgte die Proteinidentifikation der Fraktionen mit der höchsten Aktivität mittels Trypsinierung und LC-MS/MS. Neben PK wurden die Serinproteasen Plasmin, Thrombin, Serin Protease 58, Komplement C2, Koagulationsfaktor FIIa

(FXIIa) und Komplementfaktor B als Serinproteasen mit geeigneter Schnittspezifität identifiziert. Für Thrombin und FXIIa wurde eine U-II-generierende Aktivität detektiert, die jedoch gegenüber PK deutlich weniger ausgeprägt war. In einem Inhibitionsexperiment mit dem selektiven PK-Inhibitor PSKI-527<sup>[12]</sup> zeigte sich, dass PK zu einem großen Anteil für die U-II-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 verantwortlich war. Dies stellte ein weiteres Indiz für die physiologische Relevanz des PK dar. Über seine hohe Sequenzhomologie zum PK wurde der Koagulationsfaktor XIa (FXIa) als potentielles U-II-generierendes Enzym ermittelt. FXIa zeigte eine deutliche U-II-generierende Aktivität, wenn auch die kommerziell erworbene Protease zu einem Anteil von etwa 10% mit PK kontaminiert war. Im Falle der Untersuchung der proteolytischen Prozessierung des URP wurde eine URP-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 detektiert. Es fand eine proteolytische Prozessierung der Schnittstelle KR<sup>111</sup> C-terminal des Lysinrestes K<sup>110</sup> und des Argininrestes R<sup>111</sup> statt, die zur Bildung von URP und der N-terminal verlängerten Form URP+R führte. In einem Inhibitionsversuch konnte gezeigt werden, dass diese proteolytische Aktivität auf Serinproteasen zurückzuführen ist. Von den durch Fraktionierung der Cohn-Fraktion IV-4 sowie einer Proteinidentifizierung der aktivsten Fraktionen identifizierten Proteasen wurden – wie für U-II – das PK, Plasmin, Thrombin, FXIIa, FXIa und Komplementfaktor I auf ihre URP-generierende Aktivität hin untersucht. PK, Plasmin, FXIa, FXIIa und Thrombin wurden in diesem Zusammenhang als URP-generierende Enzyme identifiziert, von denen PK und FXIa die höchste Aktivität aufwiesen. Inhibitionsversuche mit dem selektiven PK-Inhibitor PSKI-527 zeigten, dass PK ebenfalls in hohem Maße für die URP-generierende Aktivität innerhalb der Cohn-Fraktion IV-4 verantwortlich war. Bei der Untersuchung einer potentiellen intrazellulären proteolytischen Prozessierung von U-II und URP wurde initial eine Generierung von U-II und URP durch Zellextrakte der Zelllinien HEK-293T, HeLa und T98G detektiert. Mithilfe von Inhibitionsversuchen konnten Serinproteasen als dafür verantwortliche Proteaseklasse identifiziert werden. Die Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität eines HEK-293T-Zellextraktes und die Identifizierung korrespondierender Enzyme ergab eine Liste von Proteasen, von denen Thrombin, der Hepatocyte growth factor activator und insbesondere die Proprotein-Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6 aufgrund ihrer Schnittspezifität geeignete Kandidaten darstellten. Für die Proprotein-Convertase 1, die stark homolog und kommerziell verfügbar ist, wurde eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige U-II und URP-generierende Aktivität detektiert, die jedoch deutlich weniger ausgeprägt als die von PK und FXIa war. Die durchgeführte Forschung lieferte wichtige Ergebnisse hinsichtlich der proteolytischen Prozessierung von U-II und URP in der Blutzirkulation sowie der intrazellulären U-II- und URP-generierenden Aktivität.

## 2 Abstract

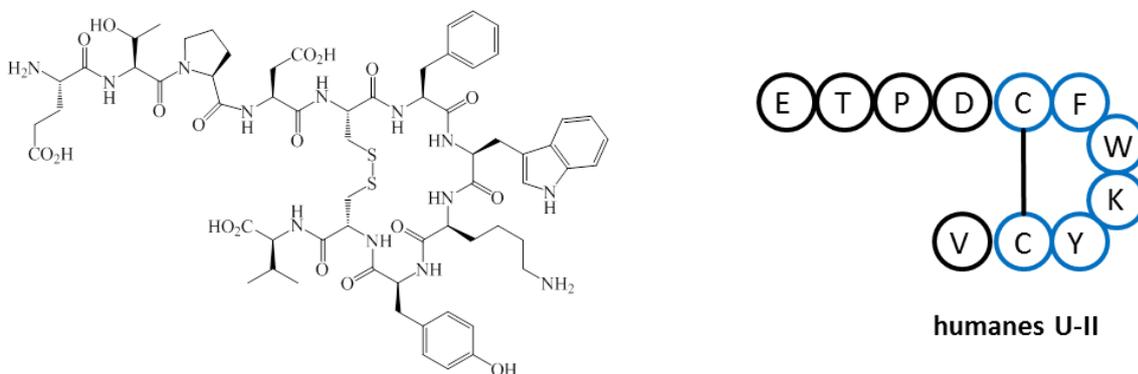
Urotensin-II (U-II) and Urotensin-II-related peptide (URP) are short, disulfide-bridged peptide hormones causing strong vasoactive action<sup>[1,2]</sup> which are correlated with pathological disorders like hypertension and heart failure.<sup>[3-6]</sup> U-II and URP contain an identical, fully conserved cyclic structure with the sequence CFWKYCV that is essential for activation of the Urotensin-II-receptor (UTR) and their biological activity.<sup>[7-10]</sup> The proteolytic processing from their precursors pre-pro-U-II and pre-pro-URP has not been fully investigated yet. The serine protease plasma kallikrein (PK) was identified as an U-II-generating enzyme before and its physiological relevance was demonstrated using inhibitions studies. A remaining U-II-generating activity in those experiments hinted towards other, yet unknown, U-II-generating enzymes.<sup>[11]</sup> URP-generating enzymes are still unknown. U-II- and URP-generating enzymes could – in similarity to the renin-angiotensin-system – function as targets for the treatment of cardiovascular diseases and therefore their identification is of great importance. One aim of this thesis was the investigation of the proteolytic processing of U-II and URP within blood circulation. Besides the validation of the physiological relevance of PK for the generation of U-II, alternative U-II-generating enzymes needed to be identified. Also, URP-generating enzymes were to be identified. One further aim of this thesis was the investigation of a potential intracellular U-II- and URP-generating activity and the identification of corresponding enzymes. For the investigation of U-II- and URP-generating activity, a mass spectrometry based enzyme assay was applied. Here, the conversion of the peptide substrates UCE-S and URP-S that consist of the 20 C-terminal amino acids of pre-pro-U-II and pre-pro-URP to active U-II and URP was monitored using MALDI-TOF- and LC-ESI-TOF-MS. Regarding U-II, the U-II generating activity of the blood plasma fraction Cohn-fraction IV-4 was validated which later served as biological source for the enrichment of U-II-generating activity and the identification of U-II-generating enzymes. The proteolytic processing of the cleavage site KKR<sup>113</sup> of UCE-S took place C-terminal to the lysine residue K<sup>111</sup>, the lysine residue K<sup>112</sup> and the arginine residue R<sup>113</sup> leading to the formation of U-II and the N-terminal elongated forms U-II+R and U-II+RK. The Cohn-fraction IV-4 was fractionated by anion-exchange chromatography and the U-II-generating activity of resulting fractions was determined. Then, protein identification of the fractions showing the highest activity via trypsination and LC-MS/MS was performed. Besides PK, the serine proteases plasmin, thrombin, serine protease 58, complement C2, coagulation factor XIIa (FXIIa), and complement factor B were identified as proteases with similar cleavage specificity. For thrombin and FXIIa, a U-II-generating activity was detected, although it was less pronounced compared to PK. An inhibition experiment using the selective PK-inhibitor PKSI-

527<sup>[12]</sup> showed that PK was to a high degree responsible for the U-II-generating activity within the Cohn-fraction IV-4 which is a further hint towards the physiological relevance of PK. Due to its high sequence homology compared to PK, the serine protease coagulation factor XIa (FXIa) was revealed as a potential U-II-generating enzyme. FXIa exhibited strong U-II-generating activity, however, the commercially obtained protease was contaminated by PK to a degree of approximately 10%. Regarding the investigation of the proteolytic processing of URP, a URP-generating activity of the Cohn-fraction IV-4 was detected. The proteolytic processing took place at the cleavage site KR<sup>111</sup> of URP-S, C-terminal to the lysine residue K<sup>110</sup> and the arginine residue R<sup>111</sup>, leading to the formation of URP and the N-terminal elongated form URP+R. In an inhibition experiment it was shown that serine proteases were responsible for the observed proteolytic activity. Further fractionation of the Cohn-fraction IV-4 and protein identification within the most active fractions revealed identified proteases out of which – like for U-II – PK, plasmin, thrombin, FXIa, FXIIa, and complement factor I were further investigated towards their URP-generating activity. In that context, PK, plasmin, FXIa, FXIIa, and thrombin were identified as URP-generating enzymes with PK and FXIa exhibiting the highest URP-generating activity. Inhibition studies using the selective PK-inhibitor PKSI-527 showed that PK also was to a high degree responsible for the URP-generating activity within the Cohn-fraction IV-4. The investigation of a potential intracellular proteolytic processing of U-II and URP revealed a U-II- and URP-generating activity for cell extracts of the cell lines HEK-293T, HeLa, and T98G. An enrichment of the U-II-generating activity of a cell extract of HEK-293T-cells and identification of corresponding enzymes resulted in a list of serine proteases containing thrombin, hepatocyte growth factor activator, and in particular proprotein convertase subtilisin/kexin type 6 with well suitable cleavage specificity. For the protease proprotein-convertase 1 that is strongly homologous and commercially available, a Ca<sup>2+</sup>-dependent U-II- and URP-generating activity was detected that was far less pronounced than that of PK and FXIa. The applied studies and experiments revealed important results regarding the proteolytic processing of U-II and URP in blood circulation as well as the intracellular U-II/URP generating activity.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Urotensin-II und Urotensin-II-related peptide

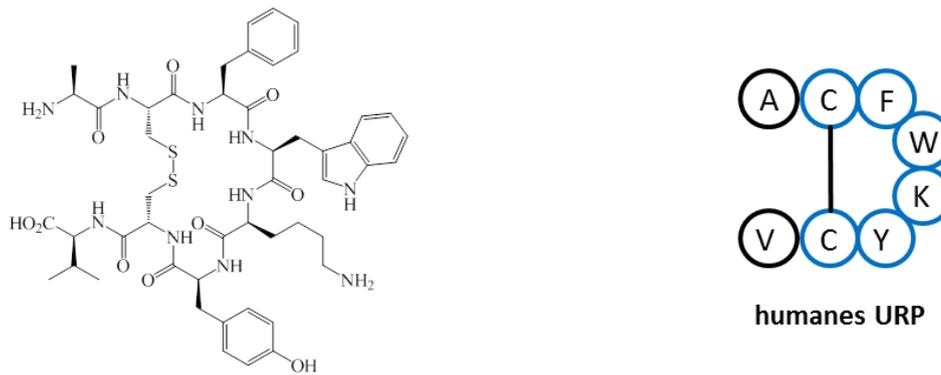
Urotensin-II (U-II) ist ein zyklisches, Disulfid-verbrücktes Peptidhormon, das über starke vasoaktive Eigenschaften verfügt.<sup>[1,2]</sup> Im Menschen kommt U-II hauptsächlich im kardiovaskulären und neurosekretorischen System, aber auch in peripheren Organen vor.<sup>[2,10]</sup> U-II wurde 1980 erstmals in der Urophyse, einem neurohemalen Organ des Knochenfisches, entdeckt.<sup>[1]</sup> Zuvor wurde bereits eine durch Extrakte der Urophyse in Fischen und Säugetieren induzierte pharmakologische Aktivität beobachtet.<sup>[13]</sup> Die Feststellung spezifischer Bindungsstellen für U-II des Gobyfisches in Ratten<sup>[14]</sup> sowie die Beobachtung durch U-II des Gobyfisches induzierter biologischer Aktivität, wie zum Beispiel der Kontraktion von Aortazellen der Ratte<sup>[15]</sup> und die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Aortazellen der Ratte,<sup>[16]</sup> legten eine biologische Bedeutung und das Vorkommen des U-II in Säugetieren nahe. Die Sequenz des humanen U-II wurde 1998 ermittelt, indem die cDNA des pre-pro-U-II des Frosches kloniert und zur Identifizierung der humanen pre-pro-U-II kodierenden cDNA verwendet wurde. Im Anschluss wurde U-II-mRNA durch Hybridisierungsstudien im menschlichen Gewebe detektiert und seine Verteilung in Geweben bestimmt.<sup>[10]</sup> Das aktive humane U-II wird vom UTS2-Gen kodiert und durch Proteolyse des Vorläufers pre-pro-U-II prozessiert.<sup>[10]</sup> Es besteht aus elf Aminosäuren und enthält ein über zwei Cysteinreste verbrücktes zyklisches Hexapeptid mit der Sequenz CFWKYC, das evolutionär unter allen bisher untersuchten Spezies vollständig konserviert ist.<sup>[9,10]</sup> Die Sequenz und Struktur des humanen U-II sind in Abbildung 1<sup>[9,10,17]</sup> dargestellt:



**Abbildung 1: Struktur und Sequenz des aktiven humanen U-II.** U-II weist die Sequenz ETPDCFWKYCV auf und enthält eine unter allen untersuchten Spezies vollständig konservierte zyklische, durch zwei Cysteinreste verbrückte, Struktur (blau).<sup>[9,10,17]</sup>

Die flankierenden Sequenzen des zyklischen Hexapeptids des aktiven U-II unterscheiden sich jedoch in unterschiedlichen Spezies in Länge und Beschaffenheit, sodass das humane U-II aus elf Aminosäuren,<sup>[10]</sup> U-II des Gobyfisches aus 12 Aminosäuren,<sup>[1]</sup> U-II des Frosches aus 13 Aminosäuren<sup>[18]</sup> und U-II der Ratte aus 14 Aminosäuren<sup>[19]</sup> bestehen. Die N-terminale Domäne der pro-Proteine, die sich an die jeweilige aktive Form des U-II anschließt, ist variabel. Das humane pre-pro-U-II weist gegenüber pre-pro-U-II des Frosches, der Ratte und der Maus Sequenzhomologien von 25%, 47% und 48% auf.<sup>[1][19]</sup> Das vollständig konservierte zyklische Hexapeptid ist für die Aktivierung des Urotensin-II-Rezeptors und die damit einhergehende biologische Aktivität essentiell.<sup>[7]</sup> U-II wurde als stärkster peptidischer Vasokonstriktor beschrieben<sup>[2]</sup> und steht unter anderem im Zusammenhang mit Bluthochdruck,<sup>[6]</sup> Arteriosklerose,<sup>[20]</sup> Herzinsuffizienz,<sup>[5]</sup> Diabetes<sup>[21]</sup> und Nephropathie.<sup>[22]</sup>

Bei dem Versuch der Isolierung von U-II aus einem Gehirnextrakt der Ratte wurde 2003 ein weiteres U-II-ähnliches Peptid, das als Urotensin-II-related peptide (URP) bezeichnet wurde, identifiziert. URP ist ebenfalls ein zyklisches, Disulfid-verbrücktes Peptidhormon, das aus acht Aminosäuren besteht und dessen mRNA-Verteilung der des U-II ähnlich ist. Es wird durch das UTS2B- bzw. URP-Gen kodiert und proteolytisch aus seinem Vorläufer pre-pro-URP prozessiert. Die aktive Form des URP enthält das zuvor beschriebene und für U-II vollständig konservierte zyklische Hexapeptid CFWKYCV.<sup>[8]</sup> Humanes U-II und URP unterscheiden sich in der Länge und in einem Alaninrest, der die zyklische Struktur N-terminal flankiert.<sup>[8,10]</sup> Die humanen Vorläufer pre-pro-U-II und pre-pro-URP haben eine geringe Sequenzhomologie von 18.8%.<sup>[8]</sup> Aktives URP sowie die dibasische Schnittstelle, die das aktive URP flankiert, liegen im Gegensatz zu U-II in den bisher untersuchten Spezies stark konserviert vor.<sup>[8,9]</sup> Der Vergleich der Sequenzen des jeweiligen pre-pro-URP zeigt eine Übereinstimmung des humanen pre-pro-URP von 54.2% mit pre-pro-URP der Ratte und von 47.5% mit pre-pro-URP der Maus.<sup>[8]</sup> URP führt zur Aktivierung des Urotensin-II-Rezeptors<sup>[8]</sup> und steht im Zusammenhang mit Bluthochdruck<sup>[4]</sup> und Herzinsuffizienz.<sup>[3]</sup> Die Struktur und Sequenz des humanen URP ist in Abbildung 2<sup>[8,9,17]</sup> dargestellt:

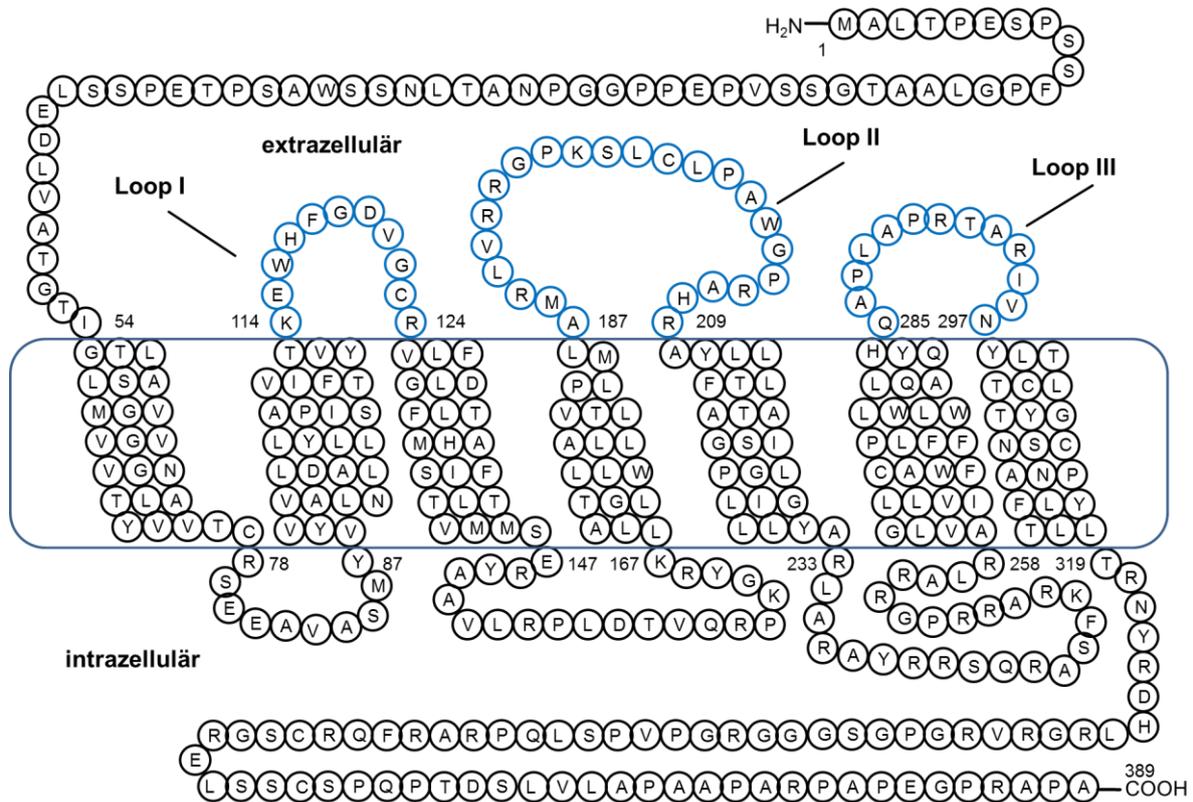


**Abbildung 2: Struktur und Sequenz des aktiven URP.** URP weist die Sequenz ACFWKYCV auf und enthält eine unter allen untersuchten Spezies vollständig konservierte zyklische, über zwei Cysteinreste verbrückte, Struktur (blau).<sup>[8,9,17]</sup>

### 3.2 Urotensin-II-Rezeptor

Durch Klonierung eines neu entdeckten Gens der Ratte wurde 1995 die Sequenz des G-Proteingekoppelten *Orphan Receptors* GPR14 entdeckt.<sup>[23,24]</sup> GPR14 wies eine hohe Übereinstimmung mit dem Somatostatin-Rezeptor auf, wobei die Gesamtsequenzhomologie 27% und die Sequenzhomologie der Transmembrandomänen 41% betrug.<sup>[24]</sup> U-II wurde 1999 als endogener Ligand des GPR14 identifiziert,<sup>[2,25–28]</sup> dessen Expression im zentralen Nervensystem, dem kardiovaskulären System und in peripheren Organen festgestellt wurde.<sup>[2,22,29–31]</sup> Neben U-II stellt auch das URP einen endogenen Liganden des GPR14 dar.<sup>[8]</sup> Der Urotensin-II-Rezeptor (UTR, GPR14) besteht aus 389 Aminosäuren und sein extrazellulärer N-Terminus ist über sieben Transmembrandomänen unter Ausbildung von drei extrazellulären Loops mit dem intrazellulären C-Terminus verbunden. Er verfügt über zwei innerhalb der Transmembrandomänen II und III befindlichen Cysteinreste an den Positionen 123 und 199, für die eine Disulfidbrücke postuliert wurde. Außerdem enthält der UTR zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen 31 und 35 im N-terminalen Bereich und 12 potentielle Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich.<sup>[2,24]</sup> Struktur-Funktions-Analysen zeigten, dass das zyklische Hexapeptid CFWKYCV und insbesondere die Aminosäuren W<sup>7</sup>, K<sup>8</sup> und Y<sup>9</sup> essentiell für die Erkennung und Aktivierung des UTR sind.<sup>[7,29]</sup> Hierbei wurde eine initiale Wechselwirkung zwischen dem Tyrosinrest Y<sup>9</sup> und dem Aspartatrest D<sup>130</sup> innerhalb der Transmembrandomäne III postuliert.<sup>[7]</sup> Die Teilsequenz DCFWKYCV (U-II<sub>4-11</sub>) wurde als minimale Sequenz mit voller biologischer Aktivität beschrieben.<sup>[7,32,33]</sup> Der Verlust des C-terminalen Valins hingegen führte zu einem sehr deutlichen Aktivitätsverlust. Für lineare U-II-Peptide wurde ebenfalls eine deutlich verringerte Aktivität gegenüber dem UTR beobachtet.<sup>[33]</sup> Weitere Bindungsstudien ergaben eine Interaktion von U-II und URP mit den extrazellulären

Loops II und III, nicht jedoch mit dem extrazellulären Loop I. Der UTR-Antagonist Urantide zeigte eine Bindungsaffinität gegenüber dem extrazellulären Loop II, aber nicht gegenüber dem extrazellulären Loop III. Dies impliziert eine Beteiligung des extrazellulären Loops III in der Signaltransduktion.<sup>[34]</sup> Eine schematische Abbildung des UTR ist in Abbildung 3<sup>[2,23,24,34]</sup> dargestellt:



**Abbildung 3: Schematische Abbildung des Urotensin-II-Rezeptors.** Der extrazelluläre N-Terminus ist über sieben Transmembrandomänen unter Ausbildung von drei extrazellulären Loops (blau) mit dem intrazellulären C-Terminus verbunden. Es wurde eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten an den Positionen 123 und 199 postuliert. Der UTR verfügt über zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen 31 und 35 im N-terminalen Bereich und 12 potentielle Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich<sup>[2,23,24]</sup> (adaptiert von S. Boivin et al.<sup>[34]</sup>).

Aufgrund der Korrelation von U-II und URP mit zahlreichen pathologischen Störungen und Krankheiten ist die Entwicklung von Antagonisten und Agonisten des UTR von großem Interesse. Das Peptidanalogue Urantide, das auf einem Grundgerüst der Aminosäuren 4-11 des humanen U-II nach Austausch der Aminosäuren C<sup>5</sup>, W<sup>7</sup> und K<sup>8</sup> besteht, wurde als starker und selektiver UTR-Antagonist beschrieben. Er führte zur Hemmung einer durch U-II induzierten Kontraktion einer isolierten Brusttaorta der Ratte.<sup>[35]</sup> Das Urocontrin A, ein weiterer peptidischer Antagonist, führte ebenfalls zur Hemmung der U-II-vermittelten Kontraktion einer Aorta der Ratte und des Affen, jedoch nicht zur Hemmung der entsprechenden URP-vermittelten Kontraktion. Dieser für

U-II und URP unterschiedliche Effekt legte einen allosterischen Inhibitionsmechanismus nahe.<sup>[36]</sup> Ein Beispiel eines nicht-peptidischen UTR-Antagonisten stellt das Palosuran dar. Für Palosuran wurde eine hohe Bindungsaffinität gegenüber dem UTR im nanomolaren Bereich festgestellt. In *in vivo*-Experimenten führte es nach intravenöser Verabreichung zu einer reduzierten glomerulären und tubulären Störung und zu reduziertem Nierenschaden als Folge einer renalen Ischämie.<sup>[37]</sup> In einer klinischen Studie am Menschen wurden Patienten mit Diabetes mit Palosuran behandelt, jedoch konnte keine Veränderung relevanter klinischer Parameter wie der glomerulären Flussrate oder des renalen Blutflusses festgestellt werden.<sup>[38]</sup> Neben gemeinsamen biologischen Aktivitäten wurden ebenfalls unterschiedliche biologische Effekte von U-II und URP beschrieben. U-II und URP schienen demnach eine funktionelle Selektivität aufzuweisen.<sup>[36,39–41]</sup> N-Methylierungs-Studien implizierten, dass die Interaktion von U-II und URP mit dem UTR zu unterschiedlichen Übergangszuständen des UTR führten.<sup>[42]</sup>

### 3.3 Biologische Funktion des U-II und URP

Sowohl U-II als auch URP verfügen über starke vasoaktive Eigenschaften und U-II wurde als stärkster bisher bekannter peptidischer Vasokonstriktor beschrieben. Die Aktivierung des UTR durch U-II oder URP resultiert in einer Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.<sup>[2,8]</sup> In diesem Zusammenhang wurde eine initiierte, Phospholipase C-abhängige Erhöhung der Inositoltriphosphat-Konzentration beschrieben,<sup>[43]</sup> die in der Folge zur Aktivierung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors, einem Calcium-Kanal, und zur Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytoplasma führt.<sup>[44]</sup> Alternativ wurde die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Neuronen des Rückenmarks der Ratte über den Protein-Kinase A-Signalweg beschrieben.<sup>[45]</sup> Die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Konzentration wurde ebenfalls im Zusammenhang mit einer Aktivierung der GTPase Rho und der Rho-Kinase beschrieben, die nachfolgend zur Kontraktion der glatten Muskelzellen führten.<sup>[46]</sup> Die Vasoaktivität des U-II zeigte eine starke Variabilität und war sowohl vom vaskulären Bett<sup>[47]</sup> als auch der untersuchten Spezies abhängig.<sup>[48]</sup> Humanes U-II führte in der Ratte zur Kontraktion der Brustarterie, nicht jedoch zur Kontraktion der abdominalen Aorta oder von femoralen und renalen Arterien. In nicht-humanen Primaten wurde dagegen eine Kontraktion aller untersuchten isolierten arteriellen Gefäße festgestellt. In *in vivo*-Experimenten wurden nach systemischer Verabreichung von humanem U-II in nicht-humanen Primaten dosisabhängige vasoaktive Effekte beobachtet, die schließlich in einem fatalen Kreislaufzusammenbruch resultierten.<sup>[2]</sup> Auch die Untersuchung der vasoaktiven Effekte des U-II in humanen Arterien ergab unterschiedliche Ergebnisse. Während U-II in vom Endothel befreiten Koronararterien, Speichenarterien sowie Brustarterien eine Vasokonstriktion bewirkte,<sup>[31]</sup> wurde in einer weiteren

Studie keine vasokonstriktorische Wirkung des U-II auf Arterien und Venen unterschiedlicher Größe festgestellt.<sup>[49]</sup> Im Gegensatz dazu wurde für kleine pulmonale Arterien eine U-II-induzierte Vasodilation beschrieben.<sup>[50]</sup> Es wurde zudem eine Abhängigkeit der Vasoaktivität vom Arterienradius beschrieben,<sup>[51]</sup> da für Arterien mit einem Durchmesser von weniger als 0.07 mm eine Vasodilation,<sup>[52]</sup> für Arterien mit einem Durchmesser von 0.07 - 0.25 mm Durchmesser eine milde Vasodilation<sup>[50]</sup> und für Arterien mit einem Durchmesser von mehr als 0.25 mm keine Effekte beobachtet wurden.<sup>[53]</sup> Mechanistisch ist die Vasodilation auf eine Aktivierung des UTR im Endothel und die daraus resultierende Freisetzung von NO sowie des Endothel-generierten hyperpolarisierenden Faktors zurückzuführen.<sup>[54]</sup> URP verfügte je nach vaskulärem Bett ebenfalls über eine vasokonstriktorische bzw. vasodilatorische Wirkung.<sup>[55,56]</sup> Es wurde eine URP-induzierte Vasokonstriktion in der Aorta der Ratte<sup>[56]</sup> und eine Vasodilation in der Koronararterie der Ratte festgestellt.<sup>[55]</sup> Die vasoaktiven Effekte des URP waren gegenüber U-II, trotz einer leicht erhöhten Bindungsaffinität des URP gegenüber dem UTR,<sup>[8,34]</sup> weniger stark ausgeprägt.<sup>[9,55,56]</sup> Bei *in vivo*-Experimenten am Menschen wurde die hämodynamische Antwort nach Injektion von U-II in die Brachialarterie untersucht. Hierbei wurde eine dosisabhängige Reduzierung des Blutflusses im Unterarm festgestellt, jedoch keine systemischen Effekte.<sup>[57]</sup> In einer weiteren Studie wurde nach Injektion von U-II gar keine Veränderung hämodynamischer Parameter festgestellt.<sup>[58]</sup> Auch in einer späteren Untersuchung des Effektes von U-II und des UTR-Antagonisten Urantide nach Injektion in die Brachialarterie wurde ein reduzierter Blutfluss des Unterarms nicht bestätigt und entsprechend keine Vasokonstriktion festgestellt. Es wurde ein erhöhter systolischer und durchschnittlicher arterieller Blutdruck beobachtet, jedoch sowohl nach Injektion von U-II als auch nach Injektion von Urantide, sodass der Effekt scheinbar nicht durch U-II induziert wurde.<sup>[59]</sup>

U-II und URP stehen zudem im Zusammenhang mit unterschiedlichen Krankheiten und pathologischen Störungen. In hypertensiven Ratten wurde eine erhöhte mRNA-Expression von U-II, URP und des UTR im Herz und der Aorta festgestellt.<sup>[4]</sup> Zusätzlich wurden in Patienten mit Bluthochdruck erhöhte U-II-Plasmakonzentrationen beobachtet.<sup>[6]</sup> In einer Untersuchung des Effektes von U-II auf den Gefäßtonus im Unterarm von gesunden und an Bluthochdruck erkrankten Patienten wurden vasodilatorische Effekte in den gesunden und vasokonstriktorische Effekte in den Patienten mit Bluthochdruck beschrieben.<sup>[60]</sup> In Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz wurde gegenüber gesunden Menschen eine erhöhte Plasmakonzentration des U-II festgestellt.<sup>[5]</sup> Die Untersuchung des Einflusses des U-II auf den Gefäßtonus ergab vasodilatorische Effekte in gesunden Menschen und vasokonstriktorische Effekte in Patienten

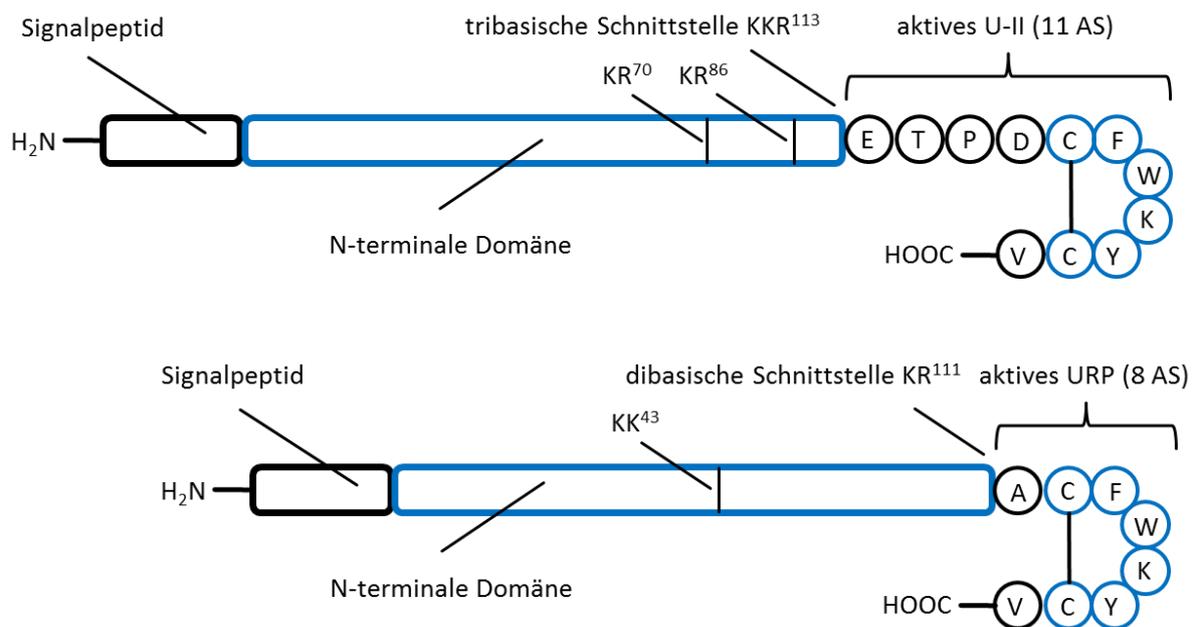
mit kongestiver Herzinsuffizienz.<sup>[61]</sup> Für URP wurde eine erhöhte mRNA-Expression im Herz von Ratten mit kongestiver Herzinsuffizienz detektiert.<sup>[3]</sup> In einer späteren Studie wurden durch eine differentielle Extraktion von U-II und URP erhöhte Plasmakonzentrationen von sowohl U-II als auch URP in Patienten mit Herzinsuffizienz festgestellt.<sup>[62]</sup> In Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie wurden signifikant erhöhte Serumlevel von U-II detektiert.<sup>[63]</sup> U-II steht ebenfalls im Zusammenhang mit Arteriosklerose. Es wurde eine erhöhte mRNA-Expression von U-II und des UTR in der Halsschlagader und der Aorta und eine erhöhte mRNA-Expression des U-II in der Koronararterie von Patienten mit Arteriosklerose festgestellt. Beide Studien implizieren eine pathophysiologische Bedeutung des U-II an der Arteriosklerose.<sup>[20,64]</sup> In einer späteren Studie wurden nach Verabreichung des UTR-Antagonisten SB657510 oder Deletion des U-II-Gens in arteriosklerotischen Mäusen mildernde Effekte, wie zum Beispiel eine verringerte Zytokinkonzentration im Plasma, ein reduzierter Blutdruck und eine erhöhte Glukosetoleranz, beschrieben.<sup>[65]</sup> In einer Untersuchung in Ratten wurde für den UTR-Antagonisten Urantide eine protektive Wirkung zum Schutz gegen Arteriosklerose beschrieben.<sup>[66]</sup> Urantide führte zu einer Verbesserung von Arteriosklerose-bezogenen Verletzungen, die über den JAK/STAT3-Signalweg vermittelt war.<sup>[67]</sup> Zudem bewirkte Urantide eine Linderung von Herzschäden in arteriosklerotischen Ratten über den MAPK-Signalweg.<sup>[68]</sup> Eine erhöhte Plasmakonzentration des U-II wurde ebenfalls in Patienten mit Diabetes<sup>[21,69,70]</sup> und in japanischen Patienten mit dem Einzelbasenaustausch S89N im UTS2-Gen festgestellt.<sup>[71]</sup> Dieser Einzelbasenaustausch schien zudem die Wahrscheinlichkeit der Erkrankung an Typ-2-Diabetes mellitus zu erhöhen.<sup>[72,73]</sup> Auch Patienten mit diabetischer Nephropathie verfügten über eine stark erhöhte mRNA-Expression von U-II und des UTR<sup>[74]</sup> und in Patienten mit Nierenschaden wurde eine erhöhte Plasmakonzentration des U-II festgestellt.<sup>[22]</sup> Dabei war die Plasmakonzentration des U-II in Patienten mit Dialyse weiter erhöht.<sup>[22]</sup> Diese Studien implizieren eine Rolle des U-II in der Pathogenese der diabetischen Nephropathie bzw. als Regulator im renalen System.<sup>[22,74]</sup> Trotz der beschriebenen erhöhten U-II-Konzentration und erhöhten Expression von U-II-mRNA in zahlreichen kardiovaskulären Störungen wurde auch eine kardioprotektive Wirkung des U-II als Ursache der erhöhten U-II-Konzentration bzw. Expression diskutiert.<sup>[17]</sup> In diesem Zusammenhang wurden erhöhte Plasmakonzentrationen des U-II in Patienten mit akutem Myokardialinfarkt festgestellt. Die erhöhte Plasmakonzentration des U-II korrelierte dabei mit einer erhöhten Überlebensrate.<sup>[75]</sup> Auch für Patienten mit Nierenschaden im Endstadium wurde eine kardioprotektive Wirkung des U-II diskutiert.<sup>[76]</sup>

Neben den vasoaktiven Eigenschaften und beschriebenen Korrelationen mit kardiovaskulären Störungen impliziert die vermehrte Expression von U-II, URP und des UTR ebenfalls eine biologische Bedeutung im zentralen Nervensystem. Die intracerebroventrikuläre Injektion von U-II in Ratten resultierte in einer Erhöhung des arteriellen Blutdrucks und der Herzrate.<sup>[77]</sup> Der Anstieg des U-II-induzierten arteriellen Blutdrucks war in hypertensiven Ratten gegenüber normotensiven Ratten stärker ausgeprägt, was eine Bedeutung des U-II, in diesem Fall zentral verabreicht, im Bluthochdruck bestärkt.<sup>[78]</sup> Zudem scheint U-II einen regulatorischen Einfluss auf Schlaf-Wach-Zyklen und insbesondere den REM-Schlaf zu haben.<sup>[79,80]</sup> Die intracerebroventrikuläre Verabreichung von U-II in Ratten führte zu einer erhöhten Anzahl an REM-Schlaf-Episoden, die auf die Aktivierung von cholinergen Neuronen im Hirnstamm zurückzuführen ist. Dieser Effekt konnte durch Vorbehandlung mit dem UTR-Antagonisten SB-710411 aufgehoben werden.<sup>[80]</sup> In einer weiteren Studie wurde eine U-II-induzierte Freisetzung von Neurotransmittern, die die Wachsamkeit erhöhen, in der Großhirnrinde der Ratte beschrieben.<sup>[79]</sup>

### **3.4 Proteolytische Prozessierung von U-II und URP**

Die proteolytische Prozessierung von U-II und URP ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Humanes U-II wird durch das UTS2-Gen kodiert. Dessen Expression führt durch alternatives Splicing zu zwei Isoformen des pre-pro-U-II, die aus 124 und 139 Aminosäuren bestehen.<sup>[2,10]</sup> Das humane URP wird durch das UTS2B- bzw. URP-Gen kodiert und als pre-pro-URP mit einer Länge von 119 Aminosäuren exprimiert.<sup>[8]</sup> Die aktiven Formen von U-II und URP werden durch proteolytische Prozessierung der Vorläufer pre-pro-U-II und pre-pro-URP generiert.<sup>[8,10]</sup> Beide Vorläufer sind strukturell ähnlich aufgebaut, weisen aber nur eine geringe Sequenzhomologie von 18.8% auf. Sie bestehen aus einem Signalpeptid am N-Terminus, einer sich anschließenden N-terminalen Domäne, einer die aktive Form von U-II bzw. URP flankierenden multibasischen Schnittstelle und die jeweilige aktive Form des U-II bzw. URP, die das vollständig konservierte zyklische Hexapeptid enthält, am C-Terminus.<sup>[8-10]</sup> N-terminale Signalpeptide dienen im Allgemeinen zur Sekretion und werden anschließend abgespalten.<sup>[81]</sup> Es wurde postuliert, dass die proteolytische Prozessierung von Peptidhormonen häufig an mono- oder dibasischen Sequenzen stattfindet,<sup>[82]</sup> woraus sich die Länge und Sequenz des aktiven U-II und URP ergeben. Die Sequenzhomologie des pre-pro-U-II ist moderat. Ein Vergleich des pre-pro-U-II des Menschen mit denen aus Frosch, Ratte und Maus ergibt Sequenzhomologien von 25%, 47% und 48%.<sup>[10,18,19]</sup> Die enthaltene, das aktive U-II flankierende, multibasische Schnittstelle ist in unterschiedlichen Spezies ebenfalls nicht vollständig konserviert. Während im Menschen, dem

Schwein und dem Frosch eine tribasische Schnittstelle mit der Sequenz KKR vorliegt,<sup>[10,18,28]</sup> verfügt die Ratte über die dibasische Schnittstelle RK<sup>109</sup>.<sup>[19]</sup> Die Maus enthält in analoger Position den einzelnen Lysinrest K<sup>109</sup> und die weitere dibasische Schnittstelle RK<sup>106</sup>.<sup>[19]</sup> Im humanen pre-pro-U-II existieren die zwei zusätzlichen potentiellen dibasischen Schnittstellen RK<sup>70</sup> und RK<sup>86</sup>.<sup>[10]</sup> Während die potentielle Schnittstelle RK<sup>70</sup> nicht konserviert ist, existiert die potentielle Schnittstelle RK<sup>86</sup> ebenfalls in Maus, Ratte und Schwein, nicht jedoch im Frosch.<sup>[10,18,19,28]</sup> Auch die Sequenz des pre-pro-URP ist nur moderat unter den Spezies konserviert und die Sequenzübereinstimmung des humanen pre-pro-URP mit dem aus Ratte und Maus beträgt 47.5% und 54.2%.<sup>[8]</sup> Im Gegensatz zu U-II ist jedoch die dibasische Schnittstelle KR, die das aktive URP flankiert, stark unter den Spezies konserviert.<sup>[9]</sup> Das humane pre-pro-URP verfügt über eine weitere potentielle dibasische Schnittstelle der Sequenz KK<sup>43</sup>. Diese ist jedoch schwach konserviert und nicht in Maus und Ratte vorhanden.<sup>[8]</sup> Eine schematische Abbildung des humanen pre-pro-U-II und des humanen pre-pro-URP sind in Abbildung 4<sup>[8-10]</sup> dargestellt:



**Abbildung 4: Schematische Abbildung des humanen pre-pro-U-II und des humanen pre-pro-URP.** Das pre-pro-U-II und das pre-pro-URP bestehen aus einem Signalpeptid am N-Terminus, einer N-terminalen Domäne und der jeweiligen aktiven Form, die das zykliche Hexapeptid (blau) enthält, am C-Terminus. Aktives U-II besteht aus elf Aminosäuren und wird von der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup> flankiert. Aktives URP besteht aus acht Aminosäuren und wird von der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup> flankiert. Pre-pro-U-II verfügt über die zwei weiteren potentiellen Schnittstellen RK<sup>86</sup> und RK<sup>70</sup>, pre-pro-URP mit der Sequenz KK<sup>43</sup> über eine weitere potentielle dibasische Schnittstelle<sup>[8,10]</sup> (adaptiert von H. Vaudry et al.<sup>[9]</sup>, modifiziert).

Das Vorhandensein weiterer potentieller dibasischer Schnittstellen ist ein Indiz für verlängerte Formen des U-II. Bisher ist nicht bekannt, ob die Generierung des aktiven U-II und URP unter Ausbildung einer Zwischenstufe erfolgt. Ein solcher Mechanismus ist zum Beispiel aus dem Renin-Angiotensin-System bekannt, wo Angiotensinogen zunächst durch Renin in das inaktive Angiotensin-I überführt wird, das schließlich durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) zum aktiven Angiotensin-II prozessiert wird.<sup>[83-85]</sup> Auf Grundlage der cDNA wurde für humanes U-II und URP eine Länge von elf bzw. acht Aminosäuren vorhergesagt.<sup>[8,10]</sup> Das Vorhandensein weiterer basischer potentieller Schnittstellen im humanen pre-pro-U-II lässt auch verlängerte Formen des aktiven U-II realistisch erscheinen. Durch Kombination von HPLC-Experimenten und immunologischen Methoden wurde die potentielle proteolytische Prozessierung C-terminal der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup>, des Argininrestes R<sup>105</sup> und des Lysinrestes K<sup>108</sup> untersucht, die zur Bildung der aus elf, 16 oder 19 Aminosäuren bestehenden Peptide führen würde. Es wurde festgestellt, dass die immunologisch detektierte Hauptkomponente mit dem aus elf Aminosäuren bestehenden Peptid koeluierte. Die aus 16 und 19 Aminosäuren bestehenden Peptide wurden nicht detektiert. Dennoch wurden weitere, vermutlich verlängerte, immunreaktive Peptide detektiert, die möglicherweise auf eine proteolytische Prozessierung C-terminal der dibasischen Schnittstellen RK<sup>70</sup> und RK<sup>86</sup> zurückzuführen sind.<sup>[86]</sup> Diese Hypothese wird durch die Detektion N-terminal verlängerter, aus 40-50 Aminosäuren bestehender, U-II-immunreaktiver Peptide im Überstand von SW-13-Tumorzellen bestärkt.<sup>[87]</sup> Ein Indiz für die Existenz eines im Blut zirkulierenden Vorläufers stellte die Detektion erhöhter U-II-Immunreaktivitäten im Plasma von Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz gegenüber gesunden Patienten dar, da die aktive aus elf Aminosäuren bestehende Form mittels LC-MS nicht detektierbar war.<sup>[88]</sup>

Die Identität des endogenen U-II-generierenden Enzyms ist ebenfalls nicht vollständig untersucht. Anhand von *in vitro*-Experimenten mit einem aus den 25 C-terminalen Aminosäuren des pre-pro-U-II bestehenden Vorläufers wurde die Generierung von U-II durch Furin und Trypsin festgestellt. Zudem wurde eine intrazelluläre Furin-ähnliche U-II-generierende Aktivität beschrieben. Es wurde eine U-II-generierende Aktivität im Blut festgestellt, die mithilfe des Serinproteaseinhibitors Aprotinin inhibiert werden konnte. Dies stellte ein Indiz für Trypsin-ähnliche U-II-generierende Serinproteasen in der Blutzirkulation dar.<sup>[89]</sup> Später wurde die Umsetzung des pro-U-II durch die Proprotein-Convertasen 1 und 2 zu aktivem U-II *in-vitro* festgestellt und postuliert, dass sie für die U-II-generierende Aktivität in neuroendokrinen und neuronalen Zellen verantwortlich sein könnten.<sup>[90]</sup> In einer vorangegangenen Arbeit wurde der

Komplementfaktor I, nach Anreicherung aus dem Blutplasma, als U-II-generierendes Enzym beschrieben.<sup>[91]</sup> In einer späteren Arbeit konnte dessen physiologische Relevanz jedoch nicht validiert werden. Stattdessen wurde die Serinprotease Plasma-Kallikrein als U-II-generierendes Enzym identifiziert und seine physiologische Relevanz durch einen Inhibitionsversuch demonstriert. Dabei implizierte eine verbliebene Restaktivität die Beteiligung weiterer, bisher unbekannter U-II-generierender Enzyme.<sup>[11]</sup> Über die Ausbildung eines Intermediates bei der proteolytischen Prozessierung des pre-pro-URP, zum Beispiel durch proteolytische Prozessierung der potentiellen dibasischen Schnittstelle KK<sup>43</sup>, sind bisher keine Informationen vorhanden. Zudem ist die Identität eines URP-generierenden Enzyms bisher nicht vollständig untersucht.

### 3.5 Plasma-Kallikrein als U-II- und URP-generierendes Enzym

Plasma-Kallikrein ist eine Serinprotease, die proteolytisch aus dem inaktiven, in der Blutzirkulation vorkommenden Vorläufer Plasma-Prekallikrein (PPK) gebildet wird.<sup>[92,93]</sup> Die mRNA des humanen PPK kodiert ein aus 638 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 79.5 kDa.<sup>[84]</sup> Sein tatsächliches Molekulargewicht beträgt 85-88 kDa, da es postranslational modifiziert wird und insbesondere glykosyliert vorliegt.<sup>[94-97]</sup> PK kommt in der Blutzirkulation zu einem Großteil gebunden an hochmolekulares Kininogen vor.<sup>[98]</sup> Die Aktivierung des PPK durch Faktor XII führt zur proteolytischen Spaltung der Arg-Ile<sup>372</sup>-Bindung. Dabei kommt es zur Ausbildung einer aus 371 Aminosäuren bestehenden schweren und einer aus 248 Aminosäuren bestehenden leichten Kette, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind.<sup>[92]</sup> Aktives PK bewirkt eine Proteolyse C-terminal von dibasischen Sequenzen, so dass eine Bedeutung des PK für die Umsetzung zahlreicher pro-Proteine und pro-Hormone in ihre aktiven Formen postuliert wurde.<sup>[99]</sup> Tatsächlich führt es entsprechend in zahlreichen Signalwegen, wie zum Beispiel der Blutkoagulation,<sup>[100]</sup> der Fibrinolyse,<sup>[101]</sup> dem Renin-Angiotensin-System<sup>[83-85]</sup> oder dem Plasma-Kallikrein-Kinin-System<sup>[102]</sup> zur Aktivierung weiterer Proteine.<sup>[103]</sup> Im Plasma-Kallikrein-Kinin-System katalysiert PK die Freisetzung von Bradykinin, einem Peptidhormon mit vasodilatorischen Eigenschaften, aus hochmolekularem Kininogen.<sup>[101,102]</sup> Im Renin-Angiotensin-System überführt PK das pro-Renin zu aktivem Renin, das dann Angiotensinogen zu Angiotensin-I umwandelt. Die weitere Umsetzung von Angiotensin-I zu Angiotensin-II durch das ACE resultiert schließlich in einer Vasokonstriktion.<sup>[83]</sup> Somit ist PK sowohl anhand der Bradykinin-vermittelten Vasodilation als auch der Angiotensin-II-vermittelten Vasokonstriktion an der Regulation des Blutdruckes beteiligt.<sup>[83,101,102]</sup> PK steht außerdem im Zusammenhang mit dem hereditären Angioödem.<sup>[104,105]</sup> Diese pathologische Störung wird bei Menschen mit C1INH-Defizienz beobachtet und führt zu Bradykinin-vermittelten Ödemen. C1INH

ist ein endogener Inhibitor von PK und Faktor XII und eine C1INH-Defizienz führt zur ausbleibenden Regulation des PK und in der Folge zu einer erhöhten Bradykinin-Freisetzung.<sup>[106]</sup> In Patienten mit PK-Defizienz wurden jedoch keine spezifischen Symptome oder Pathologien festgestellt.<sup>[103]</sup> Die Identifizierung des PK als potentiell Urotensin-II-generierendes Enzym wird durch die vorherigen Indizien für eine zirkulierende Serinprotease mit U-II-generierender Aktivität bestärkt.<sup>[89]</sup> PK verfügt über eine für die proteolytische Prozessierung der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup> des pre-pro-U-II geeignete Schnittspezifität. PK wurde nach einer Komplementfaktor I-Antikörperaffinitätschromatographie in einer Eluatfraktion mit U-II-generierender Aktivität identifiziert. Es führte *in vitro* zur proteolytischen Prozessierung von U-II-Vorläufern aus den C-terminalen Aminosäuren 95-124 und 21-124 und zur Bildung von aktivem U-II. Zudem wurde seine physiologische Relevanz durch Inhibitionsversuche mit dem selektiven Plasma-Kallikrein Inhibitor PK15<sup>[107]</sup> demonstriert, indem die U-II-generierende Aktivität von humanem Plasma reduziert wurde. Eine verbliebene Restaktivität implizierte dabei die Beteiligung weiterer, bisher unbekannter Urotensin-II-generierender Enzyme.<sup>[11]</sup> Wie bereits beschrieben, ist die Identität eines URP-generierenden Enzyms bisher unbekannt. Die für PK beschriebene proteolytische Aktivität gegenüber di- und monobasischen Sequenzen scheint ebenfalls geeignet für die proteolytische Prozessierung der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup> des pre-pro-URP. Die postulierte Beteiligung des PK am Urotensin-System würde neben dem Renin-Angiotensin-System und dem Plasma-Kallikrein-Kinin-System eine regulierende Funktion an einem weiteren vasoaktiven System mit potentiell blutdruckregulierender Wirkung bedeuten.

#### 4 Problemstellung

Urotensin-II (U-II) und Urotensin-II-related peptide (URP) sind Peptidhormone mit starken vasoaktiven Eigenschaften,<sup>[1,2,8]</sup> die mit zahlreichen pathologischen Störungen wie Bluthochdruck und Herzinsuffizienz im Zusammenhang stehen.<sup>[3-6]</sup> Die proteolytische Prozessierung von U-II und URP aus den jeweiligen Vorläufern pre-pro-U-II und pre-pro-URP ist nicht vollständig untersucht. Eine detaillierte Studie ihrer proteolytischen Prozessierung ist jedoch von großer Interesse, da – in Anlehnung an das Renin-Angiotensinogen-System – beteiligte Enzyme als Targets zur Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen fungieren könnten. In einer früheren Arbeit wurde das Plasma-Kallikrein als U-II-generierendes Enzym mit physiologischer Relevanz identifiziert.<sup>[11]</sup> URP-generierende Enzyme sind bisher unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die proteolytische Prozessierung von U-II und URP in der Blutzirkulation weitergehend untersucht werden. Dabei sollte die Umsetzung von Vorläuferpeptiden von U-II und URP, die aus den 20 C-terminalen Aminosäuren des pre-pro-U-II bzw. pre-pro-URP bestanden, zu den aktiven Formen mithilfe eines Massenspektrometrie-basierten Enzymassays (MES-Assay<sup>[108]</sup>) bestimmt werden. Im Zusammenhang der proteolytischen Prozessierung von U-II waren die Ziele dieser Arbeit die Validierung der physiologischen Relevanz des Plasma-Kallikreins (PK) als U-II-generierendes Enzym sowie die Identifizierung alternativer U-II-generierender Enzyme. Hierzu sollte eine Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität innerhalb der Cohn-Fraktion IV-4 mit anschließender Identifizierung korrespondierender Enzyme durchgeführt werden und die U-II-generierende Aktivität von relevanten Proteasen validiert und relativ quantifiziert werden. Zur Untersuchung der proteolytischen Prozessierung von URP sollte eine URP-generierende Aktivität innerhalb der Blutzirkulation anhand der Cohn-Fraktion IV-4 untersucht und entsprechende URP-generierende Enzyme angereichert und identifiziert werden. Die URP-generierende Aktivität identifizierter Proteasen sollte validiert und durch relative Quantifizierung verglichen werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung einer potentiellen intrazellulären U-II- und URP-generierenden Aktivität. Hierzu sollte die proteolytische Prozessierung von U-II und URP durch HEK-293T-, T98G- und HeLa-Zellextrakte bestimmt werden und eine Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität eines HEK-293T-Zellextraktes durchgeführt werden. Korrespondierende Enzyme sollten dann identifiziert und die potentielle U-II- und URP-generierende Aktivität geeigneter Kandidaten validiert werden.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Chemikalien

---

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
4B CNBr-aktivierte Sepharose	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Bruker Daltonik (Bremen, Deutschland)
Ammoniumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Acetonitril	VWR (Radnor, USA)
AEBSF	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Ameisensäure	Fluka (Steinheim, Deutschland)
Calciumchlorid	Honeywell (Morristown, USA)
Dinatriumhydrogenphosphat	Honeywell (Morristown, USA)
Dithiothreitol	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
E-64	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Harnstoff	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Kaliumchlorid	Grüssing (Filsum, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Leupeptin	Roche (Schweiz, Basel)
Iodacetamid	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Methanol	Honeywell (Morristown, USA)
Natriumacetat	Grüssing (Filsum, Deutschland)
Natriumchlorid	VWR (Radnor, USA)
Natriumdeoxycholat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat	Fluka (Steinheim, Deutschland)
Natriumhydroxid	Grüssing (Filsum, Deutschland)
Pepstatin A	Merck (Darmstadt, Deutschland)
PKSI-527	Enzo Life Sciences (Lausen, Schweiz)
Salzsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Triethylammoniumbicarbonat	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Trifluoressigsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tris-Hydrochlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)

---

## 5.2 Biomaterialien

<b>Biomaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Cohn-Fraktion IV-4	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
HeLa-Zellen	eigene Herstellung, Dr. Suki Albers (Universität Hamburg)
HEK-293T-Zellen	eigene Herstellung, Dr. Simone Prömel (Universität Leipzig)
Komplement C2	Antibodies-online (Aachen, Deutschland)
Komplementfaktor I	Merckmillipore (Darmstadt, Deutschland)
Koagulationsfaktor XIa	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Koagulationsfaktor XIIa	Antibodies-online (Aachen, Deutschland)
Peptid UCE-S, RIWKPYKKRETPDCFWKYCV	Synpeptide Co Ltd (Shanghai, China)
Peptid URP-S, VDGLFSSHPSKRAPDCFWKYCV	Synpeptide Co Ltd (Shanghai, China)
Plasmin	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Plasma-Kallikrein	Abcam (Cambridge, UK)
Proprotein-Convertase 1	Hölzel Diagnostika (Köln, Deutschland)
Serin Protease 58	Antibodies-online (Aachen, Deutschland)
T98G-Zellen	eigene Herstellung, Dr. Simone Prömel (Universität Leipzig)
Trypsin	Promega (Madison, USA)
Thrombin	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

## 5.3 Geräte und Materialien

<b>Geräte und Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
6224 ESI-TOF	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Anionenaustausch-Säule UNO Q-Polishing	Bio-Rad (Hercules, USA)
Anionenaustausch-Säule UNOQ1	Bio-Rad (Hercules, USA)
Anionenaustausch-Säule HiTrap® Q HP, 1 mL	GE Healthcare (Chalfont St Giles, GB)
Äkta Explorer	GE Healthcare (Chalfont St Giles, GB)
Äktaprime plus	GE Healthcare (Chalfont St Giles, GB)
Dionex Ultimate 3000 RSLCnano	Thermo Scientific (Waltham, USA)
HPLC 1200 Series	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

<b>Geräte und Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
HPLC-Säule PLRP-S, 1000 Å, 5 µm, 50 x 2.1 mm	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
HPLC-Säule Extend C18, 1.8 µm, 50 x 2.1 mm	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
HPLC-Säule Acclaim PepMap, 3 µm, 25 cm x 75 µm ID	Thermo Scientific (Waltham, USA)
HPLC-Säule Acclaim PepMap trap column, 3 µm, 2 cm x 75 µm ID	Thermo Scientific (Waltham, USA)
HPLC-Säule nanoACQUITY UPLC column, BEH 130 C18, 100 Å, 1.7 µm, 250 mm x 75 µm	Waters (Milford, USA)
HPLC-Säule nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 trap column, 100 Å, 5 µm, 20 mm x 180 µm	Waters (Milford, USA)
MALDI-TOF-TOF-MS ultrafleXtreme	Bruker Daltonik (Bremen, Deutschland)
nanoACQUITY	Waters (Milford, USA)
Orbitrap Fusion	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Orbitrap Q-Exactive	Thermo Scientific (Waltham, USA)
pH-Elektrode Orion	Thermo Scientific (Waltham, USA)
pH-Meter Orion Star A111	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Rührgerät RZR 2020	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Sonopuls Homogenisator UW 2200	Bandelin electronic (Berlin, Deutschland)
SPE-Kartusche Oasis Plus HLB	Waters (Milford, USA)
SPE-Kartusche Strata-x 33u Polymeric Reversed Phase	Phenomenex (Torrance, USA)
ThermoMixer® C	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Spektrophotometer NanoDrop 2000c	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Reinstwasseranlage arium® pro	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Vakuumzentrifuge mit Kühlfalle	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Zentrifuge MiniSpin® plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifugenfilter Amicon® Ultra, 0.5 mL, 3 kDa	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

## 5.4 Software und Datenbanken

Software und Datenbanken	Hersteller und Entwickler
Data Analysis 4.0	Bruker Daltonik (Bremen, Deutschland)
Flex Analysis 3.3	Bruker Daltonik (Bremen, Deutschland)
Flex Control 3.3	Bruker Daltonik (Bremen, Deutschland)
MassHunter Workstation Data Acquisition (Version B.06.00)	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
MassHunter Qualitative Analysis (Version B.06.00)	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
MaxQuant <sup>[109]</sup> (Version 1.6.1.0)	Max-Planck-Gesellschaft (München, Deutschland)
MEROPS-Proteasedatenbank <sup>[110]</sup>	N. D. Rawlings et al.
Nanodrop 2000/2000c Version 1.6.198	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Peptide Property Calculator	Bio-Synthesis (Lewisville, USA)
Proteome Discoverer	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Sisweb Exact Mass Calculator	Scientific Instrument Services, Adaptas Solutions (Ringoos, USA)
Uniprot-Datenbank <sup>[111]</sup>	Uniprot Consortium

## 5.5 Pufferlösungen

Pufferlösungen	Zusammensetzung
Blockierungspuffer	500 mM NaCl, 100 mM NaHCO <sub>3</sub> , 1 M Glycin, pH 8.3
Kopplungspuffer	500 mM NaCl, 100 mM NaHCO <sub>3</sub> , pH 8.3
Phosphat-gepufferte Salzlösung	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.8 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7.4
Proprotein-Convertase 1-Puffer	100 mM Natriumacetat, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 5.5

## 5.6 Zellaufschluss zur Generierung von Zellextrakten der Zelllinien HEK-293T, T98G und HeLa

Zur Generierung von Zellextrakten der Zelllinien HEK-293T, T98G und HeLa wurden die entsprechenden Zellen durch Einfrier-Auftau-Zyklen lysiert. Zellpelletts aus 5 Mio. HEK-293T-

Zellen, 11.5 Mio. T98G-Zellen und 10 Mio-HeLa-Zellen wurden zuvor erhalten. Die HeLa-Zellen wurden vor Verwendung zweimal mit jeweils 125  $\mu$ L PBS gewaschen. Die HEK-293T-, T98G- und HeLa-Zellen wurden in 500  $\mu$ L PBS suspendiert und aliquotiert. Zur Untersuchung der intrazellulären U-II/URP-generierenden Aktivität wurden Aliquote entsprechend 1 Mio. HEK-293T-Zellen, 1 Mio. T98G-Zellen und 2 Mio. HeLa-Zellen entnommen und in drei (HEK-293T und HeLa) bzw. vier (T98G) Einfrier-Auftau-Zyklen bei -20 °C eingefroren und auf Eis aufgetaut. Die Suspensionen wurden für 1 min bei 4 °C und 8000 rpm zentrifugiert, der Überstand als Zellextrakt entnommen und bei -20 °C gelagert. Zur Fraktionierung eines HEK-293T-Zellextraktes wurden etwa 2 Mio. Zellen in drei Einfrier-Auftau-Zyklen bei -20 °C eingefroren und auf Eis aufgetaut. Die Suspension wurde für 1 min bei 4 °C und 8000 rpm zentrifugiert, der Überstand als Zellextrakt entnommen und bei -20 °C gelagert. Das verbliebene Zellpellet wurde mit 100  $\mu$ L PBS suspendiert und in drei weiteren Einfrier-Auftau-Zyklen bei -20 °C eingefroren und auf Eis aufgetaut. Die Suspension wurde für 1 min bei 4 °C und 8000 rpm zentrifugiert, der Überstand als Zellextrakt entnommen und bei -20 °C gelagert. Die nach drei bzw. sechs Einfrier-Auftau-Zyklen entnommenen Zellextrakte wurden vor der nachfolgenden Fraktionierung mittels Anionenaustauschchromatographie vereint.

