

**Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung
von zirkulierenden Proteinase-inhibitorischen
Peptiden**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von Dipl.-Chemiker Michael Walden
geboren am 24.10.1967 in Bremen

Februar 2002

Referent: Prof. Dr. T. Scheper

Koreferent: Prof. Dr. W. Müller

Tag der Promotion: 08. Februar 2002

Meiner Familie

Zusammenfassung:

Proteinasen und Proteinase-Inhibitoren spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation von physiologischen Prozessen. Ein Ungleichgewicht zwischen Proteinasen und ihren endogenen Inhibitoren führt zu pathophysiologischen Prozessen wie z.B. inflammatorischen Prozessen, Infektionen, Emphysemen, Schlaganfall oder Sepsis. Dementsprechend ist die Entdeckung von spezifischen endogenen Proteinase-Inhibitoren von großer pharmakologischer Relevanz, da Proteinasen wichtige Ziele für medikamentöse Behandlungen sind. Das Ziel dieser Dissertation war es deshalb, neue zirkulierende Proteinase-Inhibitoren zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurde ein enzymatischer Test entwickelt, mit dem Proteinase-inhibitorische Peptide mit geringem Zeitbedarf in einer komplexen Matrix identifiziert werden können. Mit diesem Test können Inhibitoren von Trypsin, Thrombin und Tryptase, abhängig vom verwendeten chromogenen Substrat, detektiert werden. Der Test wird im 96 Loch Mikrotiterformat durchgeführt. Mit den entwickelten Tests wurde die Hämofiltrat-Peptidbank nach inhibitorischen Peptiden durchsucht, wobei inhibitorische Aktivitäten gegen Trypsin nachgewiesen werden konnten. Aus zwei Fraktionen der Hämofiltrat-Peptidbank wurden die inhibitorisch aktiven Peptide in konsekutiven chromatographischen Schritten isoliert. Als Chromatographietechniken wurden die Reversed-Phase (RP) und Kationenaustausch-Chromatographie verwendet. Aus einer Fraktion konnte Bikunin, ein bekannter Proteinase-Inhibitor, isoliert werden. Aus der zweiten Fraktion gelang die Isolierung von vier Domänen des Multi-Domänen Serin-Proteinase Inhibitors LEKTI. Drei dieser Domänen stellen neue zirkulierende Domänen dieses Inhibitors dar. Die isolierten Peptide wurden funktionell charakterisiert.

Schlagworte: Proteinase-Inhibitoren – inhibitorisch aktive Peptide – LEKTI

Abstract:

Proteinasen and proteinase inhibitors play a crucial role for the regulation of most physiological processes. An imbalance between proteinases and their endogenous inhibitors is therefore linked to pathophysiological processes such as inflammatory processes, infections, emphysems, stroke, or sepsis. Correspondingly, the discovery of specific endogenous proteinase inhibitors is of great pharmacological importance since enzymes like proteinases represent excellent drug targets. It was the goal of this doctoral thesis to identify new circulating proteinase inhibitors from human sources. To achieve this goal an enzymatic assay for the rapid identification of peptidic inhibitors in complex sources has been designed. This assay works with trypsin, thrombin and tryptase dependent on the chromogenic substrate and can be performed in the 96 well-plate format. Using these assays the hemofiltrate (HF) peptide library was screened for inhibitors of trypsin, thrombin and tryptase. Inhibitory activities were found against trypsin. Two hemofiltrate fractions containing trypsin inhibitory active substances were purified in consecutive chromatographic steps including RP- and cation-exchange-chromatography as state of the art techniques. Purification of trypsin inhibitory active substances from one fraction has resulted in the isolation of Bikunin, a known proteinase inhibitor, from the other fraction four domains of the multi-domain serine-proteinase-inhibitor LEKTI were isolated. Three of this domains represented new circulating domains. The isolated peptides were functionally characterized.

Key words: proteinase inhibitors – inhibitory active peptides – LEKTI

Abkürzungsverzeichnis

α_1 -AT	α_1 -Antitrypsin
λ	Lambda (Wellenlänge)
λ_{Abs}	Absorptionswellenlänge
μ -HPLC	Mikro-HPLC
Å	Angström (10^{-10} m)
A	Absorption
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
Äq.	Äquivalente
AS	Aminosäure/n
ASA	Aminosäureanalyse
AT	Antithrombin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C-	Carboxy-
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CE	Kapillarzonelektrophorese
CEC	Cation-Exchange-Chromatography (Kationenaustausch-Chromatographie)
CHC	α -Cyano-4-hydroxymizimtsäure
Chromatogr.	Chromatographie
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
$E_{214/230/280}$	Extinktion bei 214, 230 oder 280 nm
E.C.	Enzyme Commission
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ESI-MS	Electrospray-Ionisation-MS
Fr.	Fraktion
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HF	Hämofiltrat
HPLC	High performance liquid chromatography
IgE	Immunoglobulin E
Inhib.	Inhibitorisch(e)
kDa	Kilo-Dalton
Konz.	Konzentration
kV	Kilovolt
l	Liter
L-BAPNA	N α -Benzoyl-L-Arginin p-Nitroanilid

Abkürzungsverzeichnis

LEKTI	Lymphoepithelialer <u>K</u> azal- <u>T</u> yp- <u>v</u> erwandter <u>I</u> nhibitor
M	Mol/Liter (Molar)
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight
MeOH	Methanol
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
m/z	Masse/Ladungsquotient
N-	Amino-
NC	Negativkontrolle
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
o. Abb.	ohne Abbildung
OD	Optische Dichte
PC	Positivkontrolle
pH	pH-Wert
pI	Isoelektrischer Punkt
Pos.	Position
rek.	rekombinant
rel.	relativ
RNA	Ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
RP	Reversed-Phase
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SCCE	Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme
SCTE	Stratum Corneum Tryptic Enzyme
SD	Standardabweichung
SNP	single nucleotide polymorphism
t	Zeit /Zeitpunkt
t _R	Retentionszeit
t _{GS}	Startzeitpunkt des Trenngradienten
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
z.B.	Zum Beispiel

Die Abkürzungen der Aminosäuren entsprechen der Drei- bzw. Einbuchstabennomenklatur.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	PROTEINASEN.....	1
1.2	SERINPROTEINASEN.....	3
1.2.1	Hydrolysemechanismus von Serinproteinasen.....	3
1.2.2	Spezifität und Selektivität von Serinproteinasen.....	4
1.3	SERINPROTEINASE-INHIBITOREN.....	5
1.3.1	Mechanismus und Spezifität von Serinprotease-Inhibitoren	6
1.3.2	Einteilung der Serinprotease-Inhibitoren	7
1.4	PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER REGULATION VON PROTEINASEN	13
1.5	ISOLIERUNG BIOLOGISCH AKTIVER PEPTIDE AUS HÄMOFILTRAT.....	16
1.6	LEKTI – EIN MULTIDOMÄNEN SERINPROTEINASE INHIBITOR.....	18
1.7	AUFGABENSTELLUNG.....	20
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN	22
2.1.1	Umkehrphasen HPLC (Reversed-Phase HPLC, RP-HPLC).....	22
2.1.2	Kationenaustausch-HPLC	24
2.2	ANALYTISCHE METHODEN	26
2.2.1	Massenspektrometrie.....	26
2.2.2	Kapillarzonenelektrophorese.....	28
2.2.3	Peptid-Sequenzierung.....	28
2.2.4	Aminosäureanalytik.....	29
2.2.5	Proteolytische Spaltung von Peptiden.....	29
2.3	GEFRIERTROCKNUNG UND LAGERUNG VON PEPTIDEN	30
2.4	ENZYMATISCHE METHODEN.....	31
2.4.1	Protease-Inhibitor-Test.....	31
2.4.2	Enzymatische Einzelmessungen.....	33
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	35
3.1	ENTWICKLUNG EINES TESTS IM 96-LOCH MIKROTITERPLATTEN FORMAT ZUR IDENTIFIZIERUNG VON PROTEINASE-INHIBITOREN	35
3.2	ADAPTION DES TRYPSIN-INHIBITOR-TESTS AUF DIE PROTEINASEN THROMBIN UND TRYPTASE.....	37

3.3	SCREENING DER HÄMOFILTRAT-PEPTIDBANK NACH PROTEINASE-INHIBITORISCHEN PEPTIDEN.....	39
3.4	CHROMATOGRAPHISCHES VERFAHREN ZUR REINDARSTELLUNG VON INHIBITORISCHEN PEPTIDEN.....	41
3.5	ISOLIERUNG VON HF 7665	42
3.5.1	Identifizierung der 6. LEKTI-Domäne HF 7665.....	49
3.6	ISOLIERUNG VON HF 7072	51
3.6.1	Identifizierung der 5. LEKTI-Domäne HF 7072.....	53
3.7	ISOLIERUNG VON HF 7638	55
3.7.1	Identifizierung der mutierten 6. LEKTI-Domäne HF 7638	57
3.8	ISOLIERUNG VON HF 14448	58
3.8.1	Identifizierung der verbundenen 2. und 3. LEKTI-Domänen HF 14448.....	61
3.9	ZIRKULIERENDE LEKTI-DOMÄNEN	63
3.10	ISOLIERUNG VON BIKUNIN-FRAGMENTEN	65
3.10.1	Identifizierung der Bikunin-Fragmente.....	68
3.11	CHARAKTERISIERUNG DER TRYPSIN-INHIBITION DURCH DIE ISOLIERTEN LEKTI-DOMÄNEN	71
3.12	PHYSIOLOGISCHE RELEVANZ VON LEKTI	73
4	ZUSAMMENFASSUNG.....	76
5	LITERATURVERZEICHNIS	78
6	ANHANG	88
6.1	GERÄTE UND CHEMIKALIEN	88
6.2	COMPUTER, PROGRAMME UND STATISTIK	92
6.3	PUBLIKATIONEN	93
6.4	LEBENS LAUF	96

1 Einleitung

In allen organischen Lebensformen spielen biochemische Stoffwechselfvorgänge, Zyklen und Kaskaden eine entscheidende Rolle. Eine Vielzahl von Proteinen sind als Komponenten in diesen Stoffwechselfvorgängen beteiligt. Von außerordentlicher Wichtigkeit ist dabei die genaue Regulierung dieser Vorgänge, denn eine fehlerhafte Modulation oder der Ausfall einer Komponente kann zu Krankheiten oder zum Tode führen. So ist es notwendig, beteiligte Proteine in ihrer aktiven Form bereitzustellen und wieder zu degradieren. Dieser Abbau wird unter anderem durch Proteinasen (Peptidasen, Hydrolasen) geregelt, indem sie spezifisch Peptidbindungen in den Proteinen spalten und damit deren biologische Aktivität modulieren. Die Aktivität der Proteinase kann unter anderem durch Proteinase-Inhibitoren reguliert werden. Die Identifizierung und Charakterisierung humaner Inhibitoren, aber auch die Entwicklung synthetischer Proteinase-Inhibitoren ist deshalb von hoher pharmakologischer und pharmazeutischer Relevanz (SEIFE, 1997; DEADMAN, 2000).

1.1 Proteinasen

Proteinase übernehmen im Organismus die katalysierte Hydrolyse der proteinischen Amidbindung (Proteolyse), worunter man die Spaltung von Proteinen in Peptidfragmente oder den Abbau in einzelne Aminosäuren versteht. Proteinase dienen dabei nicht nur der unspezifischen Spaltung von Nahrungsmittelproteinen im Darm oder dem Abbau von nicht mehr benötigten Proteinen, sondern sind selbst an vielfältigen biochemischen Regulationsvorgängen beteiligt. Dazu gehören z.B. die Bildung von Hormonen, die Immunantwort, Blutgerinnung und Fibrinolyse, Befruchtung und Entwicklung von Eizellen und inflammatorische Prozesse. Bei inflammatorischen Vorgängen werden Proteinase wie Elastase, Cathepsin G oder auch Kollagenase freigesetzt, um Gewebe proteolytisch zu zersetzen (STEUBE UND KUNZ, 1988).

Die genaue Anzahl der humanen Proteinase ist noch nicht bekannt. Nach neueren Schätzungen kodieren ca. 1,8 % des menschlichen Genoms für Proteinase (SOUTHAN, 2000). Bei einer Anzahl von 30.000 – 40.000 Genen errechnen sich daraus 540 bis 720 Proteinase. Zur Zeit sind ca. 360 proteolytisch aktive Enzyme als mRNA in GenBank

(genomic sequence database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) verzeichnet, von denen die wenigsten genauer charakterisiert sind. Um die immer größer werdende Zahl von Proteinasen zu klassifizieren, werden sie nach dem Ort ihres Angriffes auf das Substrat in Exo- und Endoproteinasen eingeteilt. Eine weitere Unterteilung ergibt sich aufgrund der Aminosäure im aktiven Zentrum in z.B. Serin- oder Cystein-Proteinasen. Nach der Enzym-Nomenklatur gehören Proteinasen zur Klasse der Hydrolasen. Eine ständig aktualisierte Aufstellung findet sich auf dem ExPASy-Server des Schweizer Institutes für Bioinformatik unter der Internetadresse www.expasy.ch. Aus dieser Datenbank wurde die in Tabelle 1 aufgeführte Übersicht über die einzelnen, nach E.C.-Nummern sortierten, Gruppen der Proteinasen erstellt.

Tabelle 1: Auswahl proteolytischer Enzyme aus der ExPASy-Datenbank (www.expasy.ch/enzyme)

<u>Klasse 3: Hydrolasen</u>	
3.4	Peptidasen (Peptidbindungen werden hydrolysiert)
3.4.11	Amino-peptidasen (aminoternale Exopeptidasen)
3.4.13	Dipeptidasen (Exopeptidasen)
3.4.14	Dipeptidyl-Peptidasen und Tripeptidyl-Peptidasen (spalten aminoterminal Di- bzw. Tripeptide ab)
3.4.15	Peptidyl-Dipeptidasen (spalten carboxyterminal Dipeptide ab)
3.4.16	Serin-Typ Carboxypeptidasen (carboxyterminale Exopeptidasen)
3.4.17	Metallo-carboxypeptidasen (carboxyterminale Exopeptidasen)
3.4.18	Cystein-Typ Carboxypeptidasen (carboxyterminale Exopeptidasen)
3.4.21	Serinproteinasen (Endopeptidasen)
3.4.21.1	α -Chymotrypsin
3.4.21.4	Trypsin
3.4.21.5	Thrombin
3.4.21.7	Plasmin
3.4.21.10	Acrosin
3.4.21.19	Endoproteinase Glu-C
3.4.21.34	Plasma-Kallikrein
3.4.21.35	Gewebe-Kallikrein
3.4.21.36	Elastase (Pankreas)
3.4.21.37	Elastase (Leukozyten)
3.4.21.59	Tryptase
3.4.21.68	Gewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA)
3.4.22	Cysteinproteinasen (Endopeptidasen)
3.4.22.1	Cathepsin B
3.4.22.2	Papain
3.4.23	Aspartatproteinasen (Endopeptidasen)
3.4.23.1	Pepsin A
3.4.23.15	Renin
3.4.24	Metalloproteinasen

1.2 Serinproteinasen

1.2.1 Hydrolysemechanismus von Serinproteinasen

Die Serinproteinasen stellen eine große und gut charakterisierte Gruppe der Proteinasen dar. Sie sind ubiquitär im Organismus verbreitet und spielen wichtige Rollen z.B. beim Nahrungsaufschluß (Trypsin und Chymotrypsin) oder in der Blutgerinnungskaskade (Thrombin). Die Namensgebung erfolgte aufgrund der Präsenz eines Serinrestes im aktiven Zentrum aller dieser Proteinasen, welches für die Spaltung der Peptidbindung im Substrat entscheidend ist. Der Mechanismus der Spaltung soll am Beispiel des Chymotrypsins kurz erläutert werden. Die Aminosäuresequenz von Chymotrypsin enthält 28 Serine, von denen nur der Serinrest an Position 195 für die Spaltung der Peptidbindung im Substrat verantwortlich ist. Die besondere Aktivität dieses Serinrestes, bzw. der Hydroxylgruppe in seiner Seitenkette, beruht auf der konformell bedingten Nachbarschaft zweier weiterer Aminosäuren, eines Histidinrestes (Pos. 57), dessen Imidazolring als Protonenakzeptor und –donor fungiert, sowie eines Aspartatrestes an Position 102, welcher die Orientierung des Histidins während der Reaktion stabilisiert. Diese drei Aminosäuren bilden eine katalytische Triade. Um die Reaktion zu unterstützen, ist weiterhin eine Oxyaniontasche nötig, die von den NH-Gruppen in der Hauptkette von Ser 195 und Gly 193 gebildet wird (ASBOTH UND POLGAR, 1983; STRYER, 1999). Nach einer nonkovalenten Bindung des Substrates im aktiven Zentrum findet ein nucleophiler Angriff der Hydroxylgruppe des Ser 195 auf die Carbonylgruppe in der Peptidbindung des Substrates statt. Unterstützt wird dieser Angriff von His 57, welches ein Proton vom Serinrest übernimmt. Die positiv geladene Form des Histidinrestes wird dabei vom Asp 102 stabilisiert. Bei dieser Reaktion entsteht ein tetraedrisches Zwischenprodukt, der Michaelis-Komplex. Dieser Komplex wird durch Wasserstoffbrückenbindung der Protonen von Ser 195 und Gly 193 mit dem negativ geladenen Sauerstoffion des Substrates (Oxyanion) stabilisiert. Im nächsten Schritt wird ein Proton vom Histidinrest auf das Stickstoffatom der Peptidbindung im Substrat übertragen. Diesem Schritt folgt ein Bruch der Peptidbindung und das erste Fragment des Substrates wird mit einem neuen N-Terminus abgespalten. Der restliche Teil des Substrates bleibt vorerst kovalent gebunden. Diese kovalente Bindung wird dann durch Wasser unter Basenkatalyse mit Hilfe des His 57 nach gleichem Mechanismus wie im ersten Schritt gespalten. Dabei entsteht das zweite

Substratfragment mit neuem C-Terminus und das Ser 195 des Enzyms wird wieder in seinen aktiven Ausgangs-zustand versetzt (STRYER, 1999; LEUNG ET AL. 2000; WALKER UND LYNAS, 2001).

1.2.2 Spezifität und Selektivität von Serinproteinasen

Der beschriebene Mechanismus erklärt zwar die Proteinaseaktivität, jedoch nicht die Substratspezifität der einzelnen Proteinase. Chymotrypsin, Trypsin und Elastase besitzen dieselbe katalytische Triade, hydrolysieren Substrate aber an unterschiedlichen Stellen. Chymotrypsin spaltet C-terminal von Aminosäuren mit aromatischen oder voluminösen Seitenketten, Trypsin nach basischen Aminosäuren wie Lys oder Arg, während Elastase spezifisch nach Aminosäuren mit kleinen, ungeladenen Seitenketten spaltet (STRYER, 1999). Diese Spezifität beruht auf einer Substratbindungstasche, die dem aktiven Zentrum benachbart ist. Abhängig von den Eigenschaften der Aminosäuren, die diese Tasche bilden, passen unterschiedliche Aminosäuren des Substrates nach dem Schlüssel/Schloß-Prinzip in diese Tasche (Abbildung 1). So besteht die Substratbindungstasche von Chymotrypsin aus unpolaren AS, in die AS mit aromatischen Seitenketten aufgenommen werden können. Bei Trypsin befindet sich ein Aspartatrest in der die Substratbindungstasche bildenden Aminosäureabfolge, welches durch elektrostatische Wechselwirkungen bevorzugt basische Aminosäuren bindet. Elastase weist an der Substratbindungsstelle einen Valinrest sowie einen Tyrosinrest auf, wodurch selektiv kleine, unpolare Aminosäuren gebunden werden.

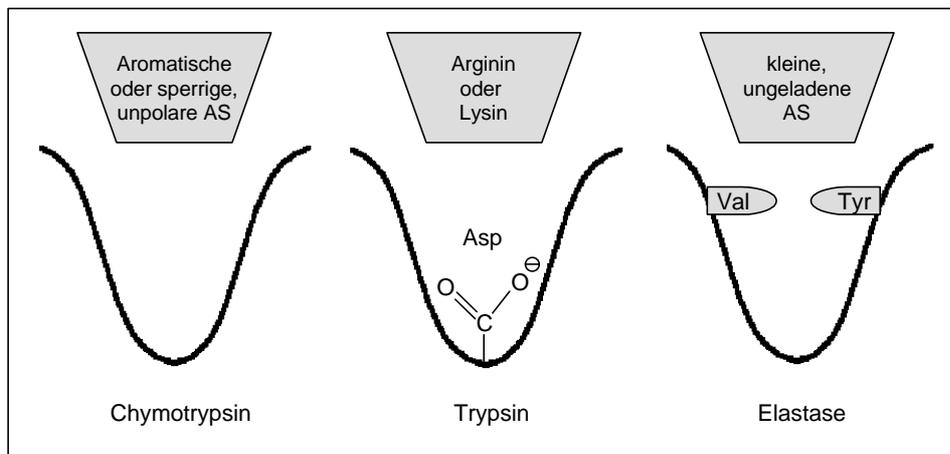


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Substratbindungstasche der Serinproteinasen Chymotrypsin, Trypsin und Elastase mit der jeweiligen Substratspezifität. Gezeichnet nach STRYER, 1999.

Zusätzlich zu der Primärspezifität, die durch die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Substratbindungstasche vorgegeben wird, gibt es noch weitere Bereiche in der Struktur von Enzym und Substrat, die für eine Bindung von Bedeutung sind. Hier spricht man von der Sekundärspezifität. Um die an der Spaltung beteiligten Aminosäuren benennen zu können, ist von SCHECHTER UND BERGER (1967) eine Nomenklatur eingeführt worden. Dabei werden die Aminosäuren des Enzyms mit S_1 bis S_n vom aktiven Zentrum (S_1) bis zum N-Terminus und S'_1 bis S'_n von der ersten Aminosäure C-terminal vom aktiven Zentrum bis zum C-Terminus bezeichnet (Abbildung 2). Die Bezeichnung der Aminosäuren im Substrat erfolgt nach gleichem Schema mit P_1 bis P_n und P'_1 bis P'_n .

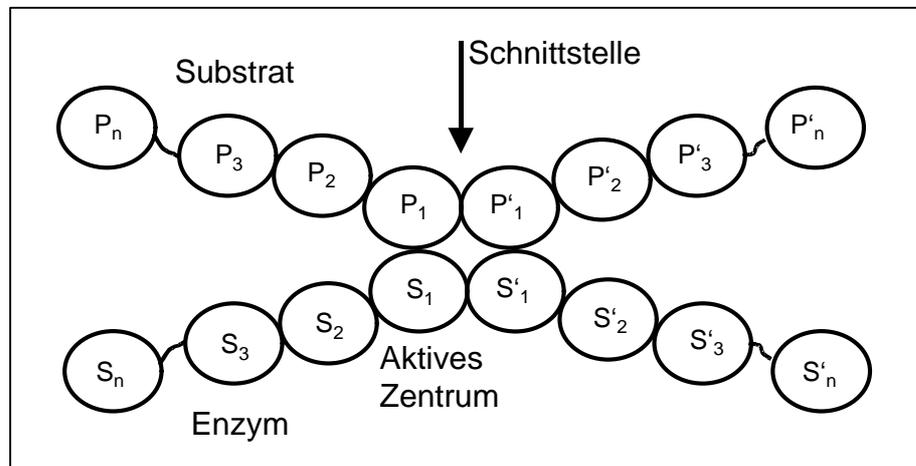


Abbildung 2: Nomenklatur zur Benennung von Aminosäuren in Enzym und Substrat, nach SCHECHTER UND BERGER (1967).

1.3 Serinproteinase-Inhibitoren

Es existieren verschiedene Regulationsmechanismen zur Kontrolle der proteolytischen Aktivität von Proteinasen. Zum einen ist die Freisetzung der Proteinase reguliert. Viele Proteinase werden als inaktive Vorstufen (Zymogene) sezerniert und erst bei Bedarf durch andere proteolytische Enzyme aktiviert. Die aktiven Proteinase können anschließend durch spezifische Inhibitoren gehemmt und im folgenden abgebaut werden. Die Regulierung der Aktivität von Proteinase ist von großer physiologischer Bedeutung (NEURATH, 1984; ROBERTS ET AL., 1995). Diese Arbeit befaßt sich mit endogenen Inhibitoren der Serinproteinase, deren Mechanismus und Einteilung im folgenden beschrieben wird.

1.3.1 Mechanismus und Spezifität von Serinproteinase-Inhibitoren

Die Reaktion zwischen Inhibitoren und Proteinasen vollzieht sich überwiegend nach dem bereits beschriebenen allgemeinen Standardmechanismus für die Bindung von Enzym und Substrat (Kap. 1.2.1). Inhibitoren stellen daher Substratanaloga da. Die Nomenklatur der reaktiven Aminosäuren entspricht jener für Substrate: P_1 für die aminoternale und P'_1 für die carboxyterminale Aminosäure in der zu spaltenden Bindung. Die aus mehreren Aminosäuren bestehende aktive Region des Inhibitors wird als exponierte Schleife in der dreidimensionalen Struktur präsentiert und paßt nach dem Schlüssel/Schloß-Prinzip in die Substratbindungstasche des Enzyms. Im Gegensatz zur Enzym/Substrat-Reaktion findet entweder keine Spaltung der Peptidbindung statt (Ausbildung des tetraedrischen Übergangszustandes ist gestört), oder nach Hydrolyse der Peptidbindung ist die Dissoziation des Komplexes stark verlangsamt (LASKOWSKI UND KATO, 1980; BODE UND HUBER, 1992). Im ersten Fall ist die Inhibition irreversibel. Der Komplex aus Proteinase und Inhibitor kann im menschlichen Körper über die Leber aus dem Blutkreislauf entfernt werden. Ein Beispiel für eine irreversible Hemmung ist die Inhibierung von Trypsin durch BPTI (basic pancreatic trypsin inhibitor; ROBERTS ET AL., 1995). Im zweiten Fall tritt nur eine temporäre Hemmung auf. Das Enzym erlangt nach einiger Zeit seine Aktivität wieder.

Eine Inhibierung der aktiven Proteinase läßt sich in zwei Bindungsmechanismen einteilen. So entsteht bei der produktähnlichen Bindung zwischen Proteinase und Inhibitor eine Blockierung des aktiven Zentrums, da die Molekülinteraktionen stark genug sind, um eine rasche Dissoziation zu verhindern. Bei der substratähnlichen Bindung stabilisieren sich intra- und intermolekulare Interaktionen der primären Inhibitor-Kontaktregion mit dem Inhibitor-Kern und mit der Enzym-Bindungsstelle gegenseitig, was dazu führt, daß eine Auflösung dieses Komplexes selten auftritt (BODE und HUBER, 1992).

Eine andere Gruppe von Inhibitoren, die nicht nach dem oben beschriebenen Standardmechanismus wirken, bindet hauptsächlich in der Nähe des aktiven Zentrums an Oberflächenstellen ihrer Zielproteinase. Dabei ist die Substratbindungsstelle nicht in die Bindung involviert. Ein Beispiel für einen Inhibitor dieser Gruppe ist der Thrombin-Inhibitor Hirudin. Röntgenstrukturanalysen des Hirudin/Thrombin-Komplexes zeigten,

daß der reaktive Serinrest der Proteinase nicht durch den Inhibitor blockiert wird und Thrombin in diesem Komplex dennoch keine Aktivität mehr aufweist (BODE UND HUBER, 1992).

Die Spezifität der Inhibitoren kann durch die Aminosäure an der P₁-Position bestimmt werden, Inhibitoren mit basischen P₁-Aminosäuren wie Arginin oder Lysin hemmen bevorzugt Trypsin oder trypsin-ähnliche Proteinase. Inhibitoren mit Alanin oder Serin an P₁ inhibieren Elastase oder Elastase-ähnliche Enzyme (LASKOWSKI UND KATO, 1980). Inhibitoren können auch mehrere aktive Schleifen und damit auch mehrere aktive P₁-Positionen gegen unterschiedliche Proteinase besitzen. Ein Beispiel dafür ist Bikunin. Zwei inhibitorischen Regionen mit Methionin (P₁) in der ersten Schleife und Arginin (P₁) in der zweiten kennzeichnen zwei unterschiedliche inhibitorische Aktivitäten (ROBERTS ET AL., 1995).

1.3.2 Einteilung der Serinproteinase-Inhibitoren

Serinproteinase-Inhibitoren werden in verschiedene Familien unterteilt. Diese Einteilung beruht auf Homologien der Inhibitoren, insbesondere in Bezug auf ihre Struktur, Disulfidverbrückung und die Lokalisation der reaktiven P₁-Stelle (LASKOWSKI UND KATO, 1980). Die vier wichtigsten Familien dieser Inhibitoren, Serpine, sowie Inhibitoren des Kunitz-, Kazal- und Leukoproteinase-Typs, werden im folgenden vorgestellt.

1.3.2.1 Serpine

Zur Familie der Serpine (serine proteinase inhibitors) gehören große, meist glykosilierte Proteine mit durchschnittlich 400 Aminosäuren und einem von Glykosilierungsgrad und Dimerbildung abhängigen Molekulargewicht zwischen 45 und 100 kDa (BODE UND HUBER, 1992; ROBERTS ET AL., 1995). Eine Übersicht der wichtigsten Vertreter dieser Familie ist in Tabelle 2 gegeben. Serpine und die entsprechenden Zielproteinase bilden stabile Michaelis-Komplexe, deren Struktur von YE ET AL. (2001) beschrieben wurden.

Tabelle 2: Serpine und inhibierte Proteinase nach ROBERTS ET AL., (1995).
Sofern ein Inhibitor weitere Bezeichnungen besitzt, sind auch diese angegeben.