### **5.7 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten**

Die Proteinkonzentration von Zellextrakten wurde mithilfe des Spektrophotometers NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) bestimmt. Es wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt. Dabei wurde PBS zur Messung des Hintergrundsignals verwendet. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, bei der jeweils 1  $\mu$ L des zu untersuchenden Zellextraktes analysiert wurde.

### **5.8 Massenspektrometrie-basierter Enzymassay zur Detektion proteolytischer Aktivitäten von Enzymen und Proteinfractionen**

Zur Untersuchung der proteolytischen Prozessierung von U-II und URP wurde ein Massenspektrometrie-basierter Enzymassay (MES-Assay<sup>[108]</sup>) zur Detektion reaktionsspezifischer Enzymaktivitäten durchgeführt. Dieser wurde 2003 von der Arbeitsgruppe Schlueter entwickelt. Die zu untersuchenden Enzyme oder Proteinfractionen wurden zunächst an 4B CNBR-aktivierte Sepharose immobilisiert und mit einem reaktionsspezifischen Peptidsubstrat, in diesem Fall den U-II/URP-Vorläufern UCE-S und URP-S, inkubiert. Nach definierten Inkubationszeiten wurden Proben entnommen und massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF- bzw. LC-ESI-TOF-MS untersucht. Zur Ermittlung der proteolytischen Spezifität und zur Quantifizierung der

Generierung von U-II und URP durch unterschiedliche Enzyme oder Proteinfractionen, erfolgte sowohl eine qualitative als auch quantitative Untersuchung der entstandenen Proteolyseprodukte.

### **5.8.1 Immobilisierung von Enzymen und Proteinfractionen**

Zur Untersuchung der proteolytischen Aktivität von Enzymen und Proteinfractionen wurden diese an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert. 10 mg der 4B CNBr-aktivierten Sepharose wurden zum Aufquellen für 30 min bei Raumtemperatur und unter Rotation mit 200 µL HCl (1 mM) inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Chromatographiepartikel zweimal mit je 100 µL H<sub>2</sub>O sowie zweimal mit je 100 µL Kopplungspuffer gewaschen. Es folgte die Kopplung der Enzyme bzw. Proteinfractionen durch Inkubation definierter Mengen der Enzyme bzw. Proteinfractionen mit definierten Mengen des Kopplungspuffers (siehe Kapitel 5.8.1.1 - 5.8.1.3 und Ergebnisse) für 2 h bei Raumtemperatur und unter Rotation. Nach Entfernen des Überstandes und zwei weiteren Waschschritten mit je 100 µL H<sub>2</sub>O erfolgte die Blockierung freier Bindungsstellen durch Inkubation mit 250 µL Blockierungspuffer für 2 h bei Raumtemperatur und unter Rotation. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Proben zweimal mit jeweils 100 µL H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Chromatographiepartikel wurden vor jeder Entnahme des Überstandes zentrifugiert, um Probenverlust zu vermeiden.

#### **5.8.1.1 Immobilisierung der Cohn-Fraktion IV-4 sowie von Sub-Fractionen der Cohn-Fraktion IV-4**

Das Aufquellen und Blockieren der 4B CNBr-aktivierten Sepharose erfolgte nach dem in Kapitel 5.8.1 beschriebenen Protokoll. Zur Kopplung der Cohn-Fraktion IV-4 wurde das entsprechende Volumen einer Cohn-Fraktion IV-4-Lösung (3.3 µg/µL) auf 250 µL mit Kopplungspuffer aufgefüllt und für 2 h bei Raumtemperatur und unter Rotation inkubiert. Zur Immobilisierung von Sub-Fractionen der Cohn-Fraktion IV-4 bei der Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen wurden 50 µL der jeweiligen Sub-Fraktion mit 200 µL Kopplungspuffer analog inkubiert. Um die Sub-Fractionen der Cohn-Fraktion IV-4 bei der Identifizierung von URP-generierenden Enzymen zu immobilisieren wurden 100 µL der jeweiligen Sub-Fraktion mit 250 µL Kopplungspuffer analog inkubiert. Die Negativkontrollen wurden mit entsprechenden Volumina an H<sub>2</sub>O anstelle der Cohn-Fraktion IV-4 bzw. der Sub-Fractionen der Cohn-Fraktion IV-4 durchgeführt.

### **5.8.1.2 Immobilisierung von Enzymen**

Die 4B CNBr-aktivierte Sepharose wurde nach dem in Kapitel 5.8.1 beschriebenen Protokoll aufgequollen und blockiert. Um die Enzyme Plasma-Kallikrein, Plasmin, Thrombin, Koagulationsfaktor XIa, Koagulationsfaktor XIIa, Komplementfaktor I, Komplement C2, Serin Protease 58 und Proprotein-Convertase 1 an die Chromatographiepartikel zu koppeln wurde die zu untersuchende definierte Enzymmenge (siehe Ergebnisse) auf 50  $\mu\text{L}$  mit Kopplungspuffer aufgefüllt und für 2 h bei Raumtemperatur und unter Rotation inkubiert. Abweichend von diesem Protokoll wurde die Kopplung von 10  $\mu\text{g}$  des Komplementfaktor I auf 100  $\mu\text{L}$  mit Kopplungspuffer aufgefüllt und analog inkubiert. Für die Negativkontrollen wurden entsprechende Volumina an  $\text{H}_2\text{O}$  anstelle der Enzyme verwendet.

### **5.8.1.3 Immobilisierung der Zellextrakte HEK-293T, T98G und HeLa sowie von Fraktionen eines HEK-293T-Zellextraktes**

Das Aufquellen und Blockieren der 4B CNBr-aktivierten Sepharose erfolgte nach dem in Kapitel 5.8.1 beschriebenen Protokoll. Zur Kopplung der Zellextrakte HEK-293T, T98G und HeLa wurden 2.5 bzw. 5.0  $\mu\text{L}$  des jeweiligen Zellextraktes auf 50 bzw. 100  $\mu\text{L}$  mit Kopplungspuffer aufgefüllt und für 2 h bei Raumtemperatur und unter Rotation inkubiert. Um die Fraktionen eines HEK-293T-Zellextraktes zu koppeln wurden 100  $\mu\text{L}$  des jeweiligen Zellextraktes mit 250  $\mu\text{L}$  Kopplungspuffer analog inkubiert. Die Negativkontrollen wurden mit entsprechenden Volumina an  $\text{H}_2\text{O}$  anstelle der verwendeten Zellextrakte bzw. Fraktionen durchgeführt.

### **5.8.2 Inkubation immobilisierter Enzyme und Proteinfractionen mit reaktionsspezifischen Peptidsubstraten**

Um proteolytische Aktivitäten zu untersuchen wurden die immobilisierten Enzyme und Proteinfractionen (siehe Kapitel 5.8.1) mit reaktionsspezifischen Peptidsubstraten inkubiert. Die Untersuchung der U-II-generierenden Aktivität erfolgte unter Verwendung des Peptidsubstrates UCE-S, das aus den 20 C-terminalen Aminosäuren des pre-pro-U-II besteht und das aktive U-II enthält. Zur Untersuchung der URP-generierenden Aktivität wurde das Peptidsubstrat URP-S, das aus den 20 C-terminalen Aminosäuren des pre-pro-URP besteht und das aktive URP enthält, verwendet. Die Inkubationen immobilisierter Enzyme oder Proteinfractionen mit UCE-S bzw. URP-S wurden in  $\text{H}_2\text{O}$ , bei Raumtemperatur und unter Rotation mit einer Konzentration des Peptidsubstrates von  $10^{-4}$  M durchgeführt. Nach definierten Inkubationszeiten wurden Proben zur massenspektrometrischen Untersuchung mittels MALDI-TOF- bzw. LC-ESI-TOF-MS

entnommen, wobei 1.5 µL-Aliquote für MALDI-TOF-MS-Experimente und 15 µL-Aliquote für LC-ESI-TOF-MS-Experimente entnommen wurden. Die Ansatzgröße der Inkubationen variierte daher in Abhängigkeit des Bedarfs an zu vermessender Inkubationslösung. Qualitative Untersuchungen der U-II/URP-generierenden Aktivität von Enzymen und Proteinfractionen wurden in einer Ansatzgröße von 30 µL durchgeführt. Eine Ausnahme bildete die Untersuchung der URP-generierenden Aktivität der Zellextrakte HEK-293T und T98G, die in einem 40 µL-Ansatz durchgeführt wurden. Quantitative Untersuchungen der URP- und/oder U-II-generierenden Aktivität durch relative Quantifizierung der durch jeweils 1 µg Plasma-Kallikrein, Plasmin, Thrombin, Koagulationsfaktor XIIa, Koagulationsfaktor XIa und Komplementfaktor I gebildeten Menge an URP und/oder U-II erfolgten jeweils in 50 µL-Ansätzen. Weitere quantitative Untersuchungen der U-II-generierenden Aktivität durch erhöhte Enzymmengen wurden in 30 µL-Ansätzen durchgeführt.

### **5.8.3 Inkubation immobilisierter Enzyme und Proteinfractionen mit UCE-S und URP-S in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren**

Zur Untersuchung inhibitorischer Effekte auf die U-II/URP-generierende Aktivität immobilisierter Enzyme und Proteinfractionen wurde die jeweilige Inkubation mit UCE-S bzw. URP-S in Anwesenheit von spezifischen Proteaseinhibitoren durchgeführt. Die Inkubationen erfolgten in H<sub>2</sub>O, bei Raumtemperatur und unter Rotation mit einer Konzentration des Peptidsubstrates von 10<sup>-4</sup> M und in Anwesenheit der folgenden Konzentrationen des jeweiligen Proteaseinhibitors: 1-100 µM PKSI-527, 1 mM AEBSF, 10 µM Leupeptin, 10 µM E-64, 1 µM Pepstatin A, 1 mM EDTA. Nach definierten Inkubationszeiten wurden Proben zur massenspektrometrischen Analyse mittels MALDI-TOF-MS bzw. LC-ESI-TOF-MS entnommen, wobei es sich bei MALDI-TOF-MS-Experimenten um 1.5 µL-Aliquote und bei LC-ESI-TOF-MS-Experimenten um 15 µL-Aliquote handelte. Die Inkubationen wurden jeweils in 40 µL-Ansätzen durchgeführt. Eine Ausnahme bildete die Untersuchung der U-II/URP-generierenden Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 in Anwesenheit von 10 µM PKSI-527, in denen eine relative Quantifizierung der gebildeten Menge an U-II bzw. URP nach 0, 2, 4, 7 und 24 h durchgeführt wurde. Hier erfolgten die Inkubationen in 90 µL-Ansätzen.

### **5.9 Untersuchung der U-II/URP-generierenden Aktivität der Proprotein-Convertase 1**

Die U-II/URP-generierende Aktivität der Proprotein-Convertase 1 wurde neben dem zuvor beschriebenen Protokoll (siehe Kapitel 5.8) nach einem davon abweichenden Ansatz untersucht. Darin wurde die enzymatische Reaktion der Proprotein-Convertase 1 mit den Peptidsubstraten

UCE-S und URP-S ohne vorherige Immobilisierung der Proprotein-Convertase 1 in Lösung durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 24 h in Anwesenheit des  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Proprotein-Convertase 1-Puffers bei 37 °C und unter Schütteln. Die Inkubation von 2 µg der Proprotein-Convertase 1 (0.25 µg/µL in  $\text{H}_2\text{O}$ ) mit UCE-S bzw. URP-S wurde in einem 50 µL-Ansatz mit einer Peptidsubstratkonzentration von  $10^{-4}$  M nach Zugabe von 37 µL des Proprotein-Convertase 1-Puffers durchgeführt. Die Inkubationen von 3 bzw. 4 µg der Proprotein-Convertase 1 (0.25 µg/µL in  $\text{H}_2\text{O}$ ) mit UCE-S bzw. URP-S erfolgte in einem 60 µL-Ansatz mit einer Peptidsubstratkonzentration von  $5 \cdot 10^{-5}$  M nach Zugabe von 41 µL des Proprotein-Convertase 1-Puffers. Differenzen im Volumen der Ansätze wurden durch Zugabe entsprechender Volumina an  $\text{H}_2\text{O}$  ausgeglichen. Die Peptidsubstrate wurden jeweils aus einer  $10^{-2}$  M konzentrierten Stammlösung 1:9 mit Proprotein-Convertase 1-Puffer verdünnt. Die Negativkontrolle wurde mit entsprechenden Volumina an  $\text{H}_2\text{O}$  anstelle der Proprotein-Convertase 1-Lösung durchgeführt.

### **5.10 Entsalzung von Inkubationslösungen**

Die Reaktionslösungen der in Proprotein-Convertase 1-Puffer durchgeführten Inkubationen der Proprotein-Convertase 1 mit UCE-S bzw. URP-S wurden vor der massenspektrometrischen Analyse mittels MALDI-TOF-MS entsalzt. Dazu wurden mit C18-Chromatographiematerial befüllte Pipettenspitzen (Bond Elute OMIX, Agilent Technologies) verwendet. Die C18-Phase wurde mit 10 µL ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50/50 v/v + 0.1% FA aktiviert und zweimal mit 0.1% FA äquilibriert. 10 µL der Inkubationslösung wurden auf die C18-Phase aufgetragen, die dann zweimal mit 0.1% FA gewaschen wurde. Die Elution der an die C18-Phase gebundenen Peptide erfolgte durch 10 µL ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50/50 v/v + 0.1% FA.

### **5.11 Fraktionierung der Cohn-Fraktion IV-4 zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen**

Zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen wurde eine Fraktionierung der Cohn-Fraktion IV-4 durch eine Anionenaustauschchromatographie mithilfe eines Äkta-Explorer-Systems (GE Healthcare) und der Anionenaustausch-Säule UNO Q6 (Bio-Rad) durchgeführt. Die Trennung erfolgte durch einen Gradienten aus 20 mM Tris (pH 8.5) und 20 mM Tris + 1 M NaCl (pH 8.5) bei einer Flussrate von 4 mL/min. In zwei Läufen wurden 65 und 80 mg der Cohn-Fraktion IV-4 injiziert und zu Fraktionsvolumina von 4 bzw. 6 mL fraktioniert. Der Start des Gradienten erfolgte nach vollständiger Elution der nicht an die stationäre Phase gebundenen Proteine, die ebenfalls aufgefangen wurden. Die Fraktionierung der Probe wurde im Anschluss an den Gradienten manuell bis zur Elution aller an die stationäre Phase gebundener Proteine

fortgesetzt. Der verwendete Gradient zur Fraktionierung der Cohn-Fraktion IV-4 ist in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1:** Gradient zur Fraktionierung der Cohn-Fraktion IV-4 durch Anionenaustauschchromatographie zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen

t [min]	20 mM Tris, pH 8.5 [%]	20 mM Tris + 1 M NaCl, pH 8.5 [%]
Durchfluss, manuell	100	0
0	100	0
15	50	50
20	0	100
Nachlauf, manuell	0	100
Äquilibrierung, manuell	100	0

### 5.12 Fraktionierung der Cohn-Fraktion IV-4 zur Identifizierung von URP-generierenden Enzymen

Zur Identifizierung von URP-generierenden Enzymen innerhalb der Cohn-Fraktion IV-4 wurde diese durch Anionenaustauschchromatographie mithilfe eines ÄKTAprime plus-Systems (GE Healthcare) und einer HiTrap-Säule (Q HP, 1 mL, GE-Healthcare) fraktioniert. Es wurde ein Gradient aus 20 mM Tris (pH 8.5) und 20 mM Tris + 1 M NaCl (pH 8.5) mit einer Flussrate von 1 mL/min angewendet. 15.2 mg der Cohn-Fraktion IV-4 wurden zu einem Fraktionsvolumen von 1 mL fraktioniert. Der verwendete Gradient zur Fraktionierung der Cohn-Fraktion IV-4 ist in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Gradient zur Fraktionierung der Cohn-Fraktion IV-4 durch Anionenaustauschchromatographie zur Identifizierung von URP-generierenden Enzymen

t [min]	20 mM Tris, pH 8.5 [%]	20 mM Tris + 1 M NaCl, pH 8.5 [%]
0	100	0
10	100	0
12, Injektion	100	0
17	100	0
32	50	50
37	0	100
39	0	100
39.1	100	0
60	100	0

Die Flussrate lag von 39.0 - 39.1 min auf 40 mL/min erhöht vor.

### 5.13 Fraktionierung eines HEK-293T-Zellextraktes zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen

Zur Fraktionierung eines HEK-293T-Zellextraktes wurde eine Anionenaustauschchromatographie mithilfe eines Äkta-Explorer-Systems (GE Healthcare) und der Anionenaustauschsäule UNO Q Polishing (Bio-Rad) durchgeführt, mit dem Ziel, intrazelluläre U-II-generierende Enzyme zu identifizieren. Die Trennung erfolgte mithilfe eines Gradienten aus 20 mM Tris (pH 8.5) und 20 mM Tris + 1 M NaCl (pH 8.5) und einer Flussrate von 0.5 mL/min. Der Start des Gradienten erfolgte nach vollständigem Durchfluss von nicht an die stationäre Phase gebundenen Proteinen, die ebenfalls aufgefangen wurden. 642.5 µg des HEK-293T-Zellextraktes wurden zu einem Fraktionsvolumen von 0.5 mL fraktioniert. Im Anschluss an den Gradienten wurde die Fraktionierung manuell bis zum Erreichen der Ausgangsleitfähigkeit fortgesetzt. Der verwendete Gradient zur Fraktionierung eines HEK-293T-Zellextraktes ist in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Gradient zur Fraktionierung eines HEK-293T-Zellextraktes durch Anionenaustauschchromatographie zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen

t [min]	20 mM Tris, pH 8.5 [%]	20 mM Tris + 1 M NaCl, pH 8.5 [%]
Durchfluss, manuell	100	0
0	100	0
15	50	50
20	0	100
25	0	100
27	100	0
Äquilibrierung, manuell	100	0

#### 5.14 Trypsinierung von Enzymen und Proteinfractionen

Zur Identifizierung von U-II/URP-generierenden Enzymen sowie zur Reinheitsbestimmung kommerziell erworbener Enzyme wurden Proteinfractionen mit hoher U-II/URP-generierender Aktivität bzw. Enzyme trypsinisiert und anschließend mittels LC-MS/MS vermessen. Die Trypsinierungen der Cohn-Fraktion IV-4 zur Identifizierung von U-II/URP-generierenden Enzymen, des HEK-293T-Zellextraktes zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen sowie die Reinheitsbestimmung der Proteasen Koagulationsfaktor XIa, Koagulationsfaktor XIIa, Thrombin, Plasmin und Plasma-Kallikrein fanden jeweils mit geringfügig abgeändertem Protokoll (siehe Kapitel 5.14.1 - 5.14.4) statt.

##### 5.14.1 Trypsinierung von Sub-Fractionen der Cohn-Fraktion IV-4 zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen

Die IEX-Fractionen mit der höchsten U-II-generierenden Aktivität wurden in Lösung trypsinisiert, um U-II-generierende Enzyme in der Cohn-Fraktion IV-4 zu identifizieren. Etwa 100 µg Protein wurden zur Reduktion der Disulfidbrücken für 20 min bei 56 °C mit 20 mM DTT (in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> oder 100 mM TEAB + 1% SDC) inkubiert. Freie Thiolgruppen wurden dann durch Inkubation mit 105 mM IAA (in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> oder 100 mM TEAB + 1% SDC) für 30 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln alkyliert. Die Proben wurden über Nacht mit 1 µg Trypsin pro 100 µg Protein bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss an die Trypsinierung wurden die Proben nach dem in Kapitel 5.14.5 beschriebenen Protokoll entsalzt und lyophilisiert.

#### **5.14.2 Trypsinierung von Sub-Fraktionen der Cohn-Fraktion IV-4 zur Identifizierung von URP-generierenden Enzymen**

Zur Identifizierung von URP-generierenden Enzymen in der Cohn-Fraktion IV-4 wurden die IEX-Fraktionen mit der höchsten URP-generierenden Aktivität in einem Cut-Off-Filter trypsiniert. Dazu wurden jeweils etwa 100 µg Protein entsprechende Volumina der IEX-Fraktionen in einen Cut-Off-Filter (3 kDa, Sigma Aldrich) überführt und durch Zentrifugation bei 14000 rcf auf ein Restvolumen von 50 µL konzentriert. Zur Denaturierung der Proteine wurden 450 µL einer 6 M Harnstoff-Lösung zugegeben und die Proben erneut durch Zentrifugation bei 14000 rcf auf ein Restvolumen von 50 µL konzentriert. Die Reduktion von Disulfidbrücken erfolgte durch Zugabe von 5.6 µL DTT (100 mM in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) und Inkubation für 30 min bei 60 °C. Die Proben wurden zur Alkylierung mit 5.6 µL IAA (300 mM in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HO}_3$ ) versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Die Trypsinierung fand nach Zugabe von 1.5 µg Trypsin pro 100 µg Protein über Nacht bei 37 °C statt. Die Inkubationslösungen wurden zur Elution bei 14000 rcf zentrifugiert und anschließend lyophilisiert.

#### **5.14.3 Trypsinierung von Sub-Fraktionen eines HEK-293T-Zellextraktes zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen**

Um intrazelluläre U-II-generierende Enzyme in einem HEK-293T-Zellextrakt zu identifizieren, wurden die IEX-Fraktionen mit der höchsten U-II-generierenden Aktivität in einem Cut-Off-Filter trypsiniert. 385 µL der jeweiligen IEX-Fraktion wurden für 30 s sonifiziert und in einen Cut-Off-Filter (3 kDa, Sigma Aldrich) überführt. Die Proben wurden durch Zentrifugation bei 14000 rcf auf ein Restvolumen von 50 µL konzentriert, anschließend zur Denaturierung der Proteine jeweils zweimal mit 450 µL einer 6 M Harnstoff-Lösung versetzt und durch Zentrifugation auf ein Restvolumen von 50 µL konzentriert. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wurden die Proben mit 1.3 µL DTT (100 mM in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) versetzt und für 20 min bei 56 °C inkubiert. Die Proben wurde durch Zugabe von 1.3 µL IAA (300 mM in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) und Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln alkyliert. Die Trypsinierung erfolgte nach Zugabe von 425 µL 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  und 0.5 µg Trypsin über Nacht bei 37 °C. Die Inkubationslösungen wurden durch Zentrifugation bei 14000 rcf zur Elution gebracht und lyophilisiert.

#### **5.14.4 Trypsinierung der Enzyme Koagulationsfaktor XIa, Koagulationsfaktor XIIa, Thrombin, Plasmin und Plasma-Kallikrein zur Reinheitsbestimmung**

Zur Reinheitsbestimmung wurden die kommerziell erworbenen Enzyme Koagulationsfaktor XIa, Koagulationsfaktor XIIa, Thrombin, Plasmin und Plasma-Kallikrein in Lösung trypsinisiert. Jeweils 5 µg der Enzyme wurden verwendet und zur Denaturierung auf 50 µL mit einer 6 M Harnstoff-Lösung versetzt. Die Reduktion von Disulfidbrücken erfolgte durch Zugabe von 5.6 µL DTT (100 mM in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) und Inkubation für 30 min bei 60 °C. Die Proben wurden zur Alkylierung mit 5.6 µL IAA (300 mM in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Die Trypsinierung fand nach Zugabe von 425 µL einer 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung und 0.05 µg Trypsin über Nacht und bei 37 °C statt. Im Anschluss an die Trypsinierung wurden die Proben nach dem in 5.14.5 beschriebenen Protokoll entsalzt und lyophilisiert.

#### **5.14.5 Entsalzung von Inkubationslösungen der Trypsinierungen mittels C18-Festphasenextraktion**

Um die Inkubationslösungen der Trypsinierungen von Proteinfractionen bzw. Enzymen zu entsalzen, wurde eine Festphasenextraktion mithilfe einer RP SPE-Kartusche (Waters bzw. Phenomenex) durchgeführt. Die Entsalzungen der unterschiedlichen Trypsinierungen erfolgten mit abgeändertem Protokoll. Zur Entsalzung der trypsinisierten IEX-Fractionen 6 und 10 zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen der Cohn-Fraktion IV-4 wurden die SPE-Kartuschen mit 3 mL MeOH konditioniert, mit 3 mL MeOH/H<sub>2</sub>O 95/5 v/v + 0.2% FA äquilibriert, die Proben wurde nach Verdünnung auf 1 mL mit MeOH/H<sub>2</sub>O 95/5 v/v + 0.2% FA aufgetragen, mit 3 mL MeOH/H<sub>2</sub>O 95/5 v/v + 0.2% FA gewaschen und mit 1.5 mL MeOH/H<sub>2</sub>O 50/50 v/v eluiert. Die SPE-Kartusche für die Entsalzung der trypsinisierten IEX-Fraktion 18 zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen der Cohn-Fraktion IV-4 wurde mit 1 mL MeOH konditioniert, mit 1 mL 0.1% FA äquilibriert, die Probe wurde nach Verdünnung auf 1 mL mit 0.1% FA aufgetragen, mit 1 mL 0.1% FA gewaschen und mit 1 mL ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 v/v eluiert. Zur Entsalzung der trypsinisierten kommerziell erworbenen Enzyme wurden die SPE-Kartuschen mit 1 mL MeOH und 1 mL ACN/H<sub>2</sub>O 95/5 v/v + 1% FA konditioniert, mit 2 mL 1% FA äquilibriert, die Probe wurde nach Verdünnung auf 1 mL mit 1% FA aufgetragen, mit 1 mL 1% FA gewaschen und mit 1 mL ACN/H<sub>2</sub>O 95/5 v/v + 1% FA eluiert. Die jeweiligen Eluate wurden lyophilisiert.

### 5.15 MALDI-TOF-MS

Die U-II/URP-generierende Aktivität von Enzymen und Proteinfractionen wurde in entsprechenden Inkubationslösungen nach definierten Inkubationszeiten qualitativ mittels MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*) analysiert. Die Messungen erfolgten an einem MALDI-TOF-TOF-Massenspektrometer (ultrafleXtreme, Bruker Daltonik). Jeweils 1 µL der entsprechenden Inkubationslösung wurde in einer Konzentration von  $10^{-4}$  M mit 1 µL DHB-Lösung als Matrix (20 mg/mL DHB in H<sub>2</sub>O/ACN 70/30 v/v + 0.1% TFA) vermischt, auf ein MALDI-Groundsteeltarget aufgetragen und trocken gelassen. Davon abweichende Konzentrationen der Inkubationslösung sind im Kapitel Ergebnisse gekennzeichnet. Nach Injektion des MALDI-Targets in das Massenspektrometer wurden die Proben manuell vermessen. Die dabei verwendeten Messparameter sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Messparameter der qualitativen Untersuchung der U-II/URP-generierenden Aktivität von Enzymen und Proteinfractionen mittels MALDI-TOF-MS

Messbereich	500-5040 m/z
Polarität	positiv
Laserintensität	28%
Spektren pro Messung	1000
Spannung Ionenquelle 1	20.00 kV
Spannung Ionenquelle 2	17.87 kV
Linsenspannung	8.80 kV
Reflektorspannung 1	21.00 kV
Reflektorspannung 2	11.00 kV

Die Dateninterpretation und Auswertung erfolgte mithilfe der Data Analysis-Software (Version 4.0, Bruker Daltonik).

### 5.16 LC-ESI-TOF-MS

Zur qualitativen und quantitativen Untersuchung der U-II/URP-generierenden Aktivität von Enzymen und Proteinfractionen wurden die entsprechenden Inkubationslösungen nach definierten Inkubationszeiten mittels LC-ESI-TOF-MS (*liquid chromatography electrospray ionization time of flight mass spectrometry*) analysiert. Dazu wurde die Inkubationslösung nach 1:1-Verdünnung mit 0.1% FA in ein HPLC-System (1200 Series, Agilent Technologies), das an ein

ESI-TOF-Massenspektrometer (6224, Agilent Technologies) gekoppelt war, injiziert. Verdünnungen der Inkubationslösung, die davon abweichen, wurden im Kapitel Ergebnisse gekennzeichnet. Die chromatographische Trennung erfolgte mithilfe einer RP Trennsäule (PLRPS, 1000 Å, 5 µm, 50 x 2.1 mm, Agilent Technologies) mit einem linearen Gradienten mit H<sub>2</sub>O + 0.1% FA und ACN + 0.1% FA als Eluenten. Die Flussrate betrug 200 µL/min und das Injektionsvolumen 5 µL. In Tabelle 5 ist der verwendete Gradient dargestellt.

Tabelle 5: Linearer Gradient zur Untersuchung der U-II/URP-generierenden Aktivität in den Inkubationen der Peptidsubstrate UCE-S und URP-S mit Enzymen oder Proteinfractionen

<b>t [min]</b>	<b>H<sub>2</sub>O + 0.1% FA [%]</b>	<b>ACN + 0.1% FA [%]</b>
0	97	3
2.0	97	3
12.0	30	70
13.0	30	70
13.5	97	3
20.0	97	3

Zur besseren chromatographischen Auftrennung von URP-S und URP in den Inkubationen der Proprotein-Convertase 1 mit URP-S wurde zudem ein verlängerter Gradient mit H<sub>2</sub>O + 0.1% FA und ACN + 0.1% FA als Eluenten verwendet. Die Flussrate betrug 200 µL/min und das Injektionsvolumen 5 µL. Der verlängerte Gradient ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Verlängerter linearer Gradient zur Untersuchung der URP-generierenden Aktivität der Inkubation von URP-S mit der Proprotein-Convertase 1

<b>t [min]</b>	<b>H<sub>2</sub>O + 0.1% FA [%]</b>	<b>ACN + 0.1% FA [%]</b>
0	97	3
2.0	97	3
32.0	30	70
33.0	30	70
33.5	97	3
40.0	97	3

Die chromatographisch aufgetrennten Peptidsubstrate und entstandenen Proteolyseprodukte wurden online in das ESI-TOF-Massenspektrometer überführt, ionisiert und detektiert. Dabei wurden die in Tabelle 7 aufgelisteten Messparameter verwendet.

Tabelle 7: Messparameter der qualitativen und quantitativen Untersuchung der U-II/URP-generierenden Aktivität mittels LC-ESI-TOF-MS

Spektratenrate	1.03 Spektren/s
Messbereich	400-3200 m/z
Polarität	positiv
Temperatur Ionenquelle	325 °C
Trocknungsgasfluss	10 l/min
Nebulizer	30 psig
Fragmentorspannung	200 V
Kapillarspannung	4000 V

Um die Menge des gebildeten U-II bzw. URP zu bestimmen, wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt, in der die jeweilige Probe in einer Dreifachbestimmung analysiert wurde. Zur Quantifizierung wurde das EIC (extrahiertes Ionenchromatogramm) des entsprechenden Proteolyseproduktes anhand seines intensivsten m/z-Wertes mit einer Toleranz von +/- 0.25 bzw. +/- 0.50 m/z generiert. Das EIC wurde durch einen Gauß-Fit prozessiert und integriert. Die relativen Quantitäten der Proteolyseprodukte wurden aus den Peakflächen erhalten. Die Auswertung und Datenprozessierung erfolgte mithilfe der MassHunter Qualitative Analysis-Software (Version B.06.00, Agilent Technologies).

### 5.17 LC-ESI-Orbitrap-MS

Die Identifizierung von U-II/URP-generierenden Enzymen und die Reinheitsbestimmung von Enzymen erfolgte durch massenspektrometrische Analyse entsprechender Trypsinierungen von Enzymen und Proteinfractionen mittels LC-ESI-Orbitrap-MS (*liquid chromatography electrospray ionization orbitrap mass spectrometry*). Dazu wurden die trypsinierten Proben nach Lyophilisierung in 0.1% FA resuspendiert und in das LC-MS/MS-System überführt. Die Messungen erfolgten an einem LIT-Q-Orbitrap-Massenspektrometer (Orbitrap Fusion, Thermo Scientific), das an ein nano-HPLC-System (Dionex Ultimate 3000 RSLCnano, Thermo Scientific) gekoppelt vorlag oder an einem Q-Orbitrap-Massenspektrometer (Q-Exactive, Thermo Scientific), das an ein nano-HPLC-System (nanoACQUITY, Waters) gekoppelt vorlag. Zur Trennung

wurde die Probe mit einer Flussrate von 250 nL/min auf eine RP-Trapping-Säule (2 cm x 75 µm ID, Acclaim PepMap trap column, 3 µm, Thermo Scientific; nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 trap column, 180 µm x 20 mm, 5 µm, 100 Å, Waters) geladen und auf eine RP-Trennsäule (25 cm x 75 µm ID, Acclaim PepMap, 3 µm, Thermo Scientific; nanoACQUITY UPLC column, BEH 130 C18, 75 µm x 250 mm, 1.7 µM, 100 Å, Waters) eluiert. Die Trennung der tryptischen Peptide erfolgte durch einen schrittweisen Gradienten mit H<sub>2</sub>O + 0.1% FA und ACN + 0.1% FA als Eluenten und einer Flussrate von 250 nL/min. Es wurden unterschiedliche Gradienten für die LC-MS/MS-Messungen der Proben unterschiedlicher Trypsinierungen verwendet. Die verwendeten Gradienten sind in den Tabellen 8-10 dargestellt:

Tabelle 8: Schrittweiser Gradient zur chromatographischen Trennung tryptischer Peptide der IEX-Fractionen 6 und 10 zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen der Cohn-Fraktion IV-4

<b>t [min]</b>	<b>H<sub>2</sub>O + 0.1% FA [%]</b>	<b>ACN + 0.1% FA [%]</b>
0	98	2
5.0	98	2
35.0	70	30
40.0	30	70
42.0	30	70
45.0	98	2
70.0	98	2

Tabelle 9: Schrittweiser Gradient zur chromatographischen Trennung tryptischer Peptide der IEX-Fraktion 18 zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen der Cohn-Fraktion IV-4

<b>t [min]</b>	<b>H<sub>2</sub>O + 0.1% FA [%]</b>	<b>ACN + 0.1% FA [%]</b>
0	98	2
5.0	98	2
35.0	70	30
40.0	30	70
41.0	10	90
42.0	10	90
42.1	98	2
60.0	98	2

Tabelle 10: Schrittweiser Gradient zur chromatographischen Trennung tryptischer Peptide aus IEX-Fractionen zur Identifizierung von URP-generierenden Enzymen der Cohn-Fraktion IV-4, zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen eines HEK-293T-Zellextraktes und zur Reinheitsbestimmung von Enzymen

<b>t [min]</b>	<b>H<sub>2</sub>O + 0.1% FA [%]</b>	<b>ACN + 0.1% FA [%]</b>
0	97	3
5.0	97	3
35.0	72	28
40.0	65	35
40.1	10	90
50.0	10	90
50.1	97	3
70	97	3

Die eluierenden Peptide wurden online in das jeweilige ESI-Orbitrap-Massenspektrometer überführt. Die Ionisation, Auswahl von Vorläuferionen und Detektion von Vorläufer- und Fragmentationen wurde unter Verwendung folgender Messparameter durchgeführt, die sich je nach verwendetem Massenspektrometer und den durchgeführten Experimenten unterschieden. Die Messparameter sind in den Tabellen 11 und 12 dargestellt.

Tabelle 11: Messparameter der LC-MS/MS-Messungen der IEX-Fractionen 6 und 10 zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen der Cohn-Fraktion IV-4<sup>1</sup>, der IEX-Fractionen zur Identifizierung von URP-generierenden Enzymen der Cohn-Fraktion IV-4<sup>2</sup> sowie zur Reinheitsbestimmung von Enzymen<sup>2</sup> (Orbitrap Fusion)

Auflösung (MS <sup>1</sup> )	120000
Messbereich (MS <sup>1</sup> )	400-1300 m/z
Polarität	positiv
Temperatur Ionenquelle	300 °C
Kapillarspannung	1: 1700 V, 2: 1800 V
AGC target (MS <sup>1</sup> )	2e5
maximale Injektionszeit (MS <sup>1</sup> )	1: 50 ms, 2: 120 ms
Intensitätsgrenzwert Fragmentierung	1: 2e5, 2: 1e4
Ladungszustand Vorläufer	1: 2-6 2: 2-5
Selektionsfenster Vorläufer	1.6 m/z
Kollisionsenergie (HCD)	1: NCE 30, 2: 30
Scanrate Ionenfalle	rapid
AGC target (MS <sup>2</sup> )	e4
Maximale Injektionszeit (MS <sup>2</sup> )	1: 200 ms, 2: 60 ms

Tabelle 12: Messparameter der LC-MS/MS-Messungen der IEX-Fraktion 18 zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen der Cohn-Fraktion IV-4<sup>1</sup> sowie von IEX-Fraktionen eines HEK-293T-Zellextraktes zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen<sup>2</sup> (Orbitrap Q-Exactive)

Auflösung (MS <sup>1</sup> )	70000
Messbereich (MS <sup>1</sup> )	400-1300 m/z
Polarität	positiv
Temperatur Ionenquelle	1: 300 °C, 2: 275 °C
Kapillarspannung	1: 1800 V, 2: 4500 V
AGC target (MS <sup>1</sup> )	1: 1e6, 2: 3e6
maximale Injektionszeit (MS <sup>1</sup> )	60 ms
Intensitätsgrenzwert Fragmentierung	1e5
Ladungszustand Vorläufer	2-7
Selektionsfenster Vorläufer	1: 2 m/z, 2: 4 m/z
Kollisionsenergie (HCD)	1: NCE 25, 2: NCE 27
Auflösung (MS <sup>2</sup> )	17500
Messbereich (MS <sup>2</sup> )	200-2000 m/z
AGC target (MS <sup>2</sup> )	1: 5e5, 2: 1e5
Maximale Injektionszeit (MS <sup>2</sup> )	1: 60 ms, 2: 50 ms

### 5.18 Datenprozessierung und Datenbankabgleich zur Proteinidentifizierung

Zur Proteinidentifizierung anhand der Rohdaten der LC-MS/MS-Messungen wurde eine Datenprozessierung und ein Datenbankabgleich mit der MaxQuant-Software<sup>[109]</sup> (Version 1.6.1.0, Max-Planck-Gesellschaft) bzw. mit der Proteome Discoverer-Software (Version 2.0, Thermo Scientific) durchgeführt. Für die Auswertung mit der MaxQuant-Software wurde die Andromeda Suchmaschine verwendet und die MS-Toleranz wurde auf 4.5 ppm, die MS/MS-Toleranz auf 0.5 Da und die maximale Anzahl an nicht erfolgten proteolytischen Spaltungen auf 2 gesetzt. Die Carbamidomethylierung von Cysteinen wurde als feste Modifikation verwendet. In der Auswertung mit der Proteome Discoverer-Software wurde eine MS-Toleranz von 10 ppm, eine MS/MS-Toleranz von 0.5 Da und eine maximale Anzahl von 2 nicht erfolgten proteolytischen Spaltungen verwendet. Die Carbamidomethylierung von Cysteinen wurde als feste Modifikation verwendet.

## 6 Ergebnisse

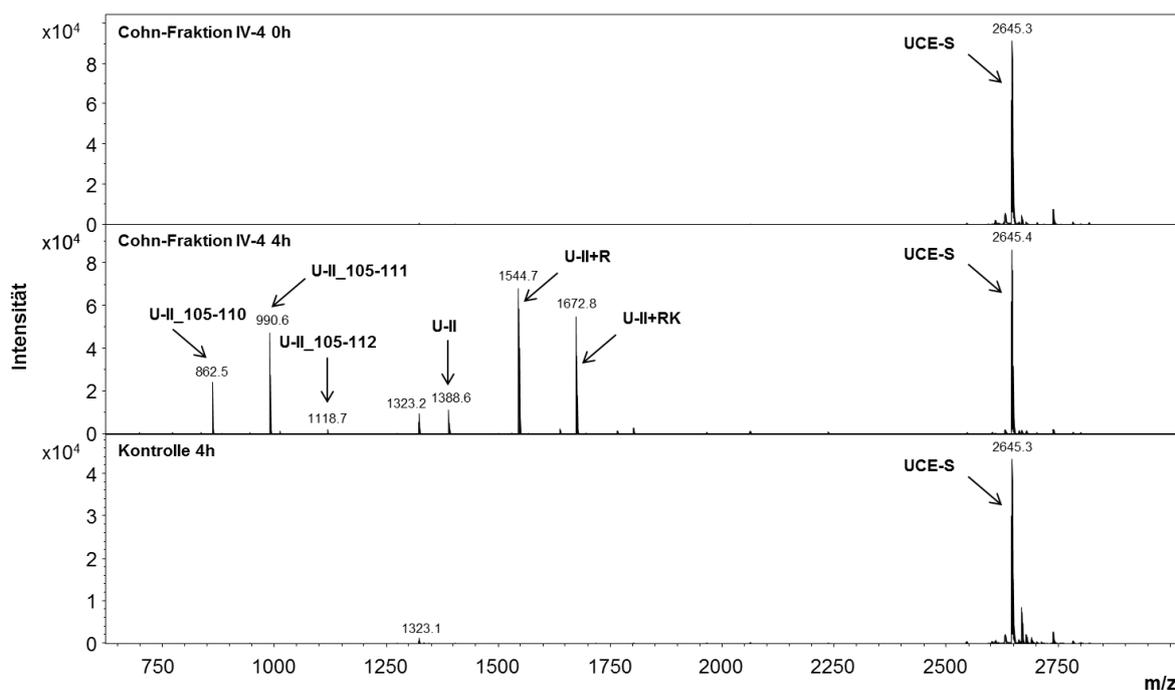
### 6.1 Untersuchung der U-II-generierenden Aktivität innerhalb der Blutzirkulation anhand der Cohn-Fraktion IV-4

Das folgende Kapitel (6.1) oder Teile daraus befinden sich derzeit zur Veröffentlichung eines Artikels mit dem Titel „Identifying circulating urotensin II and urotensin II-related peptide generating enzymes in the human plasma fraction Cohn IV-4“ in Revision bei der Fachzeitschrift Journal of Proteome Research der American Chemical Society (ACS).

Die proteolytische Prozessierung des U-II ist bisher nicht vollständig untersucht. In einer vorherigen Arbeit<sup>[11]</sup> wurde die Serin-Protease Plasma-Kallikrein als U-II-generierendes Enzym beschrieben und seine physiologische Relevanz mithilfe des Plasma-Kallikrein-Inhibitors PK15 festgestellt. Dennoch verblieb eine Restaktivität zur Bildung von U-II, die die Beteiligung weiterer, bisher unbekannter, U-II-generierender Enzyme impliziert.<sup>[11]</sup> Ausgehend von der Cohn-Fraktion IV-4, einer Unterfraktion des Blutplasmas, dessen Eignung als Quelle U-II-generierender Aktivität zuvor beschrieben wurde,<sup>[11]</sup> sollten alternative U-II-generierende Enzyme angereichert und identifiziert, sowie anschließend validiert werden. Zudem sollte die physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins zur Bildung von U-II weitergehend untersucht und bestätigt werden. Dabei sollte im Folgenden zunächst die U-II-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 validiert werden.

#### 6.1.1 Proteolytische Prozessierung von U-II durch die Cohn-Fraktion IV-4

Die Cohn-Fraktion IV-4 sollte als biologische Quelle zur Anreicherung und Identifizierung alternativer U-II-generierender Enzyme verwendet werden. Zunächst sollte die U-II-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 zur Etablierung eines qualitativen und quantitativen Massenspektrometrie-basierten Enzymassays (MES-Assay<sup>[108]</sup>) validiert werden. Dazu wurde die proteolytische Prozessierung des Peptidsubstrates UCE-S, das aus den 20 C-terminalen Aminosäuren des pre-pro-U-II besteht und das aktive U-II am C-Terminus enthält, durch die Cohn-Fraktion IV-4 mittels MALDI-TOF- und LC-ESI-TOF-MS bestimmt. Die Umsetzung des Peptidsubstrates UCE-S zu U-II zeigt dabei eine U-II-generierende Aktivität auf. Die Cohn-Fraktion IV-4 wurde an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und mit UCE-S inkubiert. In Abbildung 5 sind die MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubation von 200 µg der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S nach 4 h dargestellt:

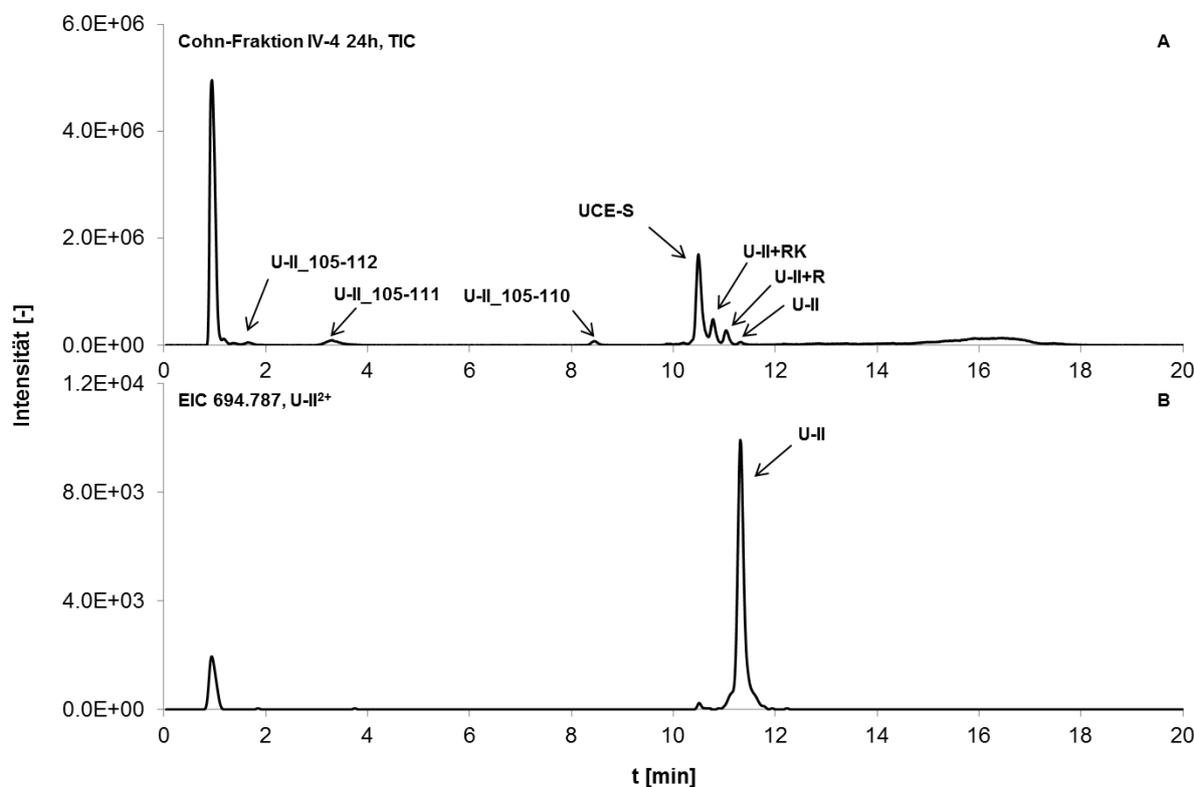


**Abbildung 5: MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S.** Nach 4 h Inkubation wurden U-II, U-II+R und U-II+RK anhand der  $m/z$ -Werte 1388.6, 1544.7 und 1672.8 sowie die N-terminalen Proteolyseprodukte U-II\_105-110, U-II\_105-111 und U-II\_105-112 anhand der  $m/z$ -Werte 862.5, 990.6 und 1118.7 detektiert. In der Negativkontrolle wurde nur das Peptidsubstrat UCE-S mit einem  $m/z$ -Wert von 2645.3 festgestellt, jedoch keine Proteolyseprodukte.

Sowohl in der Negativkontrolle als auch zu Beginn der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S ist das protonierte, einfach geladene Substrat UCE-S mit einem Signal bei  $m/z$  2645.3 zu erkennen, das zum Teil als doppelt protonierte, zweifach geladene Form mit einem  $m/z$ -Wert von 1323.1 vorliegt, jedoch keine Proteolyseprodukte. Nach 4 h Inkubation wurde ein intensives Signal bei  $m/z$  1388.6 detektiert, das auf aktives U-II zurückzuführen ist. Zudem wurden die zwei N-terminal um ein Arginin und um ein Arginin und Lysin verlängerten Formen U-II+R und U-II+RK anhand der  $m/z$ -Werte 1544.7 und 1672.8 detektiert. Neben U-II, U-II+R und U-II+RK sind die N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukte U-II\_100-110, U-II\_100-111 und U-II\_100-112 mit  $m/z$ -Werten von 862.5, 990.6 und 1118.7 zu erkennen. Dies entspricht einer dreifachen proteolytischen Prozessierung der tribasischen Schnittstelle  $\text{KKR}^{113}$ , jeweils C-terminal einer der Aminosäuren Lysin oder Arginin.

Zusätzlich zur qualitativen Untersuchung der entstandenen Proteolyseprodukte mittels MALDI-TOF-MS wurde die Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S mittels LC-ESI-TOF-MS untersucht, um eine Methode zur Quantifizierung entstandener Proteolyseprodukte in Folgeversuchen zu etablieren. Dazu wurde das Reaktionsgemisch der Inkubation chromatographisch getrennt und massenspektrometrisch analysiert. Die entsprechenden

Chromatogramme der Inkubation nach 24 h sind in Abbildung 6 und die korrespondierenden LC-ESI-TOF-MS-Spektren im Anhang auf den Abbildungen 43-49 dargestellt:



**Abbildung 6: LC-ESI-TOF-MS der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S.** A: TIC der Inkubation nach 24 h. U-II ( $m/z$  694.785,  $[M+2H]^{2+}$ ), U-II+R ( $m/z$  515.556,  $[M+3H]^{3+}$ ) und U-II+RK ( $m/z$  558.252,  $[M+3H]^{3+}$ ) wurden mit Retentionszeiten von 11.3, 11.0 und 10.8 min detektiert. Die N-terminalen Proteolyseprodukte U-II\_105-110 ( $m/z$  431.751,  $[M+2H]^{2+}$ ), U-II\_105-111 ( $m/z$  495.799,  $[M+2H]^{2+}$ ) und U-II\_105-112 ( $m/z$  559.846,  $[M+2H]^{2+}$ ) wurden mit Retentionszeiten von 8.5, 3.3 und 1.7 min detektiert. Das Peptidsubstrat UCE-S ( $m/z$  529.671,  $[M+5H]^{5+}$ ) eluierte nach 10.5 min. B: EIC des  $m/z$ -Wertes 694.787 ( $U-II^{2+}$ ) nach 24 h.

Im oberen Teil der Abbildung 6 ist der TIC der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S zu sehen. Das Peptidsubstrat UCE-S wurde mit einer Retentionszeit von 10.5 min in größtenteils fünffach geladener Form mit einem  $m/z$ -Wert von 529.671 festgestellt. Aktives U-II wurde mit einer Retentionszeit von 11.3 min und einem  $m/z$ -Wert von 694.785, der dem zweifach geladenen Peptid entspricht, detektiert. Außerdem sind die N-terminal verlängerten Formen U-II+R und U-II+RK mit Retentionszeiten von 11.0 und 10.8 min anhand der  $m/z$ -Werte 515.560 und 558.260, die den dreifach geladenen Peptiden entsprechen, zu erkennen. Die N-terminalen Proteolyseprodukte U-II\_105-110, U-II\_105-111 und U-II\_105-112 der Prozessierung der tribasischen Schnittstelle  $KKR^{113}$  wurden mit Retentionszeiten von 8.5, 3.3 und 1.7 min mit  $m/z$ -Werten von 431.751 ( $[M+2H]^{2+}$ ), 495.799 ( $[M+2H]^{2+}$ ) und 559.845 ( $[M+2H]^{2+}$ ) detektiert. Im unteren Teil der Abbildung 6 ist das EIC des  $m/z$ -Verhältnisses von 694.787, das dem zweifach

geladenen U-II entspricht, dargestellt. Es ist ein dominantes Signal mit einer Retentionszeit von 11.3 min zu erkennen, welches in Folgeexperimenten zur Quantifizierung der U-II-generierenden Aktivität von Enzymen, biologischen Proben und Sub-Fractionen verwendet wurde. Zusätzlich wurde ein schwaches Signal, coelulierend mit dem Substrat UCE-S, mit einer Retentionszeit von 10.5 min detektiert, was auf eine teilweise in der Ionenquelle stattfindende Fragmentierung des Substrates UCE-S hindeutet.

Die dominanten Proteolyseprodukte der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S, die mittels MALDI-TOF- und LC-ESI-TOF-MS detektiert wurden, sind in Tabelle 13 aufgelistet:

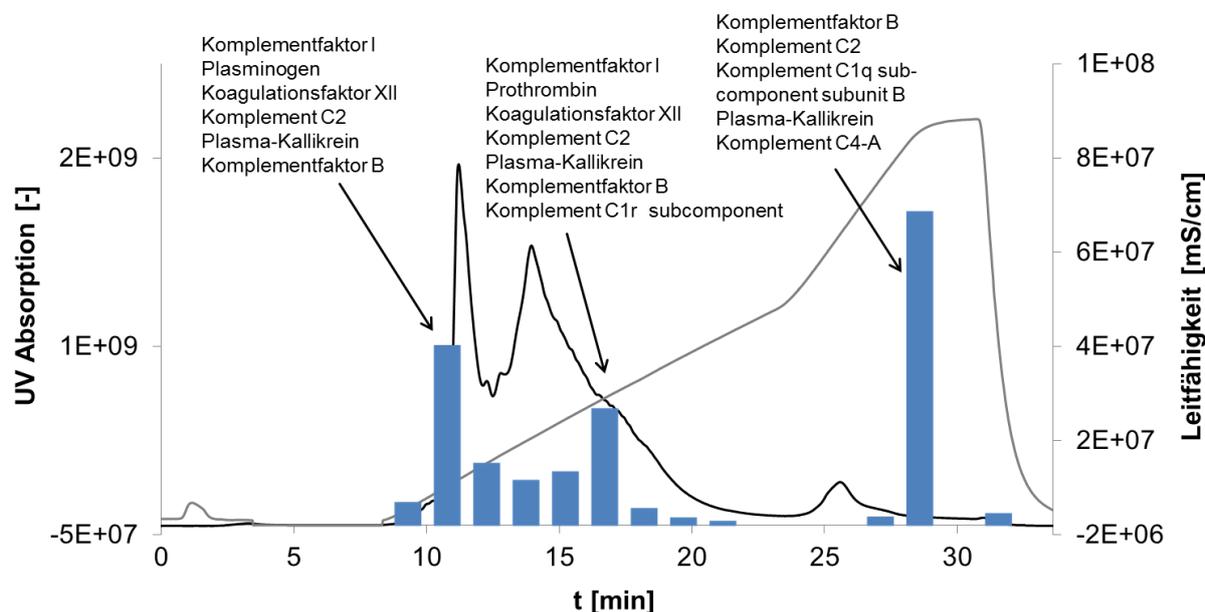
**Tabelle 13:** Proteolyseprodukte der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S sowie ihre Sequenzen, theoretischen Massen und detektierten m/z-Werte (MALDI-TOF-MS)

<b>Name</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>theoretische Masse</b>	<b>detektierter m/z-Wert</b>
U-II_114-124	U-II	ETPDCFWKYCV	1387.558	1388.6
U-II_113-124	U-II+R	RETPDCFWKYCV	1543.659	1544.7
U-II_112-124	U-II+RK	KRETPDCFWKYCV	1671.754	1672.8
U-II_105-112		RIWKPYKK	1117.676	1118.7
U-II_105-111		RIWKPYK	989.581	990.6
U-II_105-110		RIWKPY	861.486	862.5
U-II_105-124	UCE-S	RIWKPYKKRETPDCFWKYCV	2643.324	2645.3

### 6.1.2 Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4

Die Cohn-Fraktion IV-4 sollte als Ausgangsmaterial zur Identifizierung weiterer U-II-generierender Enzyme verwendet werden. Durch Kombination einer weiteren Fraktionierung und des Massenspektrometrie-basierten Assays zur Untersuchung enzymatischer Aktivitäten sollte eine Strategie verfolgt werden, in der zunächst eine Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 und eine anschließende Proteinidentifizierung in den aktivsten Fraktionen mittels Trypsinierung und LC-MS/MS durchgeführt wurde. Im Zuge dessen wurden 65 mg der Cohn-Fraktion IV-4 mittels Anionenaustauschchromatographie, bei der NaCl als Elutionsmittel verwendet wurde, auf 20 Sub-Fractionen fraktioniert. Die Sub-Fractionen wurden an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und für 24 h mit dem Peptidsubstrat UCE-S inkubiert, um die Menge an gebildetem U-II relativ zu quantifizieren. Dazu wurde jeweils das EIC des m/z-Verhältnisses von 694.781, das dem zweifach geladenen U-II entspricht, generiert und

integriert. Das entsprechende Chromatogramm des Anionenaustauschs sowie die durch die Sub-Fractionen im Elutionsbereich generierte Menge an U-II sind in Abbildung 7 dargestellt:



**Abbildung 7: Anionenaustauschchromatographie der Cohn-Fraktion IV-4, U-II-generierende Aktivität der Sub-Fractionen und identifizierte Proteasen.** Die Cohn-Fraktion IV-4 wurde mittels Anionenaustauschchromatographie (schwarz: UV-Absorption, grau: Leitfähigkeit) fraktioniert. Die U-II-generierende Aktivität der Sub-Fractionen wurde mithilfe des Massenspektrometrie-basierten Enzymassays bestimmt und ist anhand der integrierten Peakfläche des EICs mit dem m/z-Wert von 694.781, das dem zweifach geladenen U-II entspricht, in blau dargestellt. Eine Proteinidentifizierung innerhalb der drei aktivsten Fraktionen ergab die aufgelisteten Proteasen.

Dem Chromatogramm in Abbildung 7 ist zu entnehmen, dass mit zunehmendem NaCl-Gehalt (grau: Leitfähigkeit) die Elution der an die stationäre Phase gebundenen Proteine (schwarz: UV-Absorption) induziert wurde. Die Elution der Proteine begann nach etwa 9 min, wobei der Großteil der Proteine zwischen 10 und 20 min eluierte. Ein weiterer Peak im Chromatogramm ist nach etwa 25 min zu sehen. Die relative Quantifizierung des generierten U-II zeigte eine erhöhte enzymatische Aktivität der Fraktionen I5-I11, die zwischen 9 und 18 min eluieren, und wies damit ein ähnliches Profil wie das des Chromatogramms auf. Außerdem wurde für Fraktion I-18, die nach 28 min eluierte, eine hohe enzymatische Aktivität detektiert. Die Fraktionen I-6, I-10 und I-18 wiesen die höchste U-II-generierende Aktivität auf. Sie wurde im Folgenden zur Proteinidentifizierung trypsiniert, mittels LC-MS/MS analysiert und enthaltene Proteine wurden über einen Datenbankabgleich identifiziert. Dies resultierte in den in Abbildung 7 aufgelisteten Proteasen.