Serpine	Inhibierte Proteinase
α_1 -Antitrypsin (α_1 -AT) (α_1 -Antiproteinase)	Trypsin, Elastase
α_1 -Antichymotrypsin (ACT)	Chymotrypsin, Elastase, Cathepsin G, Chymase
Antithrombin (AT) Antithrombin III (AT III)	Blutgerinnungsproteinase (z.B. Thrombin, Faktor Xa)
Leuserpin (Heparin cofactor II)	Thrombin
α_2 -Antiplasmin (AP)	Plasmin, Trypsin, Chymotrypsin
Plasminogen activator inhibitor-1 und -2 (PAI-1/-2)	t-PA (tissue type plasminogen activator), u-PA (urokinase type plasminogen activator)
Protein C Inhibitor (PCI)	aktives Protein C; Thrombin; Faktor Xa

Das bekannteste und zuerst isolierte Serpin ist α_1 -Antitrypsin. Es wird hauptsächlich in der Leber exprimiert und seine Plasmakonzentration beträgt zwischen 1,5 und 3,5 g/l (ROBERTS ET AL., 1995). Der Name wurde aufgrund der zuerst entdeckten inhibitorischen Eigenschaft gegenüber Trypsin gewählt. Die physiologische Zielproteinase jedoch ist Elastase. α_1 -Antitrypsin hat eine bedeutende Funktion beim Schutz der Alveolarstruktur der Lunge vor der Aktivität der Elastase (PERLMUTTER, 1991). Dem Komplex aus α_1 -AT und Elastase wird eine chemotaktische Aktivität zugewiesen, weiterhin soll der Komplex einen Anstieg der Expression des Gens für α_1 -AT in Monozyten und Makrophagen bewirken (PERLMUTTER, 1990).

Verschiedene Proteinase der Blutgerinnungskaskade, wie zum Beispiel Thrombin, werden durch das Serpin Antithrombin inhibiert. Antithrombin ist ein Glykoprotein mit einer Molekularmasse von 58 kDa. Die Aktivität dieses Serpins kann durch Bindung von Heparin oder vergleichbaren Glykosaminoglykanen erhöht werden. Unter diesen Bedingungen bildet Antithrombin sehr stabile 1:1 Komplexe mit der Zielproteinase Thrombin (BLAJCHMAN, 1994).

Die meisten Serpine werden sekretiert und sind im Plasma in Konzentrationen bis zu 3,5 g/l enthalten (α_1 -Antitrypsin). Es sind aber auch intrazelluläre Serpine bekannt, wie Proteinase Inhibitor 6 (PI 6, cytoplasmic antiproteinase (CAP), SCOTT ET AL., 1996; RIEWALD UND SCHLEEF, 1996; RIEWALD ET AL., 1996). Eine weitergehende Übersicht über die Familie der Serpine gibt POTEPA ET AL. (1994).

1.3.2.2 Inhibitoren des Kunitz-Typs

Die zu dieser Familie gehörenden Inhibitoren sind nach Moses Kunitz benannt, der 1936 den ersten Inhibitor dieser Familie, basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI), aus bovinem Pankreas in kristalliner Form isolierte (KUNITZ UND NORTHROP, 1936). Inhibitoren der Kunitz-Familie sind generell basische Proteine (Peptide) mit geringem Molekulargewicht und können mehrere aktive Domänen enthalten, die gleiche oder unterschiedliche Proteinasen inhibieren. Eine Übersicht ist in Tabelle 3 gegeben.

Tabelle 3: Inhibitoren des Kunitz-Typs und inhibierte Proteinasen, nach ROBERTS ET AL. (1995). Sofern ein Inhibitor weitere Bezeichnungen besitzt, sind diese zusätzlich angegeben.

Kunitz-Inhibitoren	Inhibierte Proteinasen
Basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI); Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (TKI); Aprotinin; Pancreatic Kunitz Inhibitor; Trasirol [®]	Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein
Alzheimer's Amyloid Precursor Protein (Kunitz-Domäne mit 56 AS; KPI)	Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Faktor IXa und XIa
Bikunin; Urinary Trypsin Inhibitor; HI30; Inter- α -Trypsin Inhibitor (ITI)-leichte Kette;	Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Plasmin, Cathepsin G, Acrosin

Jede einzelne Domäne enthält sechs Cysteine, die nach dem Schema 1-6, 2-4, 3-5 verbrückt sind (Abbildung 3, LASKOWSKI UND KATO, 1980). Diese Disulfidverbrückung ist charakteristisch für den Kunitz-Typ, eine Reduzierung der Disulfidbrücken führt zum Verlust des inhibitorischen Potentials (ANDERER UND HÖRNLE, 1966). Kunitz-Inhibitoren zeigen in ihrer Tertiärstruktur eine exponierte Schleife, die das aktive Zentrum enthält.

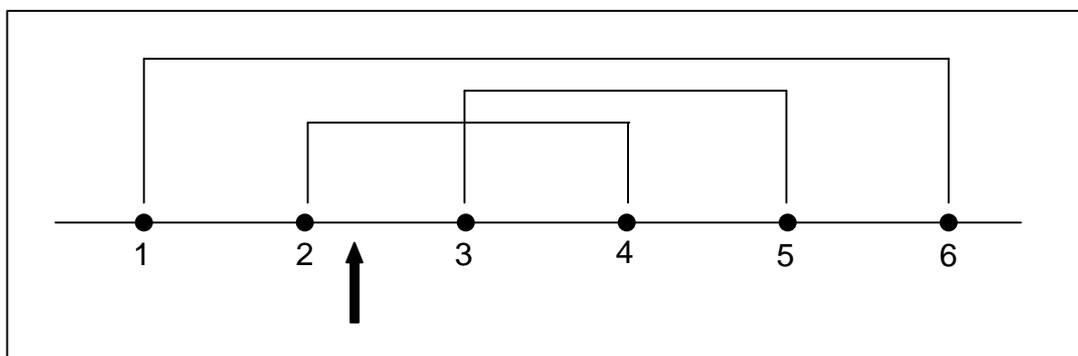


Abbildung 3: Cysteinverbrückung 1-6, 2-4, 3-5 in Inhibitoren des Kunitz-Typs. Schwarze Punkte symbolisieren die Cysteinreste in der Aminosäurekette, der Pfeil bezeichnet die Position der P₁-AS.

BPTI ist der meist untersuchte Inhibitor aus der Familie der Kunitz-Inhibitoren. BPTI besteht aus 58 Aminosäuren und inhibiert Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein, wobei die physiologische Rolle von BPTI noch immer unklar ist. BPTI ist nicht nur im bovinen Pankreas zu finden, sondern in nahezu allen bovinen Geweben und in hoher Konzentration in Mastzellen (ROBERTS ET AL., 1995). Mutationen an der P₁, P₃ und P₄ Position verstärken die Aktivität gegen Proteinase. Eine dieser BPTI Varianten ist ein starker Inhibitor von Proteinase der Blutgerinnungskaskade (Faktor Xa und Faktor XIIa) (GRZESIAK ET AL., 2000).

Der bekannteste humane Inhibitor des Kunitz-Typs ist Bikunin (WACHTER UND HOCHSTRASSER, 1981). Bikunin ist die inhibitorische Untereinheit des Inter- α -Trypsin-Inhibitors (ITI) und trägt zwei Domänen, die Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Plasmin, Cathepsin G und Acrosin inhibieren (BOST ET AL., 1998). Bikunin ist in Serum und Urin, aber auch in Geweben wie Hirn, Leber, Niere und dem Gastrointestinaltrakt zu finden (TWINING, 1994).

1.3.2.3 Inhibitoren des Kazal-Typs

Inhibitoren des Kazal-Typs ähneln in Struktur und Mechanismus den Kunitz-Inhibitoren. Namensgebend war der von KAZAL ET AL. (1948) isolierte Inhibitor PSTI (pancreatic secretory trypsin inhibitor). Kazal-Inhibitoren sind Proteine mit geringem Molekulargewicht und einer konservierten 6-Cystein Struktur. Das Muster der Disulfidverbrückung in Inhibitoren des Kazal-Typs unterscheidet sich von dem der Kunitz-Inhibitoren durch eine 1-5, 2-4, 3-6 Verbrückung (Abbildung 4, LASKOWSKI UND KATO, 1980).

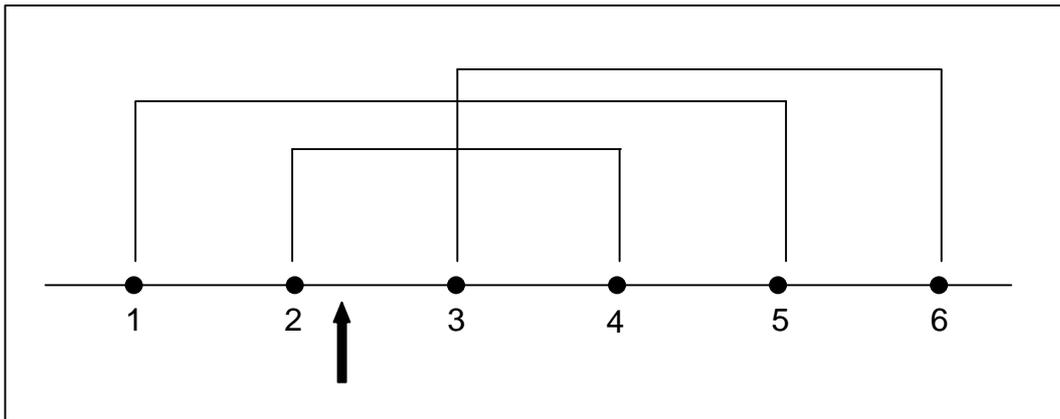


Abbildung 4: Cysteinverbrückung 1-5, 2-4, 3-6 in Inhibitoren des Kazal-Typs. Schwarze Punkte symbolisieren die Cysteinreste in der Aminosäurekette, der Pfeil bezeichnet die Position der P₁-AS.

Kazal-Inhibitoren können ebenfalls mehrere Hemmdomänen enthalten. Der Ovoinhibitor des Huhns besitzt sieben Domänen, die Trypsin, Chymotrypsin und Elastase inhibieren (SCOTT ET AL., 1987). Jede Domäne eines Kazal-Inhibitors präsentiert eine reaktive Schleife, wobei diese Kontaktregion zur Proteinase durch die Aminosäuren P₉ bis P'₃ gebildet wird (BOLOGNESI ET AL., 1982). Neben den Inhibitoren des „klassischen“ Kazal-Typs ist auch ein „nicht-klassischer“ Elastaseinhibitor aus der Seeanemone beschrieben worden. Dieser zeigt zwar die gleiche Disulfidverbrückung, weist aber weniger Aminosäuren zwischen den einzelnen Cysteinresten auf. Daraus resultiert eine veränderte Tertiärstruktur (TSCHESCHE ET AL., 1987). Tabelle 4 gibt einen Überblick über einige Inhibitoren des Kazal-Typs.

Tabelle 4: Inhibitoren des Kazal-Typs und inhibierte Proteinase, nach ROBERTS ET AL. (1995). Sofern ein Inhibitor weitere Bezeichnungen besitzt, sind diese zusätzlich angegeben.

Kazal-Inhibitoren	Inhibierte Proteinase
Pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI)	Trypsin
Tumor-associated trypsin inhibitor (TATI)	
Ovoinhibitor (Huhn)	Trypsin, Chymotrypsin, Elastase
Leech-Derived Tryptase Inhibitor (LDTI, aus dem Blutegel <i>Hirudo medicinalis</i>)	Tryptase, Trypsin, Chymotrypsin
Mouse secretory proteinase Inhibitor p12	Trypsin
Acrosin-Inhibitoren (Bull semen inhibitors: BUSI-I, BUSI-II; Human semen inhibitor: HUSI-II; Porcine semen inhibitor: POSI)	Acrosin, Trypsin
Inhibitor aus der Seeanemone <i>Anemonia sulcata</i>	Elastase
Double-Headed Proteinase Inhibitor (aus submandibularer Speicheldrüse; IPSG)	Trypsin, Chymotrypsin, Subtilisin, Elastase

PSTI konnte in allen untersuchten Vertebraten nachgewiesen werden und wird aus den Zymogengranula des Pankreas zusammen mit Zymogenen in den Pankreassaft sekretiert. PSTI inhibiert Trypsin, nicht aber Trypsinogen oder Enterokinase und fungiert damit als Regulator der Trypsinaktivität (LASKOWSKI UND KATO, 1980).

Die aus Tumoren isolierte Form von PSTI wird als tumor-associated trypsin inhibitor (TATI) bezeichnet. TATI wurde erstmals aus Urin von Patienten mit Ovarkarzinom isoliert und kann als Marker für Tumorerkrankungen dienen (LUKKONEN ET AL., 1999). Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß TATI nicht nur von normalen Nierenzellen, sondern in verstärktem Maße auch von Tumorzellen gebildet wird, was zu einer signifikanten Erhöhung der Serumkonzentration führt.

1.3.2.4 Leukoproteinase (Mucoproteinase) Inhibitoren

Leukoproteinase-Inhibitoren werden vor allem von Leukozyten und exokrinen Zellen sekretiert und können in Schleimhäuten und Knorpelgewebe wie Gelenk- und Rippenknorpel, Meniskus und Bandscheiben nachgewiesen werden (ANDREWS ET AL., 1992). Das Molekulargewicht der Inhibitoren dieser Familie beträgt höchstens 25 kDa, wichtigstes Strukturmerkmal sind acht Cysteinreste, die über vier Disulfidbrücken verbunden sind. Zielproteinase ist unter anderem Elastase (Tabelle 5), die an der Schädigung muköser Oberflächen beteiligt ist (TWINING, 1994).

Tabelle 5: Leukoproteinase-Inhibitoren und inhibierte Proteinase, nach ROBERTS ET AL. (1995).
Sofern ein Inhibitor weitere Bezeichnungen besitzt, sind diese zusätzlich angegeben.

Leukoproteinase-Inhibitoren	Inhibierte Proteinase
SKALP / Elafin (Skin-derived antileukoprotease) Elastase spezifischer Inhibitor	Elastase, Proteinase-3, Trypsin
Antileukoprotease (ALP); MPI; Sekretorischer Leukozyten Protease-Inhibitor (SLPI); Human semen inhibitor (HUSI-I)	Elastase, Cathepsin G, Trypsin, Chymotrypsin

SKALP/Elafin ist ein Peptid mit einer Molekularmasse von 6 kDa und inhibiert Elastase, Proteinase 3 und Trypsin. SKALP ist vor allem in der Haut bzw. in Keratinozyten lokalisiert. Patienten mit Psoriasis (Schuppenflechte) besitzen eine

veränderte, geringer aktive Form des Inhibitors (WIEDOW ET AL., 1990; ALKEMADE ET AL., 1994). Elafin ist auch in Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen nachgewiesen wurden und wirkt neben α_1 -AT als zweiter physiologisch wichtiger Inhibitor der Elastase (REMOLD-O'DONNELL ET AL., 1989).

Antileukoproteinase (ALP) besteht aus 107 Aminosäuren, die sich in zwei homologe Domänen aufteilen. Die N-terminale Domäne inhibiert Elastase, Cathepsin G, Trypsin und Chymotrypsin, während die C-terminale Domäne ein weiteres Molekül Cathepsin G, Trypsin und Chymotrypsin, jedoch kein weiteres Elastasemolekül inhibiert (TWINING, 1994). Eine wichtige regulatorische Funktion übernimmt ALP in der Desquamation, dem Abschuppen der oberen verhornten Hautschicht. Dieser Vorgang wird unter anderem durch die Inhibition des Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme (SCCE) durch ALP reguliert (FRANZKE ET AL., 1996). Weiterhin konnte eine antibakterielle Aktivität von ALP nachgewiesen werden (HIEMSTRA ET AL., 1996). Neuere Arbeiten weisen auf anti-inflammatorische Effekte von ALP hin. MULLIGAN ET AL. (2000) beschrieben einen Zusammenhang der inhibitorischen Aktivität von ALP mit der Reduktion der Akkumulation von Neutrophilen und der Unterdrückung der Aktivierung von NF- κ B.