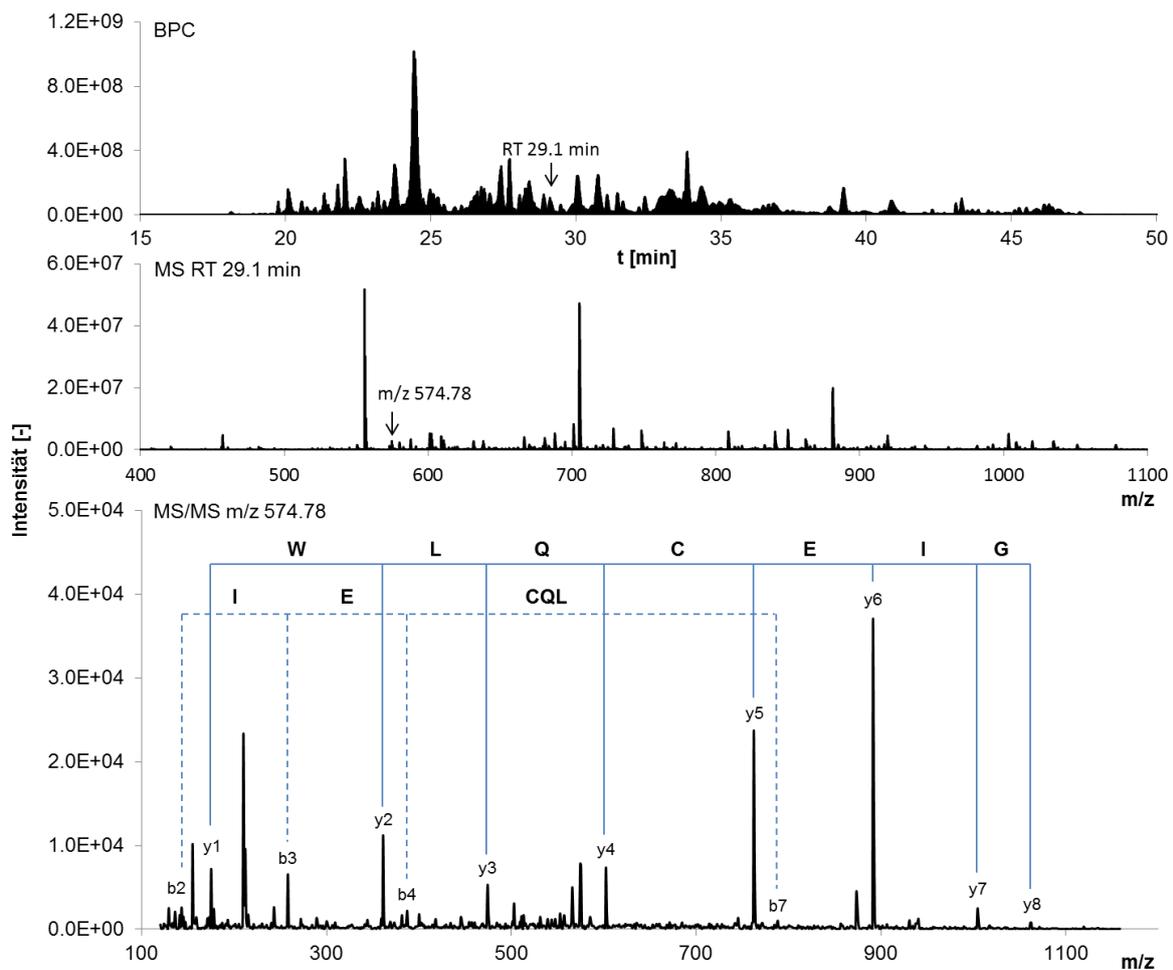
Die Strategie zur Identifizierung von U-II-generierenden Enzymen aus Fraktionierung, dem Massenspektrometrie-basierten Enzymassay und Proteinidentifizierung wurde in einem Parallelansatz erneut durchgeführt. Das resultierende Chromatogramm und die relative Quantifizierung des generierten U-II sind im Anhang auf den Abbildungen 50 und 51 dargestellt. In diesem Ansatz wurden die fünf Fraktionen mit der höchsten U-II-generierenden Aktivität (II-7, II-9, II-11 und II-25) zur Proteinidentifizierung durch Trypsinierung und LC-MS/MS verwendet. Im Folgenden werden die insgesamt in allen sieben Fraktionen identifizierten Proteine im Hinblick auf Proteasen und Protease-bezogene Proteine vertieft behandelt.

#### **6.1.2.1 Proteinidentifizierung in Sub-Fractionen der Cohn-Fraktion IV-4 mittels Trypsinierung und LC-MS/MS**

Zur Identifizierung der für die U-II-generierenden Aktivität verantwortlichen Proteasen wurde eine Proteinidentifizierung der Fraktionen I-6, I-10, I-18, II-7, II-9, II-11 und II-25 durch Trypsinierung und LC-MS/MS durchgeführt. Dazu wurden jeweils etwa 100 µg Protein der Fraktionen verwendet. Die in den Proteinen enthaltenen Disulfidbrücken wurden zunächst mit DTT reduziert und freie Cysteinreste dann mit IAA alkyliert. Der tryptische Verdau wurde durch Zugabe von Trypsin gestartet. Da Trypsin eine spezifische endoproteolytische Aktivität C-terminal von Arginin und Lysin aufweist,<sup>[110,111]</sup> handelt es sich bei den Proteolyseprodukten um Peptide mit einem C-terminalen Arginin- oder Lysinrest. Diese tryptischen Peptide wurden dann mittels LC-MS/MS, in diesem Fall LC-nanoESI-Orbitrap-MS, vermessen, wobei eine chromatographische Trennung mit einem langen Gradienten durchgeführt wurde, um die Proben effizient aufzutrennen. Während der LC-MS/MS-Messung werden kontinuierlich *full-scan*-Spektren aufgenommen, mithilfe derer die Precursor-Massen intakter tryptischer Peptide bestimmt werden. In einer Messung im *data-dependent acquisition* Modus (DDA) werden automatisch die Substanzen mit den intensivsten Signalen im MS-Spektrum zu jedem Zeitpunkt selektiert und durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) fragmentiert. Die  $m/z$ -Werte entstandener Fragmentationen werden ebenfalls detektiert und bilden das MS/MS-Spektrum des jeweiligen Precursors.<sup>[112,113]</sup> In diesem sind unter Anderen sogenannte b- und y-Ionen zu erkennen, die aus Spaltung der Amidbindung resultieren und Teil einer b- bzw. y-Ionenserie sind.<sup>[112,114]</sup> Die Massendifferenz zweier benachbarter Ionen derselben Ionenserie entspricht der Masse der jeweiligen Aminosäure, sodass die Peptidsequenz eines Peptids aus einem MS/MS-Spektrum ermittelt werden kann. Die Kombination aus Precursor-Masse und den Fragment-Massen wird schließlich zur Identifizierung von unbekanntem tryptischen Peptiden mittels

Datenbankabgleich verwendet. Ein Protein wird also auf Peptidebene über seine korrespondierenden tryptischen Peptide identifiziert.<sup>[112,113]</sup>

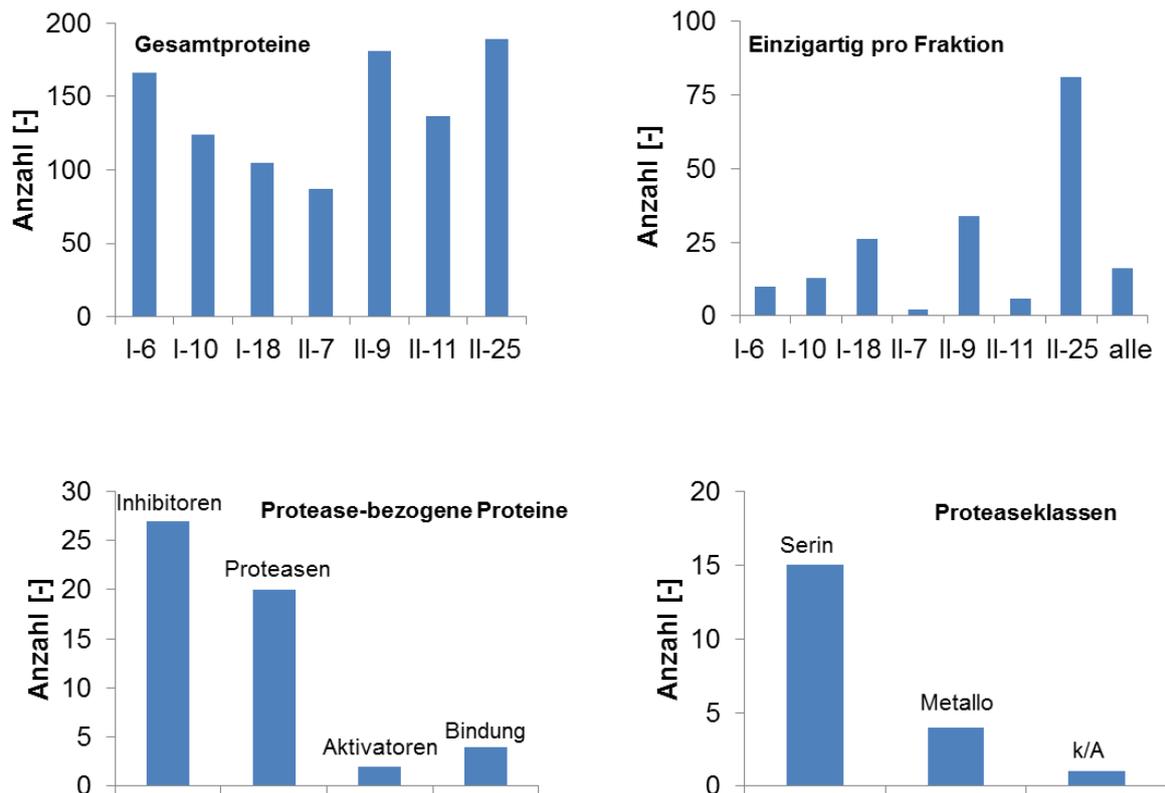
Das Konzept der Proteinidentifizierung wird am Beispiel der Identifizierung eines tryptischen Peptids des Thrombins näher veranschaulicht. In Abbildung 8 ist das BPC der chromatographischen Trennung der tryptischen Peptide aus der Sub-Fraktion I-10 dargestellt. Außerdem sind das MS- und MS/MS-Spektrum, mithilfe derer das tryptische Peptid SGIECQLWR des Thrombins identifiziert wurde, dargestellt:



**Abbildung 8: Chromatogramm der LC-MS/MS-Messung der Sub-Fraktion I-10 sowie MS- und MS/MS-Spektrum zur Identifizierung von Thrombin.** Im oberen Teil der Abbildung ist das BPC der chromatographischen Trennung der Sub-Fraktion I-10 dargestellt. Ein Großteil der tryptischen Peptide eluierte zwischen 19 und 47 min. Im mittleren und unteren Teil der Abbildung sind das MS-Spektrum zum Zeitpunkt 29.1 min und das MS/MS-Spektrum eines Vorläufers bei m/z 574.78 dargestellt. Das entsprechende tryptische Peptid wurde anhand des MS/MS-Spektrums mittels Datenbankabgleich als das Peptid SGIECQLWR des Thrombins identifiziert.

Das BPC der chromatographischen Trennung von tryptischen Peptiden der Subfraktion I-10 ist im oberen Teil der Abbildung 8 dargestellt. Zwischen 19 und 47 min ist die Elution zahlreicher tryptischer Peptide im Chromatogramm erkennbar. Die Messung wurde im DDA-Modus durchgeführt. Daher wurden die tryptischen Peptide mit den intensivsten Signalen im MS-Spektrum automatisch selektiert und fragmentiert und ihre MS/MS-Spektren aufgezeichnet. Im vorliegenden Beispiel wurde nach 29.1 min ein tryptisches Peptid mit einem m/z-Wert von 574.7802 detektiert (mittlerer Teil der Abbildung), das automatisch selektiert und durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) fragmentiert wurde. Das entsprechende Fragmentspektrum ist im unteren Teil der Abbildung 4 dargestellt. Die b- und y-Ionen, die auf eine Spaltung der Amidbindungen innerhalb des Peptids zurückzuführen sind,<sup>[112,114]</sup> sind annotiert. Aus der Massendifferenz zweier benachbarter Ionen derselben Serie ergibt sich schließlich die in Abbildung 4 dargestellte Teilsequenz des tryptischen Peptids. Insgesamt wurden vier b-Ionen und acht y-Ionen des Peptids detektiert, das per Datenbankabgleich mit hoher Übereinstimmung als das Peptid SGIECQLWR des Thrombins identifiziert wurde. Dieses hat eine theoretische Masse von 1090.512 Da, woraus sich eine Abweichung von 57.034 Da zur experimentell ermittelten Masse ergibt. Diese Abweichung ist auf eine Carbamidomethylierung des Cysteinrestes zurückzuführen, die als Folge der Alkylierung zuvor reduzierter Cysteinreste auftritt. Da drei weitere einzigartige tryptische Peptide des Thrombins detektiert wurden, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Identifizierung auszugehen.

Insgesamt wurden die Fraktionen I-6, I-10, I-18, II-7, II-9, II-11 und II-25 mittels LC-nanoESI-Orbitrap-MS im DDA-Modus analysiert. Eine Übersicht aller mindestens anhand eines tryptischen Peptids identifizierter Proteine sowie die Anzahl an Proteasen und Protease-bezogenen Proteinen sind in Abbildung 9 dargestellt:



**Abbildung 9: Insgesamt identifizierte Proteine, Proteasen und Protease-bezogene Proteine.** Insgesamt wurden 399 unterschiedliche Proteine in den Fraktionen I-6, I-10, I-18, II-7, II-9, II-11 und II-25 identifiziert. Die Überschneidung identifizierter Proteine unter den Fraktionen ist relativ hoch. Die meisten ausschließlich in einer Fraktion identifizierten Proteine wurden in den Fraktionen I-18, II-9 und II-25 detektiert. Es wurden 20 Proteasen identifiziert, von denen 15 den Serinproteasen und vier den Metalloproteasen zugeordnet werden konnten. Eine weitere Protease konnte keiner Proteaseklasse zugeordnet werden.

Insgesamt wurden in allen Fraktionen 399 Proteine identifiziert. Die Zahl der Identifikationen betrug 166, 124 und 105 für die Fraktionen I-6, I-10 und I-18 der ersten Anreicherung und 87, 181, 137 und 189 für die Fraktionen II-7, II-9, II-11 und II-25 der zweiten Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität. Die Anzahl der ausschließlich in den Fraktionen I-6, I-10, II-7 und II-9 identifizierten Proteine war mit 10, 13, 2 und 6 relativ gering. Ausschließlich in den Fraktionen I-18, II-9 und II-25 wurden 26, 34 und 81 Proteine identifiziert. Die höhere Zahl einzigartiger Proteine der Fraktionen II-9 und II-25 korreliert mit der generell hohen Zahl an Identifikationen. Die Fraktionen I-18 und II-25 liegen zudem isoliert im hinteren Elutionsbereich, während die Fraktionen I-6, I-10, II-7, II-9 und II-11 in einem ähnlichen Retentionsbereich vorliegen. Es wurden 16 Proteine in allen Fraktionen identifiziert. Insgesamt wurden in allen Fraktionen 20 Proteasen identifiziert. Zudem wurden 27 Proteaseinhibitoren, zwei Proteaseaktivatoren und 4 Protease-bindende Proteine identifiziert. Bei 53 der 399 insgesamt identifizierten Proteine handelte es sich somit um Proteasen oder Protease-bezogene Proteine. Von den 20 Proteasen

ließen sich 15 den Serinproteasen, vier den Metalloproteasen und eine keiner Proteaseklasse zuordnen. Eine Auflistung aller identifizierten Proteasen, mit Informationen über ihre Schnittspezifität, ist in Tabelle 14 dargestellt:

**Tabelle 14:** Identifizierte Proteasen, zugehörige Proteaseklasse und Informationen über die Schnittspezifität<sup>[110,111,115]</sup>

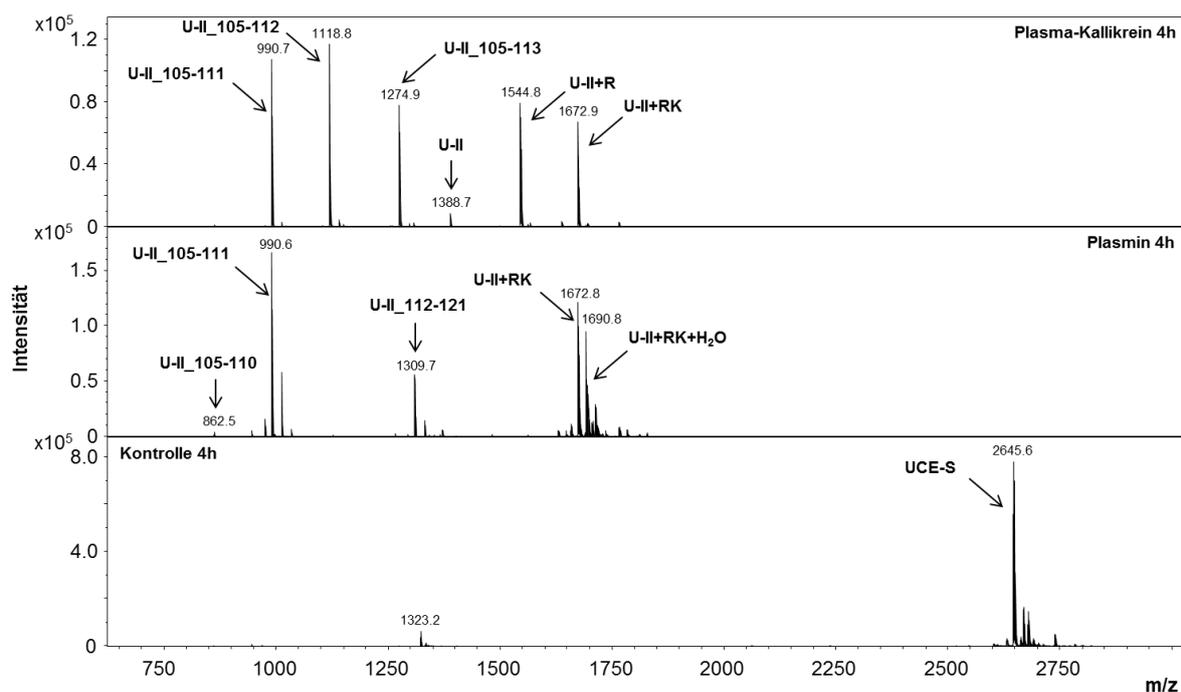
<b>Protease</b>	<b>Proteaseklasse</b>	<b>bekannte Schnittspezifität</b>
Haptoglobin related protein	Serin	enzymatisch inaktiv
Haptoglobin	Serin	enzymatisch inaktiv
Hepatocyte growth factor activator	Serin	Arg- -Val
Koagulationsfaktor XII	Serin	Arg- -Ile
Komplementfaktor B	Serin	Arg- -Ser, Arg- -Xaa
Komplement C1r subcomponent	Serin	Arg- -Ile, Lys- -Ile
Komplement C1r subcomponent-like protein	Serin	k/A
Komplementfaktor I	Serin	k/A
Komplement C2	Serin	Arg- -Ser, Arg- -Xaa
Plasma-Kallikrein	Serin	Arg- -Xaa, Lys- -Xaa
Plasminogen	Serin	Arg- -Xaa, Lys- -Xaa
Prothrombin	Serin	Arg- -Gly
Serin Protease 58	Serin	Arg- -Xaa, Lys- -Xaa
Trypsin 3	Serin	Arg- -Xaa, Lys- -Xaa
Vitamin K-dependent protein Z	Serin	enzymatisch inaktiv
Beta-Ala-His Dipeptidase	Metallo	Xaa- -His-Dipeptid, Dipeptide
Carboxypeptidase B2	Metallo	Freisetzung C-terminaler Arg- und Lys-Reste
Carboxypeptidase N catalytic chain	Metallo	Freisetzung basischer C-terminaler Aminosäuren
Matrix-Metalloproteinase-15	Metallo	-/Ser/-/- -Leu, Ser/Gln/-/-
Dermcidin	k/A	Arg- -Xaa, Lys- -Xaa

Der Tabelle 14 sind die identifizierten Proteasen und ihre überwiegend aus den Datenbanken Uniprot<sup>[111]</sup> und MEROPS<sup>[110]</sup> ermittelten proteolytischen Schnittspezifitäten zu entnehmen. Die proteolytische Prozessierung der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup> zur Generierung von aktivem

U-II erfordert eine Schnittspezifität C-terminal des Argininrestes an Position 113. Von den 20 identifizierten Proteasen werden die Proteine Haptoglobin, Haptoglobin related Protein und Vitamin K-dependent Protein Z als proteolytisch inaktiv beschrieben. Bei der Carboxypeptidase B2 und der Carboxypeptidase N catalytic chain handelt es sich um Proteasen, die Aminosäuren vom C-Terminus abspalten, also um Exoproteasen. Diese sind für die hier untersuchte endoproteolytische Prozessierung nicht geeignet. Die Beta-Ala-His Dipeptidase ist ebenfalls ungeeignet, da es sich bei ihren Proteolysesubstraten um Dipeptide handelt. Die für die Matrix-Metalloproteinase-15 erhaltene Schnittspezifität ist unabhängig von basischen Schnittmotiven und somit unpassend für die Generierung von U-II. Für den Komplementfaktor I und das Komplement C1r subcomponent-like protein ist nach der Uniprot- und der MEROPS-Datenbank keine Schnittspezifität beschrieben. Die übrigen Kandidaten, bei denen es sich mit Ausnahme des Dermcidins ausschließlich um Serinproteasen handelt, bewirken eine Proteolyse bevorzugt C-terminal von Arginin oder C-terminal von Arginin und Lysin. Sie sind damit grundsätzlich geeignet zur proteolytischen Prozessierung von U-II. Von diesen ist jedoch für die Proteasen Thrombin, Hepatocyte growth factor activator, Koagulationsfaktor XIIa und Komplement C1r subcomponent eine aliphatische Aminosäure in P1'-Position der Schnittstelle als bevorzugt beschrieben, was von der sauren Glutaminsäure in Position 114 des pre-pro-U-II abweicht. Die Proteasen Komplement C2, Serin Protease 58, Plasma-Kallikrein, Plasmin, Komplementfaktor B und Dermcidin verfügen über die geeignete Schnittspezifität Arg-|-Xaa. Von diesen wurde der Komplementfaktor B bereits in einer vorherigen Arbeit negativ auf seine U-II-generierende Aktivität getestet und entsprechend in dieser Arbeit vernachlässigt.<sup>[11]</sup> Die Serin Protease 58 und Dermcidin wurden nur anhand eines tryptischen Peptids identifiziert, weshalb ihre Identifizierung eine geringere Konfidenz aufweist. Aus diesem Grund und der geringen kommerziellen Verfügbarkeit wurde Dermcidin ebenfalls vernachlässigt. Auch der Hepatocyte growth factor activator wurde hier nicht in Betracht gezogen, da er nur anhand eines tryptischen Peptids identifiziert wurde. Im Folgenden sollten auf dieser Grundlage die Proteasen Komplement C2, Serin Protease 58 und Plasmin auf ihre U-II-generierende Aktivität hin untersucht werden. Die Proteasen Plasma-Kallikrein und Komplementfaktor I wurden in vorherigen Arbeiten als U-II-generierende Enzyme beschrieben. Sie wurden daher ebenfalls zur Validierung ihrer U-II-generierenden Aktivität und im Falle des Plasma-Kallikreins zur Validierung seiner physiologischen Relevanz als U-II-generierendes Enzym untersucht. Die Kandidatenliste wurde um die Proteasen Thrombin und den Koagulationsfaktor XIIa erweitert, aufgrund ihrer Schnittspezifität C-terminal von Arginin und ihrer kommerziellen Verfügbarkeit.

### 6.1.3 Validierung potentieller U-II-generierender Enzyme

Die potentielle U-II-generierende Aktivität sollte für die geeignetsten Kandidaten der zuvor angereicherten und identifizierten Proteasen untersucht und validiert werden. Dazu wurden die Proteasen Plasma-Kallikrein, Plasmin, Thrombin, Komplementfaktor I, Koagulationsfaktor XIIa, Serin Protease 58 und Komplement C2 kommerziell erworben. Plasma-Kallikrein und der Komplementfaktor I wurden bereits in vorherigen Arbeiten als U-II-generierende Enzyme beschrieben, von denen besonders Plasma-Kallikrein eine sehr hohe Aktivität zeigte.<sup>[11,91]</sup> Die Proteasen Serin Protease 58, Plasmin und Komplement C2 wurden ausgewählt, da ihre Schnittspezifität C-terminal von Arginin bzw. C-terminal von Arginin und Lysin der erforderlichen Schnittspezifität zur Prozessierung der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup> entspricht. Thrombin und der Koagulationsfaktor XIIa schienen ebenfalls geeignet aufgrund ihrer Schnittspezifität C-terminal von Arginin, jedoch mit bevorzugten aliphatischen Aminosäuren in P1'-Position der Schnittstelle. Dies weicht von der in P1'-Position befindlichen Glutaminsäure des pre-pro-U-II ab. Aufgrund der übereinstimmenden Schnittspezifität bezüglich der P1-Position und der guten kommerziellen Verfügbarkeit wurden Thrombin und der Koagulationsfaktor XIIa dennoch verwendet. Die kommerziell erworbenen Proteasen wurden zur Validierung einer potentiellen U-II-generierenden Aktivität an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und mit UCE-S inkubiert. In Abbildung 10 sind die MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubation von jeweils 1 µg Plasma-Kallikrein und Plasmin mit UCE-S nach 4 h Inkubation dargestellt:

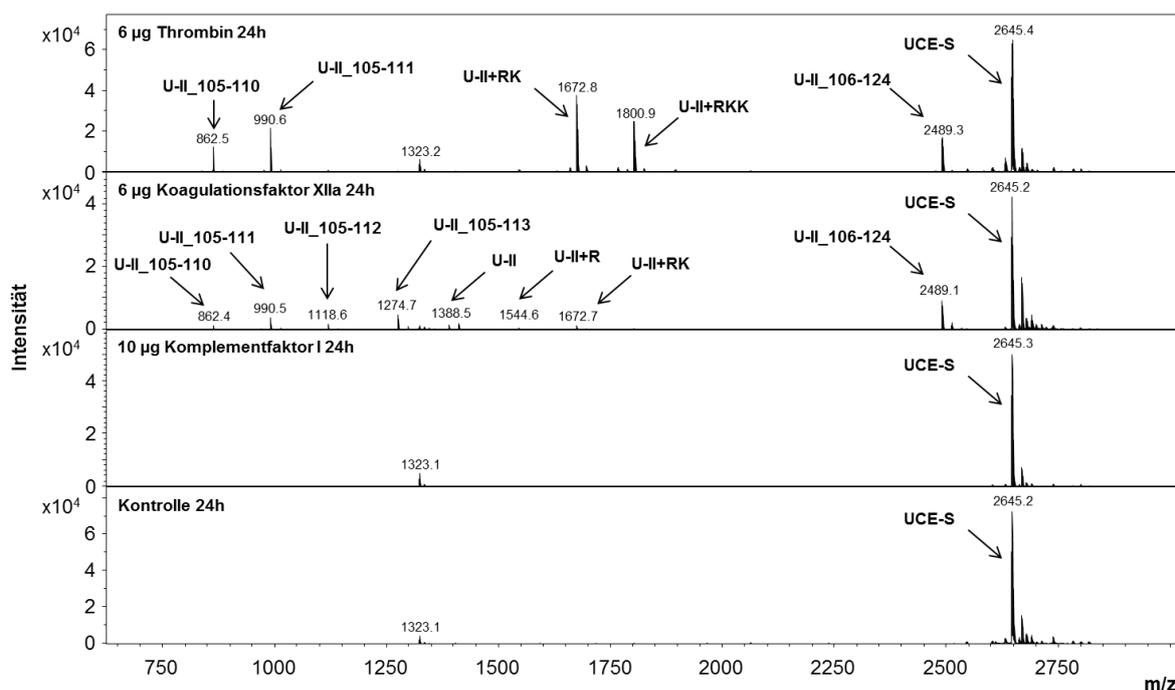


**Abbildung 10: MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubationen von Plasma-Kallikrein und Plasmin mit UCE-S.** Nach 4 h Inkubation von Plasma-Kallikrein mit UCE-S wurden U-II, U-II+R und U-II+RK und die N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukte U-II\_105-111, U-II\_105-112 und U-II\_105-113 detektiert. Die Inkubation mit Plasmin führte zur Bildung von U-II+RK und U-II+RK+H<sub>2</sub>O. Außerdem wurden die Proteolyseprodukte U-II\_105-110, U-II\_105-111 und U-II\_112-121 detektiert. Der Negativkontrolle ist das Peptidsubstrat UCE-S zu entnehmen.

Nach 4 h Inkubation des Plasma-Kallikreins mit UCE-S wurden U-II und die N-terminal verlängerten Formen U-II+R und U-II+RK detektiert. Zudem sind die N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukte U-II\_105-111, U-II\_105-112 und U-II\_105-113 zu erkennen. Dies entspricht einer dreifachen proteolytischen Prozessierung der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup>, jeweils C-terminal von Lysin oder Arginin, durch Plasma-Kallikrein. Das Peptidsubstrat UCE-S wurde in der Inkubation mit Plasma-Kallikrein nicht detektiert, was eine sehr hohe proteolytische Aktivität von 1  $\mu$ g Plasma-Kallikrein zeigt. Auch für Plasmin wurde der vollständige Abbau des Peptidsubstrates UCE-S nach 4 h Inkubation und daher eine hohe proteolytische Aktivität festgestellt. Die N-terminal verlängerte Form U-II+RK wurde mit einem intensiven Signal detektiert. U-II+RK wurde zusätzlich anhand des m/z-Wertes 1690.8 detektiert, also mit einem Massenshift von 18 Da. Der Massenshift lässt sich durch Proteolyse C-terminal des Lysinrestes K<sup>121</sup> innerhalb der zyklischen Struktur des U-II erklären, die an dieser Stelle zu einem zusätzlichen Wassermolekül im Proteolyseprodukt führt. Die bei der Proteolyse an dieser Schnittstelle entstehenden Fragmente U-II\_112-121 und U-II\_122-124 blieben über die Disulfidbrücke miteinander verknüpft, so dass eine Erhöhung der Masse detektiert wurde. Ein

weiteres intensives Signal wurde bei  $m/z$  1309.7 detektiert, das dem U-II<sub>112-121</sub> zuzuordnen ist. Seine Bildung erfordert ebenfalls sowohl eine Spaltung C-terminal des Lysinrestes K<sup>111</sup> und C-terminal des im zyklischen Hexapeptid befindlichen Lysinrestes K<sup>121</sup>. In diesem Fall blieben die Fragmente U-II<sub>112-121</sub> und U-II<sub>122-124</sub> also nicht verbunden, was eine Reduktion der Disulfidbrücke impliziert. Zusammenfassend wurde für Plasma-Kallikrein die proteolytische Prozessierung der gesamten tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup> und eine hohe U-II-generierende Aktivität detektiert. Für Plasmin wurde hauptsächlich eine proteolytische Prozessierung C-terminal des Lysinrestes K<sup>111</sup> und eine proteolytische Prozessierung C-terminal der Lysinreste K<sup>111</sup> und K<sup>121</sup> detektiert. Eine U-II-generierende Aktivität wurde nicht detektiert.

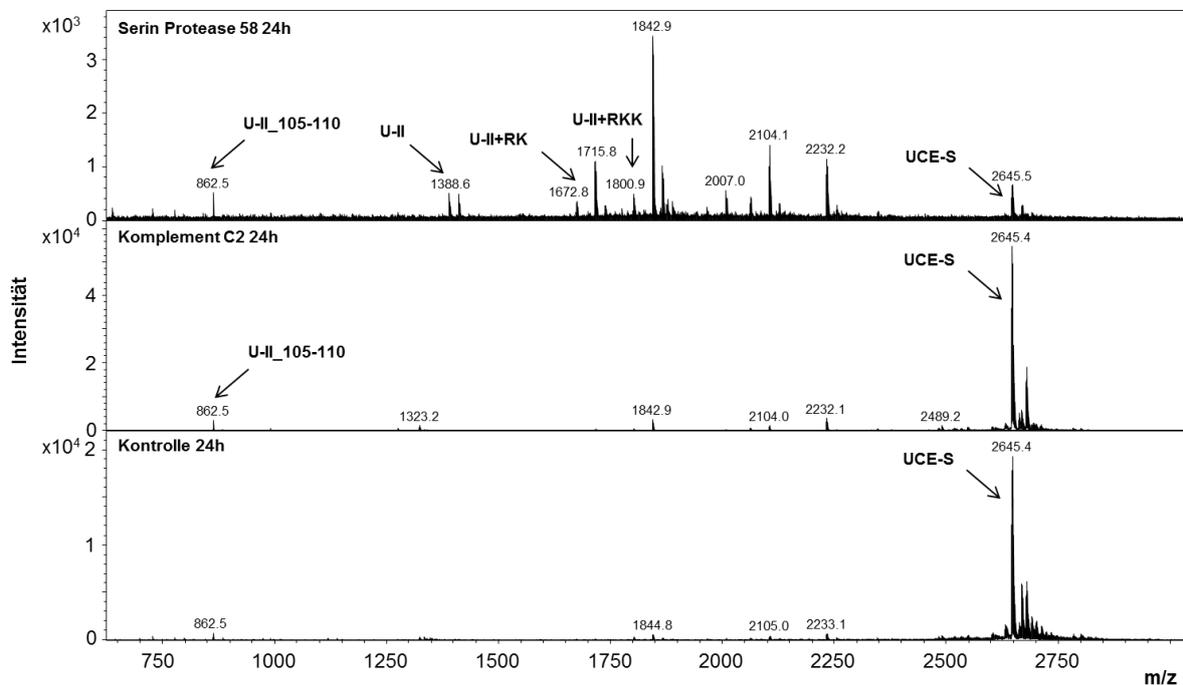
Die Inkubation von 1 µg der Proteasen Thrombin, Komplementfaktor I und Koagulationsfaktor XIIa mit UCE-S führte nach 4 h nicht zu deutlich detektierbaren Proteolyseprodukten und nicht zur erkennbaren Bildung von U-II. Die entsprechenden MALDI-TOF-MS-Spektren sind im Anhang in Abbildung 52 dargestellt. Daher wurde die Inkubationen mit erhöhter Enzymkonzentration und verlängerter Inkubationszeit wiederholt. In Abbildung 11 sind die MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubationen von 6 µg Thrombin, 10 µg Komplementfaktor I und 6 µg Koagulationsfaktor XIIa mit UCE-S nach 24 h dargestellt:



**Abbildung 11: MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubationen von Thrombin, Komplementfaktor I und Koagulationsfaktor XIIIa mit UCE-S.** Nach 24 h Inkubation von Thrombin mit UCE-S wurden U-II+RK und U-II+RKK sowie die N-terminalen Proteolyseprodukte U-II\_105-110 und U-II\_105-111 detektiert. Zusätzlich wurde das Proteolyseprodukt U-II\_106-124 detektiert. Die Inkubation des Koagulationsfaktor XIIIa führte zur Bildung von U-II, U-II+R und U-II+RK. Außerdem wurden die Proteolyseprodukte U-II\_105-110, U-II\_105-111, U-II\_105-112, U-II\_105-113 und U-II\_106-124 detektiert. In der Inkubation des Komplementfaktor I sowie in der Negativkontrolle wurde nur das Peptidsubstrat UCE-S detektiert, jedoch keine Proteolyseprodukte.

Nach 24 h Inkubation des Thrombins mit UCE-S wurde das N-terminal verlängerte Proteolyseprodukt U-II+RK und die beiden N-terminalen Proteolyseprodukte U-II\_105-110 und U-II\_105-111 festgestellt. Es ist ein weiteres intensives Signal bei  $m/z$  1800.9 zu erkennen, das der N-terminal verlängerten Form U-II+RKK entspricht. Zudem wurde U-II\_106-124, das dem UCE-S nach Abspaltung des N-terminalen Argininrestes entspricht, mit einem  $m/z$ -Wert von 2489.3 detektiert. Eine proteolytische Prozessierung von UCE-S fand demnach dominant C-terminal des Argininrestes R<sup>105</sup>, des Tyrosinrestes Y<sup>110</sup> und des Lysinrestes K<sup>111</sup> statt. U-II und U-II+R wurden nur mit relativ geringen Intensitäten detektiert. In der Inkubation des Koagulationsfaktor XIIIa wurden nach 24 h U-II, U-II+R und U-II+RK sowie die N-terminalen Proteolyseprodukte U-II\_105-110, U-II\_105-111, U-II\_105-112 und U-II\_105-113 detektiert. Zudem wurde die Abspaltung des N-terminalen Argininrestes anhand des Proteolyseproduktes U-II\_106-124 beobachtet. Dies zeigt die proteolytische Prozessierung der gesamten tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup>, jeweils C-terminal von Arginin oder Lysin, und eine deutlich auftretende proteolytische Prozessierung C-terminal des Argininrestes R<sup>105</sup>. Die beobachtete proteolytische

Aktivität war im Vergleich zu Plasma-Kallikrein und Plasmin allerdings gering. In der Inkubation des Komplementfaktor I sowie in der Negativkontrolle wurde nur das Peptidsubstrat UCE-S detektiert, jedoch keine Proteolyseprodukte. Zusammenfassend wurde für Thrombin eine proteolytische Aktivität detektiert, und zwar hauptsächlich C-terminal der Aminosäuren R<sup>105</sup>, Y<sup>110</sup> und K<sup>111</sup>. Die Inkubation des Koagulationsfaktor XIIIa führte zur proteolytischen Prozessierung der gesamten tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup>, jeweils C-terminal von Arginin und Lysin, und zur Prozessierung C-terminal der Aminosäure R<sup>105</sup>. Die zuvor beschriebene U-II-generierende Aktivität des Komplementfaktor I<sup>[91]</sup> wurde in diesem Experiment nicht bestätigt. In Abbildung 12 sind die MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubationen von jeweils 2 µg der Serin Protease 58 und des Komplement C2 mit UCE-S nach 24 h dargestellt:

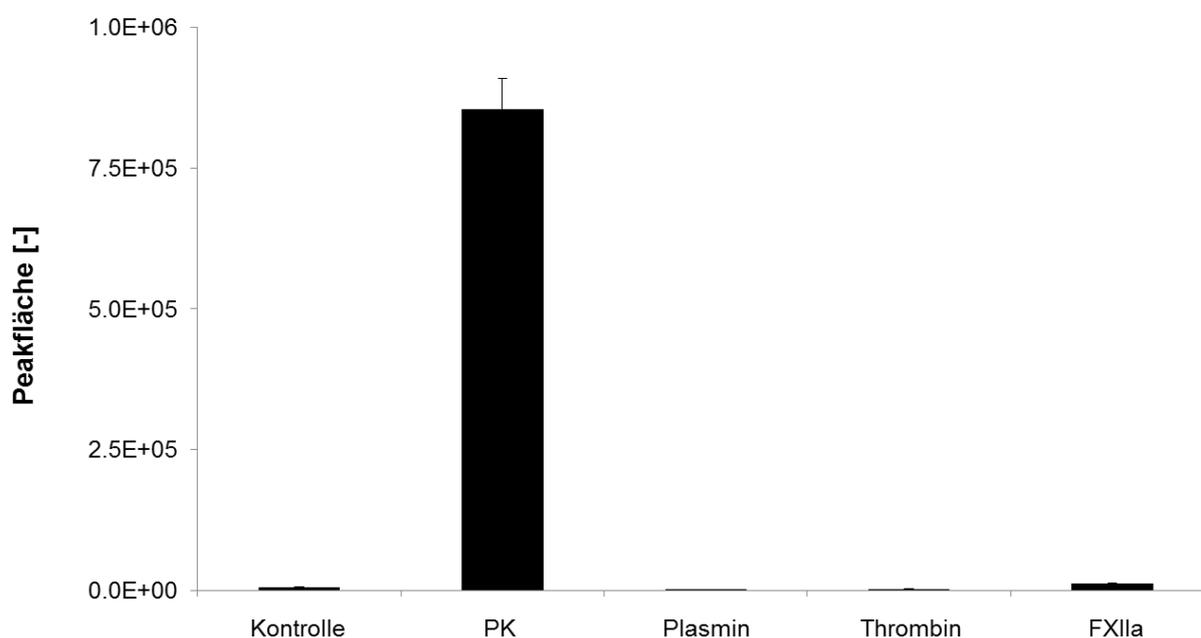


**Abbildung 12: MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubationen der Serin Protease 58 und des Komplement C2 mit UCE-S.** Nach 24 h Inkubation der Serin Protease 58 mit UCE-S wurden U-II, U-II+RK und U-II+RKK sowie das N-terminale Proteolyseprodukt U-II\_105-110 detektiert. In der Inkubation des Komplement C2 sowie in der Negativkontrolle wurde hauptsächlich das Peptidsubstrat UCE-S detektiert.

In der Inkubation der Serin Protease 58 mit UCE-S sind U-II, die N-terminal verlängerten Formen U-II+RK und U-II+RKK sowie das N-terminale Proteolyseprodukt U-II\_105-110 nach 24 h zu erkennen. Dies zeigt die proteolytische Prozessierung C-terminal der Aminosäuren Y<sup>110</sup>, K<sup>111</sup> und R<sup>113</sup>. Ein weiteres intensives Signal ist bei m/z 1715.8 zu erkennen, das der theoretischen Masse von U-II\_105-117 entspricht. Dies würde eine proteolytische Prozessierung C-terminal des Asparaginsäurerestes D<sup>117</sup> erfordern, die von der für die Serin Protease 58 beschriebenen

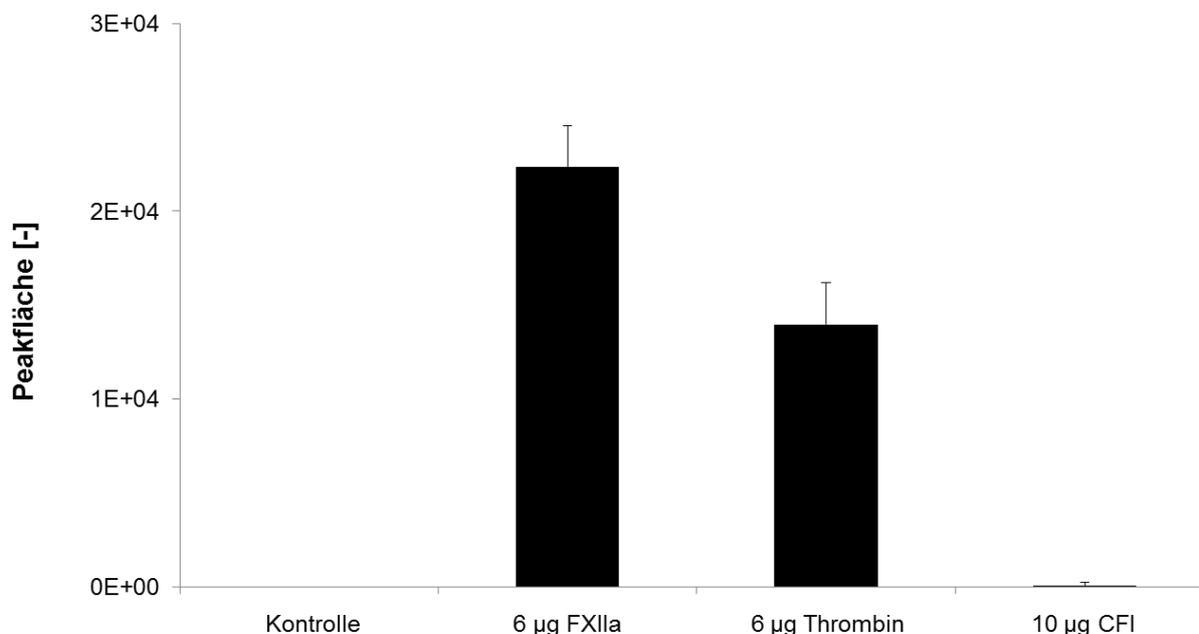
Schnittspezifität C-terminal von Arginin und Lysin<sup>[111]</sup> abweicht. Die m/z-Werte 1842.9, 2104.1 und 2232.2 sind ebenfalls in der Negativkontrolle zu sehen. In der Inkubation des Komplement C2 mit UCE-S wurden neben dem N-terminalen Proteolyseprodukt U-II<sub>105-110</sub> keine weiteren Proteolyseprodukte detektiert. Alle weiteren Signale sind ebenfalls in der Negativkontrolle zu erkennen. Zusammenfassend wurde für die Serin Protease 58 eine proteolytische Aktivität C-terminal der Aminosäuren Y<sup>110</sup>, K<sup>111</sup> und R<sup>113</sup> und somit eine U-II-generierende Aktivität detektiert. Es ist jedoch anzumerken, dass U-II und U-II+RK mit relativ geringen Intensitäten detektiert wurden, was durch Abbildung 15 unterstützt wird. Für das Komplement C2 wurde nur die Bildung von U-II<sub>105-110</sub> festgestellt.

Neben der qualitativen Untersuchung der proteolytischen Aktivität durch MALDI-TOF-MS wurde die durch die verwendeten Proteasen gebildete Menge an U-II mittels LC-ESI-TOF-MS relativ quantifiziert. Dazu wurden die Inkubationen von 1 µg Plasma-Kallikrein, Plasmin, Thrombin und des Koagulationsfaktor XIIIa mit UCE-S nach 4 h chromatographisch getrennt und massenspektrometrisch analysiert. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der relativen Quantifizierung des U-II dargestellt:



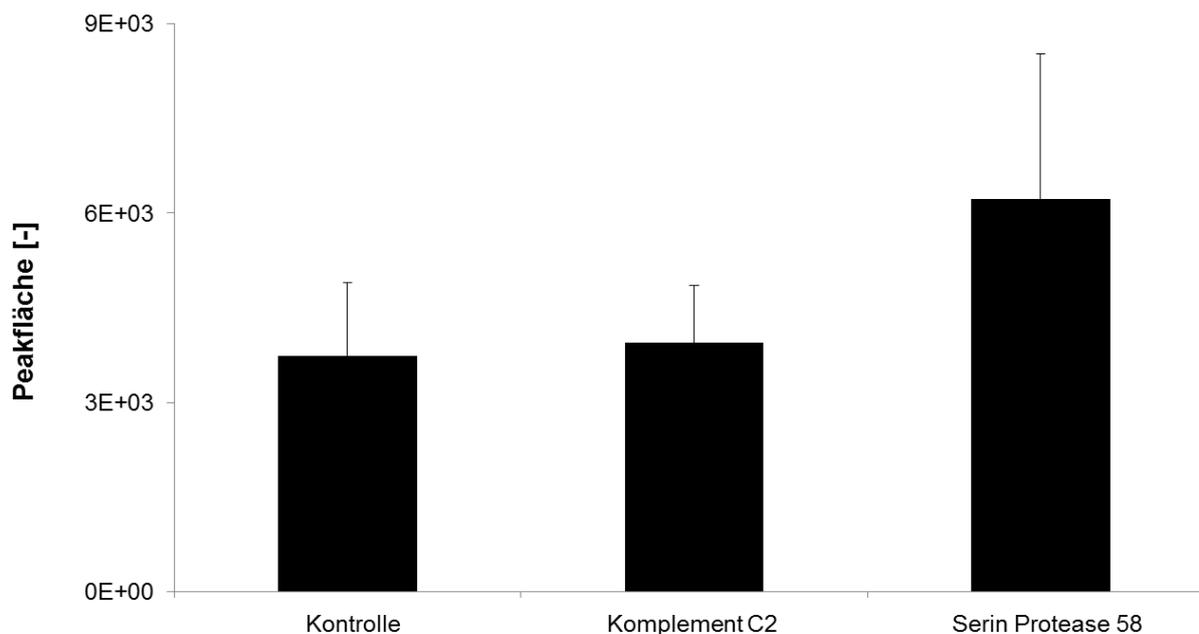
**Abbildung 13: LC-ESI-TOF-MS zur Quantifizierung von U-II nach 4 h Inkubation von jeweils 1 µg Plasma-Kallikrein, Plasmin, Thrombin bzw. Koagulationsfaktor XIIIa mit UCE-S.** U-II wurde relativ durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 694.787, der dem zweifach geladenen Peptid entspricht, quantifiziert. In der Inkubation des Plasma-Kallikreins mit UCE-S wurde eine starke Bildung von U-II beobachtet. Die Inkubation des Koagulationsfaktor XIIIa führte zur Bildung einer geringen Menge an U-II. In den Inkubationen des Plasmins und des Thrombins sowie in der Negativkontrolle wurde keine deutliche Bildung von U-II detektiert.

Der Abbildung 13 ist die relativ quantifizierte Menge an U-II in den Inkubationen von jeweils 1 µg Plasma-Kallikrein, Plasmin, Thrombin und des Koagulationsfaktor XIIa mit UCE-S zu entnehmen. Diese ergibt sich aus der Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 694.787, der dem zweifach geladenen U-II entspricht. Für Plasma-Kallikrein wurde eine starke U-II-generierende Aktivität detektiert. Dies bestätigt die hohe mittels MALDI-TOF-MS beobachtete U-II-generierende Aktivität (Abbildung 10). Verglichen mit Plasma-Kallikrein wurde für den Koagulationsfaktor XIIa eine geringe Bildung von U-II festgestellt. In den Inkubationen des Plasmins und des Thrombins mit UCE-S sowie in der Negativkontrolle wurde keine deutliche U-II-generierende Aktivität detektiert. Entsprechend der qualitativen Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS wurde insbesondere für Plasma-Kallikrein eine deutliche U-II-generierende Aktivität festgestellt. Für Plasmin wurde generell eine hohe proteolytische Aktivität detektiert, jedoch keine Bildung von U-II. Da für 1 µg der Proteasen Thrombin, Koagulationsfaktor XIIa und Komplementfaktor I generell eine geringe proteolytische Aktivität gegenüber dem Peptidsubstrat UCE-S festgestellt wurde, wurden die Inkubationen nach 24 h mit erhöhten Enzymkonzentrationen ebenfalls mittels LC-ESI-TOF-MS untersucht. Dazu wurden die Inkubationen von 6 µg des Koagulationsfaktor XIIa, 6 µg des Thrombins und 10 µg des Komplementfaktor I mit UCE-S nach 24 h chromatographisch getrennt und massenspektrometrisch analysiert. In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der relativen Quantifizierung des U-II dargestellt:



**Abbildung 14: LC-ESI-TOF-MS zur Quantifizierung von U-II nach 24 h Inkubation von 6 µg Koagulationsfaktor XIIa, 6 µg Thrombin bzw. 10 µg Komplementfaktor I mit UCE-S.** U-II wurde relativ durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 694.787, der dem zweifach geladenen Peptid entspricht, quantifiziert. Die Bildung von U-II wurde in den Inkubationen des Koagulationsfaktor XIIa und des Thrombins detektiert. In der Inkubation des Komplementfaktor I sowie in der Negativkontrolle wurde kein U-II detektiert.

In Abbildung 14 ist die relativ quantifizierte Menge an U-II in den Inkubationen von 6 µg Koagulationsfaktor XIIa, 6 µg Thrombin und 10 µg Komplementfaktor I zu sehen. Diese wurde durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 694.787, der dem zweifach geladenen U-II entspricht, erhalten. In den Inkubationen des Koagulationsfaktor XIIa und des Thrombins wurde U-II detektiert. Beide Proteasen bewirkten in erhöhter Enzymkonzentration also eine U-II-generierende Aktivität, die gegenüber der Negativkontrolle deutlich erhöht war, aber im Vergleich zur U-II-generierenden Aktivität des Plasma-Kallikreins gering ausfiel. Diese Beobachtung ist mit der qualitativen Untersuchung der proteolytischen Aktivität des Koagulationsfaktor XIIa und des Thrombins in erhöhten Enzymkonzentrationen mittels MALDI-TOF-MS vergleichbar (Abbildung 11). Für 10 µg des Komplementfaktor I wurde keine U-II-Bildung festgestellt. Dies ist konsistent mit der fehlenden proteolytischen Aktivität gegenüber UCE-S, die zuvor mittels MALDI-TOF-MS beobachtet wurde (Abbildung 11). Die U-II-Bildung durch das Komplement C2 und die Serin Protease 58 wurde ebenfalls relativ mittels LC-ESI-TOF-MS quantifiziert. Dazu wurden die Inkubationen von 2 µg des Komplement C2 und 2 µg der Serin-Protease 58 mit UCE-S nach 24 h chromatographisch getrennt und massenspektrometrisch analysiert. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der relativen Quantifizierung des U-II-dargestellt:



**Abbildung 15: LC-ESI-TOF-MS zur Quantifizierung von U-II nach 24 h Inkubation von 2 µg des Komplement C2 bzw. 2 µg der Serin Protease 58 mit UCE-S.** U-II wurde relativ durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 694.787, der dem zweifach geladenen Peptid entspricht, quantifiziert. In den Inkubationen des Komplement C2 und der Serin Protease 58 wurde U-II detektiert, jedoch nicht deutlich gegenüber der Negativkontrolle erhöht.

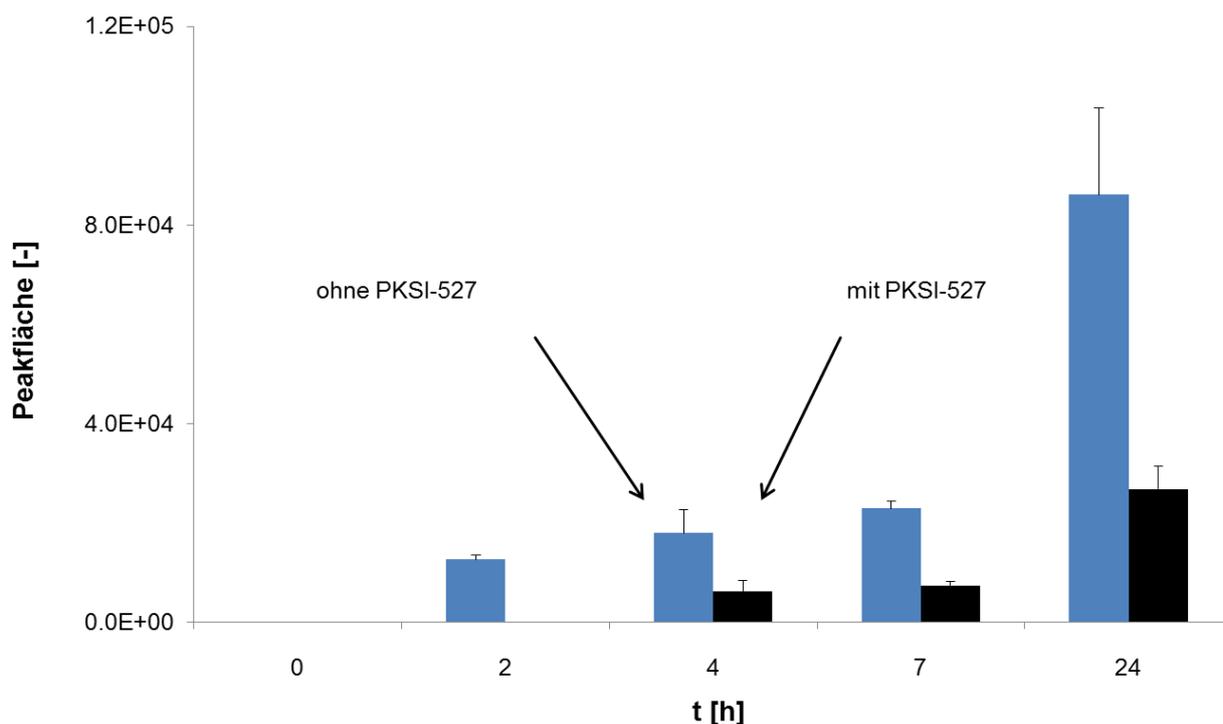
Die relativ quantifizierte Menge an U-II nach 24 h Inkubation von 2 µg des Komplement C2 und 2 µg der Serin Protease 58 mit UCE-S ist in Abbildung 15 dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 694.787, der dem zweifach geladenen U-II entspricht. In den Inkubationen des Komplement C2 und der Serin Protease 58 wurde U-II detektiert, jedoch nicht deutlich gegenüber der Negativkontrolle erhöht. Dies bestätigt die qualitative Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS, wo für das Komplement C2 keine Bildung von U-II und für die Serin-Protease 58 eine geringe Bildung von U-II detektiert wurde (Abbildung 12).

Zusammenfassend wurde für die Proteasen Komplement C2, Komplementfaktor I und Plasmin keine U-II-generierende Aktivität detektiert, wobei Plasmin generell eine hohe proteolytische Aktivität gegenüber dem Peptidsubstrat UCE-S bewirkte. In der Inkubation der Serin Protease 58 mit UCE-S wurde mittels MALDI-TOF-MS eine geringe Bildung von U-II detektiert, die relativ quantifizierte Menge an U-II mithilfe von LC-ESI-TOF-MS war jedoch nicht deutlich gegenüber der Negativkontrolle erhöht. Die Proteasen Koagulationsfaktor XIIa und Thrombin führten nach 24 h Inkubation mit UCE-S in erhöhten Enzymmengen von 6 µg zu einer deutlich gegenüber der Negativkontrolle erhöhten Bildung von U-II. Diese war verglichen mit der U-II-generierenden Aktivität des Plasma-Kallikreins relativ gering. Die Inkubation des Plasma-Kallikreins mit UCE-S führte zu einer sehr starken U-II-generierenden Aktivität, die sowohl mittels MALDI-TOF-MS als

auch durch LC-ESI-TOF-MS detektiert wurde. Die relativ quantifizierte Menge an U-II durch 1 µg Plasma-Kallikrein nach 4 h war um den Faktor 31 bzw. 61 gegenüber der gebildeten Menge an U-II durch 6 µg Koagulationsfaktor XIIa bzw. 6 µg Thrombin nach 24 h erhöht. Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse einer früheren Arbeit.<sup>[11]</sup> Im Folgenden sollte die physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins bei der Bildung von U-II mithilfe eines selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitors anhand der Cohn-Fraktion IV-4 validiert werden.

#### **6.1.4 Physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins für die Bildung von U-II**

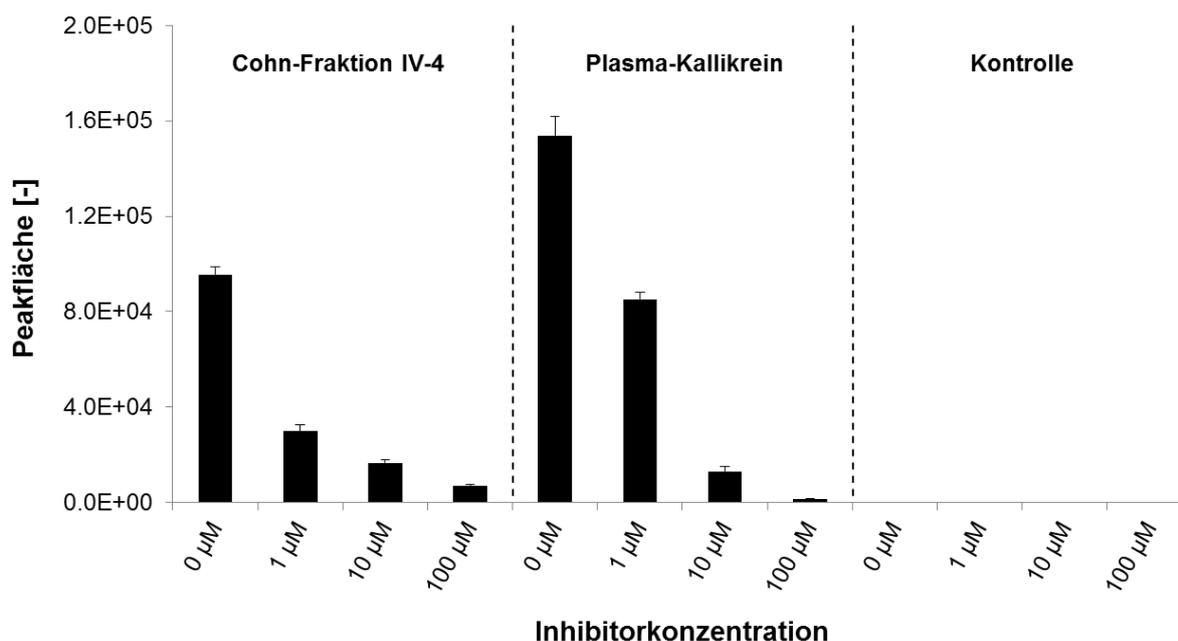
Die Untersuchung der proteolytischen Aktivität der Proteasen Plasma-Kallikrein, Plasmin, Thrombin, Komplementfaktor I, Koagulationsfaktor XIIa, Serin Protease 58 und des Komplement C2 gegenüber dem Peptidsubstrat UCE-S ergab insbesondere für Plasma-Kallikrein eine sehr deutliche U-II-generierende Aktivität. Daher sollte die physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins zur Bildung von U-II weitergehend untersucht werden. In einer vorherigen Arbeit wurde bereits eine inhibitorische Wirkung des selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitors PK15 auf die U-II-Bildung in humanem Plasma und durch kommerziell erworbenes Plasma-Kallikrein festgestellt.<sup>[11]</sup> Dies sollte in dieser Arbeit durch die Untersuchung der physiologischen Relevanz des Plasma-Kallikreins an der U-II-generierenden Aktivität innerhalb der Cohn-Fraktion IV-4 validiert werden. Dazu wurde der selektive Plasma-Kallikrein-Inhibitor PKSI-527<sup>[12]</sup> verwendet. 165 µg der Cohn-Fraktion IV-4 wurden an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und in An- und Abwesenheit von 10 µM PKSI-527 inkubiert. Es wurden Proben nach 0, 2, 4, 7 und 24 h entnommen, chromatographisch getrennt und mittels LC-ESI-TOF-MS analysiert. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der relativen Quantifizierung des U-II dargestellt:



**Abbildung 16: LC-ESI-TOF-MS zur Quantifizierung von U-II in der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S in An- und Abwesenheit des Plasma-Kallikrein-Inhibitors PKSI-527 (10  $\mu\text{M}$ ).** U-II wurde relativ durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 694.781, der dem zweifach geladenen Peptid entspricht, quantifiziert. Die Menge an U-II nimmt in Abwesenheit von PKSI-527 (schwarz) über 24 h kontinuierlich zu. In Anwesenheit von PKSI-527 (blau) wurde U-II erst nach 4 h detektiert, dessen Signal dann ebenfalls kontinuierlich zunimmt. Es ist eine deutliche Inhibierung der U-II-generierenden Aktivität in Anwesenheit von PKSI-527 zu erkennen.