1.4 Physiologische Bedeutung der Regulation von Proteinasen

Proteinasen sind an vielen zellulären und extrazellulären Prozessen beteiligt. Spezifische intrazelluläre Proteinasen spalten z.B. das Signalpeptid von Proteinen oder das Propeptid von Hormonen, Cytokinen oder anderen Enzymen ab. Extrazelluläre Proteinasen regulieren z.B. den Zyklus von Matrixproteinen. Endogene Proteinasen, die unter anderem bei Entzündungsreaktionen durch Monozyten, Makrophagen, Leukozyten oder Mastzellen freigesetzt werden, zersetzen geschädigtes Gewebe, greifen aber auch gesundes Gewebe an. Eine genaue Kontrolle der Aktivität dieser Proteinasen ist deshalb notwendig. Zusätzlich zur Kontrolle von endogenen Proteinasen müssen auch Proteinasen reguliert werden, die von Mikroorganismen oder Tumorzellen freigesetzt werden (TWINING, 1994). Proteinase spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Regulierung vieler Krankheiten, wobei das Spektrum dieser Krankheiten „von der Erkältung bis zum Krebs“ reichen kann (SEIFE, 1997).

Die Regulation von Proteinasen kann grundsätzlich auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Der erste ist die kontrollierte Freisetzung von Proteinasen zu dem Zeitpunkt, an dem sie benötigt werden. Dazu werden viele Proteinase als inaktive Vorstufen (Zymogene) sezerniert und anschließend durch proteolytische Spaltung und/oder Konformationsänderung aktiviert (STROUD ET AL., 1977). Oft ist die Aktivierung von Zymogenen in ein Kaskaden- oder Verstärkungssystem involviert, wobei der letzte Schritt zur Aktivierung einer Proteinase mit hoher physiologischer Relevanz führt. Ein Beispiel ist die Blutgerinnungskaskade, in deren letztem Schritt Thrombin aus Prothrombin freigesetzt wird. Die resultierende Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin durch Thrombin sorgt für einen Wundverschluß (TWINING, 1994; ROBERTS ET AL., 1995). Die zweite Möglichkeit der Regulation von Proteinasen ist die Inhibition durch spezifische Inhibitoren. Die Aktivität von Thrombin und anderen Enzymen der Blutgerinnungskaskade wird dabei von verschiedenen Inhibitoren kontrolliert. Der wichtigste Vertreter dieser Inhibitoren ist Antithrombin, ein Inhibitor aus der Familie der Serpine. Ein Ausfall dieser regulatorischen Funktion durch Antithrombinmangel (AT-Defizienz) führt zur vermehrten Bildung von Thromben im Körper und damit zur Thrombose. AT-Defizienz kann genetisch bedingt sein (autosomal-dominante Vererbung), wobei ein dysfunktionelles Antithrombin-Allel vererbt wird. Dieses führt dazu, daß nur 50 % des Antithrombins funktionsfähig bleiben. Eine Therapie kann durch Zugabe von Antithrombin erfolgen. Homozygote AT-Defizienz ist sehr selten. Träger dieser Krankheit sterben noch im Mutterleib oder kurz nach der Geburt durch multiples Organversagen infolge einer Thrombose (BLAJCHMAN, 1994).

Eine weitere Proteinase mit wichtiger pathophysiologischer Funktion ist die Elastase. Elastase wird von neutrophilen Granulozyten sezerniert und ist z.B. in der Lunge nachzuweisen. Die Elastizität der Lunge wird durch die Balance zwischen Elastase und einem Inhibitor, dem α_1 -Antitrypsin (α_1 -AT), aufrechterhalten. Bei einem Mangel des Inhibitors kommt es zu verstärktem proteolytischem Abbau der elastischen Fasern im Lungengewebe und anderer Bindegewebsproteine. Dieser Abbau führt langfristig zum Lungenemphysem. Ein Patient mit Lungenemphysem muß kräftiger atmen, um das gleiche Luftvolumen auszutauschen, da die Alveolen weniger elastisch sind als beim Gesunden (STEUBE UND KUNZ, 1988; STRYER, 1999). Ein Mangel an α_1 -AT kann durch Vererbung erworben werden, es sind mehr als 75 Allelvarianten des α_1 -AT Gens bekannt, von denen mindestens 20 zu Mangelzuständen führen (PERLMUTTER, 1991).

Die am weitesten verbreitete Mutation (>90 %) ist die Z-Mutation, bei der die Aminosäure Gly³⁴² gegen Lys³⁴² ausgetauscht ist. Dieser Aminosäureaustausch führt zu einer fehlerhaften Sekretion und post-translationalen Modifikation und damit zu einer Veränderung der Tertiärstruktur des Proteins. Die Serumkonzentrationen von α_1 -AT betragen bei Trägern dieser Mutation nur 15 % des Normalwertes. Zudem weisen diese 15 % eine verminderte inhibitorische Aktivität auf. Allein in den USA sollen 100.000 Personen an α_1 -AT Defizienz leiden (COAKLEY ET AL., 2001). Auch äußere Einflüsse können zu einer Herabsetzung der Menge an aktivem α_1 -AT führen. So kann Methionin, die Aminosäure an der P₁-Position des Inhibitors, durch Oxidantien im Zigarettenrauch oxidiert werden, wodurch die inhibitorische Aktivität von α_1 -AT um den Faktor 1000 herabgesetzt wird (HAUTAMAKI ET AL., 1997). Ein Therapieverfahren zur Behandlung von α_1 -AT Defizienz ist die Verabreichung von rekombinant hergestelltem α_1 -AT als Aerosol direkt in die Lunge (VEMURI ET AL., 1993).

Eine weitere wichtige Serinproteinase ist Tryptase. Tryptase kommt nahezu ausschließlich in Mastzellen vor. Beim Menschen existieren 4 Isoenzyme, deren wichtigstes, β -Tryptase, in den sekretorischen Mastzellengranula lokalisiert ist. Die Freisetzung aus den Mastzellen erfolgt schlagartig durch die Aktivierung von Rezeptoren, beispielsweise des hochaffinen IgE-Rezeptors (anaphylaktische Degranulation). Die biologische Funktion von Tryptase ist weitgehend ungeklärt, da sie mangels spezifischer endogener Inhibitoren *in vivo* nicht gezielt beeinflusst werden konnte (LUDOLPH-HAUSER ET AL., 1999). Untersuchungen *in vitro* lassen auf eine Funktion der Tryptase als Mediator in der Pathogenese von Asthma und anderen allergischen und inflammatorischen Reaktionen schließen (DEADMAN, 2000). In der aktiven Form bildet Tryptase ein durch Heparin stabilisiertes Tetramer und wird von keinem bekannten humanen Inhibitor gehemmt (SOMMERHOFF ET AL., 1999, 2000). Bis heute ist nur ein peptidischer Inhibitor bekannt, der aus dem Blutegel isolierte „Leech-derived tryptase inhibitor“ (LDTI). LDTI inhibiert weiterhin die Serinproteinasen Trypsin und Chymotrypsin und ist der Familie der Kazal-Typ Inhibitoren zuzuordnen. Tryptase kann von LDTI zu maximal 50 % inhibiert werden, da LDTI im Tryptase-Tetramer aus sterischen Gründen lediglich an zwei von vier aktiven Zentren binden kann (SOMMERHOFF ET AL., 1994).

Ca. 10 % der im Blut zirkulierenden Proteine stellen Proteinase-Inhibitoren dar (ROBERTS ET AL., 1995). Aus diesem Grund wurde eine Hämofiltrat-Peptidbank als Quelle für die Isolierung von Proteinase-inhibitorischen Peptiden ausgewählt.

1.5 Isolierung biologisch aktiver Peptide aus Hämofiltrat

Die Isolierung und Analyse von humanen, biologisch aktiven Peptiden ist von Bedeutung für die medizinische Forschung im Sinne der Diagnostik und Therapie menschlicher Erkrankungen. Diese endogenen Substanzen werden dabei als Wirkstoffe zur Normalisierung oder Beeinflussung krankhaft veränderter biochemischer Mechanismen eingesetzt. Der Grundgedanke ist eine Verminderung oder ein Ausbleiben von Nebenwirkungen, welche häufig bei künstlich hergestellten Medikamenten auftreten. Die pharmazeutische Industrie stellt bereits Peptide und Proteine in großen Mengen zum therapeutischen Einsatz her. Als Beispiel seien rekombinantes Insulin zur Behandlung des Diabetes Mellitus, Faktor VIII zur Therapie der Hämophilie A sowie Interferon- β für die Behandlung von Multipler Sklerose genannt.

Die größte Quelle zur Isolierung der regulatorischen Peptide stellt das menschliche Blut dar (FORSSMANN ET AL., 1993). Peptide werden entweder als endokrine Faktoren direkt in den Blutstrom sezerniert oder gelangen als parakrine, autokrine oder neurokrine Substanzen durch Diffusion in den intravasalen Raum (FORSSMANN, 1996). Die Peptide liegen im Blut bereits in ihrer vollständig posttranslational modifizierten und damit aktiven Form vor. Da Blut und Plasma der Forschung nur in begrenzten Mengen zur Verfügung stehen, ist am Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung, heute IPF PharmaCeuticals GmbH (An-Institut der Medizinischen Hochschule Hannover), die Isolierung von Peptiden aus Hämofiltrat etabliert worden. Hämofiltrat entsteht als Abfallprodukt der Blutwäsche niereninsuffizienter Patienten durch tangentielle Filtration an einem arteriovenösen Shunt in nephrologischen Kliniken und ist dadurch in großen Mengen erhältlich. Die qualitative Peptid- und AS-Zusammensetzung von Hämofiltrat und Plasma stimmt bis zu einer Größe von 10 kDa weitgehend überein. Die hochkonzentrierten majoren Blutproteine wie z. B. Hämoglobin sind im Hämofiltrat nur noch in sehr geringen Konzentrationen enthalten (SCHEPKY ET AL., 1994). Die IPF

PharmaCeuticals GmbH nutzt ein etabliertes Verfahren, welches die im Hämofiltrat enthaltenen Peptide durch chromatographische Trenntechniken in ca. 450 Fraktionen separiert. Die Gesamtheit dieser Fraktionen wird Peptidbank genannt (SCHULZ-KNAPPE ET AL., 1996, 1997). Dieses Verfahren, welches die Fraktionierung aller Peptide aus bis zu 10.000 l Hämofiltrat (HF) mit verschiedenen chromatographischen Methoden beinhaltet, ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

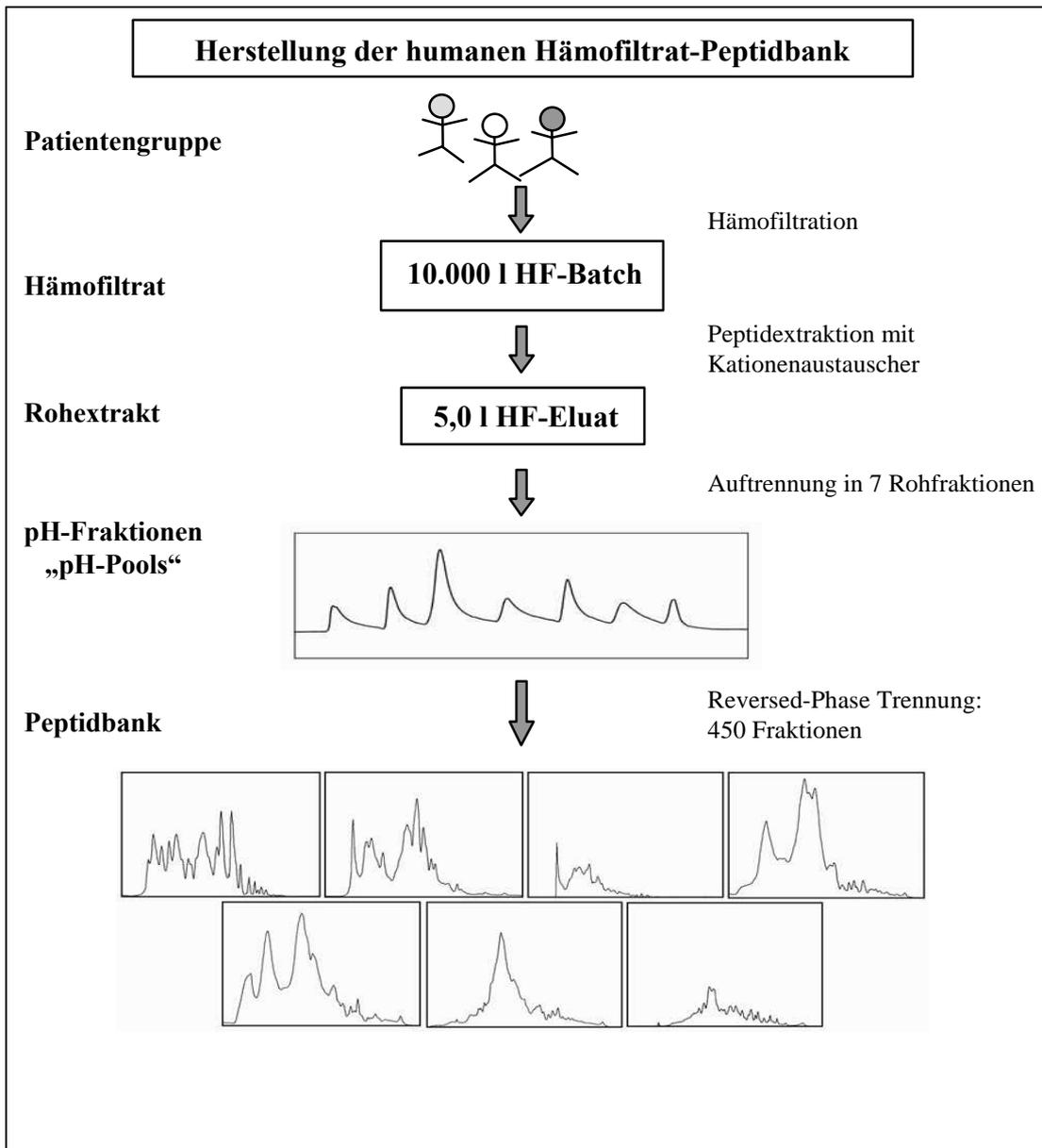


Abbildung 5: Schematische Darstellung zur Herstellung der humanen Hämofiltrat-Peptidbank.