Der Abbildung 16 ist die relativ quantifizierte Menge an U-II in der Inkubation von 165  $\mu\text{g}$  der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S in An- und Abwesenheit des selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitors PKSI-527 in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu entnehmen. Dazu wurde das EIC mit dem m/z-Wert von 694.781, der dem zweifach geladenen U-II entspricht, integriert. In Abwesenheit von PKSI-527 wurde U-II bereits nach 2 h Inkubation detektiert. Der Abbildung ist ein kontinuierlicher Anstieg der Menge an gebildetem U-II über 24 h zu entnehmen. In Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  PKSI-527 wurde U-II erst nach 4 h detektiert. Anschließend wurde ebenfalls eine kontinuierliche Bildung von U-II festgestellt. In Anwesenheit von PKSI-527 wurde eine deutliche Reduzierung der U-II-generierenden Aktivität gegenüber der Inkubation ohne Inhibitor zu jedem Messzeitpunkt detektiert. Nach 24 h Inkubation wurde eine Reduzierung der integrierten Peakfläche des U-II auf 31.1% gegenüber der Positivkontrolle festgestellt. Diese Beobachtung zeigt eine deutliche inhibitorische Wirkung des selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitors PKSI-527 auf die U-II-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4. Zur weiteren Untersuchung der inhibitorischen

Wirkung des PKSI-527 wurde die Inkubation unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen an PKSI-527 erneut durchgeführt. Zusätzlich wurde die inhibitorische Wirkung des PKSI-527 auf kommerziell erworbenes Plasma-Kallikrein untersucht. Dazu wurden 200 µg der Cohn-Fraktion IV-4 bzw. 0.5 µg Plasma-Kallikrein an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und für 4 h mit UCE-S in Anwesenheit von PKSI-527 in den Konzentrationen 1, 10 und 100 µM inkubiert. Die Inkubationen wurden chromatographisch getrennt und mittels LC-ESI-TOF-MS analysiert. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der relativen Quantifizierung des U-II dargestellt:



**Abbildung 17: LC-ESI-TOF-MS zur Quantifizierung von U-II in den Inkubationen der Cohn-Fraktion IV-4 bzw. von Plasma-Kallikrein mit UCE-S in An- und Abwesenheit des Plasma-Kallikrein-Inhibitors PKSI-527.** U-II wurde relativ durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 694.787, der dem zweifach geladenen Peptid entspricht, quantifiziert. PKSI-527 wurde in den Konzentrationen 1, 10 und 100 µM verwendet. Für beide Inkubationen wurde eine starke Inhibierung der U-II-generierenden Aktivität durch PKSI-527 gegenüber den Positivkontrollen detektiert. Die Reduzierung der U-II-Bildung stieg mit höherer Inhibitorkonzentration.

In Abbildung 17 ist die relativ quantifizierte Menge an U-II in den Inkubationen von 200 µg der Cohn-Fraktion IV-4 und 0.5 µg Plasma-Kallikrein mit UCE-S in Anwesenheit des selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitors PKSI-527 in den Konzentrationen 1, 10 und 100 µM dargestellt. Diese ergibt sich aus der Integration des EIC des zweifach geladenen U-II mit einem m/z-Wert von 694.787. In den Negativkontrollen wurde kein U-II detektiert. Nach 4 h Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 in Abwesenheit von PKSI-527 wurde U-II mit hoher Intensität detektiert. In Anwesenheit des PKSI-527 wurde eine deutliche Inhibierung der U-II-generierenden Aktivität detektiert. Die Inhibierung nahm mit steigender Inhibitorkonzentration zu, wobei die integrierte

Peakfläche des U-II in Anwesenheit von 1, 10 bzw. 100  $\mu\text{M}$  PKSI-527 auf 32.5%, 17.4% bzw. 7.3% gegenüber der Positivkontrolle reduziert vorlag. Nach 4 h Inkubation des Plasma-Kallikreins mit UCE-S in Abwesenheit von PKSI-527 wurde U-II ebenfalls mit hoher Intensität detektiert. Auch hier wurde in Anwesenheit von PKSI-527 eine deutliche Inhibierung der U-II-generierenden Aktivität detektiert, die mit zunehmender Inhibitorkonzentration stärker ausgeprägt war. In Anwesenheit von 1, 10 bzw. 100  $\mu\text{M}$  PKSI-527 wurde eine Reduktion der integrierten Peakfläche des U-II auf 55.5%, 8.5% bzw. 0.9% gegenüber der Positivkontrolle festgestellt.

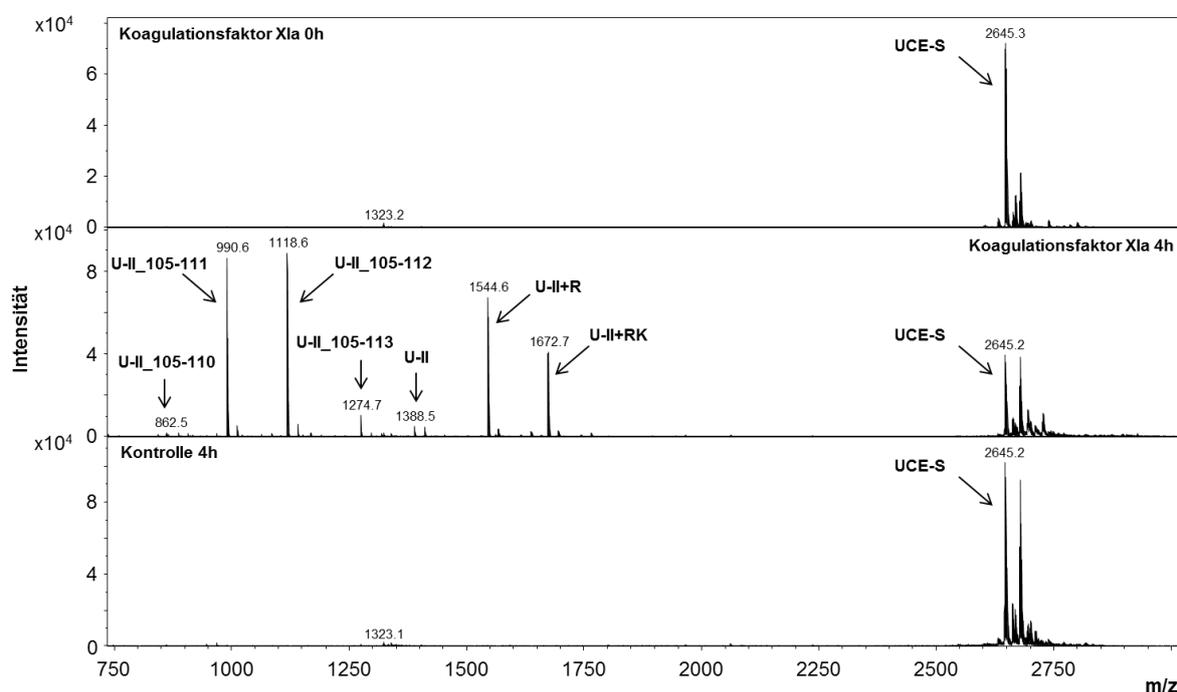
Zusammenfassend wurde für die Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  des selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitors PKSI-527 über 24 h zu jedem Messzeitpunkt eine deutliche Inhibierung der U-II-generierenden Aktivität detektiert. Die Inkubationen der Cohn-Fraktion IV-4 und des Plasma-Kallikreins mit UCE-S in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von PKSI-527 zeigten eine starke Korrelation der Inhibitorkonzentration und der gebildeten Menge an U-II. Es wurde eine stärkere Inhibierung für steigende Inhibitorkonzentrationen festgestellt. Dies zeigt, dass Plasma-Kallikrein zu einem großen Anteil für die U-II-generierende Aktivität innerhalb der Cohn-Fraktion IV-4 verantwortlich ist. Auch bei einer Inhibitorkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  PKSI-527 wurde eine Restaktivität zur Bildung von U-II durch die Cohn-Fraktion IV-4 festgestellt. Dennoch bestätigen diese Daten die Ergebnisse einer früheren Untersuchung<sup>[11]</sup> und implizieren ebenfalls eine hohe physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins zur Bildung von U-II.

#### **6.1.5 Proteolytische Prozessierung von UCE-S durch den Koagulationsfaktor XIa**

Die vorangegangenen Inhibitionsexperimente mit dem selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitor PKSI-527 zeigten, dass Plasma-Kallikrein zu einem hohen Anteil für die U-II-generierende Aktivität innerhalb der Cohn-Fraktion IV-4 verantwortlich ist. Zur Identifizierung alternativer Urotensin-II-generierender Enzyme wurde zuvor eine Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 durch Fraktionierung und Quantifizierung der durch die Sub-Fraktionen gebildeten Menge an U-II durchgeführt. Die aktivsten Sub-Fraktionen wurden dann zur Identifizierung enthaltener Proteasen verwendet. Alternativ zu dieser Strategie wurde die Sequenz des Plasma-Kallikreins verwendet, um über eine Datenbank verwandte Proteasen mit potentiell ähnlicher proteolytischer Aktivität zu ermitteln. Dazu wurde der Blast-Algorithmus<sup>[116]</sup> auf die Uniprot-Datenbank<sup>[111]</sup> angewendet, wobei sowohl die Gesamtsequenz des Plasma-Kallikreins als auch nur die Sequenz der Proteasedomäne des Plasma-Kallikreins als Eingabe verwendet wurden. Die Datenbankabfrage ergab, dass der Koagulationsfaktor XI unter den

humanen Proteinen über die höchste Sequenzübereinstimmung verfügte. Es ergab sich eine Sequenzhomologie von 58.5% für die Gesamtsequenz des Plasma-Kallikreins als Eingabe und eine Sequenzhomologie von 68.2% für die Sequenz der Proteasedomäne des Plasma-Kallikreins als Eingabe. Auf dieser Grundlage sollte eine potentielle U-II-generierende Aktivität des Koagulationsfaktor XIa im Folgenden untersucht werden.

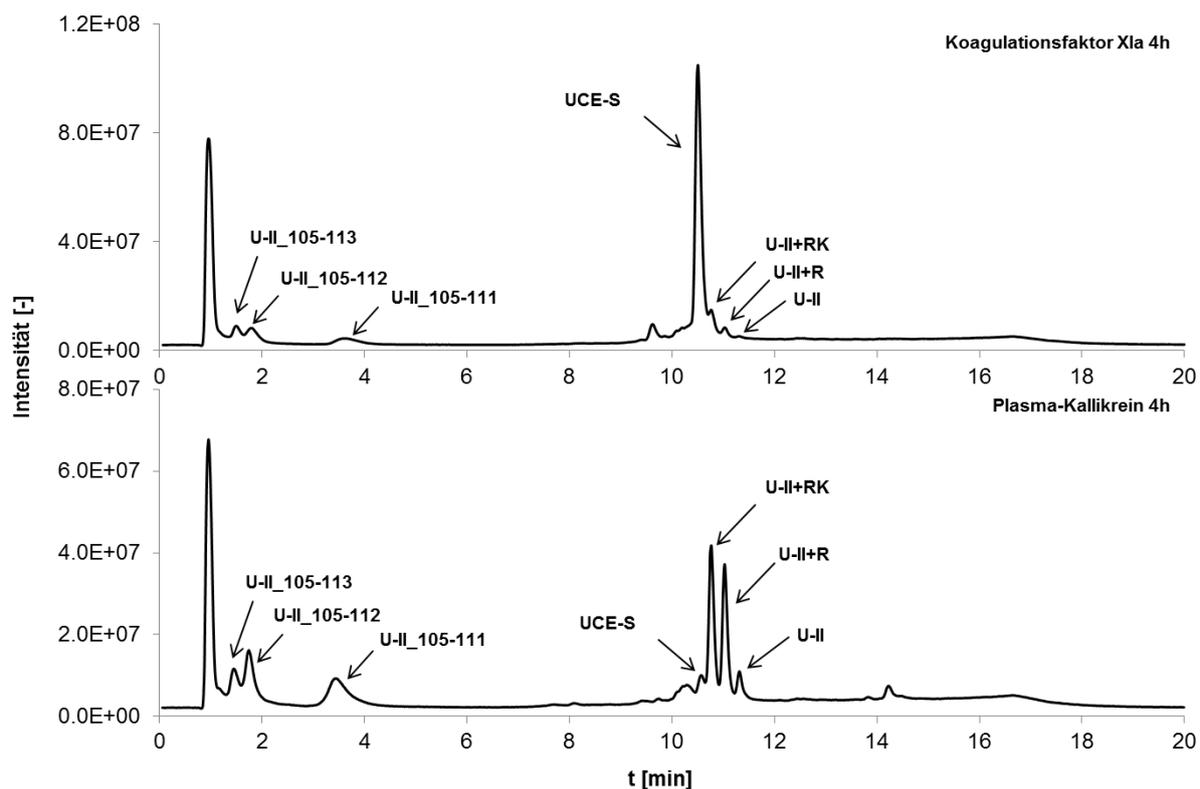
Der kommerziell erworbene Koagulationsfaktor XIa wurde dazu an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und mit UCE-S inkubiert. In Abbildung 18 sind die MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubation von 1 µg des Koagulationsfaktor XIa mit UCE-S nach 4 h Inkubation dargestellt:



**Abbildung 18: MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubation des Koagulationsfaktor XIa mit UCE-S.** Nach 4 h Inkubation des Koagulationsfaktor XIa mit UCE-S wurden U-II, U-II+R und U-II+RK sowie die N-terminalen Proteolyseprodukte U-II\_105-110, U-II\_105-111, U-II\_105-112 und U-II\_105-113 detektiert. Der Negativkontrolle ist das Peptidsubstrat UCE-S zu entnehmen.

Nach 4 h Inkubation des Koagulationsfaktor XIa mit UCE-S wurden U-II und die N-terminal verlängerten Formen U-II+R und U-II+RK detektiert. Zudem wurden die N-terminalen Proteolyseprodukte U-II\_105-110, U-II\_105-111, U-II\_105-112 und U-II\_105-113 festgestellt. Ähnlich wie bei der Inkubation des Plasma-Kallikreins mit UCE-S fand also eine dreifache proteolytische Prozessierung der tribasischen Schnittstelle  $\text{KKR}^{113}$ , jeweils C-terminal von Lysin oder Arginin, statt. Das Peptidsubstrat UCE-S war nach 4 h Inkubation noch erkennbar. Der nicht vollständige Abbau zeigt eine etwas geringere proteolytische Aktivität von 1 µg des Koagulationsfaktor XIa, verglichen mit 1 µg des Plasma-Kallikreins (Abbildung 10). Die U-II-

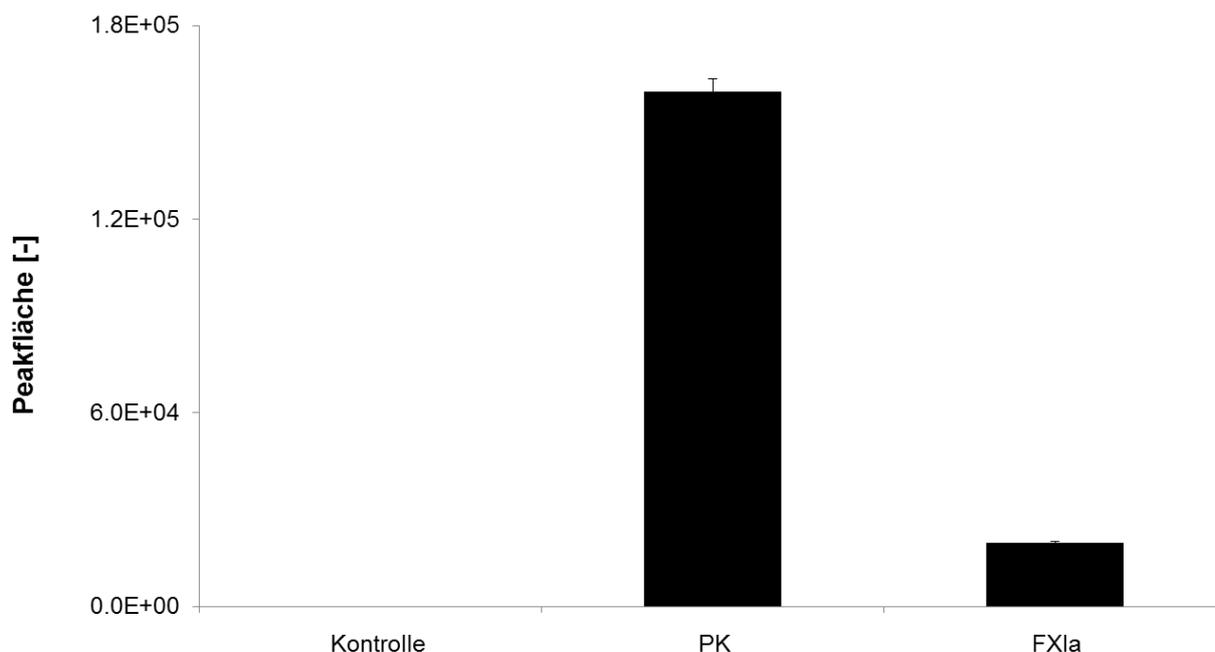
generierende Aktivität des Koagulationsfaktor XIa sollte weitergehend durch Vergleich mit der U-II-generierenden Aktivität des Plasma-Kallikreins untersucht werden. Dazu wurden Plasma-Kallikrein und der Koagulationsfaktor XIa an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und mit UCE-S inkubiert. Die Inkubationen von 1 µg Plasma-Kallikrein und 1 µg des Koagulationsfaktor XIa mit UCE-S nach 4 h wurden chromatographisch getrennt und mittels LC-ESI-TOF-MS analysiert. Die entsprechenden Chromatogramme sind in Abbildung 19 dargestellt:



**Abbildung 19: LC-ESI-TOF-MS der Inkubationen von 1 µg Plasma-Kallikrein und 1 µg des Koagulationsfaktor XIa mit UCE-S.** Es ist der TIC der Inkubationen nach 4 h dargestellt. In beiden Inkubationen wurden U-II ( $m/z$  694.794,  $[M+2H]^{2+}$ ), U-II+R ( $m/z$  772.843,  $[M+2H]^{2+}$ ) und U-II+RK ( $m/z$  558.265,  $[M+3H]^{3+}$ ) mit Retentionszeiten von 11.3, 11.0 und 10.8 min detektiert. Die N-terminalen Proteolyseprodukte U-II\_105-111 ( $m/z$  495.800,  $[M+2H]^{2+}$ ), U-II\_105-112 ( $m/z$  559.846,  $[M+2H]^{2+}$ ) und U-II\_105-113 ( $m/z$  425.600,  $[M+3H]^{3+}$ ) wurden mit Retentionszeiten von 3.6, 1.8 und 1.5 min detektiert. Das Peptidsubstrat UCE-S ( $m/z$  529.670,  $[M+5H]^{5+}$ ) eluierte nach 10.5 min.

Die Inkubationen von jeweils 1 µg des Koagulationsfaktor XIa und des Plasma-Kallikreins mit UCE-S führten zur Generierung von U-II und den N-terminal verlängerten Formen U-II+R und U-II+RK. Zudem wurden die N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukte U-II\_105-111, U-II\_105-112 und U-II\_105-113 detektiert. In beiden Fällen ist also die dreifache proteolytische Prozessierung der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup>, jeweils C-terminal von Arginin oder Lysin, zu erkennen. Insgesamt ist in der Inkubation des Plasma-Kallikreins eine stärkere Bildung der

Proteolyseprodukte und ein stärkerer Abbau des Substrates UCE-S zu beobachten. Im Folgenden wurde die Menge des gebildeten U-II relativ quantifiziert. Jeweils 0.5 µg des Plasma-Kallikreins und des Koagulationsfaktor XIa wurden erneut an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und für 4 h mit UCE-S inkubiert. Die Inkubationen wurden chromatographisch getrennt und mittels LC-ESI-TOF-MS analysiert. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung von U-II sind in Abbildung 20 dargestellt:



**Abbildung 20: LC-ESI-TOF-MS zur Quantifizierung von U-II in den Inkubationen von 0.5 µg Plasma-Kallikrein bzw. 0.5 µg Koagulationsfaktor XIa mit UCE-S.** U-II wurde relativ durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 694.787, der dem zweifach geladenen Peptid entspricht, quantifiziert. Die Bildung von U-II wurde in beiden Inkubationen detektiert. Die integrierte Peakfläche des U-II war in der Inkubation des Plasma-Kallikreins um den Faktor 8.1 gegenüber der Inkubation des Koagulationsfaktor XIa erhöht. In der Negativkontrolle wurde kein U-II detektiert.

In Abbildung 20 ist die relativ quantifizierte Menge an U-II in den Inkubationen von 0.5 µg Plasma-Kallikrein und 0.5 µg Koagulationsfaktor XIa mit UCE-S zu sehen. Diese ergibt sich aus der Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 694.787, der dem zweifach geladenen U-II entspricht. Die integrierte Peakfläche des detektierten U-II war in der Inkubation des Plasma-Kallikreins um den Faktor 8.1 gegenüber der Inkubation des Koagulationsfaktor XIa erhöht, was eine höhere U-II-generierende Aktivität des Plasma-Kallikreins zeigt.

Zusammenfassend wurde über eine Datenbankabfrage, mit der Gesamtsequenz und der Sequenz der Proteasedomäne des Plasma-Kallikreins als Eingabe, nach verwandten Proteasen

gesucht. Dabei wurde der Koagulationsfaktor Xla als alternativer Kandidat mit potentieller U-II-generierender Aktivität ermittelt. Der Koagulationsfaktor Xla zeigte nach Inkubation mit dem Peptidsubstrat UCE-S eine deutliche U-II-generierende Aktivität und führte zur Bildung von U-II, U-II+R und U-II+RK. Dies entspricht einer dreifachen proteolytischen Prozessierung der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup>. Ein Vergleich der U-II-generierenden Aktivität des Koagulationsfaktor Xla mit der des Plasma-Kallikreins ergab eine um den Faktor 8.1 erhöhte integrierte Peakfläche des U-II in der Inkubation des Plasma-Kallikreins.

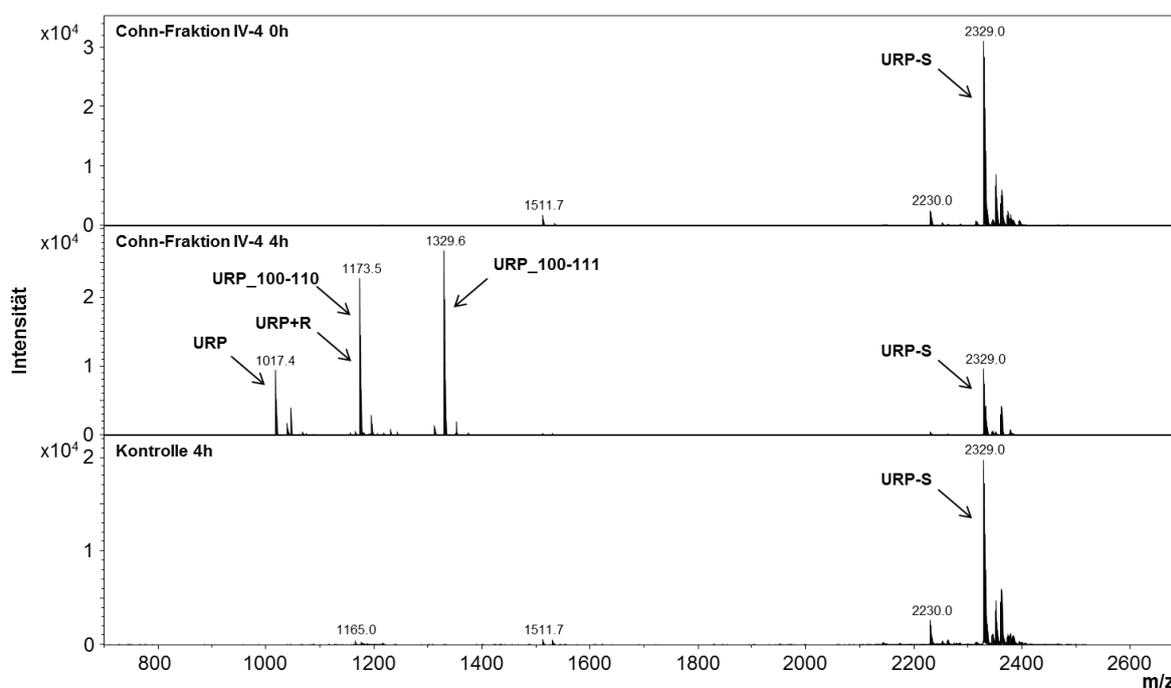
## **6.2 Untersuchung der URP-generierenden Aktivität innerhalb der Blutzirkulation anhand der Cohn-Fraktion IV-4**

Das folgende Kapitel (6.2) oder Teile daraus befinden sich derzeit zur Veröffentlichung eines Artikels mit dem Titel „Identifying circulating urotensin II and urotensin II-related peptide generating enzymes in the human plasma fraction Cohn IV-4“ in Revision bei der Fachzeitschrift Journal of Proteome Research der American Chemical Society (ACS).

Die proteolytische Prozessierung des URP ist bisher nicht vollständig untersucht. Es ist daher nicht bekannt, durch welches Enzym die Bildung von URP katalysiert wird. Die Bildung von URP erfordert die proteolytische Prozessierung der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup> des pre-pro-URP und ähnelt damit der erforderlichen Schnittspezifität zur proteolytischen Prozessierung der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup> des U-II. Im Falle der Bildung von U-II wurde in dieser und einer vorherigen Arbeit<sup>[11]</sup> eine deutliche U-II-generierende Aktivität durch die Cohn-Fraktion IV-4 festgestellt (Abbildung 5), weshalb ebenfalls von einer proteolytischen Prozessierung eines URP-Vorläuferpeptids auszugehen ist. Ein Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von URP-generierenden Enzymen innerhalb der Cohn-Fraktion IV-4. Dazu sollte zunächst die potentielle URP-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 anhand der proteolytischen Prozessierung des Peptidsubstrates URP-S mithilfe eines Massenspektrometrie-basierten Enzymassays untersucht werden. Dieses besteht aus den 20 C-terminalen Aminosäuren des pre-pro-URP und enthält das aktive URP am C-Terminus. Anschließend sollte die Cohn-Fraktion IV-4 als Ausgangsmaterial zur Anreicherung der URP-generierenden Aktivität und zur Identifizierung korrespondierender Enzyme verwendet werden. Die URP-generierende Aktivität geeigneter Kandidaten sollte validiert und ihre physiologische Relevanz untersucht werden.

### 6.2.1 Proteolytische Prozessierung von URP durch die Cohn-Fraktion IV-4

Die potentielle URP-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 sollte charakterisiert und korrespondierende URP-generierende Enzyme identifiziert werden. In diesem Zusammenhang sollte zunächst die proteolytische Prozessierung des Peptidsubstrates URP-S durch die Cohn-Fraktion IV-4 untersucht und entstandene Proteolyseprodukte mittels MALDI-TOF- und LC-ESI-TOF-MS identifiziert werden. Eine Umsetzung des Peptidsubstrates URP-S, das aus den 20 C-terminalen Aminosäuren des pre-pro-URP besteht und das aktive URP am C-Terminus enthält, zu URP zeigt dabei eine URP-generierende Aktivität auf. Die Cohn-Fraktion IV-4 wurde an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und mit URP-S inkubiert. In Abbildung 21 sind die MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubation von 200 µg der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S nach 4 h dargestellt:

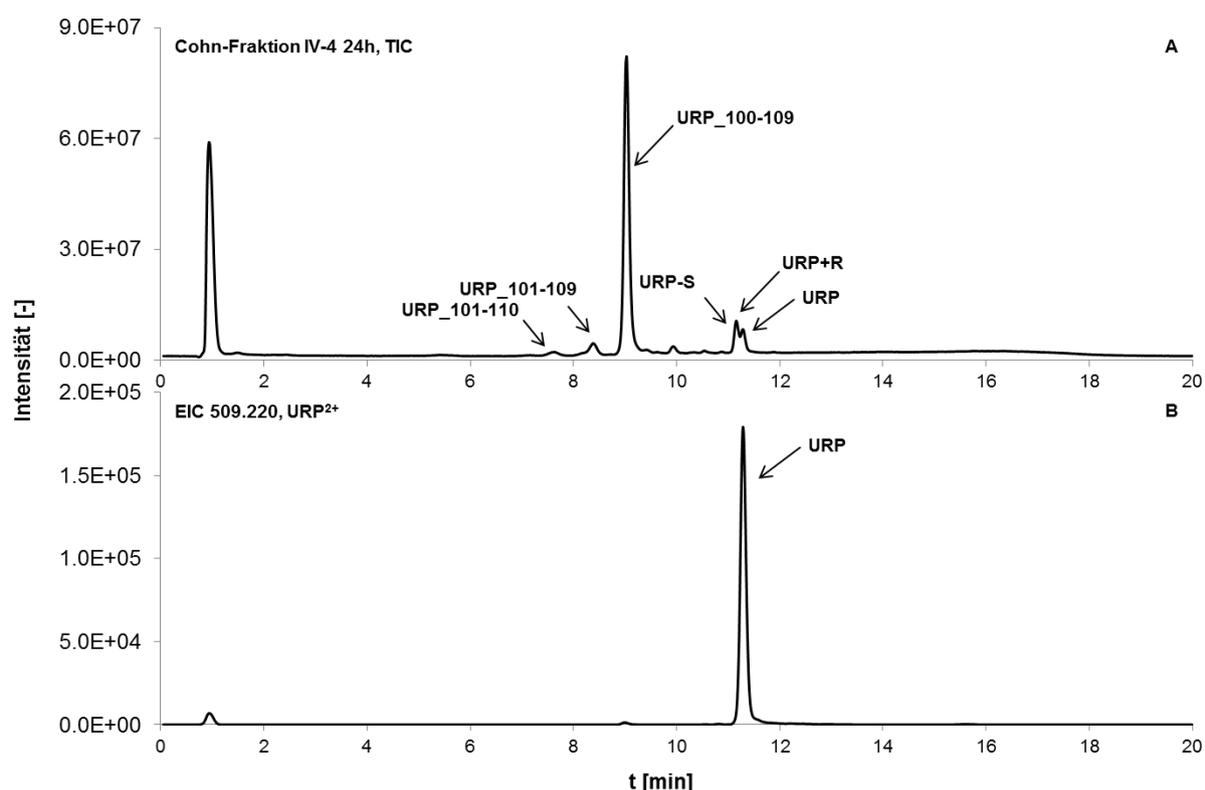


**Abbildung 21: MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S.** Nach 4 h Inkubation wurden URP und URP+R anhand der m/z-Werte 1017.4 und 1173.5 und die N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukte URP\_100-110 und URP\_100-111 anhand der m/z-Werte 1173.5 und 1329.6 detektiert. Das Peptidsubstrat URP-S wurde mit einem Signal bei m/z 2329.0 detektiert.

Das protonierte, einfach geladene, Substrat URP-S ist zu Beginn der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S und in der Negativkontrolle mit einem m/z-Wert von 2329.0 zu erkennen, jedoch keine Proteolyseprodukte. Nach 4 h Inkubation wurde ein intensives Signal bei m/z 1017.4 detektiert, das dem aktiven URP zuzuordnen ist. Zusätzlich wurden die N-terminal um ein Arginin verlängerte Form URP+R mit einem m/z-Wert von 1173.5 und die N-terminal

korrespondierenden Proteolyseprodukte URP\_100-110 und URP\_100-111 mit  $m/z$ -Werten von 1173.5 und 1329.6 detektiert. Es fand eine doppelte proteolytische Prozessierung der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup>, jeweils C-terminal einer der Aminosäuren Lysin oder Arginin statt. Bereits zu Beginn der Inkubation und in der Negativkontrolle wurde außerdem ein Signal bei  $m/z$  2230.0 detektiert, das sich dem um einen Valinrest reduzierten Peptidsubstrat URP-S zuordnen lässt. Es ist vermutlich auf ein Nebenprodukt bei der Peptidsynthese zurückzuführen.

Um eine Methode zur Quantifizierung von Proteolyseprodukten in Folgeversuchen zu etablieren, wurde die Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S zusätzlich zur qualitativen Untersuchung durch MALDI-TOF-MS mittels LC-ESI-TOF-MS untersucht. Dazu wurde die Inkubationslösung chromatographisch getrennt und massenspektrometrisch analysiert. Die entsprechenden Chromatogramme der Inkubation nach 24 h sind in Abbildung 22 und die korrespondierenden LC-ESI-TOF-MS-Spektren im Anhang auf den Abbildungen 53-58 dargestellt:



**Abbildung 22: LC-ESI-TOF-MS der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S.** A: TIC der Inkubation nach 24 h. URP ( $m/z$  509.219,  $[M+2H]^{2+}$ ) und URP+R ( $m/z$  587.270,  $[M+2H]^{2+}$ ) wurden mit Retentionszeiten von 11.3 und 11.2 min detektiert. Die N-terminalen Proteolyseprodukte URP\_100-109 ( $m/z$  523.255,  $[M+2H]^{2+}$ ), URP\_101-109 ( $m/z$  473.718,  $[M+2H]^{2+}$ ) und URP\_101-110 ( $m/z$  537.764,  $[M+2H]^{2+}$ ) wurden mit Retentionszeiten von 9.0, 8.4 und 7.6 min detektiert. Das Peptidsubstrat URP-S ( $m/z$  582.781,  $[M+4H]^{4+}$ ) eluierte nach 11.1 min. B: EIC des  $m/z$ -Wertes 509.220 (URP<sup>2+</sup>) nach 24 h.

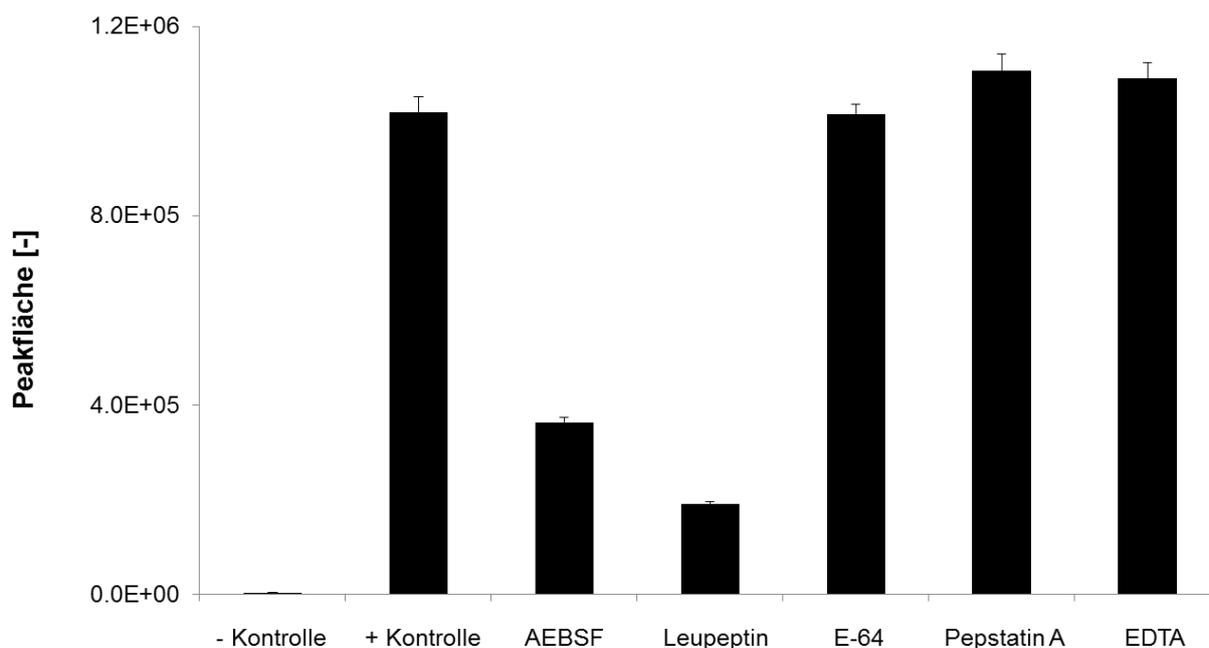
Im oberen Teil der Abbildung 22 ist der TIC der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S nach 24 h zu sehen. Das Peptidsubstrat URP-S wurde in größtenteils vierfach geladener Form mit einem m/z-Wert von 582.781 mit einer Retentionszeit von 11.1 min detektiert. Aktives URP ist mit einer Retentionszeit von 11.3 min und einem m/z-Wert von 509.219, der dem zweifach geladenen URP entspricht, zu erkennen. Die N-terminal verlängerte Form URP+R wurde, coelulierend mit dem Peptidsubstrat URP-S, mit einer Retentionszeit von 11.2 min und einem m/z-Wert von 523.255, der der zweifach geladenen Form entspricht, detektiert. Zudem sind die N-terminalen Proteolyseprodukte URP\_100-109, URP\_101-109 und URP\_101-110 mit Retentionszeiten von 9.0, 8.4 und 7.6 min anhand der m/z-Werte 523.255 ( $[M+2H]^{2+}$ ), 473.718 ( $[M+2H]^{2+}$ ) und 537.76 ( $[M+2H]^{2+}$ ) zu sehen. Im Vergleich zu den MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubation nach 4 h (Abbildung 21) sind die N-terminalen Proteolyseprodukte URP\_100-110 und URP\_100-111 kaum zu erkennen und das Proteolyseprodukt URP\_100-109 ist dominant. Dies impliziert eine weitere C-terminale Prozessierung der Proteolyseprodukte URP\_100-110 und URP\_100-111 im weiteren Reaktionsverlauf. Im unteren Teil der Abbildung 22 ist das EIC des m/z-Wertes von 509.220, der dem zweifach geladenen URP entspricht, dargestellt. URP ist anhand eines dominanten Signals mit einer Retentionszeit von 11.3 min zu erkennen, das zur Quantifizierung der URP-generierenden Aktivität von Enzymen, biologischen Proben und Subfraktionen in späteren Experimenten verwendet wurde.

Die dominanten Proteolyseprodukte der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S, die mittels MALDI-TOF- und LC-ESI-TOF-MS detektiert wurden, sind in Tabelle 15 aufgelistet:

**Tabelle 15:** Proteolyseprodukte der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S sowie ihre Sequenzen, theoretischen Massen und mittels MALDI-TOF-MS detektierten m/z-Werte<sup>1</sup> bzw. aus den mittels LC-ESI-TOF-MS detektierten m/z-Werten berechnete Massen<sup>2</sup>

Name	Abkürzung	Sequenz	theoretische Masse	m/z-Wert bzw. Masse
URP_112-119	URP	ACFWKYCV	1016.425	1017.4 <sup>1</sup>
URP_111-119	URP+R	RACFWKYCV	1172.526	1173.5 <sup>1</sup>
URP_100-111		VDGLFSSHPSKR	1328.684	1329.6 <sup>1</sup>
URP_100-110		VDGLFSSHPSK	1172.583	1173.5 <sup>1</sup>
URP_100-109		VDGLFSSHPS	1044.488	1044.495 <sup>2</sup>
URP_101-110		DGLFSSHPSK	1073.514	1073.513 <sup>2</sup>
URP_101-109		DGLFSSHPS	945.419	945.421 <sup>2</sup>
URP_100-119	URP-S	VDGLFSSHPSKRACFWKYCV	2327.098	2329.0 <sup>1</sup>

Die vorangegangenen Experimente zeigten eine deutliche URP-generierende Aktivität innerhalb der Cohn-Fraktion IV-4. Sie stellt damit eine geeignete biologische Quelle zur Untersuchung unbekannter URP-generierender Enzyme dar. Da die dibasische Schnittstelle KR<sup>111</sup> zur Generierung von aktivem URP der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup> sehr ähnlich ist, scheint es logisch, dass identische oder ähnliche Proteasen für die Bildung von U-II und URP verantwortlich sind. Um dies experimentell zu bestätigen, wurde ein Inhibitionsexperiment durchgeführt, um Rückschlüsse auf die Proteaseklasse zu ziehen, die für die Bildung von URP verantwortlich ist. Daher wurden der Inkubation von 200 µg der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S Proteaseinhibitoren gegen unterschiedliche Proteaseklassen zugefügt. In diesem Zusammenhang wurden der Serinproteaseinhibitor AEBSF, der Cysteinproteaseinhibitor E64, der Aspartatproteaseinhibitor Pepstatin A, der Metalloproteaseinhibitor EDTA und das Leuptin, sowohl ein Serin- als auch ein Cysteinproteaseinhibitor, verwendet. Die Inkubationen nach 4 h wurden chromatographisch getrennt und mittels LC-ESI-TOF-MS analysiert. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der relativen Quantifizierung von URP dargestellt:

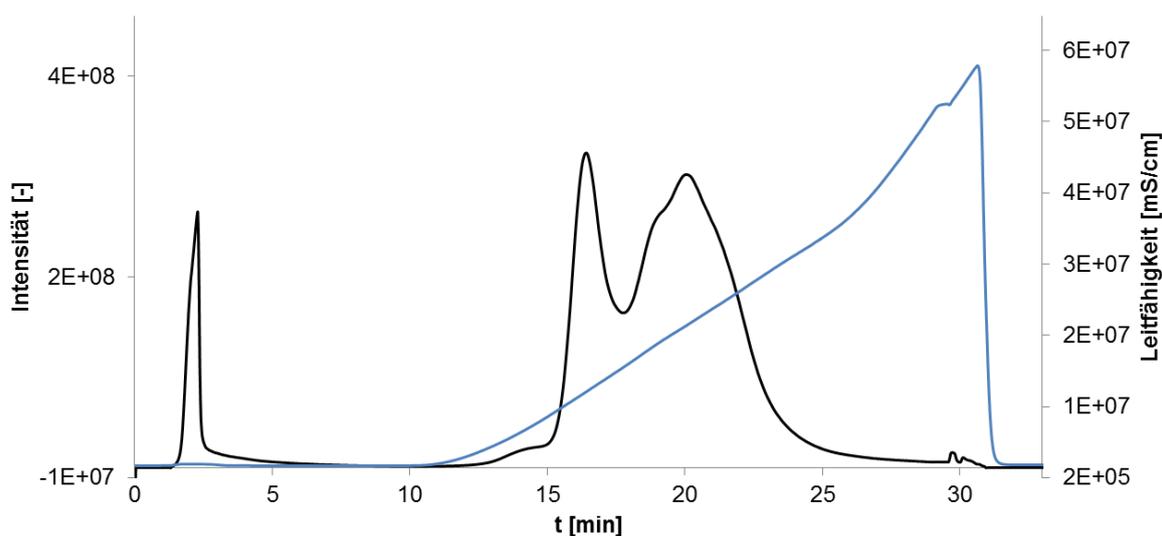


**Abbildung 23: LC-ESI-TOF-MS zur Quantifizierung von URP nach 4 h Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S in Anwesenheit der Proteaseinhibitoren AEBSF, Leupeptin, E-64, Pepstatin A bzw. EDTA.** URP wurde relativ durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 509.220, der dem zweifach geladenen Peptid entspricht, quantifiziert. Eine deutliche Inhibierung der URP-generierenden Aktivität wurde für die Proteaseinhibitoren AEBSF und Leupeptin beobachtet.

Der Abbildung 23 ist die relativ quantifizierte Menge an gebildetem URP bei der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S in Anwesenheit unterschiedlicher Proteaseinhibitoren zu entnehmen. Diese ergibt sich aus der Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 509.220, der dem zweifach geladenen URP entspricht. In der Negativkontrolle wurde keine Bildung von URP detektiert. Die Menge an gebildetem URP ist beim Vergleich der Positivkontrolle, der kein Proteaseinhibitor zugesetzt wurde, mit den Inkubationen in Anwesenheit der Proteaseinhibitoren E-64, Pepstatin A und EDTA konstant. Im Gegensatz wurde eine deutliche Inhibierung der URP-generierenden Aktivität in den Inkubationen mit AEBSF und Leupeptin gegenüber der Positivkontrolle detektiert. Es wurde eine Reduzierung der integrierten Peakfläche auf 36% für AEBSF und auf 19% für Leupeptin festgestellt. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei Leupeptin sowohl um einen Serin- als auch einen Cysteinproteaseinhibitor, bei AEBSF um einen Serinproteaseinhibitor. Da für den Cysteinproteaseinhibitor E-64 keine Inhibierung festgestellt wurde, scheint die inhibitorische Wirkung des Leupeptins Serinproteasen zu inhibieren. Diese Beobachtung bestätigt die Ähnlichkeit der proteolytischen Prozessierung von URP mit der von U-II, die ebenfalls durch Serinproteasen erfolgt.

### 6.2.2 Anreicherung der URP-generierenden Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 und Identifizierung korrespondierender Enzyme

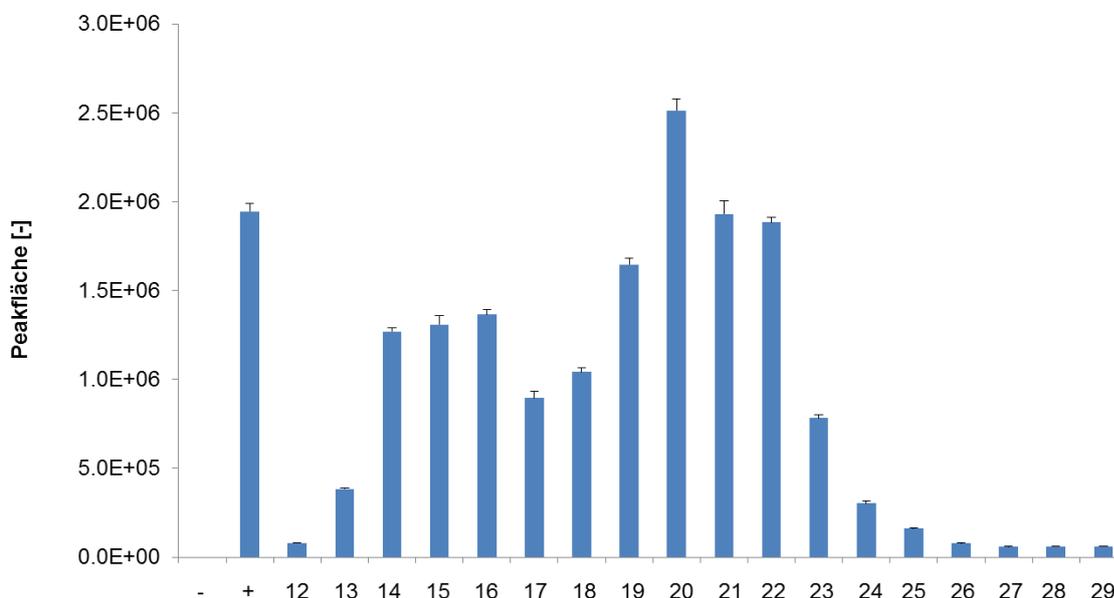
Die Cohn-Fraktion IV-4 sollte als biologische Quelle zur Anreicherung und Identifizierung URP-generierender Enzyme verwendet werden. Es wurde eine Strategie zur Anreicherung der URP-generierenden Aktivität angewendet, in der die Cohn-Fraktion IV-4 durch Anionenaustauschchromatographie weiter fraktioniert wurde und die URP-generierende Aktivität der Sub-Fractionen mithilfe eines Massenspektrometrie-basierten Enzymassays bestimmt wurde. Die daraus resultierenden Sub-Fractionen mit der höchsten URP-generierenden Aktivität wurden im Folgenden zur Proteinidentifizierung verwendet. Es wurden 15.2 mg der Cohn-Fraktion IV-4 mittels Anionenaustauschchromatographie mit NaCl als Elutionsmittel auf 30 Sub-Fractionen fraktioniert. Das Chromatogramm des Anionenaustauschs ist in Abbildung 24 dargestellt:



**Abbildung 24: Anionenaustauschchromatographie von 15.2 mg der Cohn-Fraktion IV-4.** Die UV-Absorption ist in schwarz, die Leitfähigkeit in blau dargestellt. Der Großteil der an die stationäre Phase gebundenen Proteine eluierte zwischen 12 und 28 min. Die Trennung erfolgte mit NaCl als Elutionsmittel.

In Abbildung 24 ist zu erkennen, dass mit zunehmendem NaCl-Gehalt (blau: Leitfähigkeit) die Elution der an die stationäre Phase gebundenen Proteine (schwarz: UV-Absorption) induziert wurde. Ein Großteil der Proteine eluierte zwischen 12 und 28 min, wobei zwei lokale Maxima bei etwa 16 und 20 min detektiert wurden. Für die anschließende Untersuchung der URP-generierenden Aktivität der Sub-Fractionen wurden ausschließlich die Sub-Fractionen verwendet, in denen die Elution von Proteinen im Chromatogramm erkennbar war. Daher wurden die Fractionen 12-29 an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und für 24 h mit

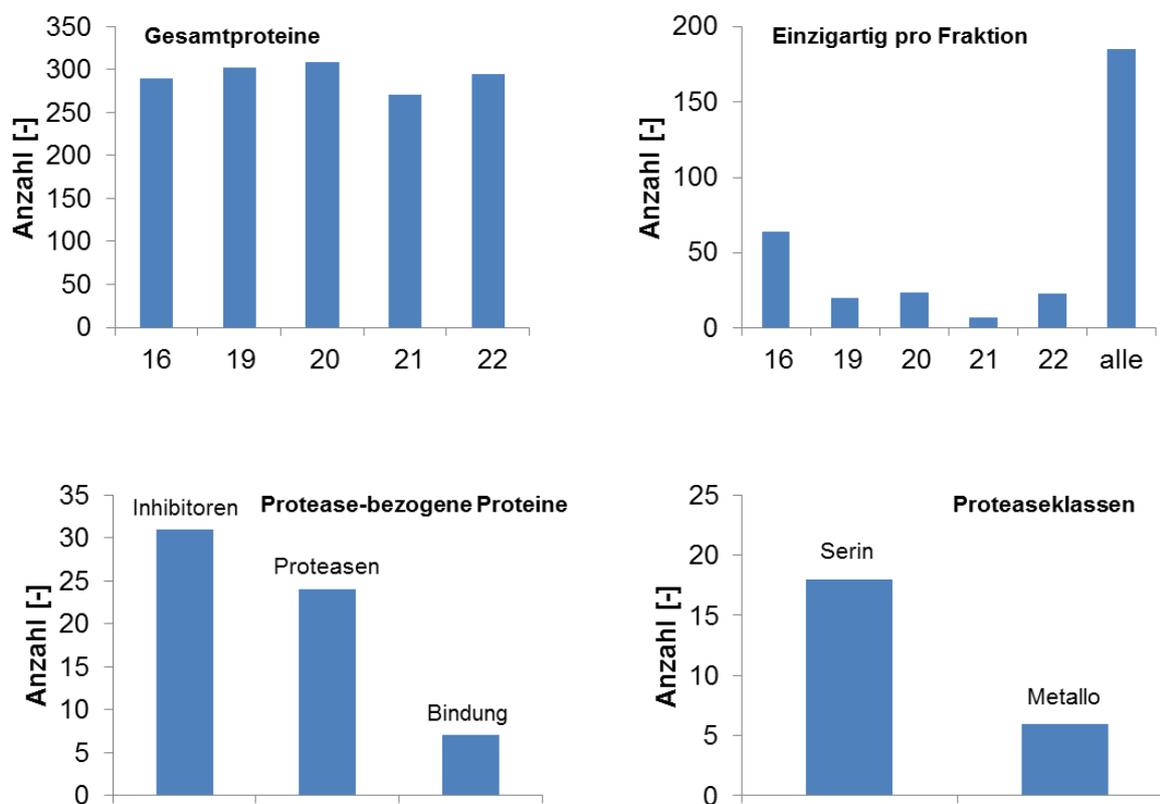
URP-S inkubiert. Als Positivkontrolle wurden 200 µg der Cohn-Fraktion IV-4 entsprechend mit URP-S für 24 h inkubiert. Die Inkubationen wurden chromatographisch getrennt und mittels LC-ESI-TOF-MS analysiert. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung des URP sind in Abbildung 25 dargestellt:



**Abbildung 25: LC-ESI-TOF-MS zur Quantifizierung von URP nach 24 h Inkubation der Fraktionen 12-29 der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S.** URP wurde relativ durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 509.220, der dem zweifach geladenen URP entspricht, quantifiziert. Das Profil der URP-generierenden Aktivität entspricht dem Elutionsprofil der Fraktionierung der Cohn-Fraktion IV-4. Die Fraktionen 16, 19, 20, 21 und 22 bewirkten die größte URP-generierende Aktivität. In der Negativkontrolle wurde kein URP detektiert.

Die relativ quantifizierte Menge an URP in den Inkubationen der Fraktionen 12-29 mit URP-S ist in Abbildung 25 dargestellt. Die relative Quantifizierung erfolgte durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 509.220, der dem zweifach geladenen URP entspricht. URP wurde in allen untersuchten Fraktionen detektiert, wobei das Profil der URP-generierenden Aktivität dem Elutionsprofil des Anionenaustauschs entspricht (Abbildung 24). In der Negativkontrolle wurde kein URP detektiert. Die höchste URP-generierende Aktivität wurde in den Fraktionen 16, 19, 20, 21 und 22 detektiert. Diese Fraktionen wurden im Folgenden zur Proteinidentifizierung mittels Trypsinierung und LC-MS/MS verwendet. Etwa 100 µg Protein entsprechende Volumina der Fraktionen wurden mit Harnstoff denaturiert, enthaltene Disulfidbrücken wurden durch DTT reduziert und freie Cysteinreste anschließend mit IAA alkyliert. Der tryptische Verdau wurde durch Zugabe von Trypsin gestartet und die entstandenen tryptischen Peptide wurden mittels LC-nanoESI-Orbitrap-MS analysiert. Es wurde eine Datenbankabfrage durchgeführt in der die korrespondierenden Proteine identifiziert wurden. Eine Übersicht aller mindestens mit einem

tryptischen Peptid identifizierten Proteine sowie die Anzahl an identifizierten Proteasen und Protease-bezogenen Proteinen sind in Abbildung 26 dargestellt:



**Abbildung 26: Übersicht der identifizierten Proteine, Proteasen und Protease-bezogenen Proteine.** Insgesamt wurden 458 unterschiedliche Proteine in den Fraktionen 16, 19, 20, 21 und 22 identifiziert. Die Überschneidung identifizierter Proteine in den Fraktionen war relativ hoch. Die meisten ausschließlich in einer Fraktion identifizierten Proteine wurden in Fraktion 16 identifiziert. Es wurden 24 Proteasen identifiziert, von denen 18 den Serinproteasen und sechs den Metalloproteasen zugeordnet werden konnten.

Es wurden insgesamt 458 Proteine in allen Fraktionen identifiziert. In den Fraktionen 16, 19, 20, 21 und 22 wurde mit 290, 303, 309, 271 und 295 identifizierten Proteinen eine vergleichbare Anzahl festgestellt. Es wurden 20, 24, 7 und 23 Proteine ausschließlich in den Fraktionen 19, 20, 21 und 22 identifiziert. Eine etwas höhere Anzahl von 64 Proteinen wurde ausschließlich in Fraktion 16 identifiziert. Dies lässt sich durch den etwas früheren Retentionsbereich gegenüber den in einem ähnlichen Retentionsbereich vorliegenden Fraktionen 19-22 erklären. Von allen identifizierten Proteinen wurden 185 in jeder der Fraktionen identifiziert. Insgesamt wurden in allen Fraktionen 24 Proteasen, 31 Proteaseinhibitoren und 7 Protease-bindende Proteine identifiziert. Bei 73 der insgesamt 458 identifizierten Proteine handelte es sich demnach um Proteasen oder Protease-bezogene Proteine. Von den 24 identifizierten Proteasen ließen sich 18 den Serinproteasen und sechs den Metalloproteasen zuordnen. Eine Auflistung aller

identifizierten Proteasen, mit Informationen über ihre Schnittspezifität, ist in Tabelle 16 dargestellt:

**Tabelle 16:** Identifizierte Proteasen, zugehörige Proteaseklasse und Informationen über die Schnittspezifität<sup>[110,111,115]</sup>

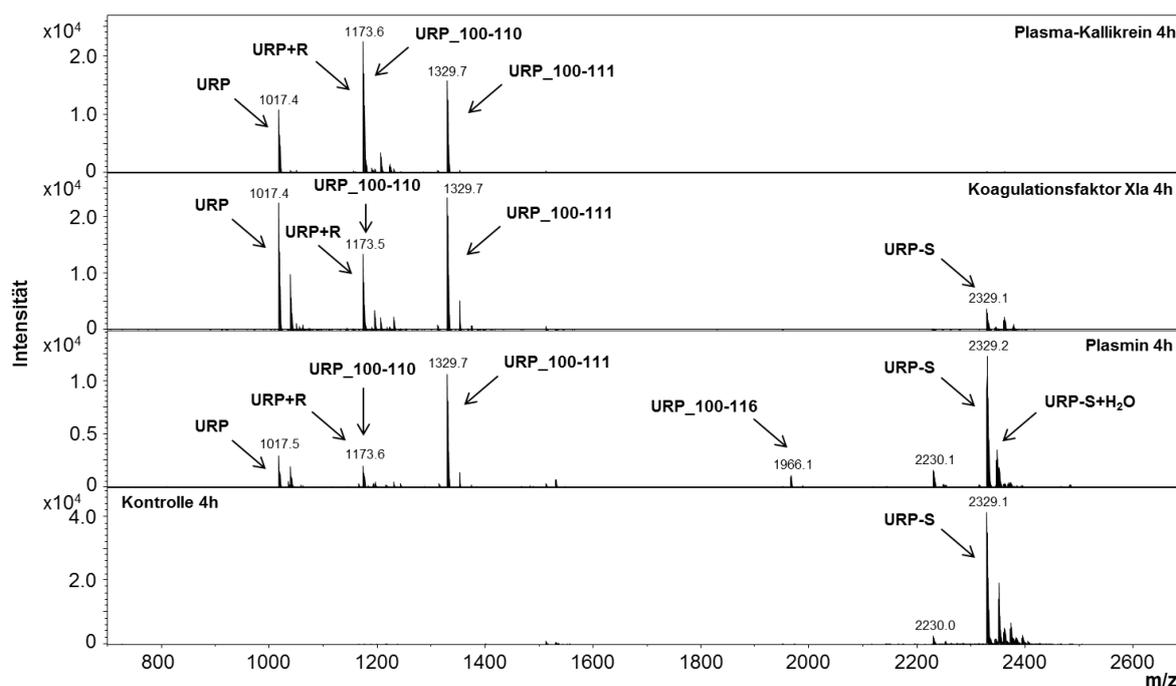
<b>Protease</b>	<b>Proteaseklasse</b>	<b>bekannte Schnittspezifität</b>
CD5 antigen-like	Serin	k/A
Haptoglobin related protein	Serin	enzymatisch inaktiv
Haptoglobin	Serin	enzymatisch inaktiv
Hepatocyte growth factor activator	Serin	Arg- -Val
Koagulationsfaktor X	Serin	Arg- -Thr, Arg- -Ile
Koagulationsfaktor XI	Serin	Arg- -Ala, Arg- -Val
Koagulationsfaktor XII	Serin	Arg- -Ile
Komplement C1r subcomponent	Serin	Arg- -Ile, Lys- -Ile
Komplement C1r subcomponent-like protein	Serin	k/A
Komplement C1s subcomponent	Serin	Arg- -Ala, Arg- -Lys, Lys- -Lys
Komplement C2	Serin	Arg- -Ser, Arg- -Xaa
Komplementfaktor B	Serin	Arg- -Ser, Arg- -Xaa
Komplementfaktor I	Serin	k/A
Plasma-Kallikrein	Serin	Arg- -Xaa, Lys- -Xaa
Plasminogen	Serin	Arg- -Xaa, Lys- -Xaa
Prothrombin	Serin	Arg- -Gly
Vitamin K-dependent protein C	Serin	X-asp-pro/thr-Arg- -ser/gly/met-X
Vitamin K-dependent protein Z	Serin	enzymatisch inaktiv
Aminopeptidase O	Metallo	Freisetzung N-terminaler Aminosäuren
Beta-Ala-His Dipeptidase	Metallo	Xaa- -His-Dipeptid, Dipeptide
Carboxypeptidase B2	Metallo	Freisetzung C-terminaler Arg- und Lys-Reste
Carboxypeptidase N catalytic chain	Metallo	Freisetzung basischer C-terminaler Aminosäuren
Dipeptidase 2	Metallo	Dipeptide
Matrix-Metalloproteinase-9	Metallo	Gly/Pro,Ala/-/Gly- -Leu/-/Gly,Ala/-

In der Tabelle 16 sind die identifizierten Proteasen und ihre überwiegend aus den Datenbanken Uniprot<sup>[111]</sup> und MEROPS<sup>[110]</sup> ermittelten proteolytischen Schnittspezifitäten aufgelistet. Die dibasische Schnittstelle KR<sup>111</sup> zur Bildung des URP unterscheidet sich von der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup> zur Bildung des U-II neben der Anzahl basischer Aminosäuren auch in der Aminosäure in P1'-Position. Hierbei handelt es sich mit Alanin im URP um eine aliphatische, mit der Glutaminsäure im U-II um eine saure Aminosäure. Die Bildung von URP erfordert eine proteolytische Prozessierung der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup> C-terminal des Argininrestes Arg<sup>111</sup>. Von den insgesamt 24 identifizierten Proteinen handelte es sich bei den Proteasen Carboxypeptidase B, Carboxypeptidase N catalytic chain und der Aminopeptidase O um Exoproteasen, die Aminosäuren vom C- bzw. N-Terminus abspalten und daher nicht für die hier erforderliche endoproteolytische Spaltung geeignet sind. Die Dipeptidasen Beta-Ala-His Dipeptidase und Dipeptidase 2 verfügen ebenfalls nicht über eine geeignete Substratspezifität, da sie die Proteolyse von Dipeptiden bewirken. Die Proteasen Haptoglobin, Haptoglobin related Protein und Vitamin K-dependent Protein Z wurden als proteolytisch inaktiv beschrieben. Auch für die Matrix-Metalloproteinase-9 wurde eine von basischen Schnittmotiven unabhängige und daher für die Bildung von URP ungeeignete Schnittspezifität erhalten. Für die Proteasen CD5 antigen-like, Complement C1r subcomponent-like protein und den Komplementfaktor I ist in der Uniprot- und der MEROPS-Datenbank keine Schnittspezifität verfügbar. Alle übrigen Kandidaten verfügen grundsätzlich über eine geeignete Schnittspezifität, da sie eine Proteolyse bevorzugt C-terminal von Arginin oder C-terminal von Arginin und Lysin bewirken. Für die Proteasen Hepatocyte growth factor activator, Koagulationsfaktor XII, Thrombin, Complement C1s subcomponent, Complement C1r subcomponent und den Koagulationsfaktor XI ist eine aliphatische Aminosäure in P1'-Position als bevorzugt beschrieben. Von diesen handelt es sich für das Complement C1s subcomponent und den Koagulationsfaktor XIa um eine Bevorzugung von Alanin in P1'-Position, was der Prozessierung C-terminal des Argininrestes R<sup>111</sup> und N-terminal des Alaninrestes A<sup>110</sup> des URP entspricht. Zudem verfügen die Proteasen Komplementfaktor B, Komplement C2, Plasma-Kallikrein und Plasmin über geeignete Schnittspezifitäten C-terminal von Arginin oder Arginin und Lysin. Von den Proteasen mit als geeignet beschriebener Schnittspezifität wurden die Proteasen Complement C1s subcomponent, Hepatocyte growth factor activator und der Koagulationsfaktor XI nur anhand eines tryptischen Peptids identifiziert, sodass mit geringerer Wahrscheinlichkeit von einer korrekten Identifizierung auszugehen ist. Auf dieser Grundlage und der Verfügbarkeit der Proteasen, deren proteolytische Aktivität zur Bildung von U-II ebenfalls untersucht wurde, sollten die Proteasen Plasma-Kallikrein, Plasmin, Thrombin, Koagulationsfaktor XIIa und Koagulationsfaktor XIa auf

ihre potentielle URP-generierende Aktivität untersucht werden. Der Komplementfaktor I, der in einer vorherigen Arbeit<sup>[91]</sup> als U-II-generierendes Enzym beschrieben wurde, wurde ebenfalls auf seine URP-generierende Aktivität untersucht.