Die Fraktionen und von diesen entnommene Äquivalentmengen werden lyophilisiert und stehen somit zur Untersuchung auf verschiedene biologische Aktivitäten zur Verfügung. Aus einer solchen Peptidbank konnten bereits diverse Peptide aus den

unterschiedlichsten Peptid/Proteinfamilien isoliert werden, wie z.B.: Cytokine, Wachstumsfaktoren, Enzyme, Plasmaproteine und Proteinase-Inhibitoren (RICHTER ET AL., 1999). Die aus Hämofiltrat isolierten Proteinase-Inhibitoren werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

1.6 LEKTI – Ein Multidomänen Serinproteinase Inhibitor

Aus Hämofiltrat konnten zwei unbekannte Peptide isoliert werden, die aufgrund ihres Molekulargewichtes als HF 6478 (6478 Da) und HF 7665 (7665 Da) bezeichnet wurden. Die Isolierung gelang aus einer Peptidbank, die nach einem ähnlichen Verfahren wie dem in Kap. 1.5 beschriebenen hergestellt wurde. Dabei wurden die Peptide aus 5.000 l HF nach Ammoniumsulfatfällung und Ultrafiltration über einen Kationenaustauscher in 40 Fraktionen getrennt. Aus zwei dieser Fraktionen wurden HF 6478 und HF 7665 isoliert. Beide Peptide besitzen ein identisches 4-Cystein-Muster, was trotz unterschiedlicher Aminosäuresequenzen auf die Zugehörigkeit zu einer gemeinsamen Proteinfamilie hinwies. Durch Datenbankvergleich konnten Übereinstimmungen mit der Familie der Serinproteinase-Inhibitoren gezeigt werden, HF 7665 besitzt eine Homologie zum Acrosin-Inhibitor BUSI-II (Bull semen inhibitor) des Rindes (STÄNDKER, 1994).

Zur genaueren Charakterisierung dieser Peptide wurden von MÄGERT ET AL. (1999) und KREUTZMANN (2000) umfangreiche molekularbiologische Arbeiten durchgeführt. Dabei konnte eine humane cDNA aus Vaginalepithel mittels mRNA amplifiziert werden, die für ein Protein kodiert, das aus 1064 Aminosäuren besteht und sich in 15 Domänen einteilen läßt. Das entsprechende Protein stellt daher einen Multidomänen Serinproteinase-Inhibitor dar (Abbildung 6).

Signal peptid:	<u>MKIATVSVLLPLALCLIQDAAS</u>		22
Domäne 1:	<u>K</u> NEDQEMCHEFQAFMKNGKLFQDPQDKKFFQSLDGMIFINKCATCKMILEKEAKSQKR	P ₁ P' ₁	79
Domäne 2:	ARHLARAPKATAPTELNCDDFKKGERDGDFTCPDYEAVCCTDGKTYDNRCALCAENAKTGSQIGVKSEGECKSSN		155
Domäne 3:	PEQDVCSAFRPFVRDGRGLCTRENDEPVLGPDGKTHGNKCAMCAELFLKEAENAKREGETRIRRN		219
Domäne 4:	AEKDFCKEYEQVRNGRLFCCTRESDPVVRGPDGRMHGNKCALCAEIFKRRFSEENSKTDQNLGKAEETKVKR		291
Domäne 5:	EIVKLCSEYQNAKNGILFCCTRENDEPIRGPDGRMHGNLCSMCQAYFQAENEKKKABARARNK		355
Domäne 6:	ESGKATSYAELCNEYRKLVRNGKLACTRENDEPIQDPDGKLVHGNTCSMCEVFFQAEKEEKKKEGESRNKR		425
Domäne 7:	QSKSTASFEELCSEYRKRKNGRLFCCTRENDEPIQDPDGKMHGNTCSMCEAFFQEEERARAKKR		489
Domäne 8:	EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPFVRGPDGKMHGNKCAMCASVFKLEEEKKNDKEEKGVAEKVKR		560
Domäne 9:	EAVQELCSEYRHYVRNGRLPCCTRENDEPIEGLDGKIHGNTCSMCEAFFQEAKEKERAEPRAKVKR		625
Domäne 10:	EAEKETCDEFRRLLQNGKLFCTRENDEPVRGPDGKTHGNKCAMCKAVFQKENEERKRKEEDQRN		689
Domäne 11:	AAGHSSGGGGNTQDCAEYQEQMKNGRLSCTRESDPVRDADGKSYNNQCTMCKAKLEREAEERKNEYSRSRN		763
Domäne 12:	GTGSESGKDTCDEFRSQMKNGKLICTRESDPVVRGPDGKTHGNKCTMCKEKLEREAAEKKKKEDEDRSN		831
Domäne 13:	TGERSNTGERSNDKEDLCREFRSMQRNGKLICTRENNEPVRGPGPYGKMHINKCAMCQSIQFDREANERKKKDEEKSSKPSN		910
Domäne 14:	NAKDECSEFRNYIRNNELICPRENDPVHGADGKFTYTKCYMCRAVFLTEALERAKLQEKPSHVRASQ		977
Domäne 15:	EEDSPDFSSLDSEMKDYRVLPRIGYLCPKDLKPVCGDDGQTYNNPQMLCHENLIRQTNTHIRSTGKCEESSTPGTTAASMPSPDE		1064

Abbildung 6: Aminosäuresequenz des LEKTI-Proteins (abgeleitet aus cDNA, nach MÄGERT ET AL., 1999 und KREUTZMANN, 2000). Das Signalpeptid ist unterstrichen. Die 15 Domänen sind nach ihrem Cystein-Muster (rot markiert) untereinander dargestellt. Die grau hinterlegten Bereiche zeigen Sequenzhomologien innerhalb der einzelnen Domänen. Die Peptide HF 6478 (1. Domäne) und HF 7665 (6. Domäne) sind in blau dargestellt. Zusätzlich sind die P₁ und P'₁-Aminosäuren angegeben.

Dreizehn dieser Domänen zeigen ein 4-Cystein Muster (Domäne 1 und 3 bis 14), zwei weitere Domänen enthalten sechs Cysteinreste (Domäne 2 und 15) und entsprechen, auch aufgrund der Abstände zwischen den Cysteinresten und dem konservierten Tyrosinrest, Inhibitoren aus der Familie der Kazal-Typ Inhibitoren (Abbildungen 6 und 7). Die Peptide HF 6478 und HF 7665 entsprechen dabei der ersten und sechsten Domäne des Gesamtproteins. Die Disulfidverbrückung von HF 7665 und HF 6478 (vier Cysteinreste mit 1-4 und 2-3 Verbrückung) ist identisch und zeigt ein neues, Kazal-Typ ähnliches Muster (KREUTZMANN, 2000; LAUBER, 2000). In einer Expressionsanalyse konnte gezeigt werden, daß die cDNA von LEKTI vor allem in mukösen Epithelien wie Vaginalepithel oder der Mundschleimhaut aber auch in anderen Geweben wie z.B. dem Thymus oder der humanen HaCaT-Zelllinie (Keratinocyten) exprimiert wird (MÄGERT ET AL., 1999; KREUTZMANN, 2000). Das Protein wurde deshalb Lymphoepithelialer Kazal-Typ-verwandter Inhibitor (LEKTI) genannt. Untersuchungen zur Inhibition verschiedener Proteinasen (Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Thrombin, Tissue plasminogen activator (tPA), Tryptase, Plasmin, Kallikrein, Faktor Xa und Urokinase) konnten für die erste Domäne (HF 6478) keine inhibitorische Aktivität, für die 6. Domäne (HF 7665) jedoch eine selektive Inhibierung von Trypsin zeigen. Nach diesem Befund schien es wahrscheinlich, daß auch die Domänen 3 bis 5 sowie 7 bis 13 Trypsin inhibieren, da die Aminosäureabfolge Arg-Glu (P₁-P'₁) im aktiven Zentrum Teil des stark konservierten „CTRE“ Motives (Abbildung 6) dieser Domänen ist, welches auch die 6. Domäne aufweist. Eine physiologisch sinnvolle Zielproteinase stellt Trypsin aufgrund der Lokalisation des Inhibitors jedoch nicht dar. Eine andere Zielproteinase wurde bislang noch nicht entdeckt.

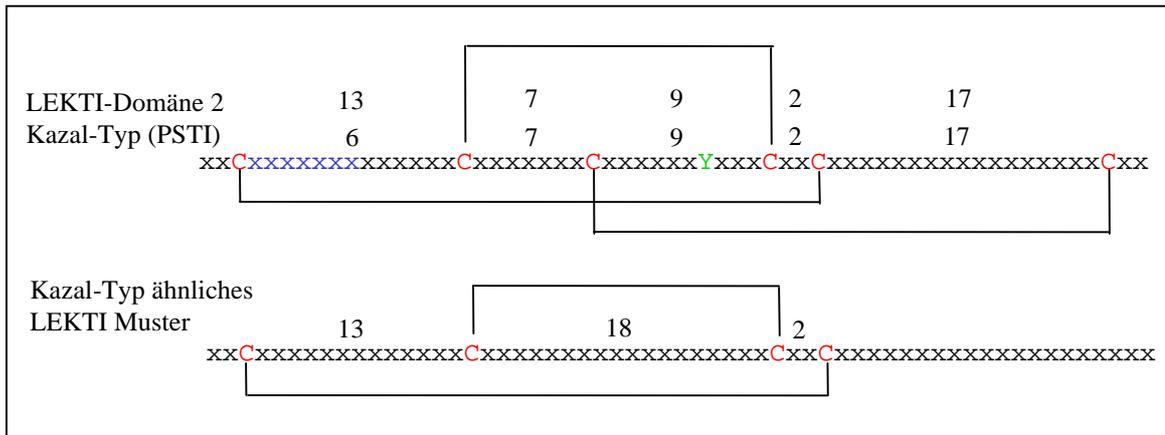


Abbildung 7: Disulfidverbrückung innerhalb der LEKTI-Domänen.

Im oberen Teil ist die Verbrückung der 2. Domäne im Vergleich zum klassischen Kazal-Typ Muster des pankreatischen sekretorischen Trypsin-Inhibitors (PSTI) gezeigt. Die Zahlen über den Sequenzschemata geben die Anzahl der zwischen den Cysteinresten (rot) liegenden Aminosäuren (x) an. Blau markiert sind die Unterschiede der 2. Domäne zu PSTI. In grün ist der konservierte Tyrosinrest der Kazal-Typ Inhibitoren markiert. Im unteren Teil ist das Kazal-Typ ähnliche Verbrückungsmuster der übrigen LEKTI-Domänen 1 und 3 bis 14 gezeigt (Für Domäne 1 und 6 bewiesen).

1.7 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue endogene, zirkulierende peptidische Proteinase-Inhibitoren aus Hämofiltrat zu isolieren. Dazu sollte ein Inhibitions-Test im 96-Loch Mikrotiterplatten Format entwickelt werden, der zur effizienten, systematischen Untersuchung der Hämofiltrat-Peptidbank nach inhibitorischen Peptiden geeignet ist. Mit diesem Test detektierte inhibitorisch aktive Substanzen sollten in konsekutiven chromatographischen Reinigungsschritten zur Homogenität gereinigt und anschließend identifiziert und charakterisiert werden. Der geplante Ablauf ist schematisch in Abbildung 8 zusammengefaßt:

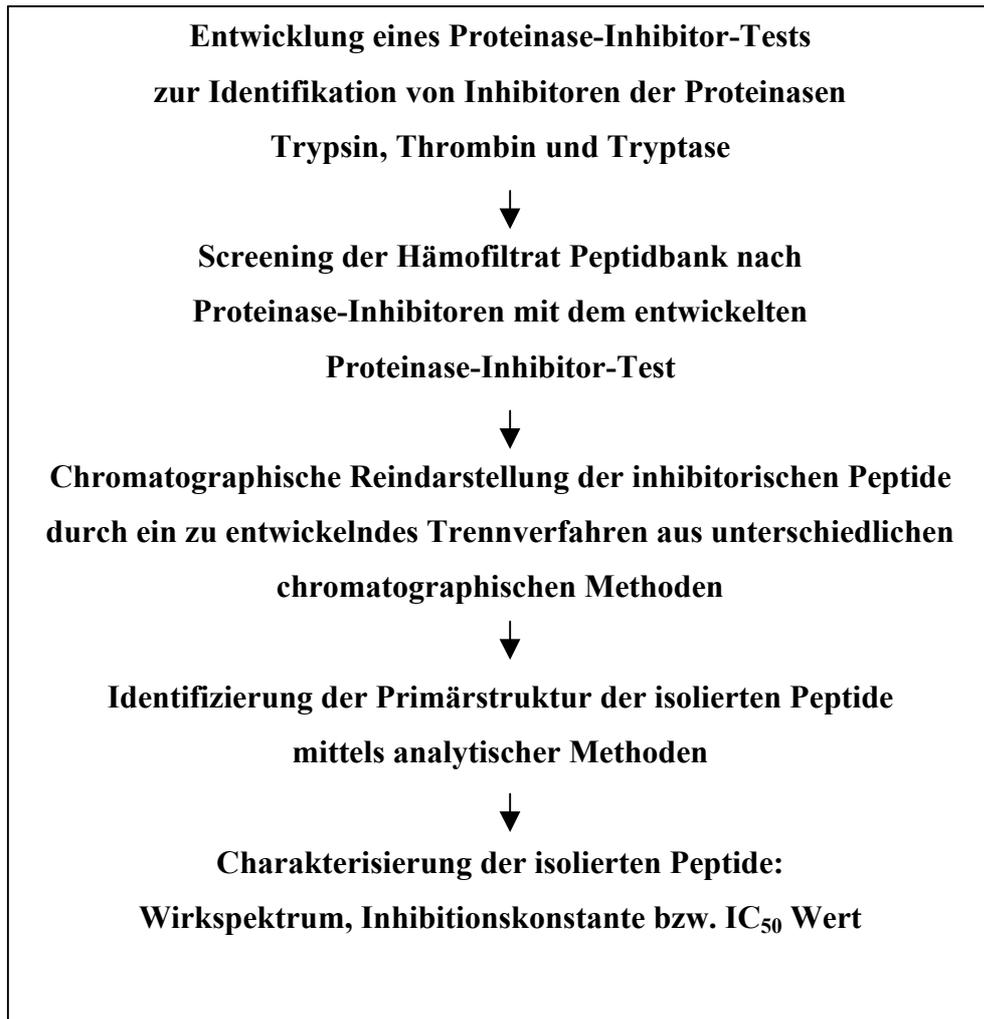


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit.

2 Material und Method

Alle verwendeten Chemikalien wurden in *pro analysi* Qualität oder einem vergleichbaren Reinheitsgrad eingesetzt. Die organischen Lösungsmittel wurden von Merck (Darmstadt, D) bezogen. Eine tabellarische Aufstellung der verwendeten Geräte und Chemikalien ist im Anhang angegeben.

2.1 Chromatographische Methoden

2.1.1 Umkehrphasen HPLC (Reversed-Phase HPLC, RP-HPLC)

Die gefriergetrockneten Peptidbankfraktionen wurden in entionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q^{UF} plus, Millipore, Eschborn, D) gelöst und die unlöslichen Bestandteile durch Filtration (Minisart, 0,2 µm, Sartorius, Göttingen, D) abgetrennt. Die Trennungen der Peptidgemische erfolgte ausschließlich über Gradientenelution durch einen linearen Anstieg von Eluent B. Gradient, Fließgeschwindigkeit und Detektionswellenlänge sind bei den jeweiligen Chromatogrammen angegeben. Die für die weitere Isolierung verwendeten Fraktionen der jeweiligen Chromatographieschritte wurden 1:5 mit entionisiertem Wasser oder dem verwendeten Eluenten A verdünnt und auf die stationäre Phase aufgetragen. Alle verwendeten Säulen und Chromatographieanlagen sind in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6: RP-Chromatographiesäulen und –anlagen, die für die Isolierung von inhibitorischen Peptiden verwendet wurden.

Säulenmaterial	Chromatographieanlage
Bakerbond, RP C-18, 47 x 300 mm, 300 Å, 15-30 µm, Waters, (Milford, MA, USA)	BioCad 60, PerSeptive Biosystems (Freiburg, D)
Vydac C-18, 47 x 300 mm, 300 Å, 15-30 µm, Vydac (Hesperina, CA, USA)	BioCad 60, PerSeptive Biosystems (Freiburg, D)
Biotek Silica C-4, 20 x 250 mm, 100 Å, 5 µm, Biotek (Östringen, D)	Kontron 422 S (Neufahrn, D)

Source RP C-15, 20 x 125 mm, 120 Å, 5 µm Pharmacia (Freiburg, D)	Kontron 430 (Neufahrn, D)
Aqua C-5, 10 x 250 mm, 300Å, 5µm, Phenomenex (Aschaffenburg, D)	Kontron 422 S (Neufahrn, D)
Jupiter C-5, 10 x 250 mm, 300 Å, 5 µm, Phenomenex (Aschaffenburg; D)	Kontron 422 S (Neufahrn, D)
Jupiter C-18, 4,6 x 250 mm, 300 Å, 5 µm, Phenomenex (Aschaffenburg, D)	Kontron 422 S (Neufahrn, D)
TSK Gel Super-ODS, 4,6 x 100 mm, 300 Å, 2 µm, TOSOH (Stuttgart, D)	Kontron 422 S (Neufahrn, D)
YMC J'Sphere ODS-H 80, 4,6 x 250 mm, 300 Å, 4 µm, YMC (Schermbbeck, D)	Kontron 422 S (Neufahrn, D)
Protein C-18, 1 x 250 mm, 300 Å, 5 µm, Grom (Herrenberg, D)	ABI 140D, Applied Biosystems (Weiterstadt, D)

Alle Chromatographiesäulen wurden nach Verwendung in 20 % (v/v) Methanol eingelagert.

Zur Herstellung der verwendeten Fließmittel (Eluent A und B) wurden organische Lösungsmittel mit entionisiertem Wasser vermischt. Die Fließmittel wurden 10 min durch einen Heliumstrom entgast. Die für die RP-Chromatographie verwendeten Eluenten sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7: Eluenten für die RP-Chromatographie.

Alle Prozentangaben entsprechen Volumenprozenten (v/v) in wäßriger Lösung.

Eluent A	Eluent B
10 mM HCl	10 mM HCl / 80 % ACN
10 mM HCl / 30 % MeOH	10 mM HCl / MeOH
0,1 % TFA	0,1 % TFA / 80 % ACN
0,06 % TFA	0,05 % TFA / 80 % ACN

Die Fraktionierung des Eluats erfolgte mit Fraktionssammlern der Firma BioRad (Hercules, CA, USA) Modell 2110 und 2128.

Das Trennverhalten der analytischen Säulen wurde vor ihrer Verwendung mit Hilfe eines Peptidstandards getestet. Die Stammkonzentration des Peptidstandards betrug 0,2 µg/µl.

Peptidstandard: Brain natriuretic peptide (hBNP)
 Neuropeptid Y (hNPY)
 Parathyroidhormon (hPTH)
 Atrial natriuretic peptide (hANP)
 Growth hormone-releasing hormone (hGHRH)

Die für den Peptidstandard verwendeten Peptide wurden in unserem Hause synthetisiert.

2.1.2 Kationenaustausch-HPLC

Für die Kationenaustausch-Chromatographie (CEC) wurden folgende, in Tabelle 8 angegebene Säulen und Chromatographieranlagen verwendet:

Tabelle 8: CEC-Säulen und Chromatographieranlagen, die für die Isolierung von inhibitorischen Peptiden verwendet wurden.

Säulenmaterial	Chromatographieranlage
Pepkat, 10 x 125 mm, 1000 Å, 7 µm, Biotek, (Östringen, D)	Kontron 420 (Neufahrn, D)
Pepkat, 4 x 125 mm, 300 Å, 5 µm, Biotek, (Östringen, D)	Kontron 420 (Neufahrn, D)

Als Eluenten dienten die in Tabelle 9 aufgeführten Puffer, die vor der Verwendung filtriert (Minisart 0,2 µm) und 10 min mittels Heliumstrom entgast wurden.

Tabelle 9: Elutionspuffer für die CEC.

Puffer A	Puffer B
50 mM KH ₂ PO ₄ , pH 4,5	1,5 M KCl / 50 mM KH ₂ PO ₄ , pH 4,5
50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 3,5	1,5 M NaCl / 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 3,5

Für die Auftrennung der Peptidgemische wurde ein linearer Gradient mit einer Steigung von 1 % Puffer B/min gewählt. Die Fraktionierung der Eluate erfolgte mit Fraktionssammlern der Firma BioRad (Hercules, CA, USA) Typ 2110 und 2128.

2.1.2.1 Entsalzung von Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie

Die Entsalzung der Proben erfolgte nach dem Prinzip der RP-Chromatographie. Die Kavitäten der 96-Loch-Extraktionsplatte (3M Empore™ 96 Well Extraction Disks, 3M Filtration Products, St. Paul, MN, USA) enthalten zwischen zwei Fritten RP C-18 Material. Zum Entsalzen der Probelösung wurde ein Aliquot der einzelnen Fraktionen in je eine der Kavitäten pipettiert. Die Peptide binden an das RP-Material. Durch Spülen mit 600 µl Eluent A (0,1 % TFA) wurde das gelöste Salz, welches nicht an das RP-Material bindet, abgetrennt. Die Peptide wurden anschließend mit 600 µl Fließmittel B (0,1 % TFA/ 80 % ACN) eluiert. Die Extraktionsplatten wurden nach ihrer Verwendung mit 100 % ACN regeneriert und in 30 % Methanol gelagert.

2.2 Analytische Methoden

2.2.1 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Bestimmung des Molekulargewichtes der in einer Fraktion enthaltenen Peptide erfolgte entweder mit einem Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight (MALDI-TOF) Massenspektrometer (LaserTec RBT II, PerSeptive/Vestec, Houston, USA oder Voyager DE-Pro, Applied Biosystems, Weiterstadt, D) oder einem Elektrospray (ESI) Ionenfallen Massenspektrometer (LCQ, ThermoFinnegan, Egelsbach, D). Die Steuerung der Geräte und die Auswertung der Spektren erfolgte mit der zugehörigen Software des jeweiligen Herstellers.

2.2.1.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Bei der MALDI-TOF MS werden die Analyten zusammen mit einem Überschuß an Matrixsubstanz (Säuren wie α -Cyano-4-hydroxymizimtsäure, die ihr Absorptionsmaximum bei der verwendeten Laserwellenlänge von 337 nm haben) auf einem Probenträger kristallisiert. Nach Laserbeschuß übertragen die erzeugten Matrixionen ihre Ladung auf die Analytmoleküle. Die Analytionen werden im angelegten Hochspannungsfeld beschleunigt und treten in die evakuierte Flugröhre ein. Nach der Detektion wird über die Flugzeit der Masse/Ladungsquotient (m/z) der Ionen berechnet. Aus diesem Wert kann das exakte Molekulargewicht der Analyten bestimmt werden.

Die Bestimmung des Molekulargewichtes mit dem LaserTec RBT-II-Massenspektrometer erfolgte im linearen Modus, mit dem Voyager DE-Pro im linearen und Reflektor Modus. Beide Geräte sind mit einem Stickstofflaser (337 nm) ausgestattet. Jeweils 1 μ l Matrix und 1 μ l salzfreie Probe wurden auf den Probenträger pipettiert, gemischt und an der Luft getrocknet. Als Matrixsubstanz wurde eine gesättigte Lösung von α -Cyano-4-hydroxymizimtsäure (CHC) und Fucose (1:1) verwendet (SCHULZ-KNAPPE ET AL., 1997). Bei der MALDI-Massenbestimmung treten überwiegend einfach geladene Ionen auf. Dies macht es möglich, komplexe Peptidmischungen mit der MALDI-TOF-MS auf ihre Substanzzusammensetzung zu

analysieren. Die Genauigkeit der Massenbestimmung beträgt 0,1 % bei dem LaserTec RBT-II-Massenspektrometer und <10 ppm im Reflektor Modus des Voyager DE-Pro.

2.2.1.2 ESI-Massenspektrometrie

Bei der ESI-MS findet eine Ionisierung des Analyten aus flüssiger Phase statt. Dazu wird der Analyt mit einer säurehaltigen Lösung aufgenommen. Als Säuren kommen dabei unter anderem 0,1 % Ameisensäure oder 0,1 % TFA (v/v) zum Einsatz. Die Ionisation der Peptide aus der flüssigen Phase erfolgt durch ein Hochspannungsfeld mit einer zwischen Nadel und Eintrittskapillare angelegten Potentialdifferenz von 4-5 kV. Die Vernebelung der flüssigen Phase wird dabei durch einen Stickstoffstrom unterstützt. Die ionisierten Peptide werden anschließend zur Ionenfalle geleitet und bis zum Erreichen einer Mindestanzahl (5×10^7 Ionen) gesammelt. Zur Detektion werden die Ionen dann auf einen Photomultiplier gelenkt, der die entstehenden Signale verstärkt. Die Spannung des Photomultipliers betrug –850 V. Im MS-Modus wurde mit drei Mikroskans pro Messung detektiert, um dann über 10 Messungen zu mitteln. Auch bei dieser Technik werden die Signale der Analyten mit ihrem m/z-Wert dargestellt. Bei der ESI-MS treten neben den einfach geladenen Molekülonen auch mehrfach geladene Spezies auf. Dieser Effekt ist durchaus gewünscht, da das verwendete Gerät nur einen Signalbereich von 50-2000 darstellen kann. Durch das Auftreten von mehrfach geladenen Molekülonen können auch größere Peptide oder Proteine im ESI detektiert werden.

Die Aufnahme von ESI-Massenspektren mit dem LCQ kann auf zweierlei Arten erfolgen. Zum einen können die zu untersuchenden Proben in Lösung direkt über eine eingebaute Spritzenpumpe mit einem Fluß von 1 bis 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert werden (Fließinjektion), zum anderen ist die Verwendung als on-line Detektor in Kopplung mit einer $\mu\text{-HPLC}$ (Eldex Micro-Pro, SunChrom, Friedrichsdorf, D) möglich (Fluß: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$). Für die Fließinjektionsmessung wurden die lyophilisierten, salzfreien Proben in 50 % MeOH, 0,1 % Ameisensäure (v/v) aufgenommen und mit einer 100 μl Spritze (Hamilton, Reno, NV, USA) injiziert. Für die on-line gekoppelte $\mu\text{-HPLC}$ wurden die lyophilisierten, salzfreien Proben in 25 μl entionisiertem Wasser

aufgenommen, um davon 20 µl über einen Autosampler (Endurance, Spark, Emmen, NL) zur HPLC zu überführen.

2.2.2 Kapillarzonenelektrophorese

Die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) dient als eine hochauflösende Analysenmethode unter anderem zur Reinheitsüberprüfung von Peptiden. Dabei erfolgt die Trennung der Analytione aufgrund von Mobilitätsunterschieden, die durch Größen- und Ladungsunterschiede der Ionen in einem angelegtem Spannungsfeld entstehen.

Als Elektrophoresesystem wurde das P/ACETM MDQ, (Beckman, München, D) verwendet. Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mit der P/ACE System MDQ Software (Beckman). Die Detektionswellenlänge betrug 214 nm. Zur Trennung der Peptide wurde eine 57 cm lange unbeschichtete "fused silica" Kapillare (Typ TSP 075375, Composite Metal Services Ltd., UK) verwendet.

Durch Anlegen eines geringen Überdruckes für 10 s wurde in die Kapillare ein Injektionsvolumen von 6 nl der Probe injiziert. Die Peptidkonzentration betrug 0,2 mg/ml. Bei geringer konzentrierten Lösungen wurde die Injektionszeit erhöht. Die Messung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 120 µA, die aus einer angelegten variablen Hochspannung von 22 - 27 kV resultierte. Die Kapillartemperatur wurde mit einer Flüssigkühlung auf 25 °C konstant gehalten. Als Puffer diente 100 mM NaH₂PO₄ mit 0,02 % Hydroxypropylmethylcellulose (pH 2,5).

2.2.3 Peptid-Sequenzierung

Die Peptidsequenzierung erfolgte durch die klassische Aminosäuresequenzanalyse auf der Basis des Edman-Abbaus. Als Sequenziergerät diente ein automatischer Edman-Sequenzier (ProciseTM 494, Applied Biosystems, Weiterstadt, D). Die Aufnahme der Daten und deren Auswertung erfolgte mittels der Modell 610 Data Analysis Software (Version 2.1, Applied Biosystems, Weiterstadt, D).

Zwischen zwei Filterplättchen aus BioPren™ wurden zwischen 10 pmol und 100 pmol Peptid appliziert. In diesen Reaktionsraum werden die verwendeten Reagenzien (Phenylisothiocyanat, TFA, Chlorbutan) gegeben. Die Analyse und Detektion der Aminosäuren erfolgte mittels automatisierten und standardisierter RP-Chromatographie, bei einer Wellenlänge von 256 nm, gegen externe Standards.

2.2.4 Aminosäureanalytik

Die quantitative Proteingehaltsbestimmung erfolgte durch eine automatisierte Aminosäureanalyse (ASA) mit dem Aminosäuren-Analysensystem Series II 1090 Aminoquant (Hewlett Packard, Fort Collins, CO, USA) mit integrierter HPLC.

Zunächst wurden die Peptide einer sauren Totalhydrolyse mit 6 M HCl für 1 h bei 160 °C unterzogen. Anschließend wurden die Aminosäuren vor der Auftrennung über eine RP-Säule selektiv derivatisiert. Aminosäuren mit primären Aminogruppen wurden mit ortho-Phthalaldehyd in Gegenwart von 3-Mercaptopropionsäure bei einem pH-Wert von 10 umgesetzt. Das bei dieser Reaktion erzeugte fluoreszierende Isoindolderivat wurde bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm fluorimetrisch detektiert. Sekundäre Aminogruppen wurden mit 9-Fluormethyl-chlorformiat (FMOC) derivatisiert. Dabei bildete sich ein sekundäres Amid. Die Anregungswellenlänge für FMOC-Aminosäuren beträgt 266 nm bei einer Emissionswellenlänge von 305 nm. Die Aminosäuren Glutamin, Glutaminsäure sowie Asparagin und Asparaginsäure lassen sich methodisch bedingt nicht unterscheiden. Cystein und Methionin können bei diesem Verfahren nur teilweise oder gar nicht erfaßt werden, da Cystein bei der Hydrolyse vollständig, Methionin zu etwa 40 % zerstört wird. Ferner standen die Aminosäuren Norvalin und Sarcosin als interne Standards zur Verfügung.