### **6.2.3 Validierung potentieller URP-generierender Enzyme**

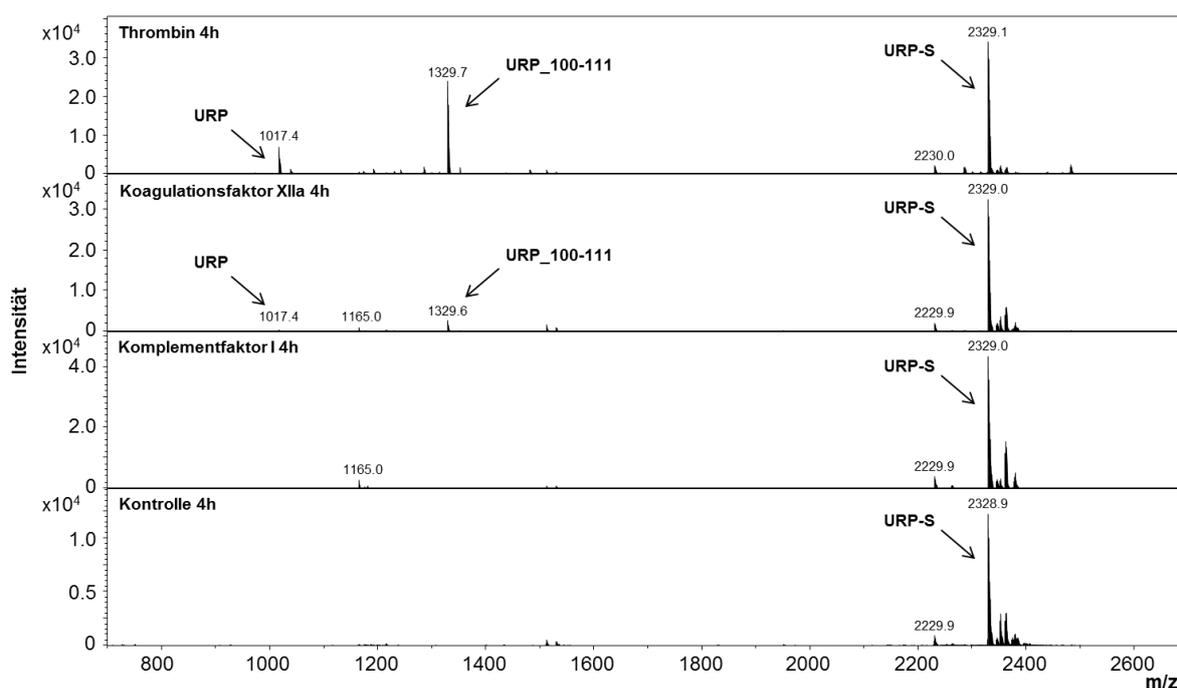
Die potentielle URP-generierende Aktivität geeigneter Proteasen, die zuvor nach Anreicherung der URP-generierenden Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 identifiziert wurden, sollte untersucht und validiert werden. Dazu wurden die Proteasen Plasma-Kallikrein, Plasmin, Koagulationsfaktor XIa, Thrombin, Koagulationsfaktor XIIa und der Komplementfaktor I verwendet, die zuvor bereits auf ihre U-II-generierende Aktivität hin untersucht wurden. Für jede dieser Proteasen wurde eine Schnittspezifität C-terminal von Arginin oder C-terminal von Arginin und Lysin beschrieben, die grundsätzlich der erforderlichen Schnittspezifität zur proteolytischen Prozessierung der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup> zur Bildung von URP entspricht. Für die Proteasen Koagulationsfaktor XIIa, Thrombin und Koagulationsfaktor XIa wurde zudem eine Bevorzugung aliphatischer Aminosäuren in P1'-Position beschrieben, wobei Isoleucin für den Koagulationsfaktor XIIa, Glycin für Thrombin und Alanin für den Koagulationsfaktor XIa als bevorzugt beschrieben wurden. Dies entspricht insbesondere für den Koagulationsfaktor XIa exakt der erforderlichen Schnittspezifität zur Proteolyse der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup>, bei der sich ein Alaninrest in P1'-Position befindet. Zur Validierung einer potentiellen URP-generierenden Aktivität wurden die kommerziell erworbenen Proteasen an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und mit URP-S inkubiert. In Abbildung 27 sind die MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubationen von jeweils 1 µg Plasma-Kallikrein, Koagulationsfaktor XIa und Plasmin dargestellt:



**Abbildung 27: MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubationen von Plasma-Kallikrein, Koagulationsfaktor XIa und Plasmin mit URP-S.** Nach 4 h Inkubation von Plasma-Kallikrein, Koagulationsfaktor XIa und Plasmin mit URP-S wurden URP und URP+R detektiert. Zudem wurden die N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukte URP\_100-110 und URP\_100-111 detektiert. In der Negativkontrolle ist das Peptidsubstrat URP-S zu erkennen, jedoch keine Proteolyseprodukte.

Nach 4 h Inkubation von jeweils 1  $\mu\text{g}$  Plasma-Kallikrein, Koagulationsfaktor XIa und Plasmin wurden URP und die N-terminal verlängerte Form URP+R detektiert. Zudem sind die N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukte URP\_100-110 und URP\_100-111 zu erkennen. Sowohl für Plasma-Kallikrein als auch für den Koagulationsfaktor XIa und Plasmin wurde eine doppelte proteolytische Prozessierung der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup> und damit eine URP-generierende Aktivität festgestellt. Dabei war der Abbau des Peptidsubstrates URP-S für Plasma-Kallikrein am stärksten, wo URP-S nach 4 h nicht mehr deutlich detektiert wurde. Das Peptidsubstrat URP-S wurde in der Inkubation des Koagulationsfaktor XIa und des Plasmins sowie in der Negativkontrolle detektiert. Für Plasmin wurde zuvor in der Untersuchung der U-II-generierenden Aktivität eine starke proteolytische Aktivität gegenüber dem in der zyklischen Struktur befindlichen Lysinrest K<sup>121</sup> detektiert (Abbildung 10). Eine analoge Prozessierung trat ebenfalls innerhalb der zyklischen Struktur des URP auf und führte zu den nur mit geringer Intensität detektierten m/z-Werten 1035.5 und 1191.6, die URP und URP+R mit einem Massenshift von 18 Da entsprechen. Zudem wurde ein Signal bei m/z 2346.2 detektiert, das dem Peptidsubstrat URP-S mit einem Massenshift von 18 Da entspricht. Analog der Prozessierung von UCE-S fand hier eine zusätzliche endoproteolytische Spaltung C-terminal des Lysinrestes K<sup>116</sup>

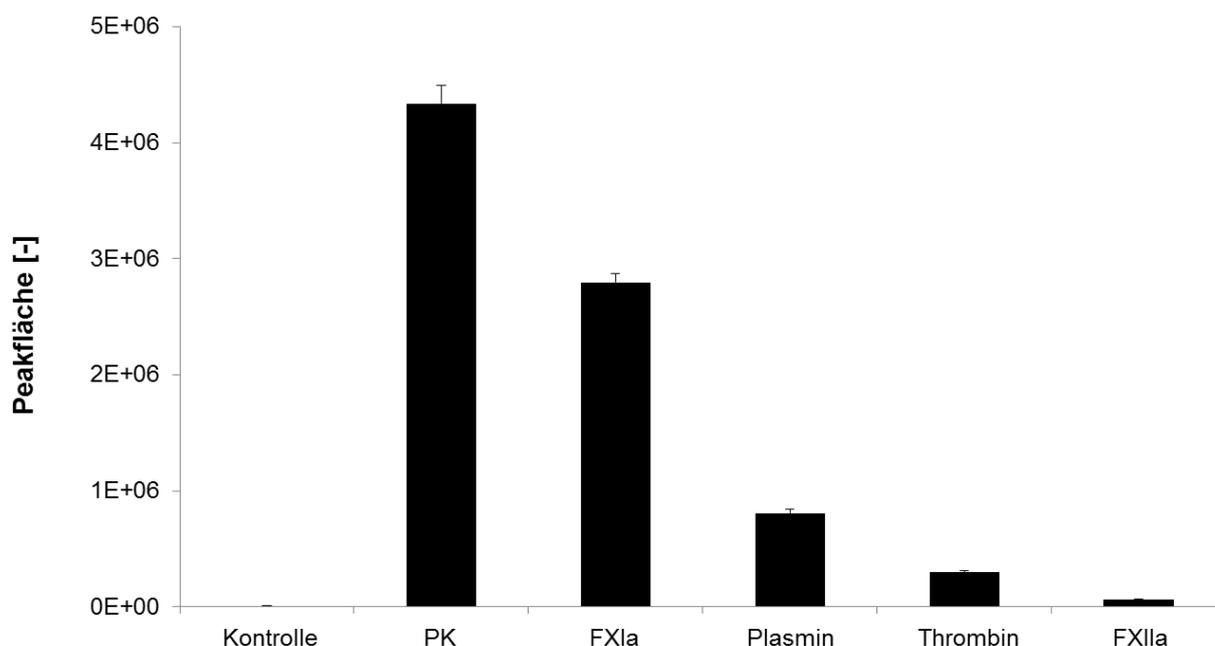
innerhalb der zyklischen Struktur statt. Die entstehenden Proteolyseprodukte blieben über die Disulfidbrücke miteinander verknüpft, sodass eine Erhöhung der Masse von 18 Da durch ein zusätzliches Wassermolekül detektiert wurde. Außerdem wurde das Proteolyseprodukt URP\_100-116 mit einem  $m/z$ -Wert von 1966.1 detektiert. In diesem Fall fand ebenfalls eine Proteolyse C-terminal des Lysinrestes  $K^{116}$  statt, aber die Proteolyseprodukte blieben nicht über die Disulfidbrücke verknüpft. Dies impliziert eine Reduktion der Disulfidbrücke. Zusammenfassend wurde für die Proteasen Plasma-Kallikrein, Koagulationsfaktor XIa und Plasmin eine proteolytische Prozessierung der gesamten dibasischen Schnittstelle  $KR^{111}$ , jeweils C-terminal von Arginin oder Lysin, und entsprechend eine URP-generierende Aktivität festgestellt. Die proteolytische Aktivität war dabei für Plasma-Kallikrein am stärksten. Plasmin bewirkte eine zusätzliche Proteolyse C-terminal des innerhalb der zyklischen Struktur des URP befindlichen Lysinrestes  $K^{116}$ . In Abbildung 28 sind die MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubationen von jeweils 1  $\mu\text{g}$  Thrombin, Koagulationsfaktor XIa und Komplementfaktor I mit URP-S dargestellt:



**Abbildung 28: MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubationen von Thrombin, Koagulationsfaktor XIa und Komplementfaktor I mit URP-S.** Nach 4 h Inkubation des Thrombins und des Koagulationsfaktor XIa mit URP-S wurden URP und das N-terminal korrespondierende Proteolyseprodukt URP\_100-111 detektiert. In der Inkubation des Komplementfaktor I sowie in der Negativkontrolle wurde das Peptidsubstrat URP-S detektiert, jedoch keine Proteolyseprodukte.

Nach 4 h Inkubation von jeweils 1 µg Thrombin und Koagulationsfaktor XIIa mit URP-S wurden URP und das N-terminal korrespondierende Proteolyseprodukt URP\_100-111 festgestellt. Es wurde eine proteolytische Prozessierung C-terminal des Argininrests R<sup>111</sup> und somit eine URP-generierende Aktivität festgestellt. Eine Prozessierung C-terminal des Lysinrestes K<sup>110</sup>, die für Plasma-Kallikrein, Koagulationsfaktor XIa und Plasmin beobachtet wurde, wurde in den Inkubationen des Thrombins und des Koagulationsfaktor XIIa nicht detektiert. Die proteolytische Aktivität des Thrombins war dabei größer als die des Koagulationsfaktor XIIa. In der Inkubation des Komplementfaktor I und der Negativkontrolle wurde das Peptidsubstrat URP-S detektiert, jedoch keine Proteolyseprodukte. Zusammenfassend wurde eine einfache proteolytische Prozessierung der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup> C-terminal des Arginins durch Thrombin und den Koagulationsfaktor XIIa beobachtet. In der Inkubation des Komplementfaktor I mit URP-S wurde keine proteolytische Aktivität festgestellt. Insgesamt wurde für die Proteasen Plasma-Kallikrein, Koagulationsfaktor XIa, Plasmin, Thrombin und den Koagulationsfaktor XIIa eine URP-generierende Aktivität detektiert.

Um die URP-generierende Aktivität untereinander zu vergleichen, sollte zusätzlich eine relative Quantifizierung von URP mittels LC-ESI-TOF-MS durchgeführt werden. Dazu wurde jeweils 1 µg der Proteasen Plasma-Kallikrein, Koagulationsfaktor XIa, Plasmin, Thrombin und Koagulationsfaktor XIIa an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und für 4 h mit URP-S inkubiert. Die Inkubationen wurden chromatographisch getrennt und mittels LC-ESI-TOF-MS analysiert. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung des URP sind in Abbildung 29 dargestellt:



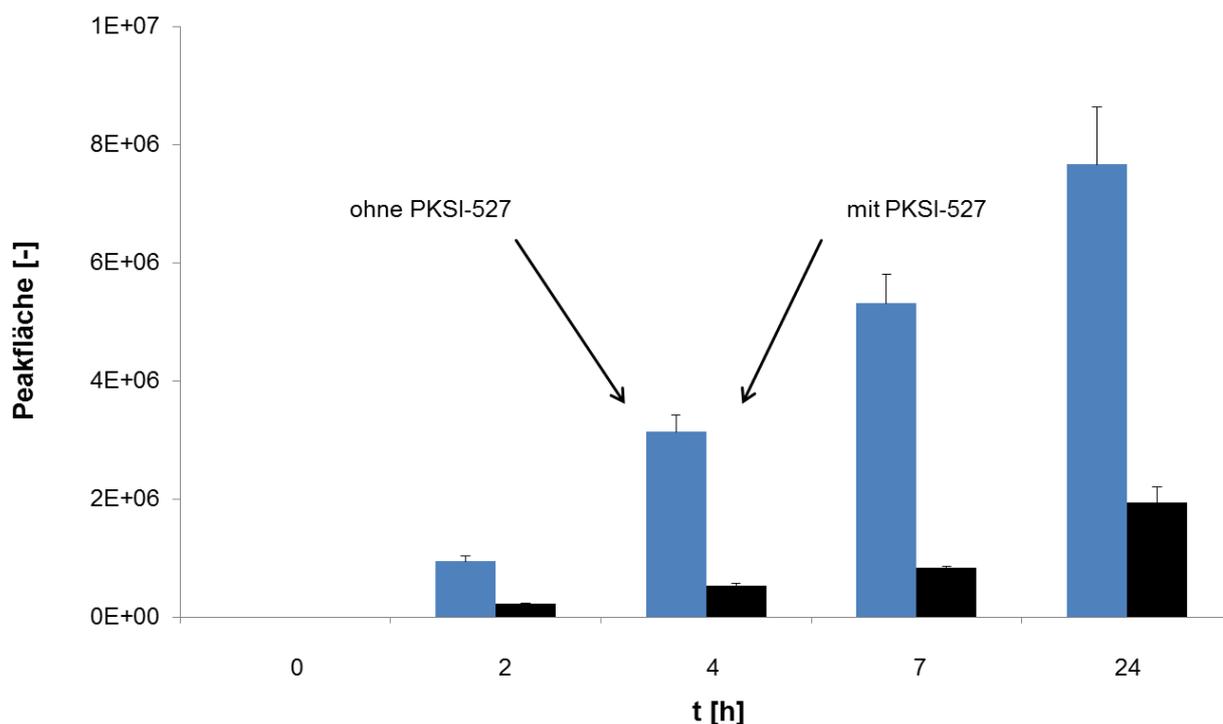
**Abbildung 29: LC-ESI-TOF-MS zur Quantifizierung von URP nach 4 h Inkubation von jeweils 1 µg Plasma-Kallikrein, Koagulationsfaktor XIa, Plasmin, Thrombin bzw. Koagulationsfaktor XIIa mit URP-S.** URP wurde relativ durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 509.220, der dem zweifach geladenen Peptid entspricht, quantifiziert. Eine Bildung von URP wurde mit absteigender Aktivität für Plasma-Kallikrein, Koagulationsfaktor XIa, Plasmin, Thrombin und Koagulationsfaktor XIIa detektiert. In der Negativkontrolle wurde keine deutliche Menge an URP detektiert.

In Abbildung 29 ist die relativ quantifizierte Menge an URP in den Inkubationen von jeweils 1 µg Plasma-Kallikrein, Koagulationsfaktor XIa, Plasmin, Thrombin und Koagulationsfaktor XIIa zu erkennen. Dazu wurde das EIC mit dem m/z-Wert von 509.220, der dem zweifach geladenen URP entspricht, integriert. URP wurde in allen Inkubationen detektiert, was die Ergebnisse der qualitativen Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS bestätigt. Die größte Menge an gebildetem URP wurde in der Inkubation des Plasma-Kallikreins detektiert. Eine ähnlich starke URP-generierende Aktivität wurde für den Koagulationsfaktor XIa beobachtet. Diese war um den Faktor 1.6 gegenüber Plasma-Kallikrein reduziert. Die integrierte Peakfläche des URP lag in der Inkubation des Plasmins um den Faktor 5.4 gegenüber Plasma-Kallikrein und um den Faktor 3.5 gegenüber dem Koagulationsfaktor XIa reduziert vor. In den Inkubationen des Thrombins und des Koagulationsfaktor XIIa wurde eine Reduzierung der integrierten Peakfläche des URP um den Faktor 14.7 bzw. 66.8 gegenüber Plasma-Kallikrein und um den Faktor 9.5 bzw. 43.1 gegenüber dem Koagulationsfaktor XIa detektiert. In der Negativkontrolle wurde keine deutliche Menge an URP detektiert. Zusammenfassend wurde für Plasma-Kallikrein nicht nur die höchste U-II-generierende, sondern auch die höchste URP-generierende Aktivität detektiert. Dennoch

bewirkten auch der Koagulationsfaktor XIa, Plasmin, Thrombin und der Koagulationsfaktor XIIa eine URP-generierende Aktivität, die insbesondere für den Koagulationsfaktor XIa stark ausgeprägt war. Die physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins zur Bildung von U-II wurde in einer vorherigen<sup>[11]</sup> und dieser Arbeit mithilfe von selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitoren untersucht und validiert. Im Folgenden sollte die physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins zur Bildung von URP analog mit einem selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitor untersucht werden.

#### **6.2.4 Physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins für die Bildung von URP**

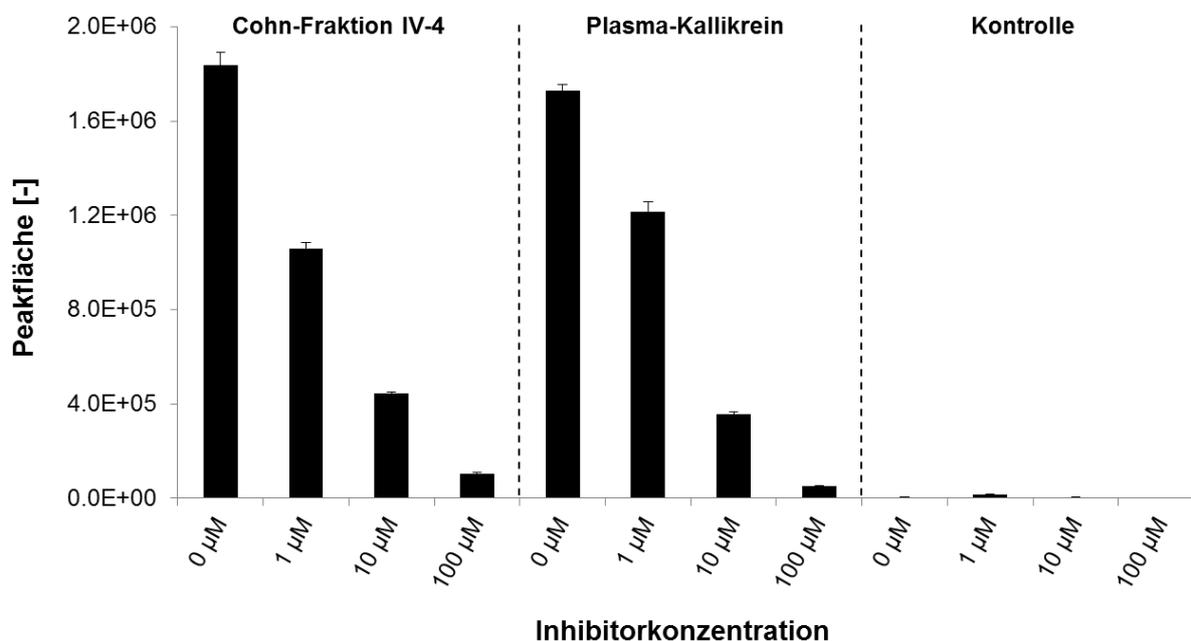
Die vorangegangene Untersuchung der URP-generierenden Aktivität geeigneter Proteasekandidaten ergab eine URP-generierende Aktivität der Proteasen Plasma-Kallikrein, Koagulationsfaktor XIa, Plasmin, Thrombin und Koagulationsfaktor XIIa. Diese war für Plasma-Kallikrein und den Koagulationsfaktor XIa am höchsten, wobei die integrierte Peakfläche der gebildeten Menge an URP für Plasma-Kallikrein um den Faktor 1.6 gegenüber dem Koagulationsfaktor XIa erhöht war. Daher sollte die physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins an der Bildung von URP durch ein Inhibierungsexperiment mithilfe des selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitors PKSI-527 untersucht werden. 200 µg der Cohn-Fraktion IV-4 wurden an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und mit URP-S in An- und Abwesenheit von PKSI-527 in einer Konzentration von 10 µM inkubiert. Es wurden Aliquote nach 0, 2, 4, 7 und 24 h entnommen. Die Proben wurden chromatographisch getrennt und mittels LC-ESI-TOF-MS analysiert. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung des URP sind in Abbildung 30 dargestellt:



**Abbildung 30: LC-ESI-TOF-MS zur Quantifizierung von URP in der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S in An- und Abwesenheit des Plasma-Kallikrein Inhibitors PKSI-527 (10  $\mu\text{M}$ ).** URP wurde relativ durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 509.220, der dem zweifach geladenen Peptid entspricht, quantifiziert. Die Menge an URP nahm in An- und Abwesenheit von PKSI-527 kontinuierlich zu. Es ist eine deutliche Inhibierung der URP-generierenden Aktivität in Anwesenheit von PKSI-527 zu erkennen.

In Abbildung 30 ist die relativ quantifizierte Menge an URP in der Inkubation von 200  $\mu\text{g}$  der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S in An- und Abwesenheit des selektiven Plasma-Kallikrein Inhibitors PKSI-527 dargestellt. Die relative Quantifizierung erfolgte durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 509.220, der dem zweifach geladenen URP entspricht. Nach 2 h Inkubation in An- und Abwesenheit von PKSI-527 wurde URP detektiert. Es ist ein kontinuierlicher Anstieg der gebildeten Menge an URP, sowohl in An- als auch in Abwesenheit von PKSI-527, zu erkennen. In Anwesenheit von PKSI-527 wurde zu jedem Messzeitpunkt eine deutliche Reduzierung der gebildeten Menge an URP gegenüber der Inkubation in Abwesenheit von PKSI-527 detektiert. Nach 24 h wurde eine Reduzierung der integrierten Peakfläche des URP auf 25.2% gegenüber der Positivkontrolle festgestellt. Dies zeigt eine deutliche Inhibierung der URP-generierenden Aktivität innerhalb der Cohn-Fraktion IV-4 durch den selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitor PKSI-527. Die Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S wurde zur weiteren Untersuchung der inhibitorischen Wirkung des PKSI-527 auf die URP-generierende Aktivität erneut in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an PKSI-527 durchgeführt. Zudem wurde die Inhibierung der URP-generierenden Aktivität von kommerziell erworbenem Plasma-Kallikrein durch PKSI-527

untersucht. 200 µg der Cohn-Fraktion IV-4 bzw. 0.5 µg Plasma-Kallikrein wurden an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und in Anwesenheit von PKSI-527 in den Konzentrationen 1, 10 und 100 µM mit URP-S inkubiert. Die Inkubationen wurden chromatographisch getrennt und mittels LC-ESI-TOF-MS analysiert. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung des URP sind in Abbildung 31 dargestellt:



**Abbildung 31:** LC-ESI-TOF-MS zur Quantifizierung von URP in den Inkubationen der Cohn-Fraktion IV-4 bzw. des Plasma-Kallikreins mit URP-S in An- und Abwesenheit des Plasma-Kallikrein-Inhibitors PKSI-527. URP wurde relativ durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 509.220, der dem zweifach geladenen Peptid entspricht, quantifiziert. PKSI-527 wurde in den Konzentrationen 1, 10 und 100 µM eingesetzt. In beiden Inkubationen wurde eine deutliche Inhibierung der URP-generierenden Aktivität durch PKSI-527 gegenüber der Positivkontrolle detektiert. Die Reduzierung der URP-Bildung stieg mit höherer InhibitorKonzentration.

Der Abbildung 31 ist die relativ quantifizierte Menge an URP in den Inkubationen von 200 µg der Cohn-Fraktion IV-4 und von 0.5 µg Plasma-Kallikrein mit URP-S in Anwesenheit des selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitors PKSI-527 in den Konzentrationen 1, 10 und 100 µM zu entnehmen. Diese ergibt sich aus Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 509.220, der dem zweifach geladenen URP entspricht. In der Negativkontrolle wurde URP nicht deutlich detektiert. Nach 4 h Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S ohne PKSI-527 wurde eine starke Bildung von URP festgestellt. In Anwesenheit von PKSI-527 wurde eine deutliche Inhibierung der URP-generierenden Aktivität detektiert, die mit steigender InhibitorKonzentration zunahm. Dabei war die integrierte Peakfläche des URP in Anwesenheit von 1, 10 und 100 µM PKSI-527 auf 57.7%, 24.1% und 5.7% gegenüber der Positivkontrolle reduziert. Auch nach 4 h Inkubation des Plasma-

Kallikreins mit URP-S ohne PKSI-527 wurde URP mit hoher Intensität detektiert. Es wurde ebenfalls eine mit steigender Konzentration an PKSI-527 stärker ausfallende deutliche Inhibierung der URP-generierenden Aktivität festgestellt. In Anwesenheit von 1, 10 und 100  $\mu\text{M}$  PKSI-527 wurde eine Reduzierung der integrierten Peakfläche des URP auf 70.4%, 20.6% und 3.1% gegenüber der Positivkontrolle detektiert.

Zusammenfassend wurde in der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  des selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitors PKSI-527 zu jedem Messzeitpunkt eine deutliche Inhibierung der URP-generierenden Aktivität festgestellt. Die Inkubationen der Cohn-Fraktion IV-4 und des Plasma-Kallikreins mit unterschiedlichen Konzentrationen an PKSI-527 zeigten eine stärker ausfallende Inhibierung für zunehmende Inhibitorkonzentrationen. Beide Experimente zeigten, dass Plasma-Kallikrein zu einem großen Anteil für die URP-generierende Aktivität innerhalb der Cohn-Fraktion IV-4 verantwortlich ist. Eine Restaktivität zur Bildung von URP wurde auch in einer Konzentration des PKSI-527 von 100  $\mu\text{M}$  in der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S detektiert. Diese Daten implizieren eine hohe physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins zur Bildung von URP.

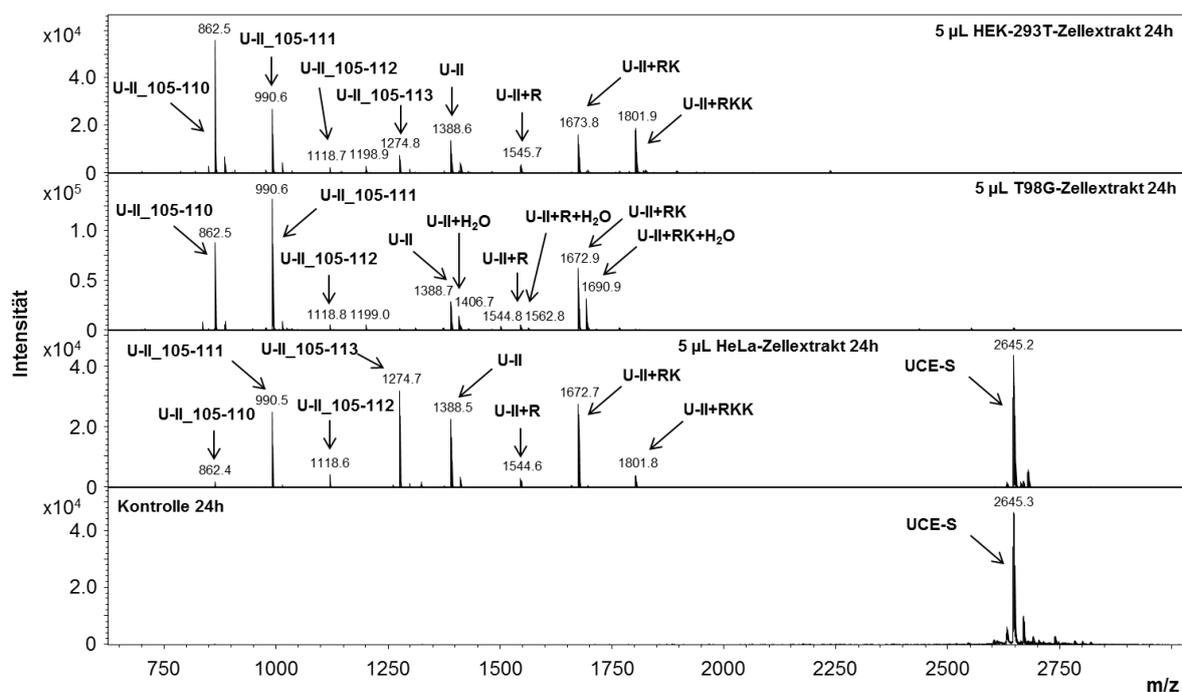
### **6.3 Untersuchung der intrazellulären U-II- und URP-generierenden Aktivität**

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die U-II/URP-generierende Aktivität in der Blutzirkulation anhand der Cohn-Fraktion IV-4 untersucht. Es erfolgte jeweils eine Anreicherung der U-II/URP-generierenden Aktivität durch Kombination einer weiteren Fraktionierung der Cohn-Fraktion IV-4 und eines Massenspektrometrie-basierten Enzymassays zur Quantifizierung von U-II und URP. In den aktivsten Sub-Fractionen wurde eine Proteinidentifizierung durch Trypsinierung und LC-MS/MS durchgeführt, um enthaltene Proteasen zu identifizieren. Die proteolytische Aktivität geeigneter Proteasen sollte anschließend validiert werden. Ergänzend dazu sollte eine potentielle intrazelluläre U-II/URP-generierende Aktivität anhand von Zellen der Zelllinien HEK-293T, T98G und HeLa charakterisiert und korrespondierende Enzyme identifiziert werden.

#### **6.3.1 Proteolytische Prozessierung von U-II und URP durch Zellextrakte der Zelllinien HEK-293T, T98G und HeLa**

Die proteolytische Aktivität von Zellextrakten der Zelllinien HEK-293T, T98G und HeLa gegenüber den Peptidsubstraten UCE-S und URP-S sollte qualitativ untersucht werden. Zur Gewinnung der Zellextrakte wurden Aliquote der HEK-293T, T98G bzw. HeLa-Zellen aufgeschlossen und die

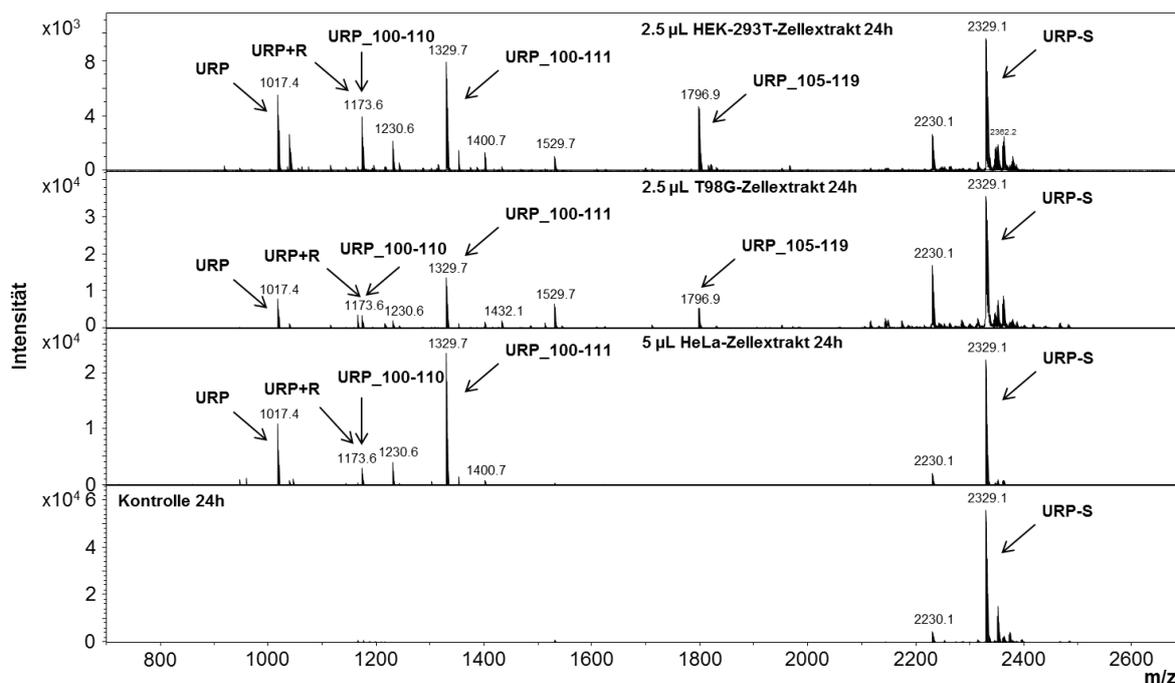
Zellextrakte entnommen. Die Konzentrationen der verwendeten HEK-293T-, T98G- und HeLa-Zellextrakte wurden mittels Spektrophotometrie auf 0.841  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 1.825  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  und 1.408  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  bestimmt. Die gewonnenen Zellextrakte wurden an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und mit UCE-S bzw. URP-S inkubiert. In Abbildung 32 sind die MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubationen von jeweils 5  $\mu\text{L}$  des HEK-293T-, T98G- und HeLa-Zellextrakte mit UCE-S nach 24 h dargestellt:



**Abbildung 32: MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubationen der Zellextrakte HEK-293T, T98G und HeLa mit UCE-S.** Nach 24h Inkubation der Zellextrakte HEK-293T und HeLa wurden U-II, U-II+R, U-II+RK und U-II+RKK sowie die N-terminalen Proteolyseprodukte U-II\_105-110, U-II\_105-111, U-II\_105-112 und U-II\_105-113 detektiert. Nach 24 h Inkubation des T98G-Zellextraktes sind U-II, U-II+R, U-II+RK sowie U-II+H<sub>2</sub>O, U-II+R+H<sub>2</sub>O und U-II+RK+H<sub>2</sub>O zu erkennen. Zudem wurden die N-terminalen Proteolyseprodukte U-II\_105-110, U-II\_105-111 und U-II\_105-112 detektiert. In der Negativkontrolle ist das Peptidsubstrat UCE-S zu erkennen, jedoch keine Proteolyseprodukte.

Nach 24 h Inkubation von je 5  $\mu\text{L}$  des HEK-293T- und des HeLa-Zellextraktes mit UCE-S wurden U-II und die N-terminal verlängerten Formen U-II+R, U-II+RK und U-II+RKK detektiert. Außerdem wurden die N-terminalen Proteolyseprodukte U-II\_105-110, U-II\_105-111, U-II\_105-112 und U-II\_105-113 festgestellt. Es fand eine dreifache proteolytische Prozessierung der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup>, jeweils C-terminal von Arginin oder Lysin, statt. Zudem wurde eine proteolytische Prozessierung C-terminal des Tyrosinrestes Y<sup>110</sup> festgestellt. Nach 24 h Inkubation des T98G-Zellextraktes mit UCE-S sind U-II, die N-terminal verlängerten Formen U-II+R und U-II+RK und die N-terminalen Proteolyseprodukte U-II\_105-110, U-II\_105-111 und

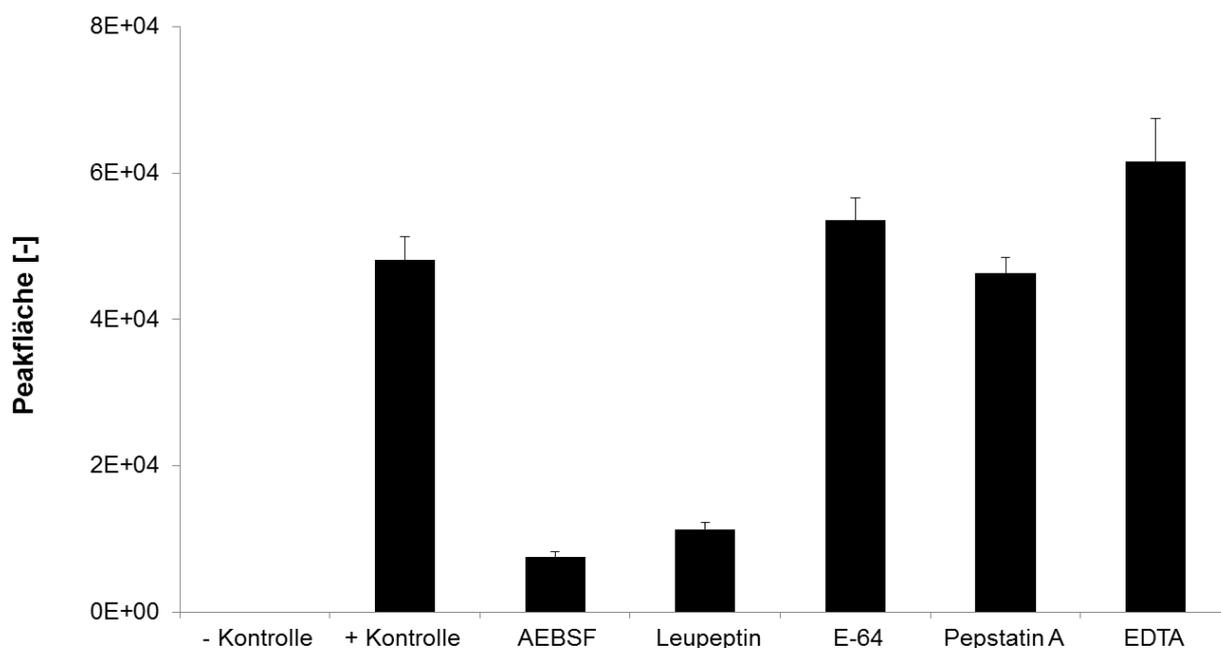
U-II<sub>105-112</sub> zu erkennen. Die Proteolyseprodukte U-II, U-II+R und U-II+RK wurden, wie zuvor für das Proteolyseprodukt U-II+RK in der Inkubation von Plasmin und UCE-S beobachtet (Abbildung 10), zusätzlich mit einem Massenshift von 18 Da anhand der m/z-Werte 1406.7, 1562.8 und 1690.9 detektiert. Dies lässt sich durch eine zusätzliche proteolytische Prozessierung C-terminal des in der zyklischen Struktur des U-II befindlichen Lysinrestes K<sup>121</sup> erklären. Die dabei entstandenen Proteolyseprodukte blieben weiterhin über die Disulfidbrücke miteinander verknüpft, was in einer Erhöhung der Masse von 18 Da durch ein zusätzliches Wassermolekül resultierte. Es wurde eine dreifache proteolytische Prozessierung der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup>, jeweils C-terminal von Arginin oder Lysin, und zudem eine proteolytische Prozessierung C-terminal des Lysinrestes K<sup>121</sup> beobachtet. Während das Peptidsubstrat UCE-S in der Inkubation des HeLa-Zellextraktes zu erkennen ist, wurde es in den Inkubationen des HEK-293T- und des T98G-Zellextraktes kaum detektiert und scheinbar größtenteils abgebaut. In jedem der verwendeten Zellextrakte wurde eine deutliche U-II-generierende Aktivität festgestellt. Zur Untersuchung der URP-generierenden Aktivität der HEK-293T-, T98G- und HeLa-Zellextrakte wurden diese erneut an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und mit URP-S inkubiert. In Abbildung 33 sind die MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubationen von 2.5 µL des HEK-293T-, 2.5 µL des T98G- und 5 µL des HeLa-Zellextraktes mit URP-S nach 24 h dargestellt:



**Abbildung 33: MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubationen der Zellextrakte HEK-293T, T98G und HeLa mit URP-S.** Nach 24 h Inkubation der Zellextrakte HEK-293T und T98G wurden URP und URP+R sowie die N-terminalen Proteolyseprodukte URP\_100-110 und URP\_100-111 detektiert. Zudem ist das Proteolyseprodukt URP\_105-119 zu erkennen. Nach 24 h Inkubation des HeLa-Zellextraktes wurden URP und URP+R sowie die N-terminalen Proteolyseprodukte URP\_100-110 und URP\_100-111 detektiert. In der Negativkontrolle ist das Peptidsubstrat URP-S zu erkennen, jedoch keine Proteolyseprodukte.

Nach 24 h Inkubation des HEK-293T- und T98G-Zellextraktes mit URP-S wurden URP, die N-terminal verlängerte Form URP+R und die N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukte URP\_100-110 und URP\_100-111 detektiert. Es fand demnach eine doppelte proteolytische Prozessierung der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup>, jeweils C-terminal von Arginin oder Lysin, statt. Es wurde ein weiteres Signal bei m/z 1796.9 detektiert. Dies lässt sich dem Proteolyseprodukt URP\_105-119 zuordnen, dessen Entstehung eine proteolytische Prozessierung C-terminal des Phenylalaninrestes F<sup>103</sup> erfordert. In der Inkubation des HeLa-Zellextraktes mit URP-S wurden nach 24 h URP und die N-terminal verlängerte Form URP+R festgestellt. Zudem sind die N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukte URP\_100-110 und URP\_100-111 zu erkennen. Es fand ebenfalls eine proteolytische Prozessierung C-terminal der Aminosäuren K<sup>110</sup> und R<sup>111</sup> statt. In der Negativkontrolle wurde das Peptidsubstrat URP-S detektiert, jedoch keine Proteolyseprodukte. Für alle verwendeten Zellextrakte wurde eine deutliche URP-generierende Aktivität festgestellt.

Die Zellextrakte HEK-293T, T98G und HeLa stellen eine geeignete biologische Quelle zur Untersuchung der intrazellulären U-II/URP-generierenden Aktivität und zur Identifizierung korrespondierender Enzyme dar. Potentielle intrazelluläre U-II/URP-generierende Enzyme benötigen eine Schnittspezifität C-terminal des Argininrestes R<sup>113</sup> des U-II bzw. C-terminal des Argininrestes R<sup>111</sup> des URP. Inhibitionsexperimente in einer früheren<sup>[91]</sup> und dieser Arbeit (Abbildung 16) ergaben, dass Serinproteasen für die U-II bzw. URP-generierende Aktivität innerhalb der Cohn-Fraktion IV bzw. der Cohn-Fraktion IV-4 verantwortlich sind. Dies impliziert generell eine hohe Relevanz der Serinproteasen für die Bildung von U-II bzw. URP in der Blutzirkulation. Die Vermutung, dass die intrazelluläre U-II/URP-generierende Aktivität ebenfalls auf Serinproteasen zurückzuführen ist, sollte im Folgenden anhand der intrazellulären U-II-generierenden Aktivität validiert werden. Dazu wurde ein Inhibitionsexperiment durchgeführt, in dem der Inkubation des HEK-293T-Zellextraktes mit UCE-S Inhibitoren gegen unterschiedliche Proteaseklassen zugesetzt wurden. Die HEK-293T-Zellen wurden aufgeschlossen und der Zellextrakt entnommen. Die Konzentration des hierfür verwendeten Zellextraktes wurde mittels Spektrophotometrie auf 0.143 µg/µL bestimmt. Jeweils 2.5 µL des HEK-293T-Zellextraktes wurden an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und für 24 h in An- und Abwesenheit der verwendeten Proteaseinhibitoren mit UCE-S inkubiert. Es wurden der Serinproteaseinhibitor AEBSF, der Cysteinproteaseinhibitor E64, der Aspartatproteaseinhibitor Pepstatin A, der Metalloproteaseinhibitor EDTA und das Leupeptin, das sowohl Cystein- als auch Serinproteasen inhibiert, verwendet. Die Inkubationen wurden chromatographisch getrennt und mittels LC-ESI-TOF-MS analysiert. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung des U-II sind in Abbildung 34 dargestellt:



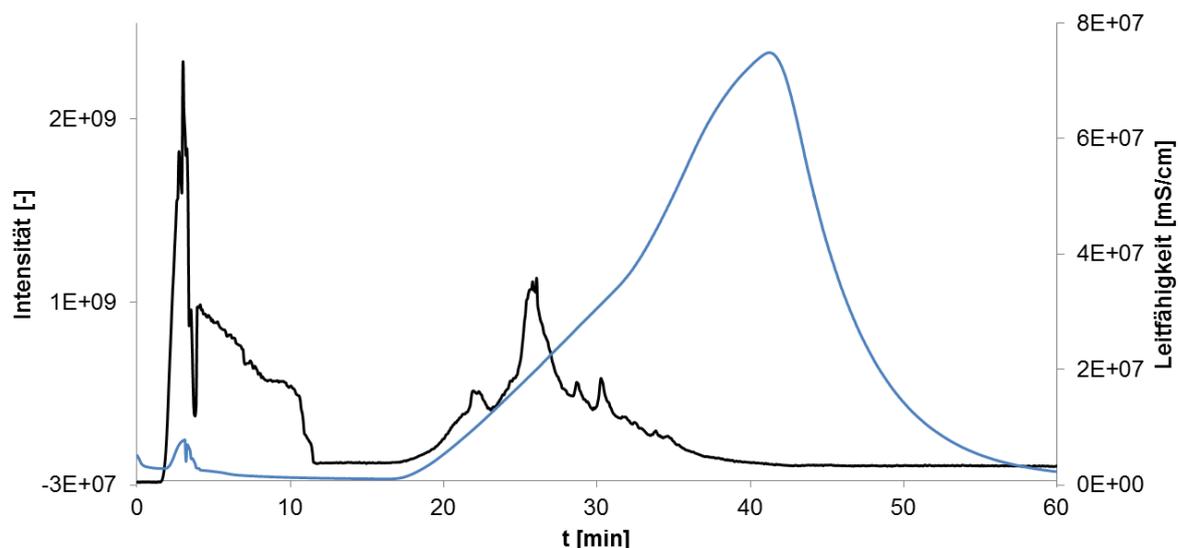
**Abbildung 34: LC-ESI-TOF-MS zur Quantifizierung von U-II nach 24 h Inkubation eines HEK-293T-Zellextraktes mit UCE-S in Anwesenheit der Proteaseinhibitoren AEBSF, Leupeptin, E-64, Pepstatin A und EDTA.** U-II wurde relativ durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 694.787, der dem zweifach geladenen Peptid entspricht, quantifiziert. Es wurde eine deutliche Inhibierung in Anwesenheit der Proteaseinhibitoren AEBSF und Leupeptin festgestellt.

In Abbildung 34 ist die relativ quantifizierte Menge an U-II nach 24 h Inkubation eines HEK-293T-Zellextraktes mit UCE-S in Anwesenheit der Proteaseinhibitoren AEBSF, Leupeptin, E-64, Pepstatin A und EDTA dargestellt. Diese ergibt sich aus Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 694.787, der dem zweifach geladenen U-II entspricht. In der Negativkontrolle wurde keine Bildung von U-II beobachtet. In der Inkubation des HEK-293T-Zellextraktes in Abwesenheit eines Proteaseinhibitors wurde U-II deutlich detektiert. In der Inkubation in Anwesenheit von Pepstatin A wurde eine gegenüber der Positivkontrolle relativ konstante Menge an U-II festgestellt. Die Inkubationen in Anwesenheit von E-64 und EDTA ergaben eine erhöhte integrierte Peakfläche des U-II gegenüber der Positivkontrolle. In den Inkubationen in Anwesenheit von AEBSF und Leupeptin wurde eine deutliche Inhibierung der U-II-generierenden Aktivität beobachtet. Dabei wurde eine Reduzierung der integrierten Peakfläche des U-II auf 15.5% für AEBSF und auf 23.5% für Leupeptin detektiert. In beiden Fällen handelt es sich um Serinproteaseinhibitoren, wobei Leupeptin ebenfalls Cysteinproteasen inhibiert. Da von E-64, das ebenfalls Cysteinproteasen inhibiert, keine inhibitorische Wirkung ausging, scheint Leupeptin Serinproteasen mit U-II-generierender Aktivität inhibiert zu haben. Dieses Experiment zeigt, dass für die zuvor beschriebene intrazelluläre U-II-generierende Aktivität des HEK-293T-Zellextraktes

Serinproteasen verantwortlich sind. Im Folgenden sollte ein HEK-293T-Zellextrakt als biologische Quelle zur Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität und zur Identifizierung intrazellulärer U-II-generierender Enzyme verwendet werden.

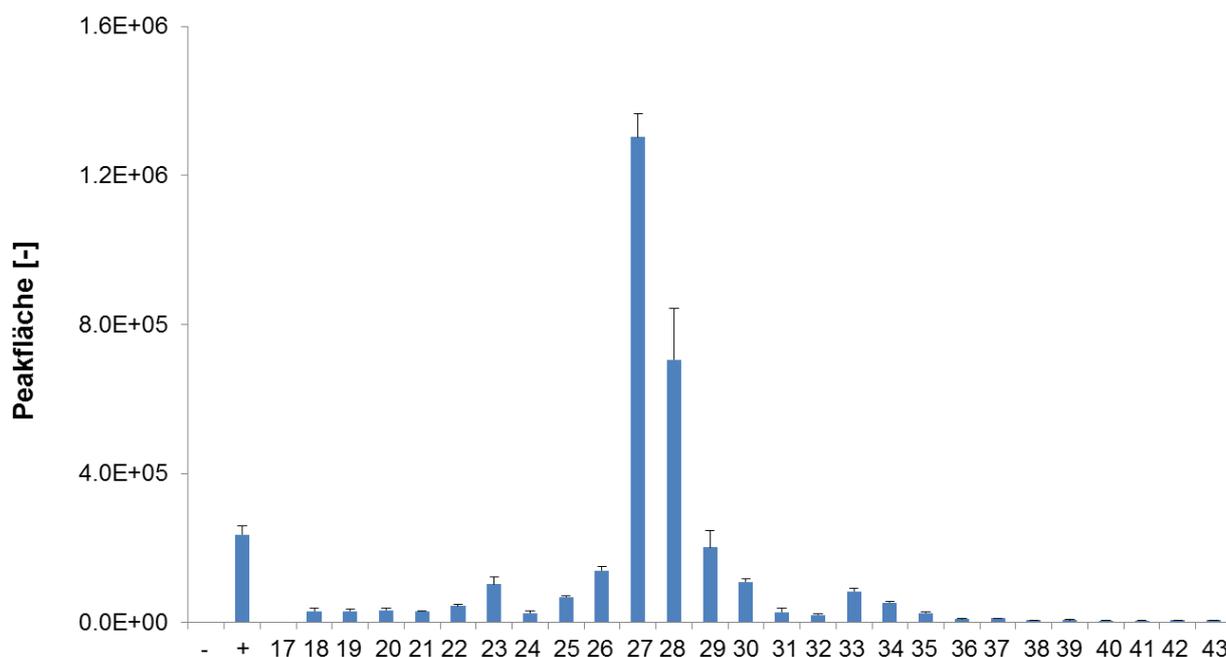
### **6.3.2 Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität eines HEK-293T-Zellextraktes und Identifizierung korrespondierender Enzyme**

In den vorangegangenen Experimenten wurde eine deutliche U-II/URP-Bildung durch die Zellextrakte HEK-293T, T98G und HeLa detektiert. Diese U-II/URP-generierende Aktivität sollte weitergehend untersucht und U-II/URP-generierende Enzyme identifiziert werden. Dies sollte anhand der U-II-generierenden Aktivität des HEK-293T-Zellextraktes erfolgen, mit dem Ziel, eine Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität durchzuführen und korrespondierende Enzyme zu identifizieren. Dazu wurde der HEK-293T-Zellextrakt durch Anionenaustauschchromatographie fraktioniert und die durch die Fraktionen gebildete Menge an U-II durch einen Massenspektrometrie-basierten Enzymassay quantifiziert. Die Fraktionen mit der höchsten U-II-generierenden Aktivität wurden zur Proteinidentifizierung mittels Trypsinierung und LC-MS/MS verwendet. Nachdem HEK-293T-Zellen aufgeschlossen und die jeweiligen Zellextrakte entnommen und vereint wurden, wurde eine mittels Spektrophotometrie ermittelte Gesamtmenge von 642.5 µg intrazellulären Proteinen gewonnen. Etwa 603.7 µg davon wurden mittels Anionenaustauschchromatographie auf 54 Fraktionen fraktioniert. Das Chromatogramm des Anionenaustauschs ist in Abbildung 35 dargestellt:



**Abbildung 35: Anionenaustauschchromatographie zur Fraktionierung eines HEK-293T-Zellextraktes.** Die UV-Absorption ist in schwarz, die Leitfähigkeit in blau dargestellt. Der Großteil der an die stationäre Phase gebundenen Proteine eluierte zwischen 18 und 39 min. Es fand eine Fraktionierung auf 54 Fraktionen mit NaCl als Elutionsmittel statt.

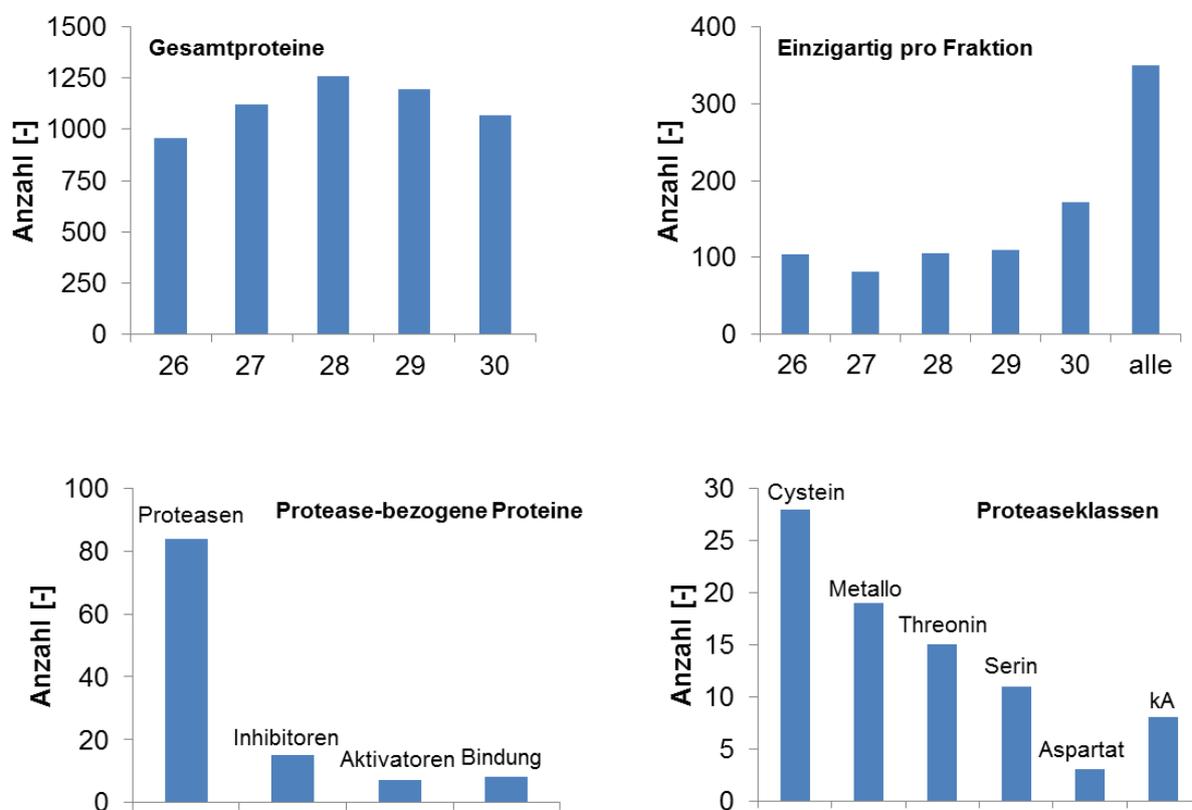
In Abbildung 35 ist zu erkennen, dass die Elution der an die stationäre Phase gebundenen Proteine (schwarz: UV-Absorption) durch zunehmenden NaCl-Gehalt (blau: Leitfähigkeit) induziert wurde. Im frühen Retentionsbereich zwischen 0 und 11 min wurde eine starke UV-Absorption und damit Elution von nicht oder schwach an die stationäre Phase gebundenen Substanzen festgestellt. Der überwiegende Teil der an die stationäre Phase gebundenen Proteine eluierte zwischen 18 und 39 min mit einem lokalen Maximum zwischen 24 und 28 min. Im Folgenden sollte die U-II-generierende Aktivität einzelner Fraktionen bestimmt werden. Es wurden nur die Fraktionen verwendet, in denen Proteine eluierten. Daher wurden die Fraktionen 17-43 verwendet. Die Fraktionen 17-43 des HEK-293T-Zellextraktes wurden an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und für 24 h mit UCE-S inkubiert. Die Inkubationen wurden chromatographisch getrennt und mittels LC-ESI-TOF-MS analysiert. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung des U-II sind in Abbildung 36 dargestellt:



**Abbildung 36: LC-ESI-TOF-MS zur Quantifizierung von U-II nach 24 h Inkubation der Fraktionen 17-43 des HEK-293T-Zellextraktes mit UCE-S.** U-II wurde relativ durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 694.781, der dem zweifach geladenen Peptid entspricht, quantifiziert. Das Profil der U-II-generierenden Aktivität entspricht dem Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie des HEK-293T-Zellextraktes. Die höchste U-II-generierende Aktivität wurde in den Fraktionen 26-30 detektiert.