2.2.5 Proteolytische Spaltung von Peptiden

Um die Aminosäuresequenz größerer Peptide und Proteine mit der Edman-Analytik aufklären zu können, müssen diese in mehrere Fragmente gespalten werden, da nur

maximal 50 AS in einer Probe detektiert werden können. Vor der Spaltung des Peptids, die mit unterschiedlichen Proteinasen (je nach gewünschter Spezifität) durchgeführt werden kann, müssen dabei die Cysteinbrücken mit DTT reduziert und mit Iodacetamid derivatisiert werden.

Das lyophilisierte Peptid wurde dabei in 100 µl Puffer (25 mM NH_4HCO_3 , pH 7,8) resuspendiert und mit 3 µl DTT-Lösung (10 mg/ml) versetzt. Die Reaktion erfolgte für 45 min bei 50 °C. Nach der Reduktion der Disulfidbrücken wurden 3 µl Iodacetamid-Lösung (10 mg/ml) hinzugefügt (45 min, RT, Lichtausschluß), um die Cysteinreste zu carboxyamidomethylieren und damit eine ungesteuerte Neuverbrückung zu verhindern. Das so reduzierte Peptid wurde anschließend mit einer RP-HPLC über eine 2 x 250 mm Säule (Jupiter C-18, Phenomenex, Aschaffenburg, D) gereinigt. Diese Spaltung der Disulfidbrücken ist bei kleineren Peptiden nicht notwendig, da mit der Edman-Analytik auch bis zu drei Hauptsequenzen gleichzeitig detektiert werden können.

Die enzymatische Spaltung wurde mit Endoproteinase GLU-C (E.C.: 3.4.21.19, Roche, Mannheim, D) nach Angaben des Herstellers in 25 mM NH_4HCO_3 , pH 7,8, oder mit Chymotrypsin (E.C.: 3.4.21.1, Roche, Mannheim, D) in 100 mM Tris-HCl, pH 7,8 durchgeführt. Nach der Spaltung wurden die entstandenen Peptidfragmente über eine 1 x 250 mm RP C-18 Säule (Grom, Herrenberg, D) aufgetrennt, um die in den Fraktionen enthaltenen Peptidfragmente nach MALDI-TOF-MS Analytik mit der Edman-Sequenzierung zu untersuchen.

2.3 Gefriertrocknung und Lagerung von Peptiden

Zum Lyophilisieren wurden die Peptidlösungen zunächst bei -80 °C eingefroren. Die Fraktionen wurden unter Vakuum in einer Hetovac-Zentrifuge (VR-I, Heto-Holten, Allerød, DK) oder einer Lyophille (Christ, Alpha 1-4, Sigma, Osterode, D) gefriergetrocknet. Die Lagerung der lyophilisierten Peptide erfolgte bei -20 °C. Eine Zwischenlagerung von Peptidlösungen über kurze Zeiträume (maximal 24 h) erfolgte bei +4 °C oder -20 °C.

2.4 Enzymatische Methoden

2.4.1 Proteinase-Inhibitor-Test

Um die im Hause zur Verfügung stehenden Peptidbanken auf inhibitorische Peptide zu untersuchen, wurde ein Proteinase-Inhibitor-Test im 96-Loch Mikrotiterplatten (MTP) Format entwickelt. Dieser Test beruht auf der Reaktion eines Enzyms mit einem spezifischen chromogenen Substrat, welches einen gebundenen Farbstoff trägt. Bei der ablaufenden Reaktion wird der Farbstoff freigesetzt und kann photometrisch detektiert werden. Wird dem Reaktionsgemisch ein Inhibitor zugesetzt, kann entweder keine oder verminderte Freisetzung des Farbstoffes detektiert werden. Als Substrate kamen käuflich erworbene chemisch synthetisierte p-Nitroanilid-Peptide zur Anwendung (Tabelle 11). Bei der Hydrolyse der Peptidbindung entsteht das bei einer Wellenlänge von 405 nm detektierbare p-Nitroanilin. Ein Maß für die Aktivität der Proteinase stellt somit die zeitliche Zunahme der Absorption (Extinktion) dar.

Das initiale Screening der Peptidbankfraktionen auf inhibitorische Peptide sowie die folgenden Untersuchungen der Fraktionen jedes Reinigungsschrittes fanden in 96-Loch Mikrotiterplatten (Greiner, Frickenhausen, D) in Doppelbestimmung statt. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 100 µl pro Kavität. Als Photometer ($\lambda_{\text{Abs}} = 405 \text{ nm}$) diente ein MTP-Leser (MRX-II, Dynex Tech., Chantilly, VA, USA) in Verbindung mit der Relevation-Software, Version 4.22 (Dynex Tech., Chantilly, VA, USA). Ein Aliquot der in entionisiertem Wasser gelösten Peptidfraktion wurde mit dem Meßpuffer und dem entsprechenden Substrat in die einzelnen Kavitäten pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet (Tabelle 10). Als Kontrollen auf jeder Platte dienten Messungen ohne Peptidfraktion und ohne Inhibitor (Negativkontrolle, NC), sowie mit Inhibitor (Positivkontrolle, PC). Die verwendeten Inhibitoren sind in Tabelle 12 aufgeführt. Vor jeder Messung wurde automatisch für 3 Sekunden geschüttelt, um eine optimale Durchmischung des Reaktionsansatzes zu erreichen. Unmittelbar nach Zugabe des Enzyms erfolgte die erste Messung ($t = 0$), um die Nullwerte zu bestimmen. Weitere Meßwerte wurden nach 5, 10, 15 und 20 min, bei Messungen mit Tryptase auch nach 30 min genommen. In den Vorversuchen zur Optimierung dieses Testes wurden die erhaltenen Meßwerte direkt dargestellt

(Kap. 3.1.). Zur Auswertung der Meßergebnisse im Screening der Peptidbanken wurde eine andere Auswertungsmethode verwendet. Hier wurde der Nullwert von dem bei der letzten Messung (z.B. $t_{20 \text{ min}}$ bei Trypsin-Inhibitions-Tests) erhaltenen Messwert subtrahiert, um eventuell vorhandene Auswirkungen durch Interferenzen der Peptidfraktionen zu korrigieren. Zur graphischen Darstellung der inhibitorischen Aktivität wurde der so erhaltene Wert der letzten Messung (t_{max}) vom Extinktionswert der Negativkontrolle (E_{NC} , Enzymaktivität = 100 %, Inhibitoraktivität = 0 %) subtrahiert. Die Berechnung des Aktivitätswertes für den Inhibitor (A_{Inh}) ergibt sich aus Gleichung 1. Dieser Aktivitätswert wurde, um eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Tests zu erhalten, in Prozent der maximalen Inhibition durch den in der Positivkontrolle verwendeten Inhibitor berechnet (Gleichung 2).

$$A_{\text{Inh}} = (E_{\text{NC}} - E_{t_0}) - (E_{t_{\text{max}}} - E_{t_0})$$

Gleichung 1: Berechnung des Aktivitätswertes A_{inh} für die inhibitorischen Substanzen im Proteinase-Inhibitor-Test.

$$A_{\text{Inh}} [\%] = A_{\text{Inh}} / (E_{\text{PC}} \cdot 100)$$

Gleichung 2: Berechnung des Aktivitätswertes A_{inh} in Prozent der maximalen Inhibition durch die Positivkontrolle (PC).

Tabelle 10: Pipettierschema für den 96-Loch MTP Trypsin-Inhibitor-Test.

	Probe [µl]	Negativ-Kontrolle [µl]	Positiv-Kontrolle [µl]	Konz. der Stammlösungen
Fraktion	1-10	-	-	
α1-AT	-	-	10	100 µg/ml
L-BAPNA	2,5	2,5	2,5	2 mM
Puffer	auf 50	47,5	37,5	
	Angegebene Volumina in einzelne Kavitäten vorlegen			
Trypsin-Lsg. in Meßpuffer	50	50	50	10 µg/ml
	Zum Starten der Reaktion in die Kavitäten zugeben			

2.4.2 Enzymatische Einzelmessungen

Die Bestimmungen der IC_{50} -Werte der isolierten Inhibitoren sowie die Analyse ihrer Wirkung auf andere Proteinase wurden in Einzelmessung in einer Küvette durchgeführt. Der IC_{50} -Wert bezeichnet die Konzentration eines Inhibitors, bei dem die Aktivität eines Enzyms zu 50 % gehemmt ist. Die Messungen fanden in einem Gesamtvolumen von 100 μ l in einer Mikro-Quarküvette (Typ 104F-QS, 10 mm Schichtdicke, Hellma, Müllheim, D) statt. Als Spektralphotometer diente ein „DU 640“ der Firma Beckman (München, D) mit temperierbarem Küvettenhalter in Verbindung mit einem „MultiTempII“-Thermostat der Firma Pharmacia (Freiburg, D). Die Methode der enzymatischen Reaktion und das Detektionsprinzip sind identisch mit den Erläuterungen im vorhergehenden Kapitel. Alle Aktivitätsbestimmungen wurden bei 405 nm und 25 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe entweder des Enzyms oder des Substrates gestartet. Es erfolgte eine Messung der Absorption über 3-10 min mit unterschiedlichen Proteinase- und Inhibitorkonzentrationen. Aus diesen Werten wurde dann die Extinktionszunahme je Zeiteinheit ($\Delta E/\Delta t$) für die einzelnen Messungen berechnet. Zur graphischen Darstellung wurde $\Delta E/\Delta t$ als prozentuale Enzymaktivität angegeben, wobei der Quotient der Messungen ohne Inhibitorzusatz eine Aktivität von 100 % darstellt.

Alle verwendeten Proteinase mit den dazugehörigen chromogenen Substraten und Meßpuffern sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tabelle 11: Verwendete Proteinase, Substrate und Meßpuffer.

Proteinase	chromogenes Substrat	Meßpuffer
Trypsin aus Rinderpankreas	N α -Benzoyl-L-Arginin p-Nitroanilid (L-BAPNA)	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,01 % (v/v) Triton X-100
Thrombin aus Rinderplasma	N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg p-Nitroanilid (Chromozym [®] TH)	50 mM Tris-HCl, pH 8,3 227 mM NaCl 0,01 % (v/v) Triton X-100
Tryptase, rek. β -Tryptase, humane Lunge,	N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg p-Nitroanilid (Chromozym [®] TH)	50 mM Tris-HCl, pH 8,3 500 mM NaCl 0,01 % (v/v) Triton X-100

Tabelle 12: Inhibitoren für die verwendeten Proteinasen

Proteinase	Inhibitor (Konzentration im Test)
Trypsin	α -1 Antitrypsin (10 μ g/ml)
Thrombin	Pefabloc [®] SC (5 μ g/ml)
Tryptase	

Die Untersuchungen zur Inhibition von Trypsin fanden mit dem in Tabelle 11 angegebenen Substrat und Puffer statt. Als Stammlösung diente eine Trypsinlösung mit einer Konzentration von 200 μ g/ml in 10 mM HCl, die im Falle des MTP-Tests vor der Messung mit Puffer auf 10 μ g/ml verdünnt wurde, sowie 20 μ g/ml bei der Durchführung in der Küvette. Die Konzentrationen im Reaktionsansatz betragen 5 μ g/ml im Test und 2 μ g/ml bei der Durchführung in der Küvette. Das verwendete Substrat L-BAPNA wurde in wasserfreiem Ethanol gelöst (Stammlösung 2 mM).

Für die Messungen in der Küvette (IC_{50} -Wert) wurde der zu untersuchende Inhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen und Volumina (0-10 μ l) eingesetzt. Es wurden 80 μ l einer Mischung von L-BAPNA (50 μ M Endkonzentration) in Meßpuffer zugesetzt und mit H₂O auf 90 μ l aufgefüllt. Der Start der Reaktion erfolgte dann durch Zugabe von 10 μ l Trypsinlösung (2 μ g/ml Endkonzentration). Die Messungen zur Bestimmung der temporären Inhibition erfolgten entsprechend, jedoch wurden Trypsin und die zu untersuchende LEKTI-Domäne vorgelegt. Die Messung wurde durch Zugabe des Substrates gestartet.

Inhibitionsuntersuchungen mit der Serinproteinase Thrombin fanden in einem Meßpuffer statt, dessen Zusammensetzung in Tabelle 12 angegeben ist. N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg-p-Nitroanilid (Chromozym[®]TH) ist ein spezifisches, chromogenes Substrat für Thrombin (LOTTENBERG ET AL., 1983). Die im Test eingesetzten Konzentrationen betragen 50 μ M für das Substrat und 1 μ g/ml für Thrombin. Die Testmethode entsprach der für Trypsin angegebenen.

Der Test zur Identifizierung von Tryptase-Inhibitoren wurde nach BURGESS ET AL., (1999) nach gleicher Methode mit dem Thrombin-Substrat Chromozym[®]TH (100 mM) durchgeführt. Das Enzym wurde in einer Konzentration von 40 ng/ml verwendet.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Entwicklung eines Tests im 96-Loch Mikrotiterplatten Format zur Identifizierung von Proteinase-Inhibitoren

Verfahren zur Bestimmung der Aktivität einer Proteinase sind seit langem bekannt. Als einfach durchzuführende und sensitive Methode hat sich die Aktivitätsbestimmung mit chromogenen Substraten erwiesen (LOTTENBERG ET AL., 1983). Mit dieser Methode kann die Freisetzung eines im Substrat gebundenen, inaktiven Farbstoffes durch eine Proteinase mit einem Spektralphotometer gemessen werden. Dabei kann auch die Wirkung eines Inhibitors bestimmt werden. Prinzipiell werden diese Tests in Küvetten durchgeführt.

Ziel der Entwicklung dieses Tests war es, in einer Peptidbank mit bis zu 450 Fraktionen nach Proteinase-Inhibitoren zu suchen. Diese hohe Probenzahl erforderte eine Anpassung des Testsystems an das 96-Loch Mikrotiterplattenformat. Folgende Bedingungen wurden an das Testsystem gestellt:

- Schnelle Durchführbarkeit (Gesamtdauer max. 1 h pro Platte)
- Selektive Detektion eines Inhibitors in einem Peptidgemisch
- Adaptionmöglichkeit auf möglichst viele Proteinase

Als Enzym wurde für die Entwicklung dieses Tests Trypsin gewählt, da etablierte Substrate und Inhibitoren zur Verfügung stehen, und es darüber hinaus kostengünstig zu erhalten ist. Ein weiterer Grund für die Verwendung von Trypsin war die geplante Verwendung des Testsystems zur Suche nach weiteren, Trypsin-inhibierenden LEKTI-Domänen. Wie in Kap. 1.6 beschrieben, sind in unserem Hause zwei Domänen dieses Multidomänen Serinproteinase-Inhibitors aus Hämofiltrat isoliert worden (MÄGERT ET AL., 1999). Um den Test zu optimieren, wurden Messungen mit verschiedenen Enzym-, Substrat- und Inhibitorkonzentrationen in Mikrotiterplatten durchgeführt. Verschiedene Konzentrationen des verwendeten Inhibitors (α_1 -Antitrypsin) wurden zugesetzt, um die für die Positivkontrolle optimale Konzentration zu ermitteln. Während bei der Positivkontrolle das Enzym vollständig gehemmt werden sollte, war bei den Messungen ohne Inhibitorzusatz eine deutliche Farbstofffreisetzung aus dem Substrat (Anstieg der

OD bei 405 nm) erforderlich. Alle Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Abbildung 9 zeigt exemplarisch die Inhibitionskurven von Trypsin (5 µg/ml), bei einer Substratkonzentration von 50 µM und unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen.