Der Abbildung 36 ist die relativ quantifizierte Menge an U-II in den Inkubationen der Fraktionen 17-43 der Anionenaustauschchromatographie des HEK-293T-Zellextraktes mit UCE-S zu entnehmen. Die relative Quantifizierung erfolgte durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 694.781, der dem zweifach geladenen U-II entspricht. U-II wurde in allen untersuchten Fraktionen mit Ausnahme der Fraktion 17 und der Negativkontrolle detektiert. Dabei entsprach das Profil der U-II-generierenden Aktivität dem Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie (Abbildung 35). Die Fraktionen 26-30 zeigten eine hohe U-II-generierende Aktivität, wovon die quantifizierte Menge an U-II in den Fraktionen 27 und 28 am höchsten war. Die Fraktionen 26-30 wurden folglich zur Proteinidentifizierung durch Trypsinierung und LC-MS/MS verwendet. Die jeweils verbliebenen 400 µL der HEK-293T-Fraktionen 26-30 wurden eingengt und mithilfe von Harnstoff denaturiert. Nachdem enthaltene Disulfidbrücken mit DTT reduziert und freie Cysteinreste mit IAA alkyliert wurden, wurde der tryptische Verdau durch Zugabe von Trypsin gestartet. Die entstandenen tryptischen Peptide wurden mittels LC-nanoESI-Orbitrap-MS analysiert und die korrespondierenden Proteine durch einen Datenbankabgleich identifiziert. In Abbildung 37 ist eine Übersicht der insgesamt anhand mindestens eines

tryptischen Peptids identifizierten Proteine, Proteasen und Protease-bezogenen Proteine dargestellt:



**Abbildung 37: Übersicht der identifizierten Proteine, Proteasen und Protease-bezogenen Proteine.** Insgesamt wurden 2038 unterschiedliche Proteine in den Fraktionen 26-30 identifiziert. Die Überschneidung identifizierter Proteine in den Fraktionen war relativ hoch. Die meisten ausschließlich in einer Fraktion identifizierten Proteine wurden in Fraktion 30 identifiziert. Es wurden insgesamt 84 Proteasen identifiziert, bei denen es sich um 28 Cystein-, 19 Metallo-, 11 Serin-, 15 Threonin- und 3 Aspartatproteasen handelte sowie um 8 ohne Klassifizierung.

Insgesamt wurden in allen Fraktionen 2038 Proteine identifiziert. In den einzelnen Fraktionen 26, 27, 28, 29 und 30 wurde mit 959, 1121, 1261, 1197 und 1068 Identifizierungen eine vergleichbar große Anzahl an Proteinen festgestellt. In den Fraktionen 26, 27, 28, 29 und 30 wurden 104, 81, 106, 110 und 172 der Proteine jeweils ausschließlich identifiziert. Insgesamt 350 Proteine wurden dabei in allen Fraktionen identifiziert. Es wurden 114 Protease-bezogene Proteine identifiziert, bei denen es sich um 84 Proteasen, 15 Proteaseinhibitoren, 7 Proteaseaktivatoren und 8 Protease-bindende Proteine handelte. Die identifizierten Proteasen setzten sich aus 28 Cystein-, 19 Metallo-, 15 Threonin-, 11 Serin- und 3 Aspartatproteasen sowie 8 Proteasen ohne Klassifizierung zusammen. Da das zuvor durchgeführte Inhibitionsexperiment mit Inhibitoren gegen unterschiedliche Proteaseklassen (Abbildung 34) eine starke Inhibierung der U-II-

generierenden Aktivität des HEK-293T-Zellextraktes durch Serinproteaseinhibitoren ergab, waren insbesondere die identifizierten Serinproteasen von großem Interesse. In Tabelle 17 ist eine Auflistung aller identifizierter Serinproteasen mit Informationen über ihre Schnittspezifität dargestellt. Zudem ist eine Auflistung der insgesamt identifizierten Proteasen im Anhang in Tabelle 19 dargestellt.

**Tabelle 17:** Identifizierte Serinproteasen und entsprechende Schnittspezifität<sup>[110,111,115]</sup>

<b>Serinprotease</b>	<b>bekannte Schnittspezifität</b>
Acylamino-acid-releasing enzyme	Freisetzung N-terminaler N-acetylierter oder N-formylierter Aminosäuren
Dipeptidylpeptidase 8	Freisetzung N-terminaler Dipeptide
Dipeptidylpeptidase 9	Freisetzung N-terminaler Dipeptide
Hepatocyte growth factor activator	Arg- -Val
Lon protease homolog, mitochondrial	k/A
Prolylendopeptidase	Pro- -Xaa, Ala- -Xaa
Prolylendopeptidase-like	k/A
Proprotein-Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6	dibasische Schnittstellen
Prothrombin	Arg- -Gly
Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	k/A
Tripeptidylpeptidase 2	Freisetzung N-terminaler Tripeptide

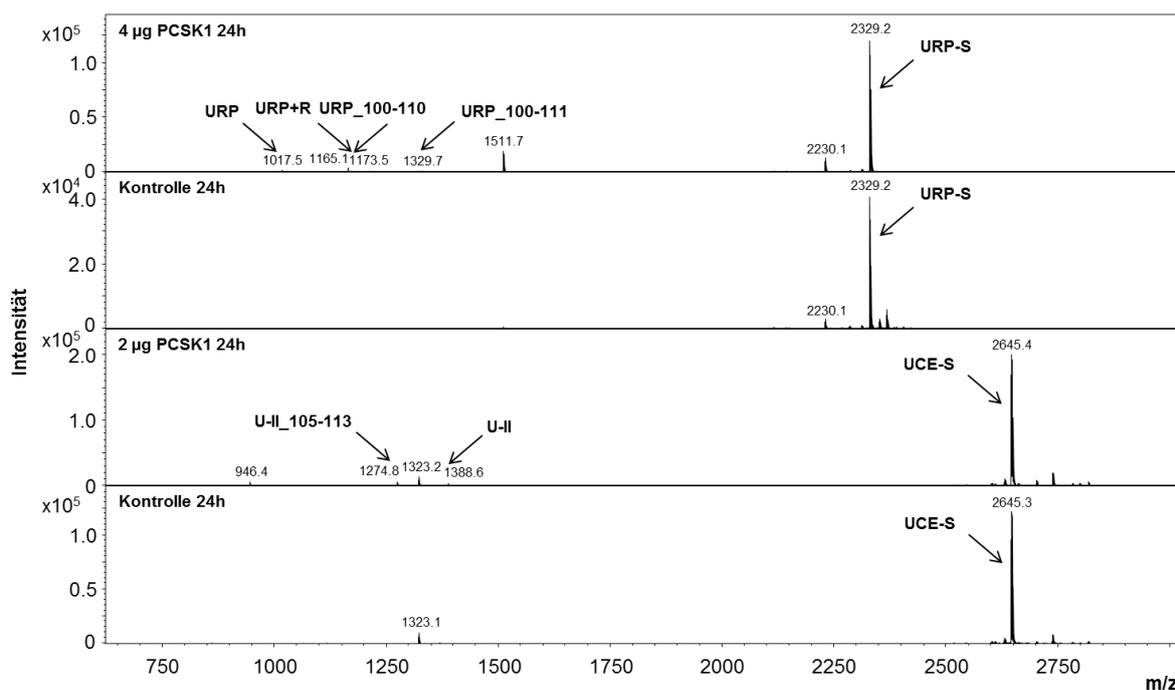
In der Tabelle 17 sind die identifizierten Serinproteasen mit ihren überwiegend aus den Datenbanken Uniprot<sup>[111]</sup> und MEROPS<sup>[110]</sup> erhaltenen proteolytischen Schnittspezifitäten aufgelistet. Wie bereits zuvor beschrieben, ist zur Bildung von U-II eine proteolytische Prozessierung der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup>, C-terminal des Argininrestes R<sup>113</sup>, erforderlich. Die Bildung von URP erfordert eine proteolytische Prozessierung der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup>, C-terminal des Argininrestes R<sup>111</sup>. Neben der Anzahl basischer Aminosäuren in den Schnittstellen unterscheiden sich U-II und URP auch in der Aminosäure in P1'-Position, bei der es sich im U-II um Glutaminsäure und im URP um Alanin handelt. Von den 11 identifizierten Serinproteasen konnte der Uniprot- und der MEROPS-Datenbank keine Schnittspezifität für die Proteasen Lon protease homolog, mitochondrial, Retinoid-inducible serine carboxypeptidase und Prolylendopeptidase-like entnommen werden. Dennoch handelt es sich bei der Retinoid-inducible serine carboxypeptidase um eine Exoprotease, die Aminosäuren vom C-Terminus

abspaltet, und ungeeignet für die hier erforderliche endoproteolytische Spaltung ist. Für die Protease Prolylendopeptidase-like war zu entnehmen, dass keine proteolytische Spaltung C-terminal von Arginin und Lysin auftritt. Die Prolylendopeptidase führt bevorzugt zur proteolytischen Prozessierung C-terminal von Prolin und die Dipeptidylpeptidase 8, Dipeptidylpeptidase 9 und Tripeptidylpeptidase 2 führen zur Freisetzung N-terminaler Di- bzw. Tripeptide. Die Protease Acylamino-acid releasing enzyme katalysiert die Freisetzung N-terminal acetylierter oder formylierter Aminosäuren. Sie verfügen demnach ebenfalls nicht über eine geeignete Schnittspezifität. Die Serin-Protease Thrombin, die bereits in der Cohn-Fraktion IV-4 identifiziert wurde, verfügt über eine Schnittspezifität C-terminal von Arginin mit einer Bevorzugung der aliphatischen Aminosäure Glycin in P1'-Position. Für den Hepatocyte growth factor activator wurde eine Schnittspezifität C-terminal von Arginin mit Valin in P1'-Position beschrieben.<sup>[115]</sup> Die Proprotein-Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6 bewirkt eine Proteolyse C-terminal von Arginin insbesondere für mehrfach basische Schnittstellen. Diese Schnittspezifität entspricht der erforderlichen proteolytischen Prozessierung der tri- bzw. dibasischen Schnittstellen KKR<sup>113</sup> und KR<sup>111</sup> zur Bildung von U-II und URP. Im Folgenden sollte die U-II/URP-generierende Aktivität der Proprotein-Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6 validiert werden. Da sie jedoch nicht kommerziell verfügbar war wurde die Proprotein-Convertase 1 verwendet, die über eine hohe Sequenzhomologie gegenüber der Proprotein-Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6 aufweist.

#### **6.3.4 Validierung potentieller intrazellulärer U-II- und URP-generierender Enzyme**

Eine potentielle intrazelluläre U-II/URP-generierende Aktivität geeigneter Kandidaten der nach Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität des HEK-293T-Zellextrakt identifizierten Proteasen sollte validiert werden. Die Proteasen Hepatocyte growth factor activator, Thrombin und die Proprotein-Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6 verfügen über eine proteolytische Schnittspezifität C-terminal von Arginin und scheinen damit für die proteolytische Prozessierung der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup> und der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup> zur Bildung von U-II bzw. URP geeignet zu sein. Für Thrombin wurde dabei die aliphatische Aminosäure Glycin in P1'-Position als bevorzugt beschrieben. Insbesondere die Proprotein-Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6 schien ein vielversprechender Kandidat zu sein, da er bevorzugt zur Prozessierung mehrfach basischer Schnittstellen in Prohormonen führt. Prothrombin wurde ebenfalls in der Cohn-Fraktion IV-4 identifiziert und daher bereits zur Untersuchung der U-II/URP-generierenden Aktivität mit UCE-S (Abbildungen 11, 13, 14 und 50) und URP-S (Abbildungen 28 und 29) inkubiert. Die Experimente ergaben beim Vergleich mit weiteren Proteasen jeweils eine

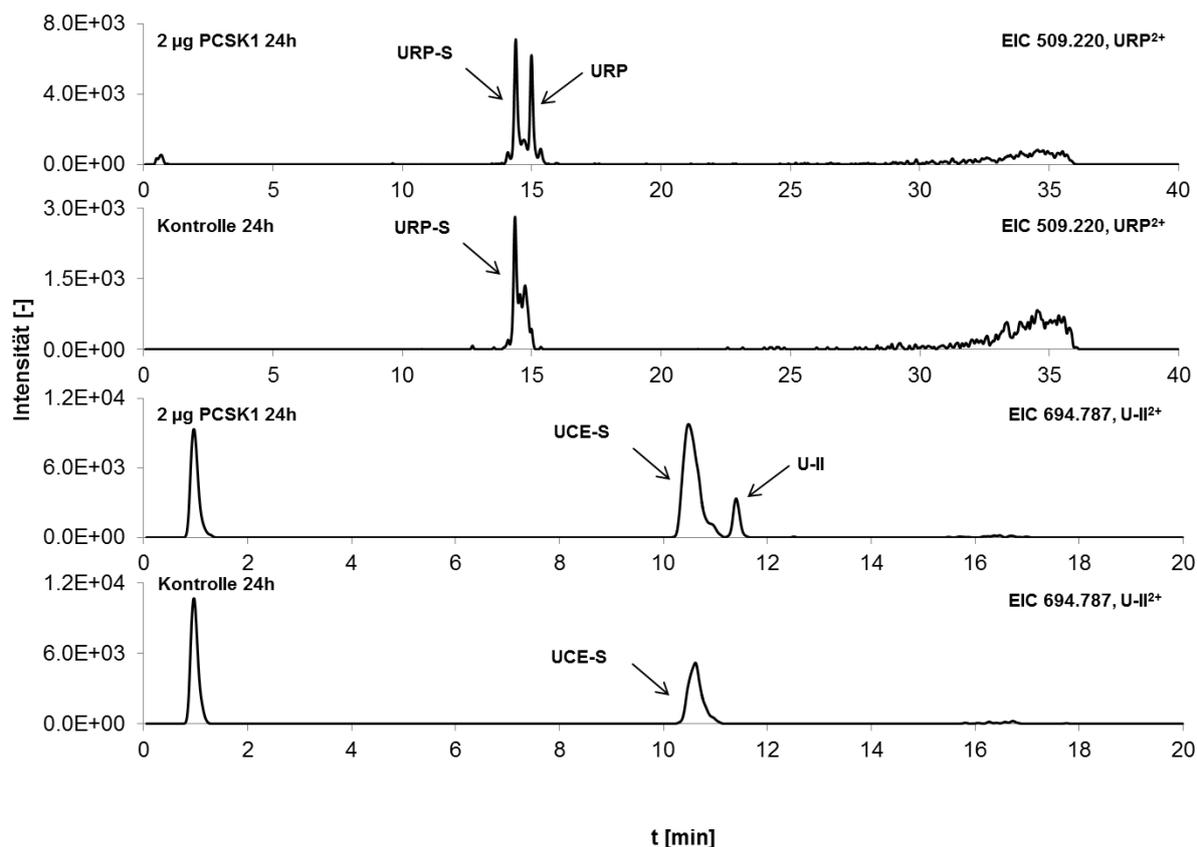
schwache U-II und URP-generierende Aktivität. Da die Proprotein-Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6 kommerziell nicht verfügbar war, wurde ein Datenbankabgleich durchgeführt, bei dem die Sequenz der Proprotein-Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6 als Eingabe diente, um verwandte Proteasen zu ermitteln. Dazu wurde der Blast-Algorithmus<sup>[116]</sup> auf die Uniprot-Datenbank<sup>[111]</sup> angewendet. Der Datenbankabgleich ergab, dass die Proprotein-Convertase 1, die kommerziell verfügbar war, über eine Sequenzübereinstimmung von 54.8% mit der Proprotein-Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6 und damit unter den humanen Proteinen über eine hohe Sequenzhomologie verfügte. Die Proprotein-Convertase 1 wurde bereits zuvor als U-II-generierendes Enzym beschrieben.<sup>[90]</sup> Sie wurde im Folgenden verwendet um eine U-II-generierende Aktivität zu validieren und eine potentielle URP-generierende Aktivität zu untersuchen. Dazu wurde die Proprotein-Convertase 1 an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert und mit den Peptidsubstraten UCE-S und URP-S inkubiert. Nach 24 h Inkubation von jeweils 2 µg der Proprotein-Convertase 1 mit UCE-S bzw. URP-S wurden die Substrate UCE-S und URP-S detektiert, jedoch keine Proteolyseprodukte. Die entsprechenden MALDI-TOF-MS-Spektren sind im Anhang auf Abbildung 59 dargestellt. Die Inkubationen wurden daher ohne vorherige Immobilisierung der Proprotein-Convertase 1 bei 37 °C in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> bei pH 5.5 wiederholt, da diese Bedingungen zuvor als geeignet beschrieben wurden.<sup>[90]</sup> In Abbildung 38 sind die MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubationen von 4 bzw. 2 µg der Proprotein-Convertase 1 mit URP-S bzw. UCE-S nach 24 h und nach Entsalzung der Inkubationslösung dargestellt:



**Abbildung 38: MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubationen der Proprotein-Convertase 1 mit URP-S bzw. UCE-S.** Nach 24 h Inkubation der Proprotein-Convertase 1 mit URP-S wurden URP und URP+R sowie die N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukte URP\_100-110 und URP\_100-111 detektiert. Nach 24 h Inkubation der Proprotein-Convertase 1 mit UCE-S wurden U-II und das N-terminal korrespondierende Proteolyseprodukt U-II\_105-113 festgestellt. In den Negativkontrollen sind die Peptidsubstrate URP-S und UCE-S zu erkennen, jedoch keine Proteolyseprodukte. Die Messung erfolgte nach Entsalzung der Inkubationslösung und nach 1:1-Verdünnung der  $10^{-4}$  M (UCE-S) bzw.  $5 \cdot 10^{-5}$  M (URP-S) konzentrierten Proben mit der Matrix DHB.

Nach 24 h Inkubation von 4 µg der Proprotein-Convertase 1 mit URP-S wurden URP und die N-terminal verlängerte Form URP+R detektiert. Zudem sind die N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukte URP\_100-110 und URP\_100-111 zu erkennen. Im Vergleich zum Peptidsubstrat URP-S war die Signalintensität der Proteolyseprodukte gering. In der Negativkontrolle wurde das Peptidsubstrat URP-S detektiert, jedoch keine Proteolyseprodukte. Die Inkubation der Proprotein-Convertase 1 mit URP-S ergab eine doppelte proteolytische Prozessierung der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup>, jeweils C-terminal von Arginin oder Lysin. Somit wurde für die Proprotein-Convertase 1 eine URP-generierende Aktivität festgestellt. In der Inkubation von 2 µg der Proprotein-Convertase 1 mit UCE-S sind nach 24 h U-II und das N-terminal korrespondierende Proteolyseprodukte U-II\_105-113 zu erkennen. Auch hier waren die Signalintensitäten der Proteolyseprodukte gegenüber dem Peptidsubstrat UCE-S relativ gering. Dennoch wurde eine proteolytische Prozessierung der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup>, C-terminal des Arginins, und damit eine U-II-generierende Aktivität festgestellt. In der

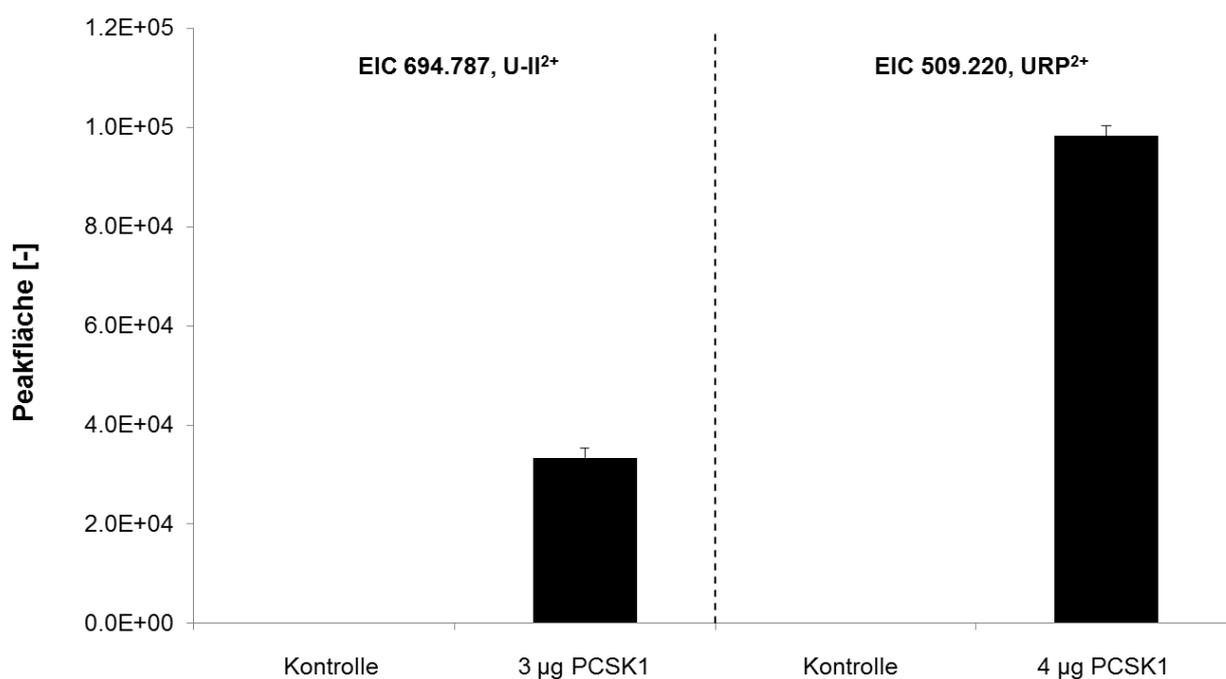
Negativkontrolle war das Peptidsubstrat UCE-S zu erkennen, jedoch keine Proteolyseprodukte. Zur Validierung der U-II/URP-generierenden Aktivität wurden die Inkubationen der Proprotein-Convertase 1 mit UCE-S bzw. URP-S ebenfalls mittels LC-ESI-TOF-MS vermessen. Die Inkubationen von 2 µg der Proprotein-Convertase 1 mit URP-S bzw. UCE-S nach 24 h wurden chromatographisch getrennt und massenspektrometrisch analysiert. Die entsprechenden Chromatogramme sind in Abbildung 39 dargestellt:



**Abbildung 39: LC-ESI-TOF-MS der Inkubationen von jeweils 2 µg der Proprotein-Convertase 1 mit URP-S bzw. UCE-S.** Dargestellt sind die EICs der  $m/z$ -Werte 509.220, der dem zweifach geladenen URP entspricht, und 694.787, der dem zweifach geladenen U-II entspricht. Nach 24 h wurde URP ( $m/z$  509.215,  $[M+2H]^{2+}$ ) in der Inkubation von PCSK1 mit URP-S mit einer Retentionszeit von 15.0 min detektiert, nicht jedoch in der Negativkontrolle. U-II ( $m/z$  694.791,  $[M+2H]^{2+}$ ) wurde nach 24 h Inkubation von PCSK1 mit UCE-S mit einer Retentionszeit von 11.3 min detektiert. In der Negativkontrolle wurde kein U-II festgestellt.

Zur besseren chromatographischen Trennung von URP-S und URP wurde die Messung der Inkubation der Proprotein-Convertase 1 mit URP-S mit verlängertem Gradienten durchgeführt. Nach 24 h Inkubation von 2 µg der Proprotein-Convertase 1 mit URP-S wurde URP mit einem  $m/z$ -Wert von 509.215, der dem zweifach geladenen Peptid entspricht, mit einer Retentionszeit von 15.0 min detektiert. In der Negativkontrolle wurde zur selben Retentionszeit kein URP

festgestellt. U-II wurde nach 24 h Inkubation von 2 µg der Proprotein-Convertase 1 mit UCE-S anhand eines m/z-Wertes von 694.791, der dem zweifach geladenen Peptid entspricht, mit einer Retentionszeit von 11.3 min festgestellt. In der Negativkontrolle wurde kein U-II detektiert. Zur Quantifizierung von U-II und URP wurde die Inkubation der Proprotein-Convertase 1 mit UCE-S bzw. URP-S erneut durchgeführt und mittels LC-ESI-TOF-MS untersucht. Die Inkubationen von 3 bzw. 4 µg der Proprotein-Convertase 1 mit UCE-S bzw. URP-S nach 24 h wurden chromatographisch getrennt und massenspektrometrisch analysiert. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung von U-II und URP sind in Abbildung 40 dargestellt:



**Abbildung 40: LC-ESI-TOF-MS zur Quantifizierung von U-II und URP nach 24 h Inkubation von 3 bzw. 4 µg der Proprotein-Convertase 1 mit UCE-S bzw. URP-S.** U-II und URP wurden relativ durch Integration der EICs mit den m/z-Werten von 694.787 und 509.220, die den zweifach geladenen Peptiden entsprechen, quantifiziert. Es wurde die Bildung von U-II und URP beobachtet. In den Negativkontrollen wurde weder U-II noch URP detektiert. Die Messung erfolgte nach 1:1-Verdünnung der  $5 \cdot 10^{-5}$  M konzentrierten Proben mit 0.1% FA.

Die relativ quantifizierte Menge an U-II und URP nach 24 h Inkubation von 3 bzw. 4 µg der Proprotein-Convertase 1 mit UCE-S bzw. URP-S ist in Abbildung 40 dargestellt. Dazu wurden die EICs mit den m/z-Werten von 694.787 bzw. 509.220, die dem zweifach geladenen U-II bzw. URP entsprechen, integriert. Nach 24 h Inkubation wurden U-II und URP deutlich detektiert. In den Negativkontrollen wurden U-II und URP nicht festgestellt. Die Untersuchung der U-II/URP-generierenden Aktivität der Proprotein-Convertase 1 mittels LC-ESI-TOF-MS bestätigt die zuvor nur schwach mittels MALDI-TOF-MS beobachtete Bildung von U-II und URP. Zusammenfassend

fürte die Proprotein-Convertase 1 zur proteolytischen Prozessierung der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup> des UCE-S, C-terminal von Arginin, und zur doppelten proteolytischen Prozessierung der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup> des URP-S, C-terminal von Arginin und Lysin. Somit wurde eine U-II- und URP-generierende Aktivität der Proprotein-Convertase 1 festgestellt.

## 7 Diskussion

Die proteolytische Prozessierung und Generierung von U-II und URP sind bisher nicht vollständig untersucht. Für aktives humanes U-II wurde die zuvor vorhergesagte Länge von elf Aminosäuren<sup>[10]</sup> schließlich experimentell bestätigt,<sup>[86]</sup> was eine proteolytische Prozessierung der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup> des pre-pro-U-II, C-terminal des Arginins, erfordert. Eine solche proteolytische Prozessierung ist konsistent mit der allgemeinen Beschreibung der Aktivierung von Peptidhormonen an dibasischen Sequenzmotiven.<sup>[82]</sup> Die Sequenz des aktiven URP wurde ursprünglich anhand der Ratte bestimmt, woraus sich eine Länge von acht Aminosäuren ergab.<sup>[8]</sup> Sowohl das aktive URP als auch die flankierende dibasische Schnittstelle KR<sup>111</sup> liegen in unterschiedlichen Spezies stark konserviert vor, woraus sich auch für das aktive humane URP eine Länge von acht Aminosäuren ergibt.<sup>[8,9]</sup> Die dafür erforderliche proteolytische Prozessierung der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup>, C-terminal von Arginin, passt ebenfalls in das Konzept der proteolytischen Prozessierung von Prohormonen an dibasischen Schnittstellen.<sup>[82]</sup> In vorherigen Arbeiten wurden der Komplementfaktor I und das Plasma-Kallikrein als zirkulierende U-II-generierende Enzyme identifiziert.<sup>[11,91]</sup> Während die physiologische Relevanz des Komplementfaktor I nicht bestätigt werden konnte, wurde sie für Plasma-Kallikrein im humanen Plasma anhand von Inhibitionsexperimenten mit dem selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitor PK15 demonstriert. Eine verbliebene Restaktivität implizierte dabei die Beteiligung weiterer, bisher unbekannter U-II-generierender Enzyme.<sup>[11]</sup>

Ein Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung alternativer U-II-generierender Enzyme in der Blutzirkulation. Zudem sollte die physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins in der Blutzirkulation, anhand der Cohn-Fraktion IV-4 und mithilfe eines weiteren selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitors, des PKSI-527, validiert werden. Die Cohn-Fraktion IV-4 wurde verwendet, da es sich um eine kommerziell erhältliche Blutplasma-Unterfraktion mit geeigneter Zusammensetzung handelt. Sie ist ein Produkt der Cohn-Fraktionierung, einer Methode zur Blutplasmafraktionierung, bei der Blutplasma anhand physikochemischer Eigenschaften unterteilt wird. Gegenüber humanem Plasma sind in der Cohn-Fraktion IV-4 einige der sehr abundanten Blutbestandteile wie Albumin, Fibrinogen oder die Immunglobuline angereichert. Entsprechend liegen andere Bestandteile, insbesondere  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globuline, angereichert vor.<sup>[117]</sup> Eine hohe proteolytische und U-II-generierende Aktivität der Cohn-Fraktionen IV<sup>[91]</sup> und IV-4<sup>[11]</sup> wurden in vorherigen Arbeiten beschrieben. Auch die zuvor als U-II-generierende Enzyme identifizierten Plasmaproteasen Komplementfaktor I und Plasma-Kallikrein waren in der Cohn-Fraktion IV-4 nachweisbar.<sup>[11]</sup> Die Cohn-Fraktion IV-4 stellt damit eine sehr gut geeignete

biologische Quelle zur Identifizierung von U-II- und URP-generierenden Enzymen dar. Zur Untersuchung der U-II-generierenden Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 wurde diese mithilfe eines Massenspektrometrie-basierten Enzymassays (MES-Assay<sup>[108]</sup>) mit einem aus den 20 C-terminalen Aminosäuren des pre-pro-U-II bestehenden Vorläufers inkubiert und entstandene Proteolyseprodukte massenspektrometrisch analysiert. Ein Vorteil der verwendeten Methode ist die vorherige Immobilisierung der zu untersuchenden Proteinfraktion an Chromatographiepartikel. Auf diese Weise kann eine bestimmte reaktionsspezifische enzymatische Aktivität, in diesem Fall die Umsetzung des U-II-Vorläufers UCE-S zu aktivem U-II, von sehr komplexen biologischen Proben wie der Cohn-Fraktion IV-4 untersucht werden, ohne dass die biologische Probe selbst in das Massenspektrometer injiziert wird. So kann die direkte Injektion von störenden Substanzen, Pufferlösungen und Salzen vermieden werden, die die Analytik erschweren würden.<sup>[108]</sup> Die Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S führte zur Bildung von U-II sowie zu den N-terminal verlängerten Peptiden U-II+R und U-II+RK und weiteren N-terminalen Proteolyseprodukten (Abbildung 5). Dieses Ergebnis ist konsistent mit der vorherigen Untersuchung der proteolytischen Prozessierung des Peptidsubstrates UCE-S durch humanes Plasma und die Cohn-Fraktion IV-4.<sup>[11,91]</sup> Auffällig ist, dass die verlängerten U-II-Peptide U-II+R und U-II+RK sowohl mittels MALDI-TOF- als auch mittels LC-ESI-TOF-MS (Abbildungen 5 und 6) über eine höhere Signalintensität verfügten als das aktive U-II selbst. Dies kann zum Teil damit begründet werden, dass die Eigenschaften von Peptiden wie die Löslichkeit oder die Ionisationseffizienz ihre Signalintensitäten beeinflussen.<sup>[112]</sup> Demnach könnten U-II+R und U-II+RK selbst bei gleicher Konzentration eine höhere Signalintensität als U-II aufweisen. Dennoch zeigt die deutliche Detektion von U-II+R und U-II+RK, dass es neben der proteolytischen Prozessierung C-terminal des Argininrestes R<sup>113</sup> ebenfalls deutlich zur proteolytischen Prozessierung C-terminal der Lysinreste K<sup>111</sup> und K<sup>112</sup> kommt. Ob diese verlängerten Formen des U-II tatsächlich in der Blutzirkulation vorkommen ist nicht bekannt. Jedoch wurde das Auftreten weiterer, vermutlich verlängerter, U-II-immunreaktiver Peptide durch eine Kombination von HPLC und immunologischer Detektion beschrieben.<sup>[86]</sup> Fraglich ist außerdem, ob U-II+R und U-II+RK zur Aktivierung des UTR führen würden. Struktur-Funktions-Analysen zeigten, dass insbesondere die zyklische Struktur des aktiven U-II essentiell für die Aktivierung des UTR ist, aber auch der C-terminale Valinrest wichtig für eine hohe biologische Aktivität ist. Die N-terminale Verlängerung des zyklischen Hexapeptids um einzelne Aminosäuren oder kurze Segmente führte ebenfalls zu aktiven Analoga, was einen geringen Anteil des N-terminalen Bereichs für die Aktivität gegenüber dem UTR implizierte.<sup>[33]</sup> Eine Aktivität der verlängerten Formen U-II+R und U-II+RK gegenüber dem UTR ist somit auch denkbar. Eine weitere Erklärung

für U-II+R und U-II+RK könnte deren Generierung als Intermediate darstellen, die nachfolgend weiter zu aktivem U-II prozessiert werden. Ein solcher Mechanismus wurde für die proteolytische Prozessierung von Neuropeptiden unter Ausbildung von C- und N-terminal um basische Aminosäuren verlängerten Formen beschrieben. Diese stellen Intermediate dar und werden durch zusätzliche proteolytische Prozessierung durch Amino- oder Carboxypeptidasen in die eigentliche aktive Form überführt.<sup>[118]</sup> So könnten auch die verlängerten U-II-Peptide U-II+R und U-II+RK Substrate für Aminopeptidasen darstellen, die weiter zu aktivem U-II prozessiert werden. Anzumerken ist hier allerdings, dass U-II+R und U-II+RK auch nach 24 h Inkubation mit der Cohn-Fraktion IV-4 noch mit hoher Signalintensität detektiert wurden, was ihre Stabilität in der Cohn-Fraktion IV-4 verdeutlicht.

Aufgrund der U-II-generierenden Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 wurde sie im Folgenden als Ausgangsmaterial zur Identifizierung von alternativen U-II-generierenden Enzymen verwendet. Durch Kombination einer weiteren Fraktionierung der Cohn-Fraktion IV-4 durch Anionenaustauschchromatographie und dem beschriebenen Massenspektrometrie-basierten Enzymassay wurde eine Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität durchgeführt. Dabei entsprach das Elutionsprofil dem Profil der U-II-generierenden Aktivität (Abbildung 7). Die Konzentration der U-II-generierenden Enzyme korrelierte also mit einer generell erhöhten Proteinkonzentration. Eine Ausnahme bildete Fraktion I-18, die trotz einer geringen Proteinkonzentration über eine starke U-II-generierende Aktivität verfügte. Die resultierenden Sub-Fractionen mit der höchsten U-II generierenden Aktivität wurden zur Proteinidentifizierung durch Trypsinierung und LC-MS/MS verwendet. Mit insgesamt 53 der 399 identifizierten Proteine war der Anteil der Protease-bezogenen Proteine relativ hoch. Bei 15 der 20 identifizierten Proteasen handelte es sich um Serinproteasen. Diese waren insbesondere von großem Interesse, da bereits zuvor Indizien für das potentielle Auftreten einer zirkulierenden Serinprotease mit U-II-generierender Aktivität beschrieben wurden.<sup>[89]</sup> Ein grundsätzliches Problem bei der Proteinidentifizierung mittels Trypsinierung und LC-MS/MS ist die Tatsache, dass bei Anwesenheit abundanter Proteine die Identifizierung von sehr gering konzentrierten Proteinen stark erschwert wird.<sup>[112]</sup> Dennoch implizierte die hohe, zuvor festgestellte, U-II-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 eine Mindestkonzentration der korrespondierenden Enzyme, die ihre Identifizierung wahrscheinlich erscheinen ließ. Im Folgenden wurden Experimente durchgeführt, in denen die U-II-generierende Aktivität einzelner zuvor identifizierter Proteasen validiert werden sollte. Auf Grundlage der Schnittspezifität, der Verfügbarkeit, der Konfidenz der Proteinidentifizierung und den Ergebnissen vorheriger Arbeiten

wurden die Proteasen Plasma-Kallikrein, Plasmin, Thrombin, Koagulationsfaktor XIIa, Komplementfaktor I, Komplement C2 und die Serin Protease 58 auf ihre U-II-generierende Aktivität untersucht. Die Proteasen Plasma-Kallikrein und Komplementfaktor I wurden in vorherigen Arbeiten als U-II-generierende Enzyme beschrieben und ihre U-II-generierende Aktivität sollte validiert werden.<sup>[11,91]</sup>

Für Plasma-Kallikrein wurde in der Inkubation mit UCE-S eine starke proteolytische und U-II-generierende Aktivität festgestellt. Dabei wurde ein großer Teil des Peptidsubstrates UCE-S proteolytisch abgebaut, das mittels MALDI-TOF-MS nach 4 h nicht mehr erkennbar war. Ähnlich wie bei der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S führte Plasma-Kallikrein zur Bildung von U-II und den N-terminal verlängerten Formen U-II+R und U-II+RK sowie zur Bildung der N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukte (Abbildung 10). Auch hier fand eine dreifache proteolytische Prozessierung der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup>, C-terminal von Arginin oder Lysin, statt. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der zuvor beschriebenen U-II-generierenden Aktivität des Plasma-Kallikreins.<sup>[11]</sup> Wie bereits für die Cohn-Fraktion IV-4 beschrieben, war die mittels MALDI-TOF-MS und LC-ESI-TOF-MS detektierte Signalintensität der N-terminal verlängerten Formen U-II+R und U-II+RK in der Inkubation von Plasma-Kallikrein mit UCE-S größer als die des aktiven U-II. Diese stellen also auch hier deutliche Nebenprodukte der proteolytischen Prozessierung des UCE-S durch Plasma-Kallikrein dar. Wie bereits diskutiert, ist nicht bekannt, ob eine Aktivierung des UTR durch U-II+R und U-II+RK erfolgen kann oder ob U-II+R und U-II+RK Intermediate darstellen, die weiter zu U-II prozessiert werden. In der Inkubation des Komplementfaktor I mit UCE-S wurde selbst mit einer erhöhten Enzymkonzentration keine proteolytische Aktivität gegenüber UCE-S beobachtet. Entsprechend wurde die zuvor beschriebene U-II-generierende Aktivität in dieser Arbeit nicht bestätigt (Abbildung 11). In der Inkubation des Plasmins mit UCE-S wurde eine hohe proteolytische Aktivität gegenüber UCE-S festgestellt, jedoch keine U-II-generierende Aktivität. Stattdessen wurde die N-terminal verlängerte Form U-II+RK, die durch proteolytische Prozessierung C-terminal des Lysinrestes K<sup>111</sup> entsteht, detektiert. Zudem wurde eine proteolytische Prozessierung C-terminal des im zyklischen Hexapeptid befindlichen Lysinrestes K<sup>121</sup> beobachtet, die in Kombination mit der proteolytischen Prozessierung C-terminal des Lysinrestes K<sup>111</sup> auftrat. Dies führte je nach Oxidationszustand der Cysteinreste zu einem weiterhin Disulfid-verbrückten Proteolyseprodukt oder zu zwei weiteren Proteolyseprodukten (Abbildung 10). Die beobachtete proteolytische Prozessierung des UCE-S durch Plasmin entspricht nicht der eines U-II-generierenden Enzyms, insbesondere nicht die proteolytische Prozessierung innerhalb der

biologisch aktiven zyklischen Struktur. Diese würde zur Linearisierung und damit Inaktivierung führen, da die zyklische Struktur essentiell für die Aktivierung des UTR ist und linearisierte U-II-Peptide als deutlich weniger aktiv beschrieben wurden.<sup>[33]</sup> Eine Bedeutung des Plasmins für den Abbau von aktivem U-II ist bisher nicht bekannt. In den Inkubationen des Thrombins und des Koagulationsfaktor XIIa wurden zunächst keine deutlich erkennbaren Proteolyseprodukte detektiert (Abbildung 52), weshalb die Inkubationen mit einer erhöhten Enzymkonzentration wiederholt wurden. Daraufhin ergab die Inkubation des Thrombins mit UCE-S eine starke Bildung der N-terminal verlängerten U-II-Peptide U-II+RK und U-II+RKK sowie eine starke Bildung von U-II<sub>106-124</sub>, das dem UCE-S nach Abspaltung des N-terminalen Argininrestes R<sup>105</sup> entspricht (Abbildung 11). Es wurde also eine dominante proteolytische Prozessierung C-terminal des Tyrosinrestes K<sup>110</sup>, des Lysinrestes K<sup>111</sup> und des Argininrestes R<sup>105</sup> detektiert. Thrombin verfügt über eine Schnittspezifität C-terminal von Arginin mit einem Glycinrest in P1'-Position, wie zum Beispiel in der Thrombin-vermittelten Spaltung des Fibrinogens.<sup>[119]</sup> Der Proteasedatenbank MEROPS ist zudem eine Schnittspezifität C-terminal von Lysin zu entnehmen.<sup>[110]</sup> Die Bildung von U-II+RK und U-II<sub>106-124</sub> ist konsistent mit den für Thrombin beschriebenen Schnittspezifitäten. Die proteolytische Prozessierung C-terminal des Tyrosinrestes Y<sup>110</sup> weicht allerdings davon ab. Das Thrombin verfügt über eine Vielzahl unterschiedlicher Substrate und Interaktionspartner, wie zum Beispiel Fibrinogen, Faktor V, Faktor XI oder Protein C<sup>[120]</sup> und es wurde eine Abhängigkeit der Substratspezifität des Thrombins von unterschiedlichen Co-Faktoren beschrieben.<sup>[121]</sup> Diese Variabilität der Substratspezifität könnte eine Erklärung für die von der beschriebenen Schnittspezifität des Thrombins abweichende proteolytische Spaltung C-terminal des Tyrosinrestes Y<sup>110</sup> sein. Mittels LC-ESI-TOF-MS wurde außerdem die Bildung von U-II detektiert, sodass eine U-II-generierende Aktivität des Thrombins festgestellt wurde. Die Inkubation des Koagulationsfaktor XIIa in erhöhter Enzymkonzentration mit UCE-S führte zur Bildung von U-II, den N-terminal verlängerten Formen U-II+R und U-II+RK und den N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukten (Abbildung 11). Es fand also eine dreifache proteolytische Prozessierung der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup> statt, wobei die Signalintensitäten der Proteolyseprodukte verglichen mit dem Peptidsubstrat UCE-S relativ gering waren. Zudem wurde das Proteolyseprodukt U-II<sub>106-124</sub> mit einer etwas größeren Signalintensität detektiert, das auf die proteolytische Prozessierung C-terminal des Argininrestes R<sup>105</sup> zurückzuführen ist. Diese Prozessierung ist konsistent mit der beschriebenen proteolytischen Prozessierung C-terminal von Arginin mit einem Isoleucinrest in P1'-Position durch den Koagulationsfaktor XIIa, die zum Beispiel zur Aktivierung des Koagulationsfaktor XI und des Plasma-Kallikreins führt.<sup>[92,122]</sup> Der Koagulationsfaktor XIIa verfügte demnach über eine

U-II-generierende Aktivität und führte, wie Thrombin, zur deutlichen Bildung von U-II<sub>106-124</sub>. Diese Beobachtung ist vor dem Hintergrund des potentiellen Auftretens von N-terminal verlängerten U-II-Peptiden als Intermediate von großem Interesse. Wie bereits diskutiert, wurde das Auftreten weiterer, vermutlich verlängerter, U-II-immunreaktiver Peptide beschrieben. Dabei wurde zunächst die potentielle proteolytische Prozessierung C-terminal der basischen Aminosäuren R<sup>105</sup> und K<sup>108</sup>, die zur Bildung von aus 19 bzw. 16 Aminosäuren bestehenden Peptiden führen würde, untersucht. Diese konnten experimentell durch Kombination aus HPLC und immunologischer Detektion zwar nicht detektiert werden,<sup>[86]</sup> aber die aus 19 Aminosäuren bestehende Form, die aus proteolytischer Prozessierung C-Terminal des Argininrestes R<sup>105</sup> resultieren würde, entspricht dem in dieser Arbeit beobachteten Proteolyseprodukt U-II<sub>106-124</sub>. Im Gegensatz dazu, wurde U-II<sub>106-124</sub> in der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S nicht detektiert. Dennoch könnte die Detektion des U-II<sub>106-124</sub> in den Inkubationen des Thrombins und des Koagulationsfaktor XIIIa mit UCE-S ein Indiz für ein potentielles Intermediat bei der proteolytischen Prozessierung des pre-pro-U-II zu U-II darstellen. In der Inkubation des Komplement C2 mit UCE-S wurden neben dem N-terminalen Proteolyseprodukt U-II<sub>105-110</sub> keine Proteolyseprodukte und damit kaum proteolytische Aktivität des Komplement C2 gegenüber UCE-S und keine U-II-generierende Aktivität festgestellt (Abbildung 12). Die Inkubation der Serin Protease 58 mit UCE-S führte zur Bildung von U-II, den N-terminal verlängerten Formen U-II+RK und U-II+RKK sowie zur Bildung des N-terminalen Proteolyseproduktes U-II<sub>105-110</sub> (Abbildung 12). Es wurde demnach eine proteolytische Prozessierung C-terminal des Tyrosinrestes Y<sup>110</sup>, des Lysinrestes K<sup>111</sup> und des Argininrestes R<sup>113</sup> festgestellt. Zudem wurde ein Signal bei m/z 1713.8 detektiert, das U-II<sub>105-117</sub> entspricht und auf eine proteolytische Prozessierung C-terminal des Asparaginsäurerestes D<sup>117</sup> zurückzuführen wäre. Die proteolytische Prozessierung C-terminal von Y<sup>110</sup> und D<sup>117</sup> weicht von der für die Serin Protease 58 beschriebenen Schnittspezifität C-terminal von Arginin und Lysin<sup>[111]</sup> ab. U-II und U-II+RK wurden mit relativ geringen Signalintensitäten detektiert und die Signalintensität des U-II war bei der relativen Quantifizierung mittels LC-ESI-TOF-MS nicht deutlich gegenüber der Negativkontrolle erhöht (Abbildung 15). Zum Vergleich der U-II-generierenden Aktivität wurde je 1 µg der Proteasen Plasma-Kallikrein, Plasmin, Thrombin und Koagulationsfaktor XIIIa mit UCE-S inkubiert und die gebildete Menge an U-II relativ mittels LC-ESI-TOF-MS quantifiziert (Abbildung 13). Dies bestätigte die zuvor mittels MALDI-TOF-MS festgestellte sehr hohe U-II-generierende Aktivität des Plasma-Kallikreins. Der Koagulationsfaktor XIIIa führte zur Bildung einer geringen Menge an U-II und in den Inkubationen von Plasmin und Thrombin wurde U-II nicht erkennbar detektiert. Die integrierte Peakfläche des durch 1 µg Plasma-Kallikrein

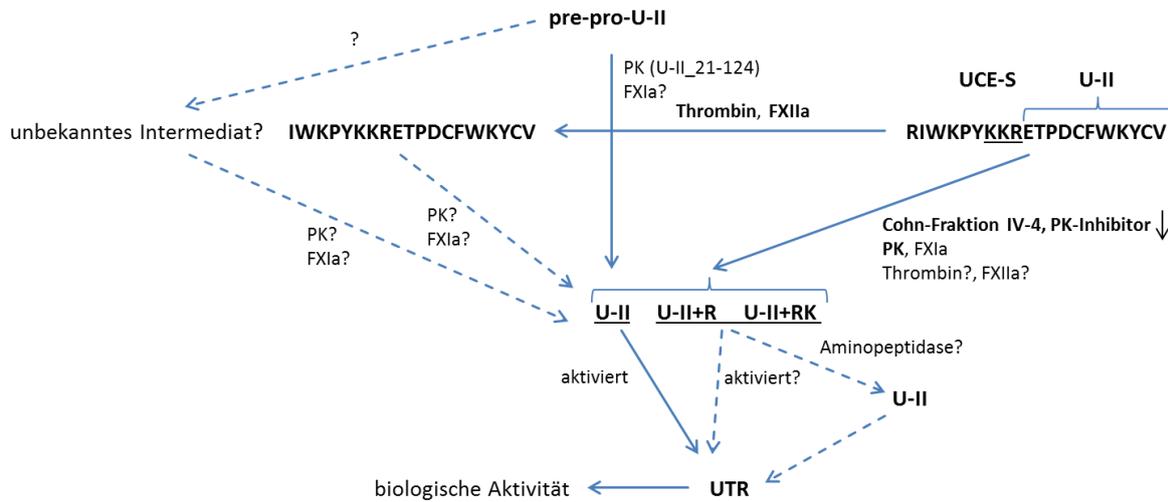
gebildeten U-II war ebenfalls sehr deutlich gegenüber der integrierten Peakfläche des durch 6 µg Koagulationsfaktor XIIa bzw. 6 µg Thrombin gebildeten U-II erhöht (Abbildungen 13 und 14). Dies verdeutlicht, dass Plasma-Kallikrein über eine deutlich höhere U-II-generierende Aktivität als alle anderen untersuchten Proteasen verfügte. Daher sollte die physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins für die Generierung von U-II validiert werden.

Zuvor wurde die physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins für die Generierung von U-II durch Inhibitionsexperimente in humanem Plasma mithilfe des selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitors PK15 demonstriert.<sup>[11]</sup> Zur Validierung dieser Ergebnisse wurde die physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins für die U-II-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 mithilfe des selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitors PKSI-527 untersucht. Die Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S in Anwesenheit von PKSI-527 ergab über 24 h zu jedem Messzeitpunkt eine deutlich reduzierte Bildung von U-II (Abbildung 16). In den Inkubationen von Plasma-Kallikrein und der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von PKSI-527 wurde eine mit zunehmender Inhibitorkonzentration stärker ausfallende Inhibierung der U-II-generierenden Aktivität festgestellt (Abbildung 17). In einer Inhibitorkonzentration von 100 µM wurde eine Reduzierung der integrierten Peakfläche des gebildeten U-II auf 7.3% in der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 und auf 0.9% in der Inkubation des Plasma-Kallikreins gegenüber der jeweiligen Positivkontrolle detektiert. Plasma-Kallikrein ist also zu einem großen Anteil für die U-II-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 verantwortlich. Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor festgestellte Inhibierung der U-II-generierenden Aktivität humanen Plasmas durch PK15<sup>[11]</sup> und implizieren eine hohe physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins für die Bildung von U-II.

Die bisher verwendete Strategie zur Identifizierung U-II-generierender Enzyme umfasste eine Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 durch eine Kombination aus weiterer Fraktionierung und des Massenspektrometrie-basierten Enzymassays mit anschließender Identifizierung korrespondierender Enzyme. Es wurde zudem ein alternativer Ansatz verwendet, in dem mittels eines Datenbankabgleiches gezielt nach dem Plasma-Kallikrein ähnlichen Proteasen gesucht wurde, da das Plasma-Kallikrein über die bisher höchste U-II-generierende Aktivität verfügte. Dabei wurde sowohl die Gesamtsequenz des Plasma-Kallikreins als auch die Sequenz der Proteasedomäne als Eingabesequenz für die Datenbankabfrage verwendet, in der der Blast-Algorithmus<sup>[116]</sup> auf die Uniprot-Datenbank<sup>[111]</sup> angewendet wurde. Diese ergab, dass der Koagulationsfaktor XI mit einer Gesamtsequenzhomologie von 58.5% und einer Sequenzhomologie der jeweiligen Proteasedomänen von 68.2% unter den humanen

Proteinen über die höchste Sequenzhomologie mit Plasma-Kallikrein verfügte. Beide Proteasen werden durch den Koagulationsfaktor XIIa proteolytisch prozessiert und dadurch aktiviert.<sup>[92,122]</sup> Der Koagulationsfaktor XIa überführt seinerseits den Faktor IX in die aktive Form Faktor FIXa,<sup>[123]</sup> woraus sich eine Schnittspezifität C-terminal von Arginin mit Alanin oder Valin in P1'-Position ergibt.<sup>[111,123]</sup> Der Proteasedatenbank MEROPS<sup>[110]</sup> ist zudem eine Schnittspezifität C-terminal von Lysin zu entnehmen. Im Folgenden sollte die U-II-generierende Aktivität des Koagulationsfaktor XIa untersucht werden. Der Koagulationsfaktor XIa führte bei der Inkubation mit UCE-S zur Bildung von U-II, den N-terminal verlängerten Formen U-II+R und U-II+RK sowie zu den N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukten (Abbildung 18), wobei das entsprechende MALDI-TOF-MS-Spektrum vergleichbar mit dem der Inkubation des Plasma-Kallikreins mit UCE-S war (Abbildung 10). Die durch 0.5 µg Plasma-Kallikrein bzw. 0.5 µg des Koagulationsfaktor XIa gebildete Menge an U-II wurde mittels LC-ESI-TOF-MS relativ quantifiziert, was eine deutlich erhöhte Bildung von U-II durch Plasma-Kallikrein ergab (Abbildung 20). Zur Überprüfung der Reinheit der verwendeten Enzyme wurde eine Proteinidentifizierung durch Trypsinierung und LC-MS/MS durchgeführt. Diese ergab für den kommerziell erworbenen Koagulationsfaktor XIa, dass ebenfalls das Plasma-Kallikrein identifiziert wurde. In diesem LC-MS/MS-Experiment und anschließender Datenbankabfrage wurden dem Koagulationsfaktor XI insgesamt 903 Peptidspektren zugeordnet, während dem Plasma-Kallikrein 100 Peptidspektren zugeordnet wurden (Tabelle 18). Daraus ergibt sich ein Faktor von 9 bezüglich der zugeordneten Peptidspektren, aus denen sich die Quantitäten der Proteasen näherungsweise abschätzen lassen. Es ist damit nicht eindeutig festzustellen, ob die beobachtete U-II-generierende Aktivität auf den Koagulationsfaktor XIa selbst oder auf die Kontamination mit Plasma-Kallikrein zurückzuführen ist. Ein Ansatz dieses Problem zu umgehen wäre die Verwendung eines rekombinant hergestellten Koagulationsfaktor XIa anstelle der hier verwendeten, aus Blutplasma angereicherten Protease. Basierend auf dem Faktor der zugeordneten Peptidspektren von 9 wurde ein weiteres Kontrollexperiment durchgeführt, in dem der Koagulationsfaktor XIa und das Plasma-Kallikrein etwa im ermittelten Verhältnis verwendet und die gebildeten Mengen an U-II mittels LC-ESI-TOF-MS relativ quantifiziert wurden (Abbildung 60). In diesem Experiment war die integrierte Peakfläche des durch den Koagulationsfaktor XIa gebildeten U-II um den Faktor 9.8 gegenüber der integrierten Peakfläche des durch Plasma-Kallikrein gebildeten U-II erhöht. Dies impliziert, dass die beobachtete U-II-generierende Aktivität nicht ausschließlich auf die Kontamination von näherungsweise 10% Plasma-Kallikrein zurückzuführen ist und der Koagulationsfaktor XIa ebenfalls über eine U-II-generierende Aktivität verfügt. Dennoch ist auch der gegenteilige Fall, dass die beobachtete U-II-generierende Aktivität auf die Kontamination mit

Plasma-Kallikrein zurückzuführen ist, nicht auszuschließen. In den zuvor beschriebenen Experimenten wurde neben Plasma-Kallikrein eine U-II-generierende Aktivität des Thrombins, des Koagulationsfaktor XIIa und voraussichtlich des Koagulationsfaktor XIa festgestellt. Dabei war die U-II-generierende Aktivität des Plasma-Kallikreins deutlich höher als die der anderen verwendeten Proteasen. Zudem wurde die physiologische Relevanz des Plasma-Kallikreins in einer vorherigen Arbeit<sup>[11]</sup> und in dieser Arbeit anhand von Inhibitionsexperimenten demonstriert. In beiden Fällen verblieb dabei eine Restaktivität zur Bildung von U-II, die ein Indiz für weitere U-II-generierende Enzyme darstellt. Ein weiteres Argument für diese Hypothese könnte das Auftreten einer vererbaren Plasma-Kallikrein-Defizienz im Menschen sein, wo betroffene Personen weitgehend ohne spezifische Symptome sind, obwohl Plasma-Kallikrein an zahlreichen Signalkaskaden und der Aktivierung von Proproteinen und Prohormonen beteiligt ist.<sup>[103]</sup> Dies impliziert die Kompensation des Plasma-Kallikreins durch alternative Proteasen. Ein Beispiel für die Kompensation von Proteasen stellt das Renin-Angiotensin-System dar. Dort wurde beschrieben, dass die proteolytische Prozessierung von Angiotensin-1 zu Angiotensin-2 unter bestimmten Bedingungen nicht ausschließlich durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE), sondern durch alternative Proteasen erfolgen kann.<sup>[124]</sup> Welche Bedeutung die Proteasen Thrombin, Koagulationsfaktor XIIa und Koagulationsfaktor XIa für eine potentielle Kompensation des Plasma-Kallikreins im Hinblick auf die Generierung von U-II haben, ist nicht bekannt. Eine Übersicht der Aktivitäten und Hypothesen zur proteolytischen Prozessierung von U-II die in einer vorherigen<sup>[11]</sup> und dieser Arbeit beobachtet wurden ist in Abbildung 41 dargestellt:



**Abbildung 41: Proteolytische Prozessierung von U-II am Beispiel des Peptidsubstrates UCE-S.** Proteolytische Aktivitäten gegenüber UCE-S, die in einer vorherigen<sup>[11]</sup> und dieser Arbeit beobachtet wurden sind durch Pfeile, Hypothesen und Fragestellungen durch gestrichelte Pfeile gekennzeichnet. Plasma-Kallikrein wies die höchste U-II-generierende Aktivität auf, gefolgt vom Koagulationsfaktor XIa. Die U-II-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 wurde durch den Plasma-Kallikrein-Inhibitor PKSI-527 inhibiert.

Die proteolytische Prozessierung des URP ist nicht vollständig untersucht und die Identität von URP-generierenden Enzymen bisher nicht bekannt. Wie für das U-II könnte die proteolytische Prozessierung von URP sowohl intrazellulär, als auch in der Blutzirkulation erfolgen. Ebenfalls unbekannt ist, ob die Generierung von URP unter Ausbildung eines Intermediates erfolgt. Es wurden U-II-immunreaktive Peptide, die vermutlich gegenüber U-II verlängert waren, durch eine Kombination aus HPLC und immunologischer Detektion beobachtet. Diese sind vermutlich auf verlängerte U-II-Peptide zurückzuführen.<sup>[86]</sup> Vor dem Hintergrund, dass Antikörper zur immunologischen Detektion von U-II gegebenenfalls nicht in der Lage sind zwischen U-II und URP, die über eine große strukturelle Ähnlichkeit verfügen, zu differenzieren,<sup>[62]</sup> könnten weitere U-II-immunreaktive Peptide ebenfalls auf URP oder verlängerte Formen des URP zurückzuführen sein. Zur Identifizierung von URP-generierenden Enzymen wurde die Cohn-Fraktion IV-4 zunächst auf ihre URP-generierende Aktivität hin untersucht. Sie wurde verwendet, da in einer vorherigen<sup>[11]</sup> und dieser Arbeit bereits eine U-II-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 beobachtet wurde und eine hohe proteolytische Aktivität wahrscheinlich erschien. Zur Untersuchung der URP-generierenden Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 wurde das Peptidsubstrat URP-S, das aus den 20 C-terminalen Aminosäuren des pre-pro-URP besteht und das aktive URP enthält, verwendet. Die Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S führte zur Bildung von URP, der N-terminal verlängerten Form URP+R sowie zu den N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukten (Abbildung 21). Es fand also eine doppelte proteolytische Prozessierung

der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup> statt. Wie schon für die Generierung von U-II beobachtet, war die Signalintensität der N-terminal verlängerten Form URP+R gegenüber der des URP erhöht. Eine Erklärung hierfür könnte ebenfalls die Abhängigkeit der Signalintensität von der Ionisationseffizienz darstellen.<sup>[112]</sup> Dennoch handelt es sich bei URP+R um ein deutliches Nebenprodukt bei der Generierung von URP durch die Cohn-Fraktion IV-4. Fraglich ist, ob URP+R in der Blutzirkulation vorkommt und ob es zur Aktivierung des UTR führen würde. Wie bereits für U-II beschrieben, führte eine N-terminale Verlängerung des U-II um einzelne Aminosäuren oder kurze Segmente von Aminosäuren in Struktur-Funktions-Analysen zu aktiven Formen.<sup>[33]</sup> Somit könnte URP+R, das sich nur in der Länge und den Aminosäuren Arginin und Alanin am N-Terminus von aktivem U-II unterscheidet, ebenfalls zur Aktivierung des UTR führen. Alternativ könnte URP+R ein Intermediat darstellen, das durch zusätzliche proteolytische Prozessierung durch eine Aminopeptidase in aktives URP überführt wird. Eine solche weitere proteolytische Prozessierung von um basische Aminosäuren verlängerten Peptidhormonen wurde, wie bereits erwähnt, zuvor beschrieben.<sup>[118]</sup> Zusammenfassend wurde eine deutliche URP-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 festgestellt, die im Folgenden als biologisches Ausgangsmaterial zur Identifizierung von URP-generierenden Enzymen verwendet wurde.

Zur Identifizierung der für die URP-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 verantwortlichen Proteaseklasse wurde zunächst ein Inhibitionsexperiment durchgeführt, in dem die Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren, die gegen unterschiedliche Proteaseklassen gerichtet sind, durchgeführt. Der Cysteinproteaseinhibitor E-64, der Aspartatproteaseinhibitor Pepstatin A und der Metalloproteaseinhibitor EDTA führten zu keiner messbaren Inhibierung der URP-generierenden Aktivität. Im Gegensatz dazu wurde eine deutliche Inhibierung der URP-generierenden Aktivität in Anwesenheit des Serinproteaseinhibitors AEBSF und des Leupeptins, bei dem es sich sowohl um einen Serin- als auch einen Cysteinproteaseinhibitor handelt, detektiert (Abbildung 23). Aus diesem Experiment geht hervor, dass die URP-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 auf Serinproteasen zurückzuführen ist. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von U-II und URP, sowie der N-terminal flankierenden tribasischen bzw. dibasischen Schnittstelle, ist diese Beobachtung konsistent mit der vorherigen Beschreibung eines potentiellen zirkulierenden U-II-generierenden Enzyms als Trypsin-ähnliche Serinprotease.<sup>[89]</sup> Zur Identifizierung von URP-generierenden Enzymen wurde eine Anreicherung der URP-generierenden Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 durch Kombination aus einer weiteren Fraktionierung und dem Massenspektrometrie-basierten Enzymassay durchgeführt. Das Elutionsprofil der Fraktionierung

durch Anionenaustauschchromatographie entsprach, wie bei U-II, dem Profil der URP-generierenden Aktivität (Abbildungen 24 und 25). Demnach korrelierte die Konzentration URP-generierender Enzyme mit der Gesamteinkonzentration. Es wurde eine Proteinidentifizierung in den aktivsten Fraktionen durch Trypsinierung und LC-MS/MS durchgeführt, wobei insgesamt 458 Proteine identifiziert wurden, von denen 73 Protease-bezogene Proteine darstellten. Von insgesamt 24 identifizierten Proteasen handelte es sich bei 18 um Serinproteasen. Diese waren aufgrund der zuvor festgestellten Inhibierung der URP-generierenden Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 durch Serinproteaseinhibitoren von großem Interesse. Die Generierung von URP erfordert eine proteolytische Prozessierung C-terminal von Arginin mit einem Alaninrest in P1'-Position. Die Proteasen Plasma-Kallikrein, Plasmin, Thrombin, Koagulationsfaktor X, Koagulationsfaktor XI, Koagulationsfaktor XII, Komplementfaktor B, Komplement C2, Complement C1s subcomponent, Hepatocyte growth factor activator und Complement C1r subcomponent schienen grundsätzlich zur proteolytischen Prozessierung von URP geeignet, da für sie eine Schnittspezifität C-terminal von Arginin oder C-terminal von Arginin und Lysin ermittelt wurde.<sup>[110,111,115]</sup>

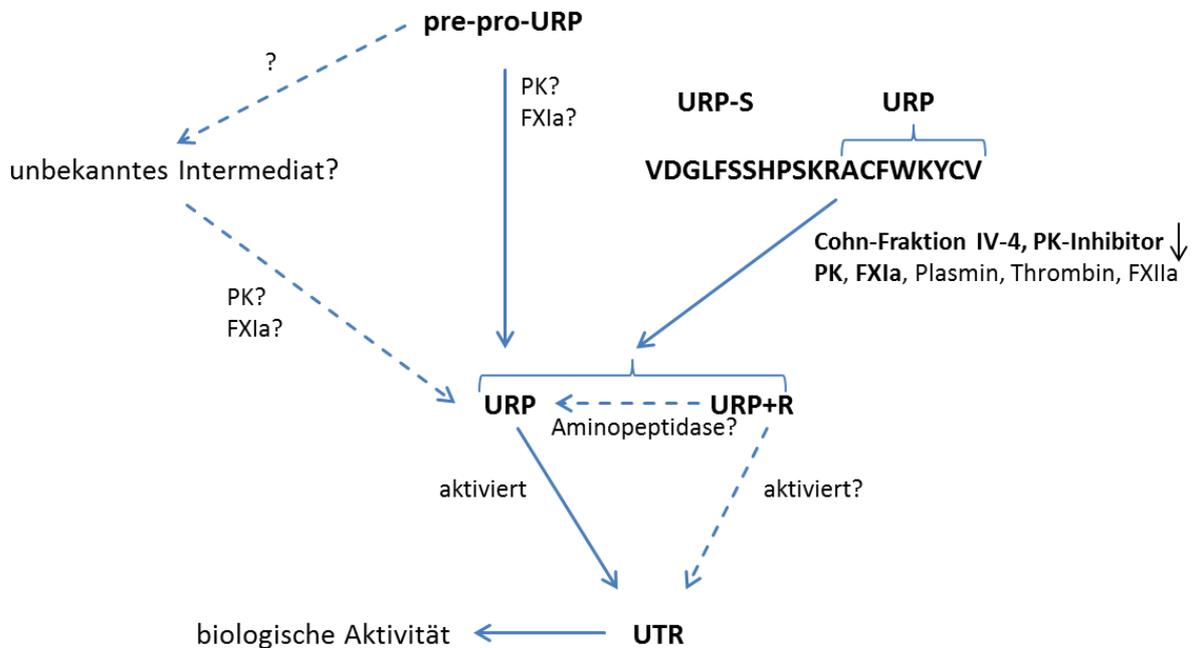
Auf Grundlage der Schnittspezifität und der Verfügbarkeit wurden die Proteasen Plasma-Kallikrein, Koagulationsfaktor XIa, Plasmin, Thrombin und der Koagulationsfaktor XIIa, die bereits auf ihre U-II-generierende Aktivität untersucht wurden, zur Validierung einer potentiellen URP-generierenden Aktivität verwendet. Die Inkubationen des Plasma-Kallikreins, des Koagulationsfaktor XIa und des Plasmins bewirkten die Bildung von URP, der N-terminal verlängerten Form URP+R sowie der N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukte (Abbildung 27). Der Verbrauch des Substrates URP-S war in der Inkubation des Plasma-Kallikreins am höchsten, gefolgt von den Inkubationen des Koagulationsfaktor XIa und des Plasmins. Plasma-Kallikrein, Koagulationsfaktor XIa und Plasmin führten zur doppelten proteolytischen Prozessierung der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup> und verfügten entsprechend über eine deutliche URP-generierende Aktivität. In der Inkubation des Plasmins wurde zusätzlich eine proteolytische Prozessierung C-terminal des im Hexazyklus befindlichen Lysinrestes K<sup>116</sup> detektiert. Diese trat allein oder in Kombination mit den proteolytischen Prozessierungen C-terminal des Lysinrestes K<sup>110</sup> oder des Argininrestes R<sup>111</sup> auf und führte je nach Oxidationszustand der Cysteinreste zur Bildung weiterhin Disulfid-verbrückter Proteolyseprodukte oder zu Proteolyseprodukten mit freien Cysteinresten. Die Signalintensität dieser Proteolyseprodukte war relativ gering, dennoch würde die proteolytische Prozessierung innerhalb der zyklischen Struktur, die essentiell für die Aktivierung des UTR und die biologische

Aktivität ist,<sup>[30]</sup> zur Linearisierung und Inaktivierung des URP führen. Die Inkubationen des Thrombins und des Koagulationsfaktor XIIa mit URP-S resultierten in der Bildung von URP und dem N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukt. Es wurde entsprechend eine einfache proteolytische Prozessierung der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup>, C-terminal von Arginin, und damit eine URP-generierende Aktivität festgestellt (Abbildung 28). Diese war, verglichen mit Plasma-Kallikrein, Koagulationsfaktor XIa und Plasmin relativ gering. Zudem wurde im Gegensatz zu den Inkubationen des Plasma-Kallikreins, des Koagulationsfaktor XIa und des Plasmins mit URP-S kein URP+R detektiert. Dies ist zwar konsistent mit der für Thrombin und den Koagulationsfaktor XIIa beschriebenen Schnittspezifität C-terminal von Arginin,<sup>[111]</sup> unterscheidet sich jedoch von den Inkubationen des Thrombins und des Koagulationsfaktor XIIa mit UCE-S, wo auch eine proteolytische Prozessierung C-terminal von Lysin beobachtet wurde (Abbildung 11). Mögliche Ursachen könnten die dortige Erhöhung der Enzymkonzentration und der Inkubationsdauer oder die unterschiedliche Beschaffenheit der di- bzw. tribasischen Schnittstelle des URP-S bzw. des UCE-S sein. In der Inkubation des Komplementfaktor I mit URP-S wurde keine proteolytische Aktivität festgestellt (Abbildung 28), was die ausbleibende proteolytische Aktivität gegenüber UCE-S bestätigt (Abbildung 11). Zum Vergleich der URP-generierenden Aktivität der verwendeten Proteasen wurde die durch Plasma-Kallikrein, Koagulationsfaktor XIa, Plasmin, Thrombin und Koagulationsfaktor XIIa gebildete Menge an URP relativ quantifiziert (Abbildung 29). URP wurde in allen Inkubationen deutlich detektiert. Die URP-generierende Aktivität des Plasma-Kallikreins und des Koagulationsfaktor XIa war dabei am höchsten, gefolgt von Plasmin, Thrombin und Koagulationsfaktor XIIa. Zusammenfassend verfügte das Plasma-Kallikrein neben der zuvor ermittelten höchsten U-II-generierenden Aktivität auch über die höchste detektierte URP-generierende Aktivität. Damit wurde ein vielversprechendes URP-generierendes Enzym identifiziert. Zudem wurden weitere alternative URP-generierende Enzyme identifiziert, von denen der Koagulationsfaktor XIa und das Plasmin über eine hohe URP-generierende Aktivität verfügten. Auch hier ist anzumerken, dass der kommerziell erworbene Koagulationsfaktor XIa zum Teil durch Plasma-Kallikrein verunreinigt war. Die Verunreinigung durch Plasma-Kallikrein wurde anhand zugeordneter Peptidspektren bei der Reinheitsbestimmung mittels Trypsinierung und LC-MS/MS (Tabelle 18) in grober Näherung auf 10% bestimmt. Die hier detektierte URP-generierende Aktivität des Koagulationsfaktor XIa befand sich in der Größenordnung der URP-generierenden Aktivität des Plasma-Kallikreins. Diese hohe URP-generierende Aktivität des Koagulationsfaktor XIa lässt sich nicht durch eine Verunreinigung durch Plasma-Kallikrein von 10%, also entsprechend 0.1 µg, erklären. Sie ist zudem konsistent mit der für den Koagulationsfaktor XIa beschriebenen Schnittspezifität

C-terminal von Arginin mit Alanin in P1'-Position, die der erforderlichen proteolytischen Prozessierung C-terminal des Argininrestes R<sup>111</sup> und N-terminal des Alaninrestes A<sup>112</sup> zur Generierung von URP entspricht.

Aufgrund der hohen URP-generierenden Aktivität des Plasma-Kallikreins wurde dessen physiologische Relevanz zur Bildung von URP weitergehend untersucht. Es wurde, analog der Untersuchung der physiologischen Relevanz des Plasma-Kallikreins zur Bildung von U-II, ein Inhibitionsexperiment unter Verwendung des selektiven Plasma-Kallikrein-Inhibitors PKSI-527 durchgeführt. In der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S in Anwesenheit von PKSI-527 wurde in einem Zeitraum von 24 h zu jedem Messzeitpunkt eine deutlich reduzierte Produktbildung von URP festgestellt (Abbildung 30). Aus der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 bzw. des Plasma-Kallikreins mit URP-S in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an PKSI-527 ergab sich eine mit zunehmender Inhibitorkonzentration stärker ausfallende Inhibierung der URP-generierenden Aktivität (Abbildung 31). In Anwesenheit von 100 µM PKSI-527 wurde eine Reduzierung der integrierten Peakfläche des durch die Cohn-Fraktion IV-4 gebildeten URP auf 5.7% und des durch Plasma-Kallikrein gebildeten URP auf 3.1% gegenüber der Positivkontrolle festgestellt. Dies zeigt, dass Plasma-Kallikrein zu einem hohen Anteil für die URP-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 verantwortlich ist und impliziert neben einer hohen physiologischen Relevanz des Plasma-Kallikreins zur Bildung des U-II eine hohe physiologische Relevanz zur Bildung von URP. Vor dem Hintergrund der hohen URP-generierenden Aktivität des Koagulationsfaktor XIa und des Plasmins ist die starke Inhibierung der URP-generierenden Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 durch PKSI-527 sehr auffällig. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine gegenüber dem Koagulationsfaktor XIa und dem Plasmin erhöhte Konzentration des Plasma-Kallikreins in der Cohn-Fraktion IV-4. Tatsächlich wurde der Koagulationsfaktor XI nur in einer Sub-Fraktion der Anreicherung der URP-generierenden Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 anhand nur eines tryptischen Peptides identifiziert, was eine geringe Konzentration andeutet. Eine weitere Erklärung könnte eine gewisse Affinität des PKSI-527 gegenüber weiteren Proteasen wie Plasmin oder dem Koagulationsfaktor XIa darstellen. PKSI-527 wurde als selektiver Plasma-Kallikrein-Inhibitor beschrieben, dessen Dissoziationskonstante gegenüber dem Plasma-Kallikrein auf 0.81 µM bestimmt wurde. Zudem wurde seine Affinität gegenüber weiteren Proteasen untersucht, woraus sich für Urokinase, Plasmin und Thrombin Dissoziationskonstanten von 200 µM, 390 µM und >500 µM ergaben.<sup>[12,125]</sup> Dies verdeutlicht die hohe Selektivität des PKSI-527 für Plasma-Kallikrein, dessen Dissoziationskonstante um den Faktor 482 niedriger war als die des Plasmins. Dennoch könnte

es bei hohen Inhibitorkonzentrationen auch bei geringeren Affinitäten zur Inhibierung weiterer Proteasen, wie zum Beispiel des Plasmins oder des Koagulationsfaktor XIa, kommen. Eine Übersicht der Aktivitäten und Hypothesen zur proteolytischen Prozessierung von URP, die in dieser Arbeit beobachtet wurden, ist in Abbildung 42 dargestellt:



**Abbildung 42: Proteolytische Prozessierung von URP am Beispiel des Peptidsubstrates URP-S.** Beobachtete proteolytische Aktivitäten gegenüber URP-S sind durch Pfeile, Hypothesen und Fragestellungen durch gestrichelte Pfeile gekennzeichnet. Plasma-Kallikrein wies die höchste URP-generierende Aktivität auf, gefolgt vom Koagulationsfaktor XIa. Die URP-generierende Aktivität der Cohn-Fraktion IV-4 wurde durch den Plasma-Kallikrein-Inhibitor PKSI-527 inhibiert.

Der bisherige Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Untersuchung der U-II/URP-generierenden Aktivität in der Blutzirkulation und der Identifizierung bzw. Validierung korrespondierender Enzyme. Eine weitere Möglichkeit zur Bildung von aktivem U-II und URP stellt eine intrazelluläre proteolytische Prozessierung dar. Zuvor wurde in humanen epikardialen Mesothelzellen eine Furin-ähnliche U-II-generierende Aktivität anhand der Umsetzung eines aus 25 Aminosäuren bestehenden Vorläufers zu aktivem U-II beschrieben. Dies stellte ein Indiz für das Vorkommen von intrazellulären U-II-generierenden Enzymen dar.<sup>[89]</sup> Später wurde eine U-II-generierende Aktivität der intrazellulären Proteasen Proprotein-Convertase 1 und 2 *in vitro* festgestellt und ihre Verantwortlichkeit für die U-II-generierende Aktivität in neuroendokrinen und neuronalen Zellen angedeutet.<sup>[90]</sup> Das Vorkommen und die Identität von intrazellulären URP-generierenden Enzymen sind bisher unbekannt. Ein Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von intrazellulären U-II/URP-generierenden Enzymen. Zunächst sollte die U-II/URP-generierende Aktivität von

Zellextrakten der humanen Zelllinien HEK-293T, T98G und HeLa untersucht werden. In den Inkubationen des HEK-293T-, T98G- und HeLa-Zellextraktes mit UCE-S wurde die Bildung von U-II, den N-terminal verlängerten Formen U-II+R und U-II+RK sowie den N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukten detektiert (Abbildung 32). Die HEK-293T-, T98G- und HeLa-Zellextrakte bewirkten eine dreifache proteolytische Prozessierung der tribasischen Schnittstelle KKR<sup>113</sup>, C-terminal von Arginin und Lysin, und verfügten damit über eine U-II-generierende Aktivität. In den Inkubationen des HEK-293T- und des HeLa-Zellextraktes wurde zusätzlich eine proteolytische Prozessierung C-terminal des Tyrosinrestes Y<sup>110</sup> und die Bildung von U-II+RKK und des N-terminal korrespondierenden Proteolyseproduktes festgestellt. In der Inkubation des T98G-Zellextraktes wurde, wie zuvor für Plasmin beschrieben, zudem eine Kombination der proteolytischen Prozessierung C-terminal des Lysinrestes K<sup>111</sup>, des Lysinrestes K<sup>112</sup> bzw. des Argininrestes R<sup>113</sup> und C-terminal des in der zyklischen Struktur befindlichen Lysinrestes K<sup>121</sup> detektiert. Eine solche Prozessierung würde, wie bereits diskutiert, zum Verlust der zyklischen Struktur und damit der biologischen Aktivität führen.<sup>[33]</sup> Auffällig war, dass die Spaltung C-terminal des Lysinrestes K<sup>111</sup> und des Argininrestes R<sup>113</sup> in allen Inkubationen dominant auftrat. Entsprechend wies U-II+R, im Gegensatz zur Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S, eine relativ geringe Signalintensität auf. Der Anteil des U-II an den drei typischen Proteolyseprodukten U-II, U-II+R und U-II+RK war gegenüber dem Anteil an den durch die Cohn-Fraktion IV-4 gebildeten Proteolyseprodukten erhöht, was auch deutlich aus dem Chromatogramm der LC-ESI-TOF-MS-Messung der Inkubation des T98G-Zellextraktes mit UCE-S hervorgeht (Abbildung 61). Die proteolytische Prozessierung C-terminal des Lysinrestes K<sup>112</sup> scheint also intrazellulär weniger stark katalysiert zu werden. Eine andere Erklärung könnte eine weitere Umsetzung des U-II+R zu U-II darstellen. Bezüglich der Generierung von U-II+R und U-II+RK ist, wie bereits diskutiert, fraglich, ob sie tatsächlich vorkommen und ob sie zur Aktivierung des UTR führen würden oder Intermediate darstellen und weiter zu U-II prozessiert würden. Die Inkubationen des HEK-293T-, T98G- und HeLa-Zellextraktes mit URP-S resultierten in der Bildung von URP, der N-terminal verlängerten Form URP+R sowie der N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukte (Abbildung 33). Wie zuvor diskutiert, ist auch hier fraglich, ob URP+R tatsächlich vorkommt und ob es den UTR aktivieren würde oder weiter zu URP prozessiert würde. Die HEK-293T-, T98G- und HeLa-Zellextrakte bewirkten also eine doppelte proteolytische Prozessierung der dibasischen Schnittstelle KR<sup>111</sup>, C-terminal von Arginin und Lysin, und verfügten entsprechend neben einer intrazellulären U-II-generierenden Aktivität über eine intrazelluläre URP-generierende Aktivität. In den Inkubationen des HEK-293T- und des T98G-Zellextraktes trat zudem ein deutliches Signal bei m/z 1796.9 auf, das dem

Proteolyseprodukt URP<sub>104-119</sub> entspricht. Dieses ist auf eine proteolytische Prozessierung C-terminal des Phenylalaninrestes F<sup>103</sup> zurückzuführen. Dieses Proteolyseprodukt wurde weder in der Inkubation des HeLa-Zellextraktes noch in allen vorherigen Inkubationen der Cohn-Fraktion IV-4 oder einzelner Proteasen aus der Blutzirkulation mit URP-S beobachtet. Ob diese proteolytische Spaltung eine Bedeutung für die proteolytische Prozessierung von URP hat ist unbekannt. Wie für die proteolytische Prozessierung von U-II wäre eine Generierung von aktivem URP unter Ausbildung eines Intermediates vorstellbar. Dennoch würde eine solche proteolytische Prozessierung C-terminal von Phenylalanin vom Konzept der häufig an mono- oder dibasischen Schnittstellen stattfindenden Prozessierung von Prohormonen abweichen.<sup>[72]</sup> Zusammenfassend wurde die U-II- und URP-generierende Aktivität der Zellextrakte HEK-293T, T98G und HeLa festgestellt.

Im Folgenden sollte der HEK-293T-Zellextrakt als Ausgangsmaterial zur Identifizierung von intrazellulären U-II-generierenden Enzymen verwendet werden. Zuvor sollte die für die intrazelluläre U-II-generierende Aktivität des HEK-293T-Zellextraktes verantwortliche Proteaseklasse identifiziert werden. Dazu wurde die Inkubation des HEK-293T-Zellextraktes mit UCE-S in Anwesenheit von Inhibitoren, die gegen unterschiedliche Proteaseklassen gerichtet sind, durchgeführt und die gebildete Menge an U-II relativ quantifiziert (Abbildung 34). Dies ergab eine deutliche Inhibierung der U-II-generierenden Aktivität in Anwesenheit des Serinproteaseinhibitors AEBSF und des Leupeptins, das sowohl die Inhibierung von Serin- als auch Cysteinproteasen bewirkt. Die gebildete Menge an U-II in Anwesenheit des Aspartatproteaseinhibitors Pepstatin A lag im Bereich der Positivkontrolle und in Anwesenheit des Cysteinproteaseinhibitors E-64 und des Metalloproteaseinhibitors EDTA wurde eine leicht erhöhte URP-Bildung festgestellt. Mögliche Ursachen für die erhöhte URP-Bildung könnten Schwankungen im Experiment, eine potentielle Inhibierung des Abbaus von URP oder eine potentielle Inhibierung der Bildung von Nebenprodukten sein. Die Ergebnisse zeigen, dass Serinproteasen für die beobachtete intrazelluläre U-II-generierende Aktivität verantwortlich sind. Dies ist konsistent mit der zuvor beschriebenen intrazellulären Furin-ähnlichen U-II-generierenden Aktivität<sup>[89]</sup> und der beobachteten U-II-generierenden Aktivität der Proprotein-Convertasen 1 und 2,<sup>[90]</sup> bei denen es sich ebenfalls um Serinproteasen handelt.<sup>[111]</sup> Es folgte eine Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität eines HEK-293T-Zellextraktes durch Kombination einer Fraktionierung und des Massenspektrometrie-basierten Enzymassays. Das Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie entsprach dem Profil der U-II-generierenden Aktivität (Abbildungen 35 und 36), was wiederum eine Korrelation der Konzentration von U-II-

generierenden Enzymen und einer generell hohen Proteinkonzentration zeigte. In der Proteinidentifikation der aktivsten Fraktionen mittels Trypsinierung und LC-MS/MS wurden 2038 Proteine, 114 Protease-bezogene Proteine und 84 Proteasen identifiziert. Von diesen handelte es sich bei elf um Serinproteasen, die aufgrund der zuvor festgestellten Inhibierung der U-II-generierenden Aktivität des HEK-293T-Zellextraktes durch Serinproteasen von besonderem Interesse waren. Der Hepatocyte growth factor activator, Thrombin und die Proprotein-Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6 verfügten über eine geeignete Schnittspezifität C-terminal von Arginin.<sup>[110,111,115]</sup> Für Thrombin, das ebenfalls in der Cohn-Fraktion IV-4 identifiziert wurde, wurde bereits eine Untersuchung der U-II/URP-generierenden Aktivität durchgeführt. Jedoch scheint eine intrazelluläre proteolytische Prozessierung von U-II und URP durch Thrombin unwahrscheinlich, da der Vorläufer Prothrombin erst in der Blutzirkulation als Teil der Koagulationskaskade durch Faktor Xa und Faktor Va aktiviert wird.<sup>[126]</sup> Der vielversprechendste Kandidat der identifizierten Proteasen war die Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6, die zur proteolytischen Prozessierung C-terminal von Arginin, insbesondere von mehrfach basischen Sequenzen führt.<sup>[111]</sup> Eine proteolytische Prozessierung der tri- bzw. dibasischen Schnittstellen von U-II und URP schien daher wahrscheinlich. Jedoch war die Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6 nicht kommerziell verfügbar. Daher wurde nach alternativen und verwandten Enzymen mit kommerzieller Verfügbarkeit gesucht. Ein Sequenzvergleich der aktiven Form der Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6, also ohne Signalpeptid und Proproteinsequenz, mithilfe des Blast-Algorithmus<sup>[116]</sup> und der Uniprot-Datenbank<sup>[111]</sup> ergab Sequenzübereinstimmungen von 56.7%, 54.8% und 45.7% mit den Proprotein-Convertasen 5, 1 und 4. Ein analoger Sequenzvergleich der Proteasedomäne der Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6 ergab Sequenzhomologien von 76.3%, 62.6% und 62.1% mit den Proprotein-Convertasen 5, 1 und 4. Zudem ergab sich eine Sequenzhomologie von 51.2% und 69.0% für die aktive Form bzw. die Proteasedomäne der Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6 mit Furin. Die Ähnlichkeit mit Furin ist ein weiteres Indiz für eine U-II-generierende Aktivität der Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6, da für Furin bereits zuvor eine U-II-generierende Aktivität beschrieben wurde.<sup>[89]</sup> Da außerdem zuvor eine U-II-generierende Aktivität der Proprotein-Convertase 1 beschrieben wurde,<sup>[90]</sup> diese über eine große Sequenzübereinstimmung mit der Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6 verfügte und kommerziell verfügbar war, sollte die U-II-generierende Aktivität in dieser Arbeit validiert und eine potentielle URP-generierende Aktivität der Proprotein-Convertase 1 untersucht werden. Nach Immobilisierung der Proprotein-Convertase 1 und Inkubation mit UCE-S und URP-S wurde keine proteolytische Aktivität festgestellt (Abbildung 59). Zuvor wurde eine Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit

der Umsetzung von pro-U-II durch die Proprotein-Convertasen 1 und 2 festgestellt,<sup>[90]</sup> weshalb der Versuch ohne vorherige Immobilisierung, in Anwesenheit von  $\text{CaCl}_2$  und unter veränderten Reaktionsbedingungen erneut durchgeführt wurde. Die Inkubation der Proprotein-Convertase 1 mit UCE-S führte zur Bildung von U-II und seinem N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukt. In der Inkubation der Proprotein-Convertase 1 mit URP-S wurden URP, die N-terminal verlängerte Form URP+R sowie die N-terminal korrespondierenden Proteolyseprodukte detektiert (Abbildung 38). Da die Signalintensitäten der Proteolyseprodukte verglichen mit dem jeweiligen Peptidsubstrat sehr gering waren, wurden entsprechende Inkubationen ebenfalls qualitativ und quantitativ mittels LC-ESI-TOF-MS untersucht. Dies ergab jeweils eine deutlich gegenüber der Negativkontrolle erhöhte Bildung von U-II und URP (Abbildungen 39 und 40). Die Proprotein-Convertase führte zur proteolytischen Prozessierung der tribasischen Schnittstelle  $\text{KKR}^{113}$  des UCE-S, C-terminal des Arginins, und der dibasischen Schnittstelle  $\text{KR}^{111}$  des URP-S, C-terminal von Arginin und Lysin. Die Proprotein-Convertase verfügte in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  also über eine U-II und URP-generierende Aktivität. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der in der Literatur beschriebenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Bildung von U-II durch die Proprotein-Convertase 1.<sup>[90]</sup> Zusammenfassend wurde die U-II-generierende Aktivität der Proprotein-Convertase 1 festgestellt und die Proprotein-Convertase 1 als intrazelluläres URP-generierendes Enzym identifiziert.

**8 Literaturliste**

- [1] D. Pearson, J. E. Shively, B. R. Clark, I. I. Geschwind, M. Barkley, R. S. Nishioka, H. A. Bern, Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 5021-5024, **1980**.
- [2] R. S. Ames, H. M. Sarau, J. K. Chambers, R. N. Willette, N. V. Aiyar, A. M. Romanic, C. S. Loudon, J. J. Foley, C. F. Sauermeilch, R. W. Coatney, Z. Ao, J. Disa, S. D. Holmes, J. M. Stadel, J. D. Martin, W. S. Liu, G. I. Glover, S. Wilson, D. E. McNulty, C. E. Ellis, N. A. Elshourbagy, U. Shabon, J. J. Trill, D. W. Hay, E. H. Ohlstein, D. J. Bergsma, S. A. Douglas, Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14, *Nature*, 401, 282-286, **1999**.
- [3] T. Nakayama, T. Hirose, K. Totsune, N. Mori, Y. Maruyama, T. Maejima, K. Minagawa, R. Morimoto, K. Asayama, M. Kikuya, T. Ohkubo, J. Hashimoto, M. Kohzuki, K. Takahashi, Y. Imai, Increased gene expression of urotensin II-related peptide in the hearts of rats with congestive heart failure, *Peptides*, 29, 801-808, **2008**.
- [4] T. Hirose, K. Takahashi, N. Mori, T. Nakayama, M. Kikuya, T. Ohkubo, M. Kohzuki, K. Totsune, Y. Imai, Increased expression of urotensin II, urotensin II-related peptide and urotensin II receptor mRNAs in the cardiovascular organs of hypertensive rats: comparison with endothelin-1, *Peptides*, 30, 1124-1129, **2009**.
- [5] L. L. Ng, I. Loke, R. J. O'Brien, I. B. Squire, J. E. Davies, Plasma urotensin in human systolic heart failure, *Circulation*, 106, 2877-2880, **2002**.
- [6] B. M. Y. Cheung, R. Leung, Y. B. Man, L. Y. F. Wong, Plasma concentration of urotensin II is raised in hypertension, *Journal of Hypertension*, 22, 1341-1344, **2004**.
- [7] W. A. Kinney, J. H. R. Almond, J. Qi, C. E. Smith, R. J. Santulli, L. de Garavilla, P. Andrade-Gordon, D. S. Cho, A. M. Everson, M. A. Feinstein, P. A. Leung, B. E. Maryanoff, Structure-function analysis of urotensin II and its use in the construction of a ligand-receptor working model, *Angewandte Chemie International Edition*, 41, 2940-2944, **2002**.
- [8] T. Sugo, Y. Murakami, Y. Shimomura, M. Harada, M. Abe, Y. Ishibashi, C. Kitada, N. Miyajima, N. Suzuki, M. Mori, M. Fujino, Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310, 860-868, **2003**.

- [9] H. Vaudry, J. Leprince, D. Chatenet, A. Fournier, D. G. Lambert, J.-C. Le Mével, E. H. Ohlstein, A. Schwertani, H. Tostivint, D. Vaudry, International union of basic and clinical pharmacology. XCII. Urotensin II, urotensin II-related peptide, and their receptor: from structure to function, *Pharmacological Reviews*, 67, 214-258, **2015**.
- [10] Y. Coulouarn, I. Lihrmann, S. Jegou, Y. Anouar, H. Tostivint, J. C. Beauvillain, J. M. Conlon, H. A. Bern, H. Vaudry, 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, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 15803-15808, **1998**.
- [11] Maria Trusch, Dissertation Thesis, Universität Hamburg, **2010**.
- [12] S. Okamoto, U. Okamoto, K. Wanaka, A. Hijikata-Okunomiya, M. Bohgaki, T. Naito, N. Horie, Y. Okada, Highly selective synthetic inhibitors with regard to plasma-kallikrein activities, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 247B, 29-34, **1989**.
- [13] D. Chan, Cardiovascular and renal effects of urotensins I and II in the eel, *Anguilla rostrata*, *General and Comparative Endocrinology*, 27, 52-61, **1975**.
- [14] H. Itoh, D. McMaster, K. Lederis, Functional receptors for fish neuropeptide urotensin II in major rat arteries, *European Journal of Pharmacology*, 149, 61-66, **1988**.
- [15] A. Gibson, P. Wallace, H. A. Bern, Cardiovascular effects of urotensin II in anesthetized and pithed rats, *General and Comparative Endocrinology*, 64, 435-439, **1986**.
- [16] A. Gibson, S. Conyers, H. A. Bern, The influence of urotensin II on calcium flux in rat aorta, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 40, 893-895, **1988**.
- [17] B. Ross, K. McKendy, A. Giaid, Role of urotensin II in health and disease, *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298, R1156-R1172, **2010**.
- [18] J. Conlon, F. O'Harte, D. Smith, M.-C. Tonon, H. Vaudry, Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 188, 578-583, **1992**.
- [19] Y. Coulouarn, S. Jégou, H. Tostivint, H. Vaudry, I. Lihrmann, Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors, *FEBS Letters*, 457, 28-32, **1999**.
- [20] N. Boussette, L. Patel, S. A. Douglas, E. H. Ohlstein, A. Giaid, Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta, *Atherosclerosis*, 176, 117-123, **2004**.
- [21] K. Totsune, K. Takahashi, Z. Arihara, M. Sone, S. Ito, O. Murakami, Increased plasma urotensin II levels in patients with diabetes mellitus, *Clinical Science*, 104, 1-5, **2003**.

- [22] K. Totsune, K. Takahashi, Z. Arihara, M. Sone, F. Satoh, S. Ito, Y. Kimura, H. Sasano, O. Murakami, Role of urotensin II in patients on dialysis, *The Lancet*, 358, 810-811, **2001**.
- [23] M. Tal, D. A. Ammar, M. Karpuj, V. Krizhanovsky, M. Naim, D. A. Thompson, A novel putative neuropeptide receptor expressed in neural tissue, including sensory epithelia, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 209, 752-759, **1995**.
- [24] A. Marchese, M. Heiber, T. Nguyen, H. H. Heng, V. R. Saldivia, R. Cheng, P. M. Murphy, L. C. Tsui, X. Shi, P. Gregor, Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors, *Genomics*, 29, 335-344, **1995**.
- [25] M. Matsushita, M. Shichiri, T. Imai, M. Iwashina, H. Tanaka, N. Takasu, Y. Hirata, Co-expression of urotensin II and its receptor (GPR14) in human cardiovascular and renal tissues, *Journal of Hypertension*, 19, 2185-2190, **2001**.
- [26] H. P. Nothacker, Z. Wang, A. M. McNeill, Y. Saito, S. Merten, B. O'Dowd, S. P. Duckles, O. Civelli, Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction, *Nature Cell Biology*, 1, 383-385, **1999**.
- [27] Q. Liu, S. S. Pong, Z. Zeng, Q. Zhang, A. D. Howard, D. L. Williams, M. Davidoff, R. Wang, C. P. Austin, T. P. McDonald, C. Bai, S. R. George, J. F. Evans, C. T. Caskey, Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266, 174-178, **1999**.
- [28] M. Mori, T. Sugo, M. Abe, Y. Shimomura, M. Kurihara, C. Kitada, K. Kikuchi, Y. Shintani, T. Kurokawa, H. Onda, O. Nishimura, M. Fujino, Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265, 123-129, **1999**.
- [29] S. Flohr, M. Kurz, E. Kostenis, A. Brkovich, A. Fournier, T. Klabunde, Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II, *Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 1799-1805, **2002**.
- [30] J. Gartlon, F. Parker, D. C. Harrison, S. A. Douglas, T. E. Ashmeade, G. J. Riley, Z. A. Hughes, S. G. Taylor, R. P. Munton, J. J. Hagan, J. A. Hunter, D. N. Jones, Central effects of urotensin-II following ICV administration in rats, *Psychopharmacology*, 155, 426-433, **2001**.
- [31] J. J. Maguire, R. E. Kuc, A. P. Davenport, Orphan-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1, *British Journal of Pharmacology*, 131, 441-446, **2000**.

- [32] P. Labarrère, D. Chatenet, J. Leprince, C. Marionneau, G. Loirand, M.-C. Tonon, C. Dubessy, E. Scalbert, B. Pfeiffer, P. Renard, B. Calas, P. Pacaud, H. Vaudry, Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18, 77-88, **2003**.
- [33] A. Brkovic, A. Hattenberger, E. Kostenis, T. Klabunde, S. Flohr, M. Kurz, S. Bourgault, A. Fournier, Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306, 1200-1209, **2003**.
- [34] S. Boivin, L. Guilhaudis, I. Milazzo, H. Oulyadi, D. Davoust, A. Fournier, Characterization of urotensin-II receptor structural domains involved in the recognition of U-II, URP, and urantide, *Biochemistry*, 45, 5993-6002, **2006**.
- [35] R. Patacchini, P. Santicioli, S. Giuliani, P. Grieco, E. Novellino, P. Rovero, C. A. Maggi, Urantide: an ultrapotent urotensin II antagonist peptide in the rat aorta, *British Journal of Pharmacology*, 140, 1155-1158, **2003**.
- [36] D. Chatenet, M. Létourneau, Q. T. Nguyen, N. D. Doan, J. Dupuis, A. Fournier, Discovery of new antagonists aimed at discriminating UII and URP-mediated biological activities: insight into UII and URP receptor activation, *British Journal of Pharmacology*, 168, 807-821, **2013**.
- [37] M. Clozel, C. Binkert, M. Birker-Robaczewska, C. Boukhadra, S.-S. Ding, W. Fischli, P. Hess, B. Mathys, K. Morrison, C. Müller, C. Müller, O. Nayler, C. Qiu, M. Rey, M. W. Scherz, J. Velker, T. Weller, J.-F. Xi, P. Ziltener, 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, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311, 204-212, **2004**.
- [38] P. N. Sidharta, F. D. Wagner, H. Bohnemeier, A. Jungnik, A. Halabi, S. Krähenbühl, H. Chadha-Boreham, J. Dingemans, Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the urotensin II receptor antagonist palosuran in macroalbuminuric, diabetic patients, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 80, 246-256, **2006**.
- [39] H. C. G. Prosser, M. E. Forster, A. M. Richards, C. J. Pemberton, Urotensin II and urotensin II-related peptide (URP) in cardiac ischemia-reperfusion injury, *Peptides*, 29, 770-777, **2008**.
- [40] N. D. Doan, T. T. M. Nguyen, M. Létourneau, K. Turcotte, A. Fournier, D. Chatenet, Biochemical and pharmacological characterization of nuclear urotensin-II binding sites in rat heart, *British Journal of Pharmacology*, 166, 243-257, **2012**.

- [41] M. Jarry, M. Diallo, C. Lecointre, L. Desrues, T. Tokay, D. Chatenet, J. Leprince, O. Rossi, H. Vaudry, M.-C. Tonon, L. Prézeau, H. Castel, P. Gandolfo, The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation, *The Biochemical Journal*, 428, 113-124, **2010**.
- [42] F. Merlino, É. Billard, A. M. Yousif, S. Di Maro, D. Brancaccio, L. Abate, A. Carotenuto, R. Bellavita, R. Di d'Emmanuele Villa Bianca, P. Santicioli, L. Marinelli, E. Novellino, T. E. Hébert, W. D. Lubell, D. Chatenet, P. Grieco, Functional selectivity revealed by N-methylation scanning of human urotensin II and related peptides, *Journal of Medicinal Chemistry*, 62, 1455-1467, **2019**.
- [43] O. S. Opgaard, H.-P. Nothacker, F. J. Ehlert, D. N. Krause, Human urotensin II mediates vasoconstriction via an increase in inositol phosphates, *European Journal of Pharmacology*, 406, 265-271, **2000**.
- [44] J. B. Parys, H. de Smedt, Inositol 1,4,5-trisphosphate and its receptors, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 740, 255-279, **2012**.
- [45] C. M. Filipeanu, E. Brailoiu, S. Le Dun, N. J. Dun, Urotensin-II regulates intracellular calcium in dissociated rat spinal cord neurons, *Journal of Neurochemistry*, 83, 879-884, **2002**.
- [46] V. Sauzeau, E. Le Mellionnec, J. Bertoglio, E. Scalbert, P. Pacaud, G. Loirand, Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase, *Circulation Research*, 88, 1102-1104, **2001**.
- [47] H. Itoh, Y. Itoh, J. Rivier, K. Lederis, Contraction of major artery segments of rat by fish neuropeptide urotensin II, *The American Journal of Physiology*, 252, R361-R366, **1987**.
- [48] S. A. Douglas, A. C. Sulpizio, V. Piercy, H. M. Sarau, R. S. Ames, N. V. Aiyar, E. H. Ohlstein, R. N. Willette, Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey, *British Journal of Pharmacology*, 131, 1262-1274, **2000**.
- [49] C. Hillier, C. Berry, M. C. Petrie, P. J. O'Dwyer, C. Hamilton, A. Brown, J. McMurray, Effects of urotensin II in human arteries and veins of varying caliber, *Circulation*, 103, 1378-1381, **2001**.
- [50] A. Stirrat, M. Gallagher, S. A. Douglas, E. H. Ohlstein, C. Berry, A. Kirk, M. Richardson, M. R. MacLean, Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 280, H925-H928, **2001**.
- [51] N. Desai, J. Sajjad, W. H. Frishman, Urotensin II: a new pharmacologic target in the treatment of cardiovascular disease, *Cardiology in Review*, 16, 142-153, **2008**.

- [52] M. R. MacLean, D. Alexander, A. Stirrat, M. Gallagher, S. A. Douglas, E. H. Ohlstein, I. Morecroft, K. Pollard, Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat, *British Journal of Pharmacology*, 130, 201-204, **2000**.
- [53] R. T. Bennett, R. D. Jones, A. H. Morice, C. F. C. Smith, M. E. Cowen, Vasoconstrictive effects of endothelin-1, endothelin-3, and urotensin II in isolated perfused human lungs and isolated human pulmonary arteries, *Thorax*, 59, 401-407, **2004**.
- [54] J. McDonald, M. Batuwangala, D. G. Lambert, Role of urotensin II and its receptor in health and disease, *Journal of Anesthesia*, 21, 378-389, **2007**.
- [55] H. C. G. Prosser, J. Leprince, H. Vaudry, A. M. Richards, M. E. Forster, C. J. Pemberton, Cardiovascular effects of native and non-native urotensin II and urotensin II-related peptide on rat and salmon hearts, *Peptides*, 27, 3261-3268, **2006**.
- [56] D. Chatenet, C. Dubessy, J. Leprince, C. Boularan, L. Carlier, I. Ségalas-Milazzo, L. Guilhaudis, H. Oulyadi, D. Davoust, E. Scalbert, B. Pfeiffer, P. Renard, M.-C. Tonon, I. Lihmann, P. Pacaud, H. Vaudry, Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide, *Peptides*, 25, 1819-1830, **2004**.
- [57] F. Böhm, J. Pernow, Urotensin II evokes potent vasoconstriction in humans in vivo, *British Journal of Pharmacology*, 135, 25-27, **2002**.
- [58] I. Wilkinson, High plasma concentrations of human urotensin II do not alter local or systemic hemodynamics in man, *Cardiovascular Research*, 53, 341-347, **2002**.
- [59] J. Cheriyan, T. J. Burton, T. J. Bradley, S. M. L. Wallace, K. M. Mäki-Petäjä, I. S. Mackenzie, C. M. McEniery, J. Brown, I. B. Wilkinson, The effects of urotensin II and urantide on forearm blood flow and systemic haemodynamics in humans, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 68, 518-523, **2009**.
- [60] B. Sondermeijer, A. Kompa, P. Komesaroff, H. Krum, Effect of exogenous urotensin-II on vascular tone in skin microcirculation of patients with essential hypertension, *American Journal of Hypertension*, 18, 1195-1199, **2005**.
- [61] M. Lim, S. Honisett, C. D. Sparkes, P. Komesaroff, A. Kompa, H. Krum, Differential effect of urotensin II on vascular tone in normal subjects and patients with chronic heart failure, *Circulation*, 109, 1212-1214, **2004**.
- [62] P. P. Jani, H. Narayan, L. L. Ng, The differential extraction and immunoluminometric assay of urotensin II and urotensin-related peptide in heart failure, *Peptides*, 40, 72-76, **2013**.
- [63] S. Jumaah, A. Çelekli, M. Sucu, The role of human urotensin-II in patients with hypertrophic cardiomyopathy, *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 39, 150-162, **2018**.

- [64] G. S. Hassan, S. A. Douglas, E. H. Ohlstein, A. Giaid, Expression of urotensin-II in human coronary atherosclerosis, *Peptides*, 26, 2464-2472, **2005**.
- [65] Z. You, J. Genest, P.-O. Barrette, A. Hafiane, D. J. Behm, P. D'Orleans-Juste, A. G. Schwertani, Genetic and pharmacological manipulation of urotensin II ameliorate the metabolic and atherosclerosis sequelae in mice, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32, 1809-1816, **2012**.
- [66] J. Zhao, Q.-X. Yu, W. Kong, H.-C. Gao, B. Sun, Y.-Q. Xie, L.-Q. Ren, The urotensin II receptor antagonist, urantide, protects against atherosclerosis in rats, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 5, 1765-1769, **2013**.
- [67] T. Wang, Y.-Q. Xie, G.-X. Miao, H.-P. Cui, K. Liu, Y. Li, J. Zhao, Urotensin receptor antagonist urantide improves atherosclerosis-related kidney injury by inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway in rats, *Life Sciences*, 247, 117421, **2020**.
- [68] J. Zhao, G. Miao, T. Wang, J. Li, L. Xie, Urantide attenuates myocardial damage in atherosclerotic rats by regulating the MAPK signalling pathway, *Life Sciences*, 262, 118551, **2020**.
- [69] T. Suguro, T. Watanabe, S. Kodate, G. Xu, T. Hirano, M. Adachi, A. Miyazaki, Increased plasma urotensin-II levels are associated with diabetic retinopathy and carotid atherosclerosis in Type 2 diabetes, *Clinical Science*, 115, 327-334, **2008**.
- [70] K. Totsune, K. Takahashi, Z. Arihara, M. Sone, O. Murakami, S. Ito, M. Kikuya, T. Ohkubo, J. Hashimoto, Y. Imai, Elevated plasma levels of immunoreactive urotensin II and its increased urinary excretion in patients with Type 2 diabetes mellitus: association with progress of diabetic nephropathy, *Peptides*, 25, 1809-1814, **2004**.
- [71] K. L. Ong, L. Y. F. Wong, Y. B. Man, R. Y. H. Leung, Y.-Q. Song, K. S. L. Lam, B. M. Y. Cheung, Haplotypes in the urotensin II gene and urotensin II receptor gene are associated with insulin resistance and impaired glucose tolerance, *Peptides*, 27, 1659-1667, **2006**.
- [72] S. Suzuki, Z. Wenyi, M. Hirai, Y. Hinokio, C. Suzuki, T. Yamada, S. Yoshizumi, M. Suzuki, Y. Tanizawa, A. Matsutani, Y. Oka, Genetic variations at urotensin II and urotensin II receptor genes and risk of type 2 diabetes mellitus in Japanese, *Peptides*, 25, 1803-1808, **2004**.
- [73] Z. Wenyi, S. Suzuki, M. Hirai, Y. Hinokio, Y. Tanizawa, A. Matsutani, J. Satoh, Y. Oka, Role of urotensin II gene in genetic susceptibility to Type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects, *Diabetologia*, 46, 972-976, **2003**.
- [74] R. G. Langham, D. J. Kelly, R. M. Gow, Y. Zhang, J. K. Dowling, N. M. Thomson, R. E. Gilbert, Increased expression of urotensin II and urotensin II receptor in human diabetic nephropathy, *American Journal of Kidney Diseases*, 44, 826-831, **2004**.

- [75] S. Q. Khan, S. S. Bhandari, P. Quinn, J. E. Davies, L. L. Ng, Urotensin II is raised in acute myocardial infarction and low levels predict risk of adverse clinical outcome in humans, *International Journal of Cardiology*, 117, 323-328, **2007**.
- [76] C. Zoccali, F. Mallamaci, F. A. Benedetto, G. Tripepi, P. Pizzini, S. Cutrupi, L. Malatino, Urotensin II and cardiomyopathy in end-stage renal disease, *Hypertension*, 51, 326-333, **2008**.
- [77] Y. Lin, T. Tsuchihashi, K. Matsumura, I. Abe, M. Iida, Central cardiovascular action of urotensin II in conscious rats, *Journal of Hypertension*, 21, 159-165, **2003**.
- [78] Y. Lin, T. Tsuchihashi, K. Matsumura, M. Fukuhara, Y. Ohya, K. Fujii, M. Iida, Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats, *Hypertension Research*, 26, 839-845, **2003**.
- [79] T. Ono, Y. Kawaguchi, M. Kudo, T. Kushikata, E. Hashiba, H. Yoshida, T. Kudo, K. Furukawa, S. A. Douglas, R. Guerrini, G. Calo', K. Hirota, Urotensin II evokes neurotransmitter release from rat cerebrocortical slices, *Neuroscience Letters*, 440, 275-279, **2008**.
- [80] S. Huitron-Resendiz, M. P. Kristensen, M. Sánchez-Alavez, S. D. Clark, S. L. Grupke, C. Tyler, C. Suzuki, H.-P. Nothacker, O. Civelli, J. R. Criado, S. J. Henriksen, C. S. Leonard, L. de Lecea, Urotensin II modulates rapid eye movement sleep through activation of brainstem cholinergic neurons, *The Journal of Neuroscience*, 25, 5465-5474, **2005**.
- [81] K. Nakai, Protein sorting signals and prediction of subcellular localization, *Advances in Protein Chemistry*, 54, 277-344, **2000**.
- [82] N. G. Seidah, R. Day, M. Marcinkiewicz, M. Chrétien, Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 839, 9-24, **1998**.
- [83] J. E. Sealey, S. A. Atlas, J. H. Laragh, Linking the kallikrein and renin systems via activation of inactive renin, *The American Journal of Medicine*, 65, 994-1000, **1978**.
- [84] S. S. Karnik, H. Unal, J. R. Kemp, K. C. Tirupula, S. Eguchi, P. M. L. Vanderheyden, W. G. Thomas, International union of basic and clinical pharmacology. XCIX. Angiotensin receptors: Interpreters of pathophysiological angiotensinergic stimuli corrected, *Pharmacological Reviews*, 67, 754-819, **2015**.
- [85] L. T. Skeggs, J. R. Kahn, N. P. Shumway, The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme, *The Journal of Experimental Medicine*, 103, 295-299, **1956**.

- [86] N. Chartrel, J. Leprince, C. Dujardin, D. Chatenet, H. Tollemer, M. Baroncini, R. J. Balment, J.-C. Beauvillain, H. Vaudry, Biochemical characterization and immunohistochemical localization of urotensin II in the human brainstem and spinal cord, *Journal of Neurochemistry*, 91, 110-118, **2004**.
- [87] K. Takahashi, K. Totsune, O. Murakami, S. Shibahara, 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, 1175-1179, **2001**.
- [88] F. D. Russell, D. Meyers, A. J. Galbraith, N. Bett, I. Toth, P. Kearns, P. Molenaar, Elevated plasma levels of human urotensin-II immunoreactivity in congestive heart failure, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 285, H1576-H1581, **2003**.
- [89] F. D. Russell, P. Kearns, I. Toth, P. Molenaar, Urotensin-II-converting enzyme activity of furin and trypsin in human cells in vitro, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310, 209-214, **2004**.
- [90] J. Bilodeau, A. Désilets, F.-O. McDuff, C. St-Pierre, E. Barbar, R. Leduc, P. Lavigne, Influence of Ca<sup>2+</sup> and pH on the folding of the prourotesin II precursor, *FEBS Letters*, 585, 1910-1914, **2011**.
- [91] Sandra Kurzawski, Dissertation Thesis, Freie Universität Berlin, **2007**.
- [92] D. W. Chung, K. Fujikawa, B. A. McMullen, E. W. Davie, Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contains four tandem repeats, *Biochemistry*, 25, 2410-2417, **1986**.
- [93] W. E. Hathaway, L. P. Belhasen, H. S. Hathaway, Evidence for a new plasma thromboplastin factor. I. Case report, coagulation studies and physicochemical properties, *Blood*, 26, 521-532, **1965**.
- [94] R. L. Heimark, E. W. Davie, Bovine and human plasma prekallikrein, *Methods in Enzymology*, 80, 157-172, **1981**.
- [95] B. N. Bouma, L. A. Miles, G. Beretta, J. H. Griffin, Human plasma prekallikrein. Studies of its activation by activated factor XII and of its inactivation by diisopropyl phosphorfluoridate, *Biochemistry*, 19, 1151-1160, **1980**.
- [96] C. F. Scott, C. Y. Liu, R. W. Colman, Human plasma prekallikrein: a rapid high-yield method for purification, *European Journal of Biochemistry*, 100, 77-83, **1979**.
- [97] R. Mandle, A. P. Kaplan, Hageman factor substrates. Human plasma prekallikrein: mechanism of activation by Hageman factor and participation in hageman factor-dependent fibrinolysis, *The Journal of Biological Chemistry*, 252, 6097-6104, **1977**.

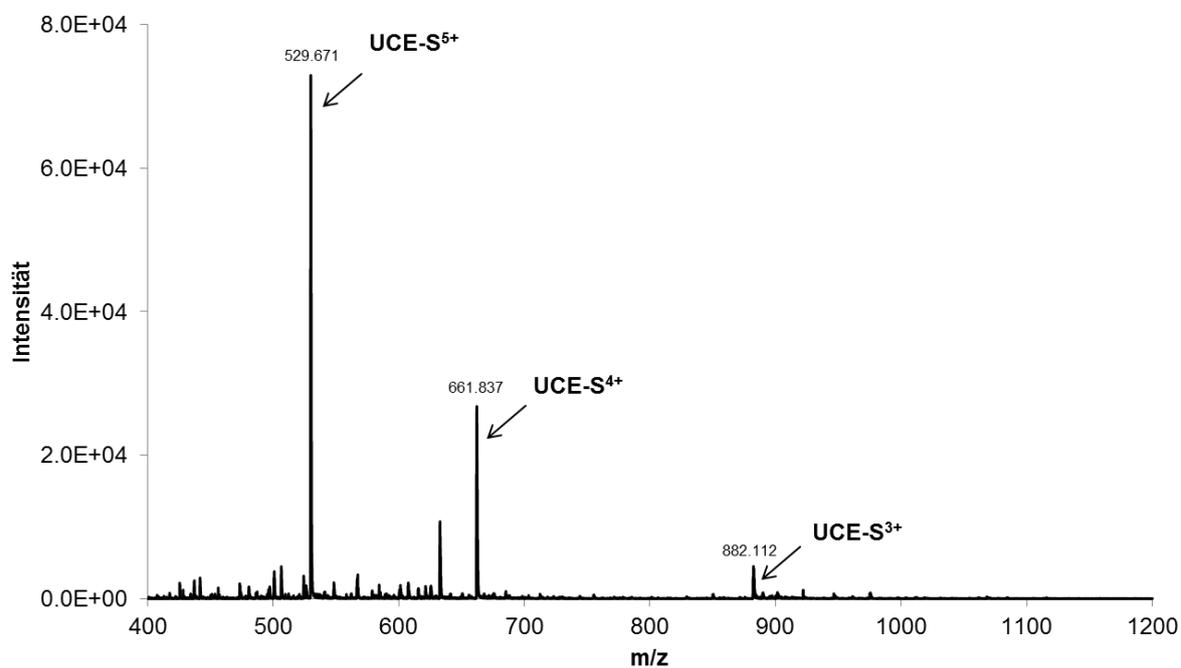
- [98] R. J. Mandle, R. W. Colman, A. P. Kaplan, Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73, 4179-4183, **1976**.
- [99] D. J. McConnell, B. Mason, The isolation of human plasma prekallikrein, *British Journal of Pharmacology*, 38, 490-502, **1970**.
- [100] C. A. Fisher, A. H. Schmaier, V. P. Addonizio, R. W. Colman, Assay of prekallikrein in human plasma: comparison of amidolytic, esterolytic, coagulation, and immunochemical assays, *Blood*, 59, 963-970, **1982**.
- [101] R. W. Colman, A. H. Schmaier, Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes, *Blood*, 90, 3819-3843, **1997**.
- [102] I. M. Sainz, R. A. Pixley, R. W. Colman, Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology, *Thrombosis and Haemostasis*, 98, 77-83, **2007**.
- [103] J. Björkqvist, A. Jämsä, T. Renné, Plasma kallikrein: the bradykinin-producing enzyme, *Thrombosis and Haemostasis*, 110, 399-407, **2013**.
- [104] J. Björkqvist, A. Sala-Cunill, T. Renné, Hereditary angioedema: a bradykinin-mediated swelling disorder, *Thrombosis and Haemostasis*, 109, 368-374, **2013**.
- [105] V. H. Donaldson, R. R. Evans, A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema, *The American Journal of Medicine*, 35, 37-44, **1963**.
- [106] A. P. Kaplan, K. Joseph, The bradykinin-forming cascade and its role in hereditary angioedema, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 104, 193-204, **2010**.
- [107] C. Heinis, T. Rutherford, S. Freund, G. Winter, Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides, *Nature Chemical Biology*, 5, 502-507, **2009**.
- [108] H. Schlüter, J. Jankowski, J. Rykl, J. Thiemann, S. Belgardt, W. Zidek, B. Wittmann, T. Pohl, Detection of protease activities with the mass-spectrometry-assisted enzyme-screening (MES) system, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, 1102-1107, **2003**.
- [109] J. Cox, M. Mann, MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification, *Nature Biotechnology*, 26, 1367-1372, **2008**.
- [110] N. D. Rawlings, F. R. Morton, C. Y. Kok, J. Kong, A. J. Barrett, MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Research*, 36, D320-D325, **2008**.
- [111] UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021, *Nucleic Acids Research*, 49, D480-D489, **2021**.

- [112] H. Steen, M. Mann, The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing, *Nature Reviews - Molecular Cell Biology*, 5, 699-711, **2004**.
- [113] R. Aebersold, M. Mann, Mass spectrometry-based proteomics, *Nature*, 422, 198-207, **2003**.
- [114] P. Roepstorff, J. Fohlman, Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides, *Biomedical Mass Spectrometry*, 11, 601, **1984**.
- [115] M. Kawaguchi, H. Orikiwa, T. Baba, T. Fukushima, H. Kataoka, Hepatocyte growth factor activator is a serum activator of single-chain precursor macrophage-stimulating protein, *The FEBS Journal*, 276, 3481-3490, **2009**.
- [116] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, Basic local alignment search tool, *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410, **1990**.
- [117] E. J. Cohn, J. L. Oncley, L. E. Strong, W. L. Hughes, S. H. Armstrong, Chemical, clinical, and immunological studies on the products of human plasma fractionation. I. The characterization of the protein fractions of human plasma, *The Journal of Clinical Investigation*, 23, 417-432, **1944**.
- [118] V. Hook, L. Funkelstein, D. Lu, S. Bark, J. Wegrzyn, S.-R. Hwang, Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48, 393-423, **2008**.
- [119] B. Blombäck, M. Blombäck, The molecular structure of fibrinogen, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 202, 77-97, **1972**.
- [120] J. A. Huntington, How Na<sup>+</sup> activates thrombin--a review of the functional and structural data, *Biological Chemistry*, 389, 1025-1035, **2008**.
- [121] D. A. Lane, H. Philippou, J. A. Huntington, Directing thrombin, *Blood*, 106, 2605-2612, **2005**.
- [122] R. Asakai, E. W. Davie, D. W. Chung, Organization of the gene for human factor XI, *Biochemistry*, 26, 7221-7228, **1987**.
- [123] P. N. Walsh, H. Bradford, D. Sinha, J. R. Piperno, G. P. Tuszynski, Kinetics of the Factor XIa catalyzed activation of human blood coagulation Factor IX, *The Journal of Clinical Investigation*, 73, 1392-1399, **1984**.
- [124] F. Fyhrquist, O. Saijonmaa, Renin-angiotensin system revisited, *Journal of Internal Medicine*, 264, 224-236, **2008**.
- [125] K. Wanaka, S. Okamoto, M. Bohgaki, A. Hijikata-Okunomiya, T. Naito, Y. Okada, Effect of a highly selective plasma-kallikrein synthetic inhibitor on contact activation relating to kinin generation, coagulation and fibrinolysis, *Thrombosis Research*, 57, 889-895, **1990**.

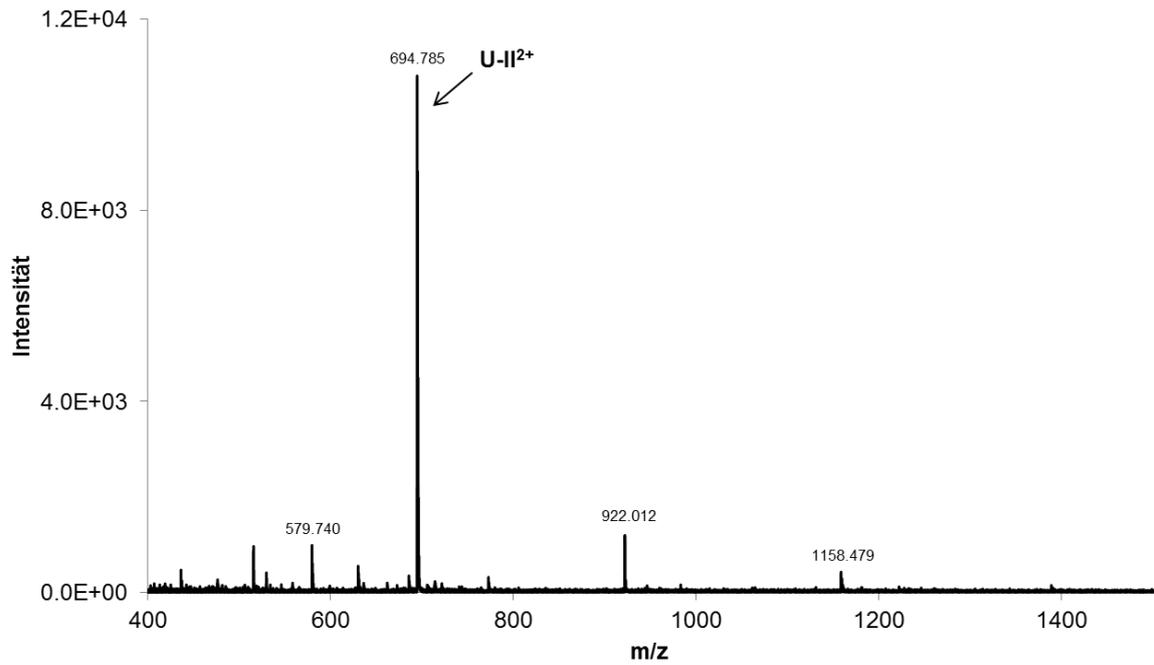
- [126] E. W. Davie, K. Fujikawa, W. Kisiel, The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation, *Biochemistry*, 30, 10363-10370, **1991**.
- [127] Sigma Aldrich, Webseite der Firma, [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com), **2021**.
- [128] Enzo Life Sciences, Webseite der Firma, [www.enzolifesciences.com](http://www.enzolifesciences.com), **2021**.

## 9 Anhang

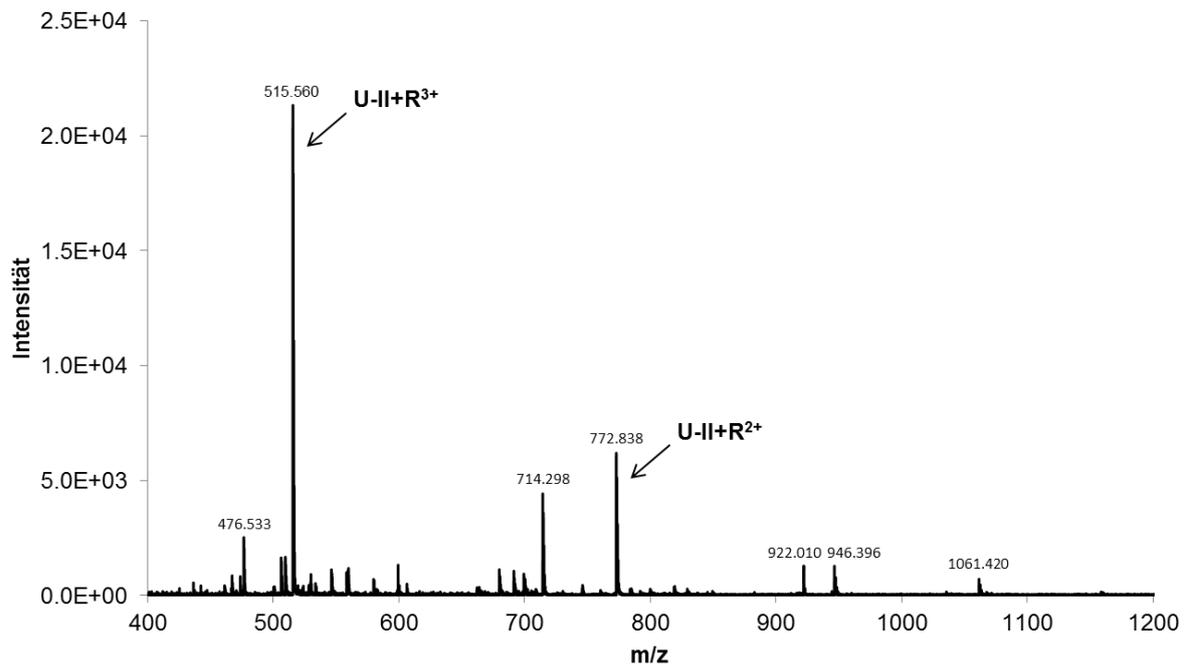
## 9.1 LC-ESI-TOF-MS- und MALDI-TOF-MS-Spektren, Chromatogramme, relative Quantifizierung von U-II und Tabellen



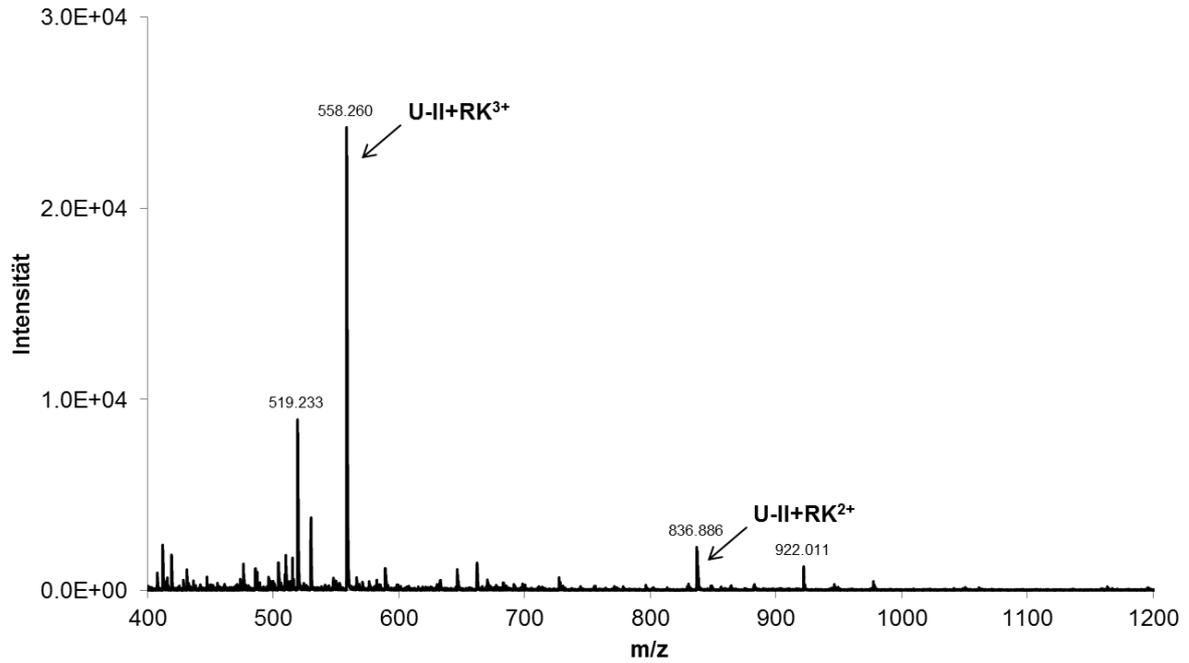
**Abbildung 43:** LC-ESI-TOF-MS der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S. Nach 24 h Inkubation wurde UCE-S ( $m/z$  529.671  $[M+5H]^{5+}$ ,  $m/z$  661.837  $[M+4H]^{4+}$ ,  $m/z$  882.112  $[M+3H]^{3+}$ ) mit einer Retentionszeit von 10.5 min detektiert.



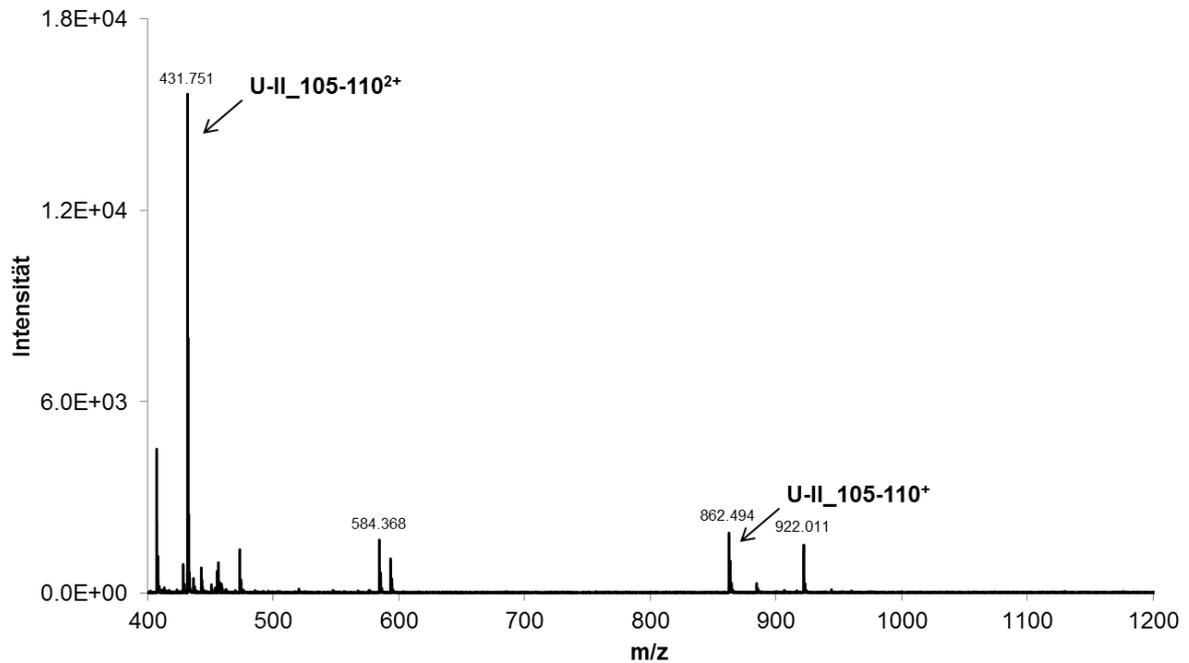
**Abbildung 44:** LC-ESI-TOF-MS der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S. Nach 24 h Inkubation wurde U-II ( $m/z$  694.785 [ $M+2H$ ]<sup>2+</sup>) mit einer Retentionszeit von 11.3 min detektiert.



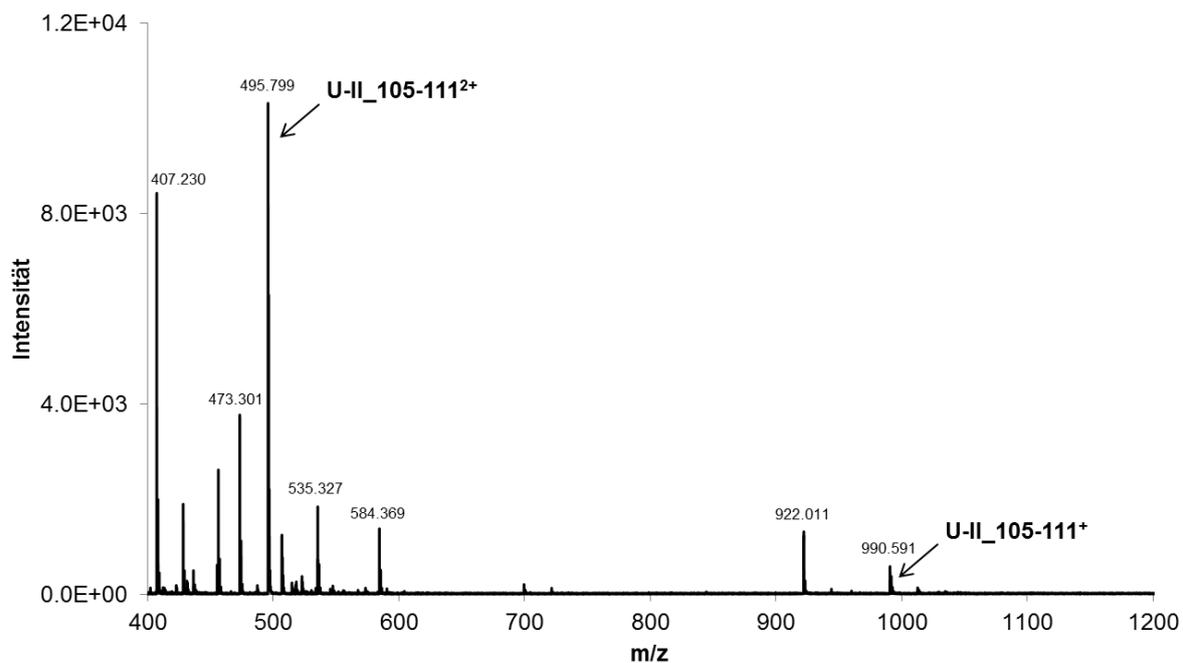
**Abbildung 45:** LC-ESI-TOF-MS der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S. Nach 24 h Inkubation wurde U-II+R ( $m/z$  515.560 [ $M+3H$ ]<sup>3+</sup>,  $m/z$  772.838 [ $M+2H$ ]<sup>2+</sup>) mit einer Retentionszeit von 11.0 min detektiert.



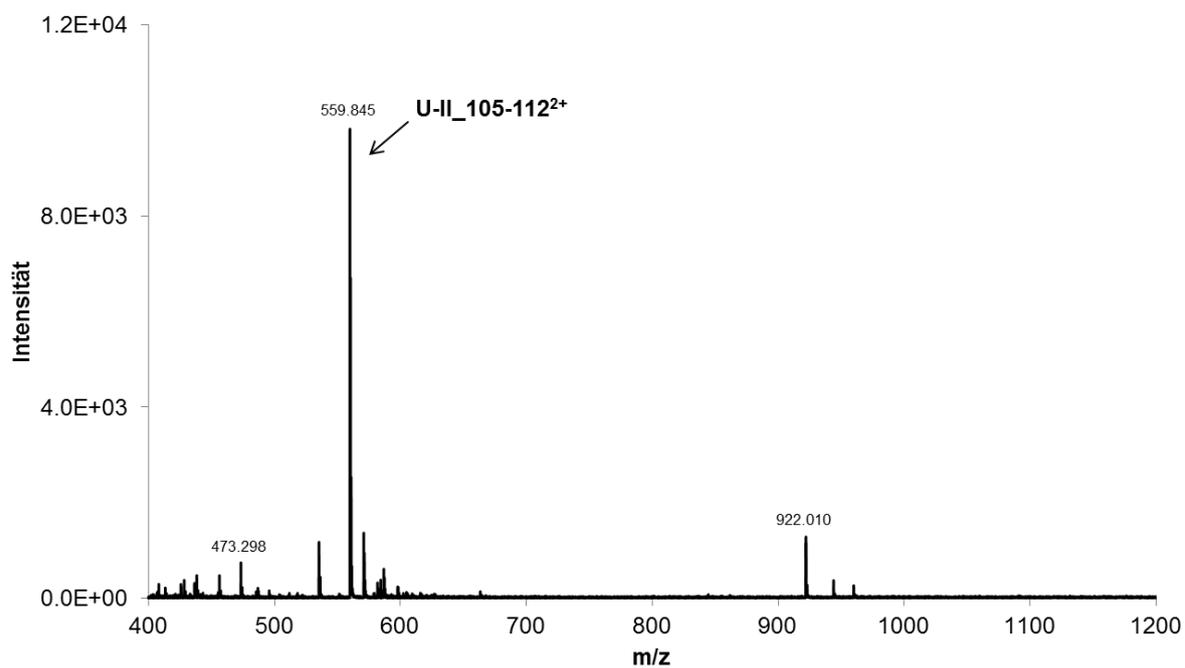
**Abbildung 46:** LC-ESI-TOF-MS der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S. Nach 24 h Inkubation wurde U-II+RK (m/z 558.260 [M+3H]<sup>3+</sup>, m/z 836.886 [M+2H]<sup>2+</sup>) mit einer Retentionszeit von 10.8 min detektiert.



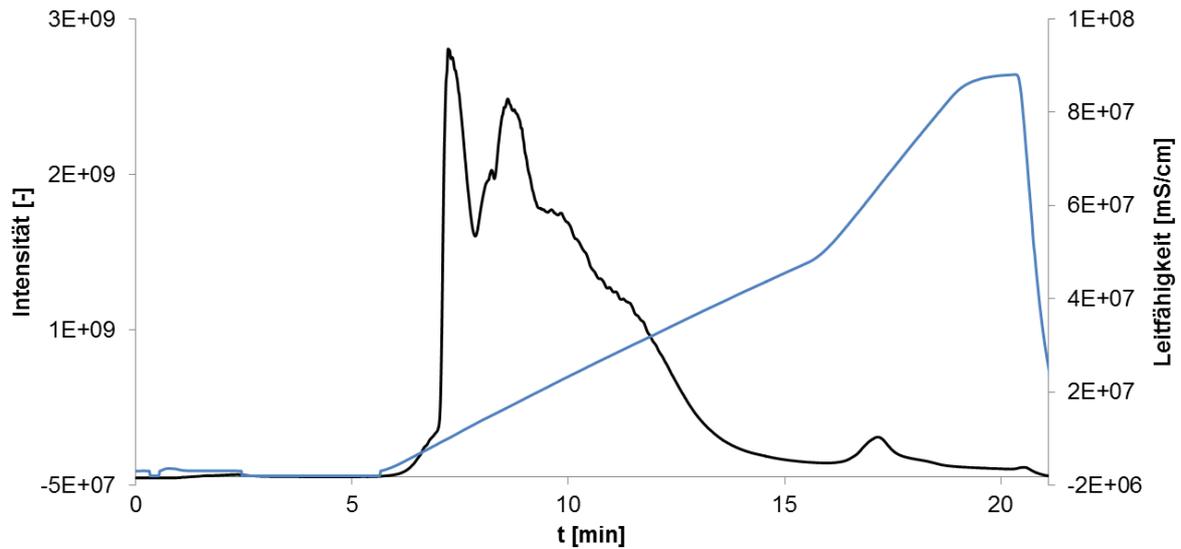
**Abbildung 47:** LC-ESI-TOF-MS der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S. Nach 24 h Inkubation wurde U-II\_105-110 (m/z 431.751 [M+2H]<sup>2+</sup>, m/z 862.494 [M+H]<sup>+</sup>) mit einer Retentionszeit von 8.5 min detektiert.



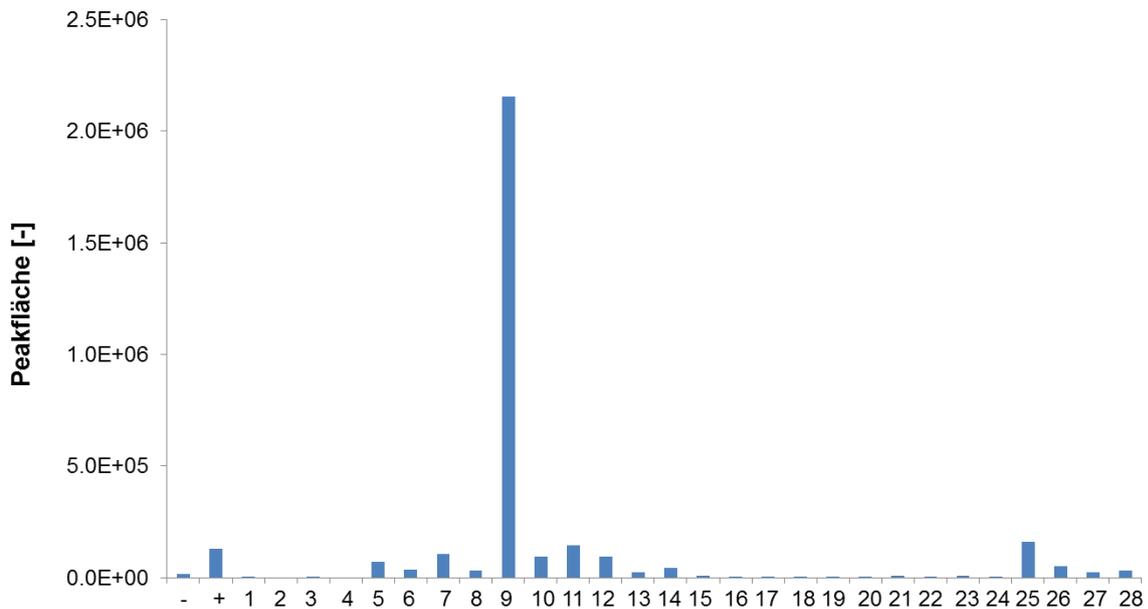
**Abbildung 48:** LC-ESI-TOF-MS der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S. Nach 24 h Inkubation wurde U-II\_105-111 ( $m/z$  495.799 [ $M+2H$ ]<sup>2+</sup>,  $m/z$  990.591 [ $M+H$ ]<sup>+</sup>) mit einer Retentionszeit von 3.3 min detektiert.



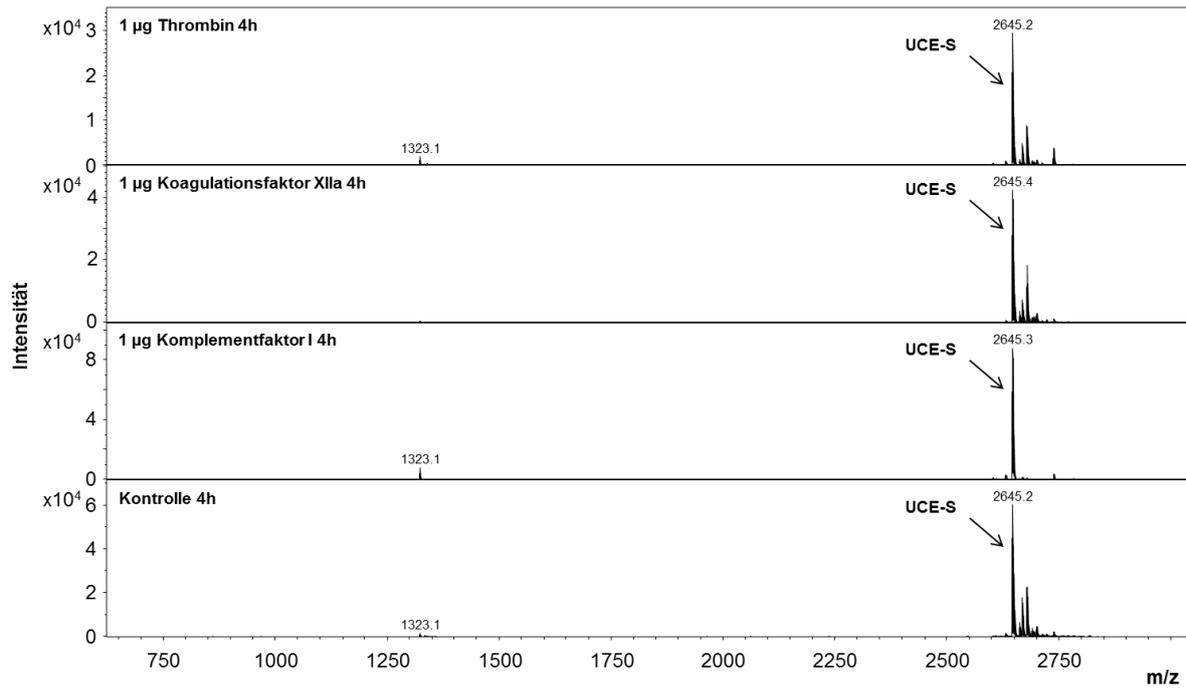
**Abbildung 49:** LC-ESI-TOF-MS der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit UCE-S. Nach 24 h Inkubation wurde U-II\_105-112 ( $m/z$  559.845 [ $M+2H$ ]<sup>2+</sup>) mit einer Retentionszeit von 1.7 min detektiert.



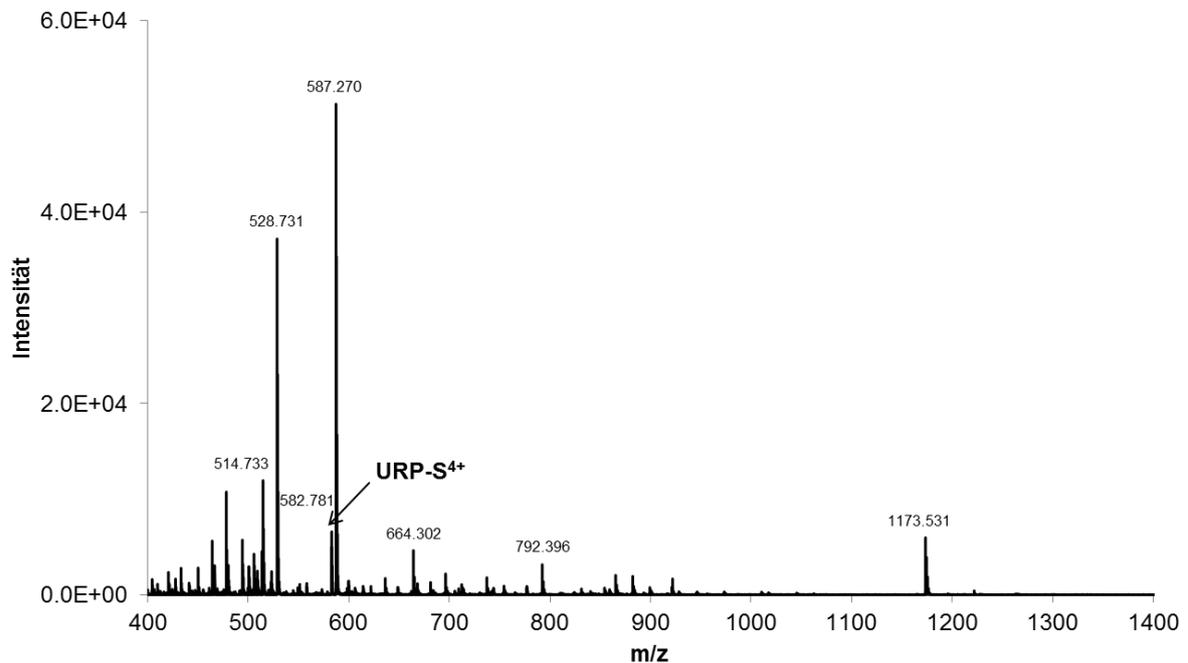
**Abbildung 50: Anionenaustauschchromatographie von 80 mg der Cohn-Fraktion IV-4 zur Anreicherung der U-II-generierenden Aktivität.** Die UV-Absorption ist in schwarz, die Leitfähigkeit in blau dargestellt. Der Großteil der an die stationäre Phase gebundenen Proteine eluierte zwischen 6 und 15 min mit einem weiteren Peak bei etwa 17 min. Die Trennung erfolgte mit NaCl als Elutionsmittel.



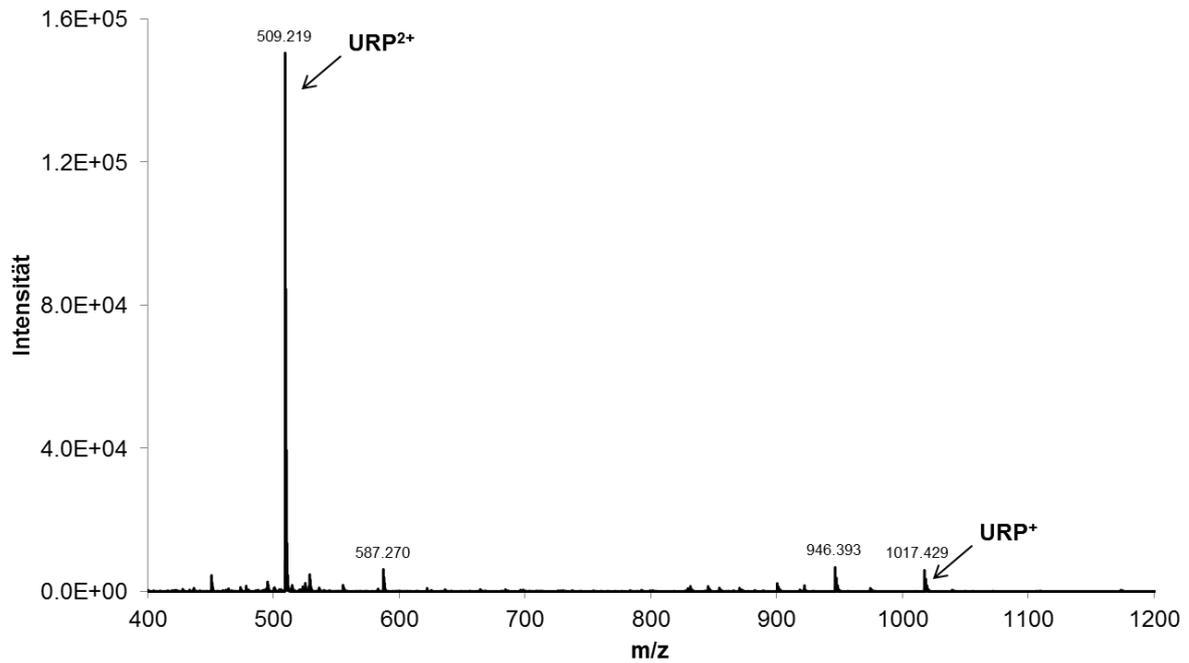
**Abbildung 51: LC-ESI-TOF-MS zur Quantifizierung von U-II nach 24 h Inkubation der Fraktionen 1-28 mit UCE-S.** U-II wurde relativ durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 694.781, der dem zweifach geladenen Peptid entspricht, quantifiziert. Die höchste U-II-generierende Aktivität wurde in den Fraktionen 7, 9, 11 und 25 detektiert.



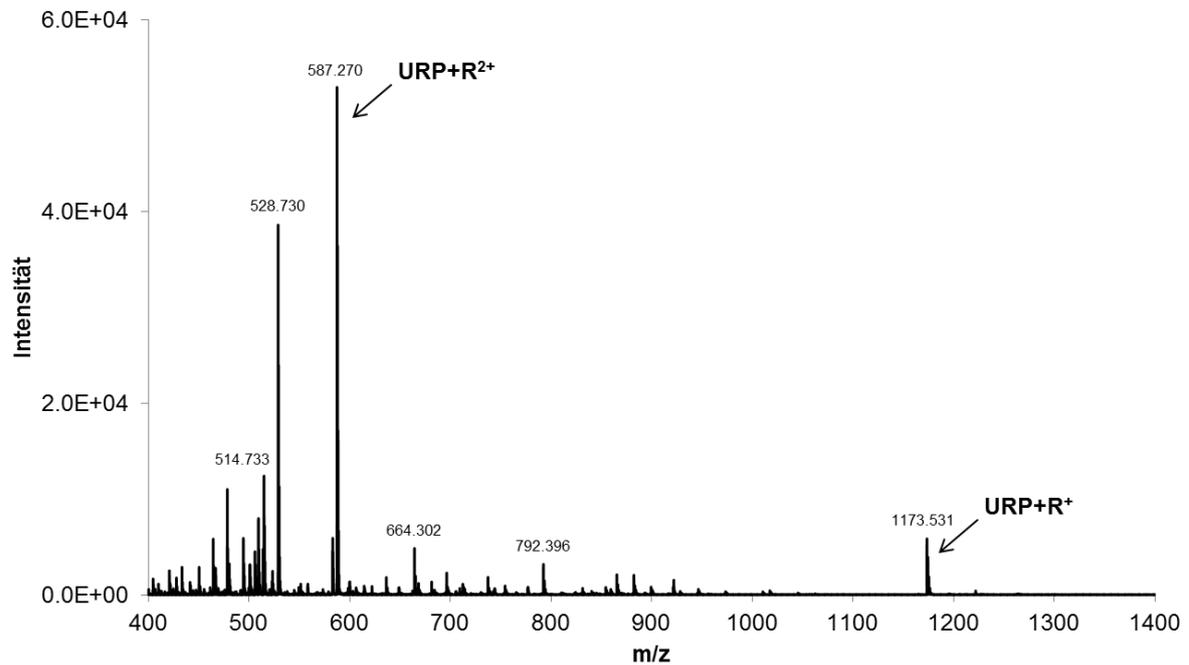
**Abbildung 52: MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubationen von jeweils 1 µg Thrombin, Komplementfaktor I und Koagulationsfaktor XIIa mit UCE-S.** Nach 4 h Inkubation von Thrombin, Komplementfaktor I und Koagulationsfaktor XIIa sowie in der Negativkontrolle wurde nur das Peptidsubstrat UCE-S detektiert, jedoch keine Proteolyseprodukte.



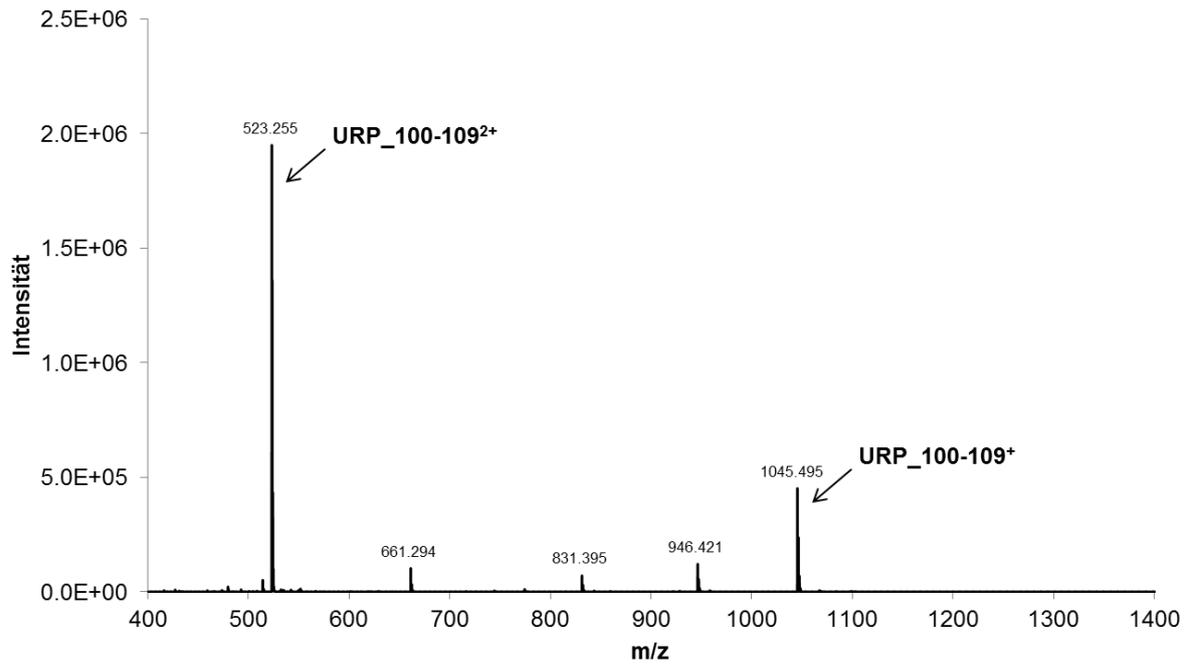
**Abbildung 53: LC-ESI-TOF-MS der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S.** Nach 24 h Inkubation wurde URP-S ( $m/z$  587.270 [ $M+4H$ ]<sup>4+</sup>) mit einer Retentionszeit von 11.1 min detektiert.



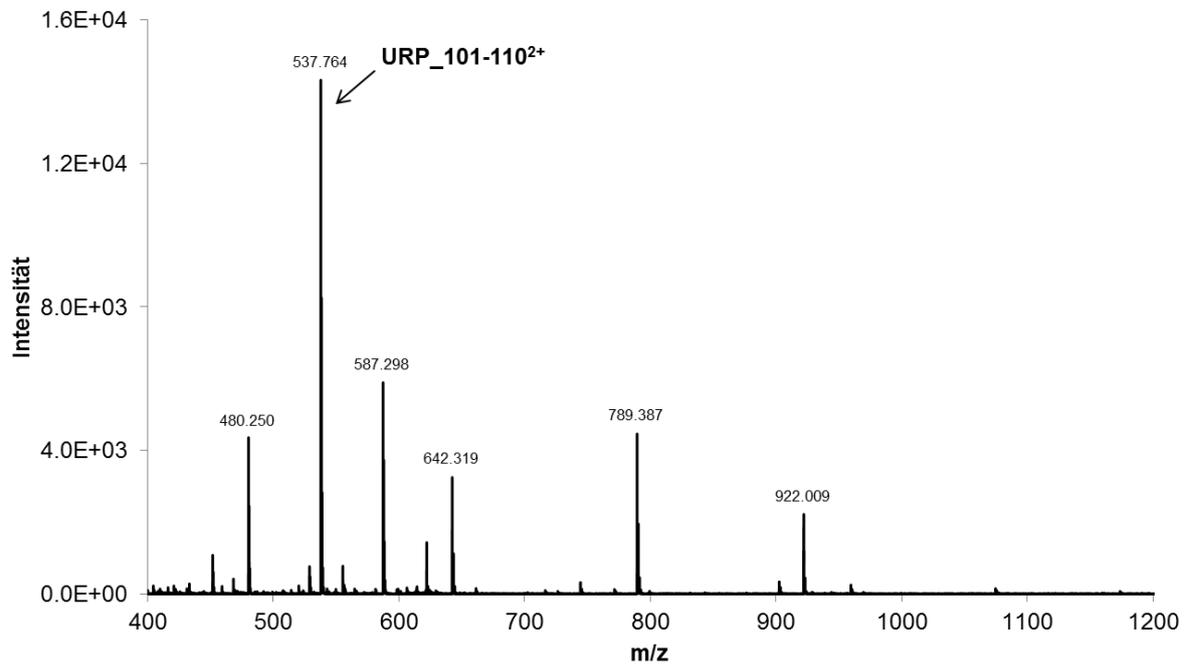
**Abbildung 54:** LC-ESI-TOF-MS der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S. Nach 24 h Inkubation wurde URP ( $m/z$  509.219  $[M+2H]^{2+}$ ,  $m/z$  1017.429  $[M+H]^+$ ) mit einer Retentionszeit von 11.3 min detektiert.



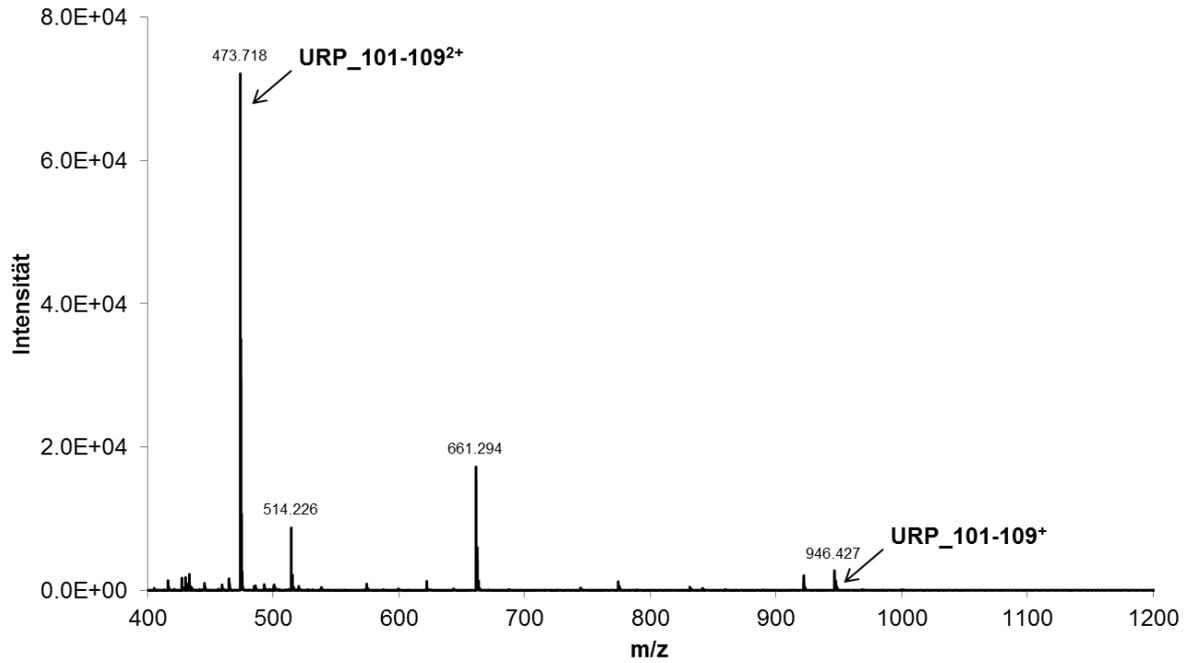
**Abbildung 55:** LC-ESI-TOF-MS der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S. Nach 24 h Inkubation wurde URP+R ( $m/z$  587.270  $[M+2H]^{2+}$ ,  $m/z$  1173.531  $[M+H]^+$ ) mit einer Retentionszeit von 11.2 min detektiert.



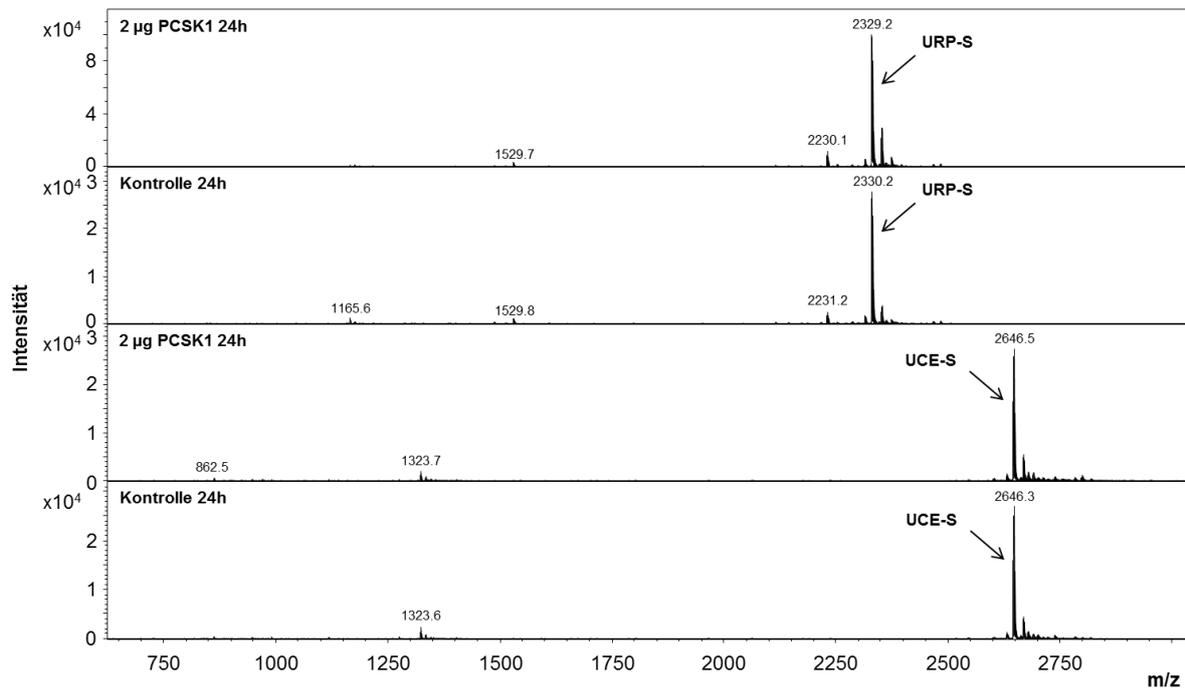
**Abbildung 56:** LC-ESI-TOF-MS der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S. Nach 24 h Inkubation wurde URP\_100-109 ( $m/z$  523.255  $[M+2H]^{2+}$ ,  $m/z$  1045.495  $[M+H]^+$ ) mit einer Retentionszeit von 9.0 min detektiert.



**Abbildung 57:** LC-ESI-TOF-MS der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S. Nach 24 h Inkubation wurde URP\_101-110 ( $m/z$  537.764  $[M+2H]^{2+}$ ) mit einer Retentionszeit von 7.6 min detektiert.



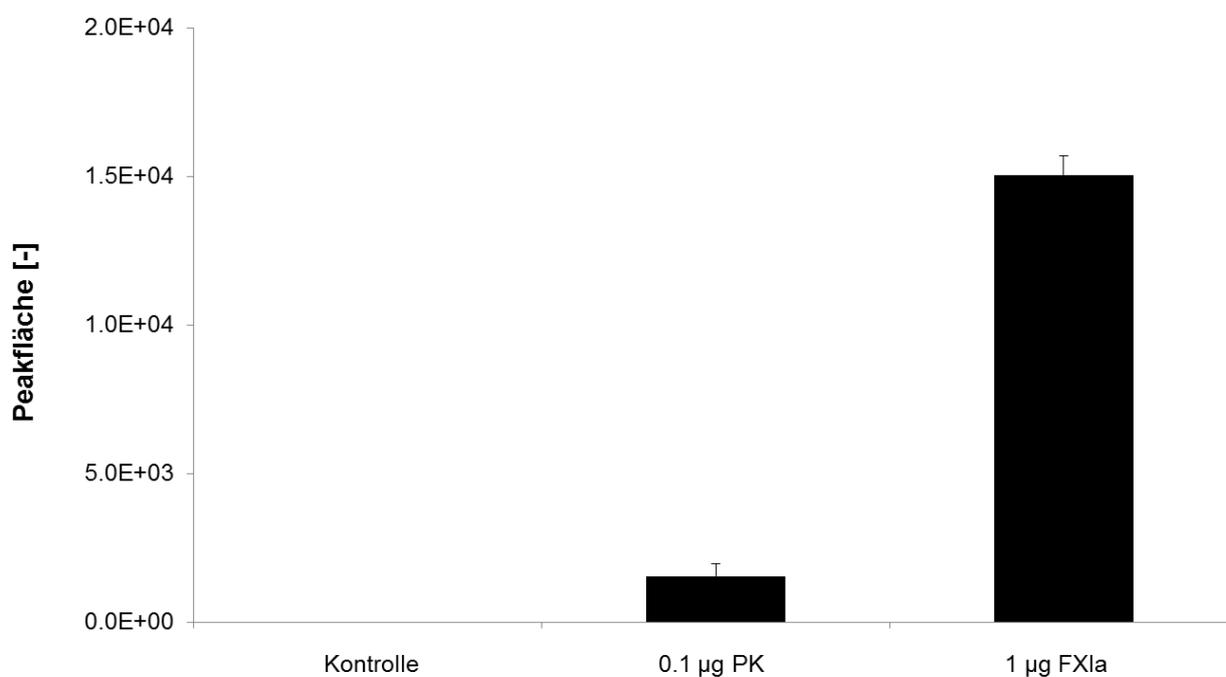
**Abbildung 58:** LC-ESI-TOF-MS der Inkubation der Cohn-Fraktion IV-4 mit URP-S. Nach 24 h Inkubation wurde URP\_101-109 ( $m/z$  473.718  $[M+2H]^{2+}$ ,  $m/z$  946.427  $[M+H]^+$ ) mit einer Retentionszeit von 8.4 min detektiert.



**Abbildung 59:** MALDI-TOF-MS-Spektren der Inkubationen der Proprotein-Convertase 1 mit URP-S bzw. UCE-S. Nach 24 h Inkubation der zuvor an 4B CNBr-aktivierte Sepharose immobilisierten Proprotein-Convertase 1 mit URP-S bzw. UCE-S sowie in den Negativkontrollen wurden nur die Peptidsubstrate URP-S und UCE-S detektiert, jedoch keine Proteolyseprodukte.

**Tabelle 18:** Zugeordnete Peptidspektren (PSMs) der Proteasen Koagulationsfaktor XIa, Koagulationsfaktor XIIa, Plasmin, Thrombin und Plasma-Kallikrein bei der LC-nanoESI-Orbitrap-Messung der trypsinierten kommerziell erworbenen Proteasen Koagulationsfaktor XIa, Koagulationsfaktor XIIa, Plasmin, Thrombin und Plasma-Kallikrein (entspricht der Messreihenfolge)

Protease	PSMs FXIa	PSMs FXIIa	PSMs Plasmin	PSMs Thrombin	PSMs PK
FXIa	903	70	1	0	100
FXIIa	355	307	0	0	5
Thrombin	55	1	0	422	1
Plasmin	9	0	355	24	0
PK	11	0	5	9	338



**Abbildung 60:** LC-ESI-TOF-MS zur Quantifizierung von U-II nach 4 h Inkubation von 0.1 µg Plasma-Kallikrein bzw. 1 µg Koagulationsfaktor XIa mit UCE-S. U-II wurde relativ durch Integration des EIC mit dem m/z-Wert von 694.787, der dem zweifach geladenen Peptid entspricht, quantifiziert. U-II wurde in den Inkubationen des Plasma-Kallikreins und des Koagulationsfaktor XIa mit UCE-S detektiert, nicht jedoch in der Negativkontrolle.

**Tabelle 19:** Identifizierte Proteasen der Fraktionen 26, 27, 28, 29 und 30 des HEK-293T-Zellextraktes sowie ihre zugehörige Proteaseklasse

<b>Protease</b>	<b>Proteaseklasse</b>
Ataxin-3	Cystein
Bleomycin Hydrolase	Cystein
Calpain small subunit 1	Cystein
Calpain small subunit 2	Cystein
Calpain-1 catalytic subunit	Cystein
Calpain-2 catalytic subunit	Cystein
Caspase-7	Cystein
Cathepsin Z	Cystein
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	Cystein
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-Y	Cystein
Protein Disulfid-Isomerase A3	Cystein
Secernin-1	Cystein
Sorcin	Cystein
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 4	Cystein
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	Cystein
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	Cystein
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10	Cystein
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 13	Cystein
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	Cystein
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15	Cystein
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 19	Cystein
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 25	Cystein
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 48	Cystein
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	Cystein
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	Cystein
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5	Cystein
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase MINDY-3	Cystein
Ubiquitin Thioesterase OTUB1	Cystein
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	Metallo
Aminopeptidase B	Metallo

---

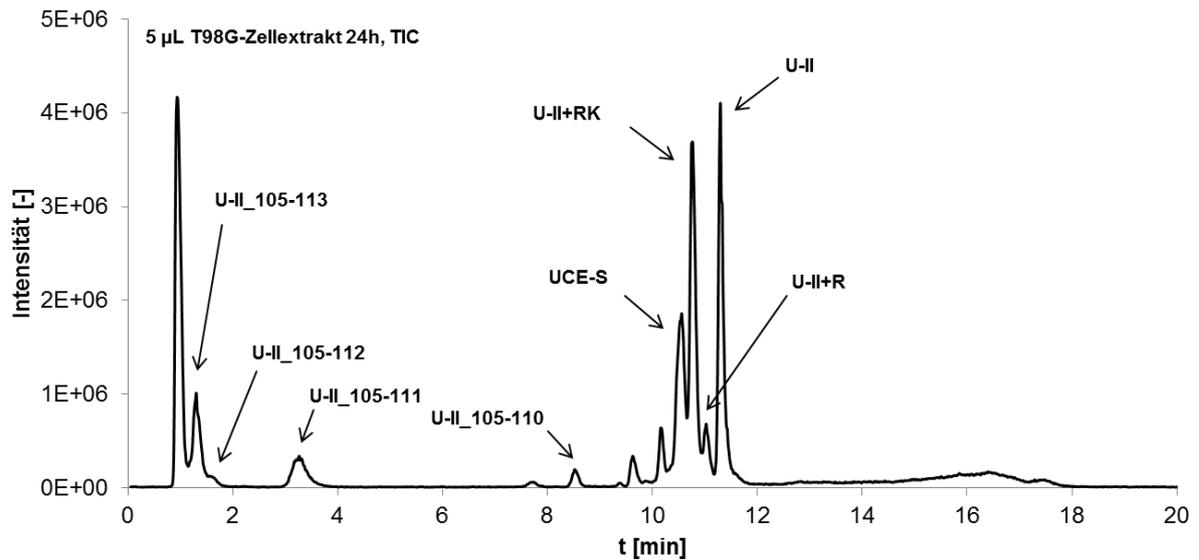
<b>Protease</b>	<b>Proteaseklasse</b>
Cytosol-Aminopeptidase	Metallo
Cytosolic non-specific dipeptidase	Metallo
Dipeptidylpeptidase 3	Metallo
Insulin-degrading enzyme	Metallo
Leukotriene A-4 Hydrolase	Metallo
Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36	Metallo
Mitochondrial intermediate peptidase	Metallo
Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	Metallo
Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	Metallo
Presequence protease, mitochondrial	Metallo
Puromycin-sensitive aminopeptidase	Metallo
Puromycin-sensitive aminopeptidase-like protein	Metallo
Stromelysin-1	Metallo
Thimet Oligopeptidase	Metallo
Xaa-Pro Aminopeptidase 1	Metallo
Xaa-Pro Aminopeptidase 3	Metallo
Xaa-Pro Dipeptidase	Metallo
Proteasome subunit alpha type-1	Threonin
Proteasome subunit alpha type-2	Threonin
Proteasome subunit alpha type-3	Threonin
Proteasome subunit alpha type-4	Threonin
Proteasome subunit alpha type-5	Threonin
Proteasome subunit alpha type-6	Threonin
Proteasome subunit alpha type-7	Threonin
Proteasome subunit alpha type-8	Threonin
Proteasome subunit beta type-1	Threonin
Proteasome subunit beta type-2	Threonin
Proteasome subunit beta type-3	Threonin
Proteasome subunit beta type-4	Threonin
Proteasome subunit beta type-5	Threonin
Proteasome subunit beta type-6	Threonin
Proteasome subunit beta type-7	Threonin

---

---

<b>Protease</b>	<b>Proteaseklasse</b>
Acylamino-acid-releasing enzyme	Serin
Dipeptidylpeptidase 8	Serin
Dipeptidylpeptidase 9	Serin
Hepatocyte growth factor activator	Serin
Immunglobulin heavy constant gamma 1	Serin
Immunglobulin heavy constant gamma 3	Serin
Lon protease homolog, mitochondrial	Serin
Prolylendopeptidase	Serin
Prolylendopeptidase-like	Serin
Proprotein-Convertase Subtilisin/Kexin Typ 6	Serin
Prothrombin	Serin
Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	Serin
Tripeptidylpeptidase 2	Serin
Caspase-3	Aspartat
Cathepsin D	Aspartat
Protein DDI1 homolog 2	Aspartat
COP9 signalosome complex subunit 4	kA
Copine-1	kA
Dermcidin	kA
JmjC domain-containing protein 5	kA
Nuclear distribution protein nudE-like 1	kA
Peptidase M20 domain-containing protein 2	kA
Ubiquitin recognition factor ER-associated degradation protein 1	kA
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	kA

---



**Abbildung 61: LC-ESI-TOF-MS der Inkubation von 5 µL eines T98G-Zellextraktes mit UCE-S.** Es ist der TIC der Inkubation nach 24 h dargestellt. U-II ( $m/z$  694.880,  $[M+2H]^{2+}$ ), U-II+R ( $m/z$  515.630,  $[M+3H]^{3+}$ ) und U-II+RK ( $m/z$  558.335,  $[M+3H]^{3+}$ ) wurden mit Retentionszeiten von 11.3, 11.0 und 10.8 min detektiert. Die N-terminalen Proteolyseprodukte U-II\_105-110 ( $m/z$  431.803,  $[M+H]^+$ ), U-II\_105-111 ( $m/z$  495.859,  $[M+2H]^{2+}$ ), U-II\_105-112 ( $m/z$  559.915,  $[M+2H]^{2+}$ ) und U-II\_105-113 ( $m/z$  425.654,  $[M+3H]^{3+}$ ) sind mit Retentionszeiten von 8.5, 3.2, 1.6 und 1.3 min zu erkennen. Das Peptidsubstrat UCE-S ( $m/z$  529.733,  $[M+5H]^{5+}$ ) eluierte nach 10.5 min.

## 9.2 Gefahrstoffinformationen

Tabelle 20: Verwendete Substanzen sowie entsprechende GHS-Symbole, H-Sätze und P-Sätze<sup>[127,128]</sup>

Substanz	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
4B CNBR-aktivierte Sepharose	-	-	-
2,5-Dihydroxybenzoesäure		315-319-335	261-305+351+338
Ammoniumhydrogencarbonat		302	301+312+330
Acetonitril		225-302+312+332- 319	210-280-301+312-303+ 361+353-304+340+312- 305+351+338
AESBF		315-319	264-280-302+352- 305+351+338-332+313- 337+313
Ameisensäure		226-302-314-331	210-280-301+312-303+ 361+353-304+340+310- 305+351+338
Calciumchlorid		319	264-280-305+351+338- 337-313
Dinatriumhydrogenphosphat	-	-	-
Dithiothreitol		302-315-318	264-270-280-301+312- 302+352-305+351+338
E-64	-	-	-
Ethylendiamintetraessigsäure- Dinatriumsalz		332-373-412	260-271-273- 304+340+312-314-501
Glycin	-	-	-
Harnstoff	-	-	-
Iodacetamid		301-315-317-319- 335	261-264-280-301+310- 302+352-305+351+338
Kaliumchlorid	-	-	-
Kaliumdihydrogenphosphat	-	-	-
Leupeptin	-	-	-

Substanz	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
Methanol		225-301+311+331- 370	210-233-280-301+310- 303+361+353-304+340+ 311
Natriumacetat	-	-	-
Natriumchlorid	-	-	-
Natriumdeoxycholat		302-412	264-270-273-301+312- 501
Natriumhydrogencarbonat	-	-	-
Natriumhydroxid		290-314	234-260-280-301+330+ 331-303+361+353-305+ 351+338
Pepstatin A	-	-	-
PKSI-527	-	-	-
Salzsäure		290-314-335	234-261-271-280-303+ 361+353-305+351+338
Triethylammoniumbicarbonat	-	-	-
Trifluoressigsäure		314-332-412	261-273-280-303+361+ 353-304+340+310-305+ 351+338
Tris-Hydrochlorid	-	-	-

### 9.3 Informationen zum Umgang mit KMR-Substanzen

Es wurden keine KMR-Substanzen der Kategorie 1a oder 1b verwendet.

## 10 Danksagungen

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen, die mich während meiner Promotion unterstützt haben bedanken. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Maria Riedner für die Ermöglichung der Promotion, Unterstützung bei dem Erhalt eines Stipendiums, die Bereitstellung des interessanten Themas und inhaltliche Unterstützung. Herrn Prof. Dr. Sascha Rohn möchte ich für die Übernahme der Co-Betreuung danken, sowie für die Bereitstellung von Geräten und Materialien sowie intellektuellen Austausch. Herrn Prof. Dr. Ralph Holl danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Bereitstellung von Geräten. Ich möchte Herrn Prof. Dr. Hartmut Schlüter für die Bereitstellung von Materialien, Zugang zu Orbitrap-Massenspektrometern und inhaltliches Feedback danken. Ich danke der Universität Hamburg für die Gewährung eines Protomotionsstipendiums nach dem HmbNFG. Katharina Hoff möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung einer Anionenaustauschchromatographie danken. Mein Dank gilt weiterhin Pascal Steffen, Laura Heikaus, Benjamin Drejer und Dennis Krösser sowie dem gesamten AK Schlüter für Unterstützung im Labor und für die Durchführung von massenspektrometrischen Messungen. Jonas Klein, Tatiana Tiufiakova, Thorsten Mix, Sahra Jasmin Massoud und Manuela Moritz danke ich für die Unterstützung im Labor im Rahmen von Projektstudien und Forschungspraktika. Ich danke außerdem Dany Gellert, Gaby Graack, Christine Christ, Inge Schult und der gesamten massenspektrometrischen Abteilung für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und für die Unterstützung in unterschiedlichsten Sachverhalten. Ich möchte mich bei Dr. Thomas Hackl für die Unterstützung in fachlichen Fragestellungen bedanken. Claas, René, Marie, Anke, Johanna, Caro, Navid und Jasmin danke ich für die schöne Zeit im 4. Stock. Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden, meiner Familie und meiner Freundin Nadine für die bedingungslose und fortwährende Unterstützung während meines Studiums und der Promotion bedanken.

## **11 Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass die Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, 15.01.2022

Raphael Schuster