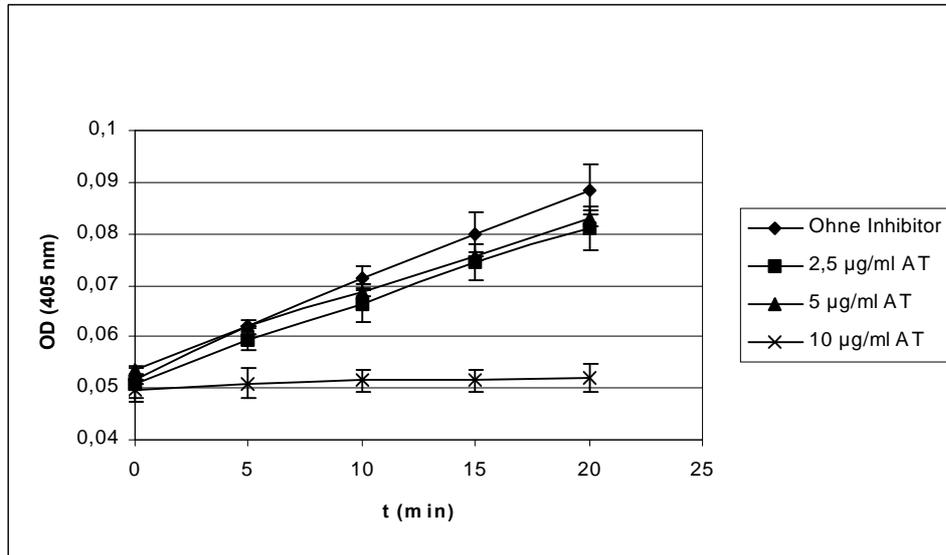


Abbildung 9: Bestimmung der optimalen Inhibitorkonzentration für Trypsin im 96-Loch MTP Format.
Konzentrationen: Trypsin: 5 µg/ml, L-BAPNA: 50 µM, α1-Antitrypsin (AT) wie angegeben.
Die dargestellten Werte stellen Mittelwert und Standardabweichung der Doppelbestimmungen dar.

Diese Messung zeigte, daß bei einer Konzentration von 10 µg/ml α₁-Antitrypsin kein Farbstoff aus dem Substrat freigesetzt wurde, und damit keine Trypsinaktivität mehr zu beobachten war. Der Anstieg der OD durch den freigesetzten Farbstoff des Substrates in den Messungen ohne Inhibitor war gleichmäßig und mit einer Differenz von 0,04 Einheiten über 20 min signifikant von der völligen Inhibition zu unterscheiden. Bei der Untersuchung von Peptidbanken ist zu beachten, daß ein potentieller Inhibitor in einer Peptidbankfraktion nicht allein und in hoher Konzentration vorliegt, sondern in einer Mischung von bis zu 1000 verschiedenen Peptiden und in möglicherweise sehr geringer Konzentration. Somit war es bei der Entwicklung dieses Tests von großer Wichtigkeit, die Enzymkonzentration so gering wie möglich zu halten, um auch die Wirkung gering konzentrierter Inhibitoren in den einzelnen Fraktionen zu erfassen. Andererseits mußte die Konzentration des Enzyms hoch genug sein, um ein ausreichendes Signal zu erhalten, welches sich signifikant von den verwendeten Kontrollen unterscheidet. Vor dem Hintergrund dieser Erfordernisse wurde die HF-

Peptidbank mit einer Trypsinkonzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$, einer Substratkonzentration von 50 μM und einer InhibitorKonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ untersucht.

3.2 Adaption des Trypsin-Inhibitor-Tests auf die Proteinase Thrombin und Tryptase

Um auch Inhibitoren anderer Proteinase wie Thrombin oder Tryptase detektieren zu können bzw. diese in Peptidbanken zu identifizieren, wurde der Test auf diese Proteinase adaptiert. Für Tryptase sind bisher keine endogenen peptidischen Inhibitoren bekannt. Als Reagenzien kamen die in Kapitel 2.4.1 angegebenen Substrate, Inhibitoren und Puffer zur Anwendung. Auch hier wurde in Versuchsreihen die optimale Konzentration jeder einzelnen Komponente bestimmt, die Ergebnisse sind in den Abbildungen 10 und 11 zusammengefaßt.

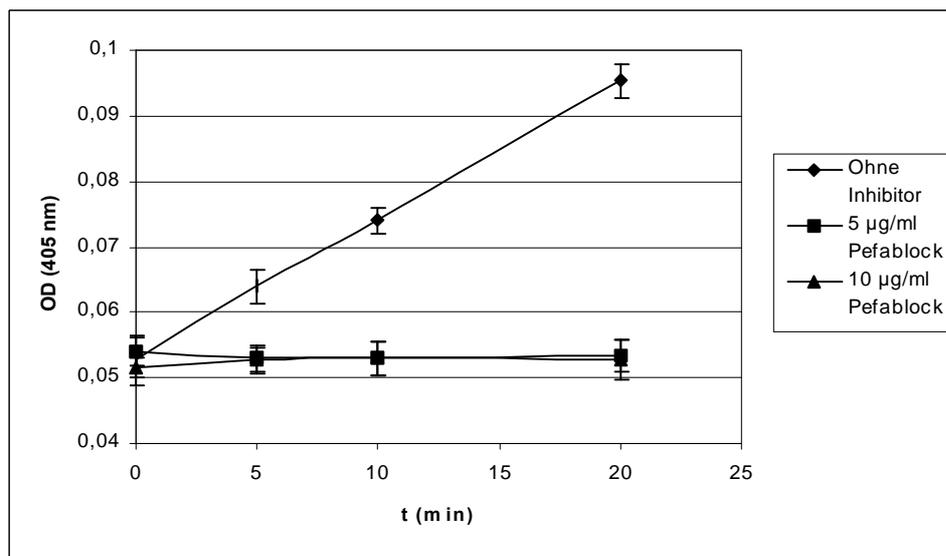


Abbildung 10: Bestimmung der optimalen InhibitorKonzentration für Thrombin im 96-Loch MTP Format.
Konzentrationen: Thrombin 1 $\mu\text{g/ml}$, Chromozym TH 50 μM , Pefablock wie angegeben.
Die dargestellten Werte stellen Mittelwert und Standardabweichung der Doppelbestimmungen dar.

Für nicht inhibiertes Thrombin zeigte sich bei den eingesetzten Konzentrationen von 1 $\mu\text{g/ml}$ und 50 μM für das verwendete Substrat Chromozym[®] TH innerhalb von 20 min Meßzeit ein Anstieg der OD-Werte. Die Differenz der OD in den Messungen mit und ohne Inhibitor betrug 0,045 Einheiten und war damit signifikant zu unterscheiden. Der

Inhibitor Pefablock zeigte in den getesteten Konzentrationen von 5 bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ eine komplette Hemmung der Thrombin-Aktivität. Somit ist als Positivkontrolle (PC) für die Untersuchung der HF-Peptidbank auf Thrombininhibitoren eine Inhibitorkonzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ ausreichend.

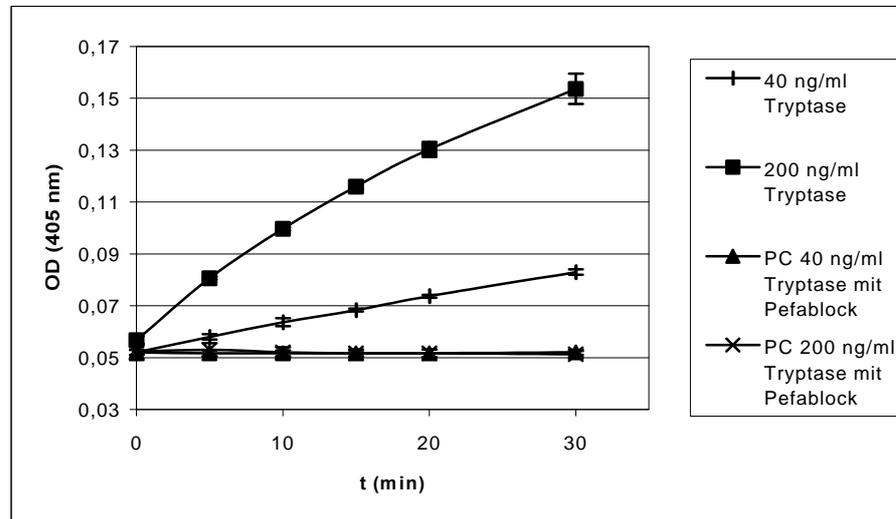


Abbildung 11: Bestimmung der optimalen Tryptasekonzentration im 96-Loch MTP Format. In diesem Versuch wurde Tryptase in Konzentrationen von 40 und 200 ng/ml eingesetzt. Die Substratkonzentration betrug 50 μM (Chromozym TH), als Inhibitor wurde Pefablock in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Die dargestellten Werte stellen Mittelwert und Standardabweichung der Doppelbestimmungen dar.

Bei den in Abbildung 11 dargestellten Versuchen zur Bestimmung der optimalen Tryptasekonzentration zeigte sich, daß bei einer Tryptasekonzentration von 200 ng/ml zwar eine komplette Hemmung durch Pefablock in der Positivkontrolle erreicht werden konnte, der Anstieg der OD aber nicht linear war. Das läßt darauf schließen, daß die Konzentration zu hoch gewählt wurde, was möglicherweise zu fehlerhaften Ergebnissen in der Untersuchung der Peptidbank führen könnte. Bei einer Konzentration von 40 ng/ml Tryptase hingegen konnte ein linearer Anstieg der OD über 30 min festgestellt werden. Die Differenz in der OD zur Positivkontrolle betrug 0,03 Einheiten, wodurch eine gute Bewertung inhibitorischer Aktivitäten möglich war. Mit diesen für Thrombin und Tryptase ermittelten Parametern wurde die Hämofiltrat-Peptidbank auf inhibitorische Peptide untersucht.

3.3 Screening der Hämofiltrat-Peptidbank nach Proteinase-inhibitorischen Peptiden

Für das Screening der Hämofiltrat-Peptidbank (450 Fraktionen) nach Trypsin-inhibitorischen Peptiden wurden lyophilisierte 5 l Aliquots der Peptidbank verwendet, in denen jeweils fünf aufeinander folgende HPLC Fraktionen vereinigt waren (5-Fraktionenspool). Dieses Vorgehen reduzierte die Anzahl der zu untersuchenden Fraktionen von 450 auf 92. Die lyophilisierten Aliquots wurden in 250 µl entionisiertem Wasser aufgenommen. Je 5 µl dieser Lösungen (100 ml HF-Äquivalente), wurden pro Messung in einer einzelnen Kavität eingesetzt. Die Untersuchung der Einzelfraktionen der Peptidbank erfolgte in Konsequenz detektierter inhibitorischer Aktivität in den 5-Fraktionenspools.

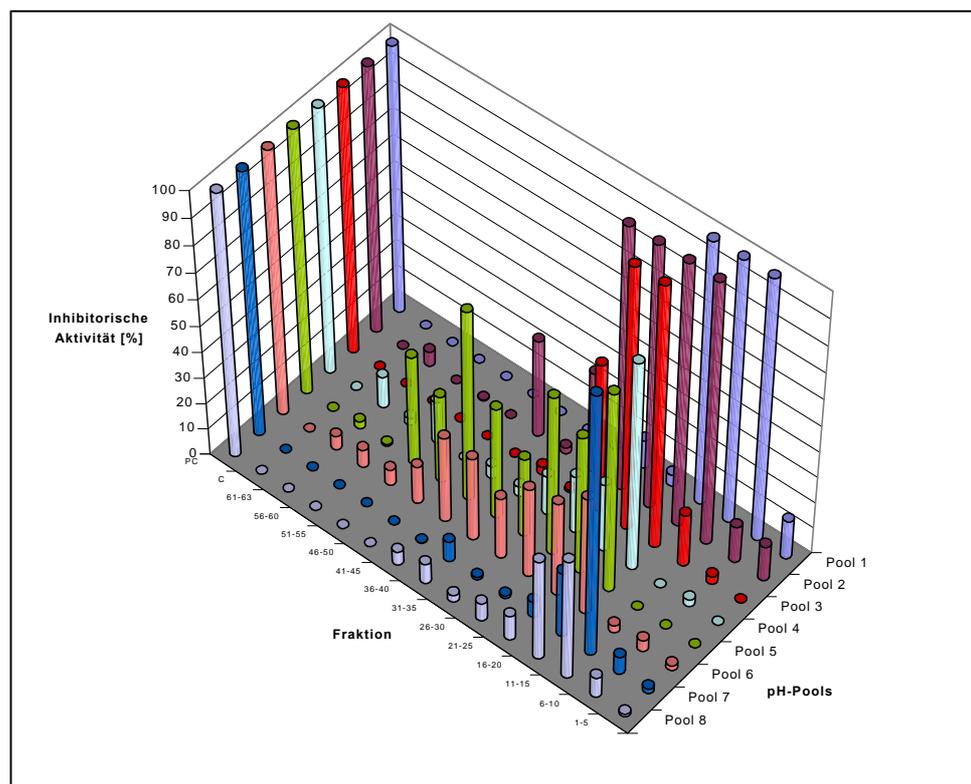


Abbildung 12: Trypsin-inhibitorische Aktivität der HF-Peptidbank (5-Fraktionenspools). Komplette Inhibierung von Trypsin wurde durch das in der Positiv-Kontrolle (PC) eingesetzte α 1-Antitrypsin erreicht und entspricht 100 % inhibitorische Aktivität. Im Test eingesetzte Konzentrationen: Trypsin 5 µg/ml, α 1-AT 100 µg/ml, L-BAPNA 50 µM, Fraktionen 100 ml Äq. HF.

Bei der Untersuchung der HF-Peptidbank mit dem Trypsin-Inhibitor-Test (Abbildung 12) konnte in zahlreichen Fraktionen inhibitorische Aktivität nachgewiesen

werden. Die stärkste Inhibition wurde in den Fraktionen der pH-Pools 1-3 detektiert. Eine komplette Inhibierung von Trypsin wurde in Pool 1 in den vereinigten Fraktionen 11-20 detektiert. In pH-Pool 2 zeigten die vereinigten Fraktionen 6-20, in pH-Pool 3 die vereinigten Fraktionen 16-25 eine vollständige Inhibierung. In den pH-Pools 4 bis 8 fanden sich einzelne stark und viele schwach aktive Fraktionen. Um eine genauere Charakterisierung der inhibierenden Fraktionen durchzuführen, wurden die Einzelfraktionen der pH-Pools mit starker Aktivität nochmals getestet. Abbildung 13 zeigt das Chromatogramm und die Trypsin-inhibitorische Aktivität in pH-Pool 3. Der Versuch wurde mit 25 ml HF-Äquivalenten einer jeden Fraktion durchgeführt.

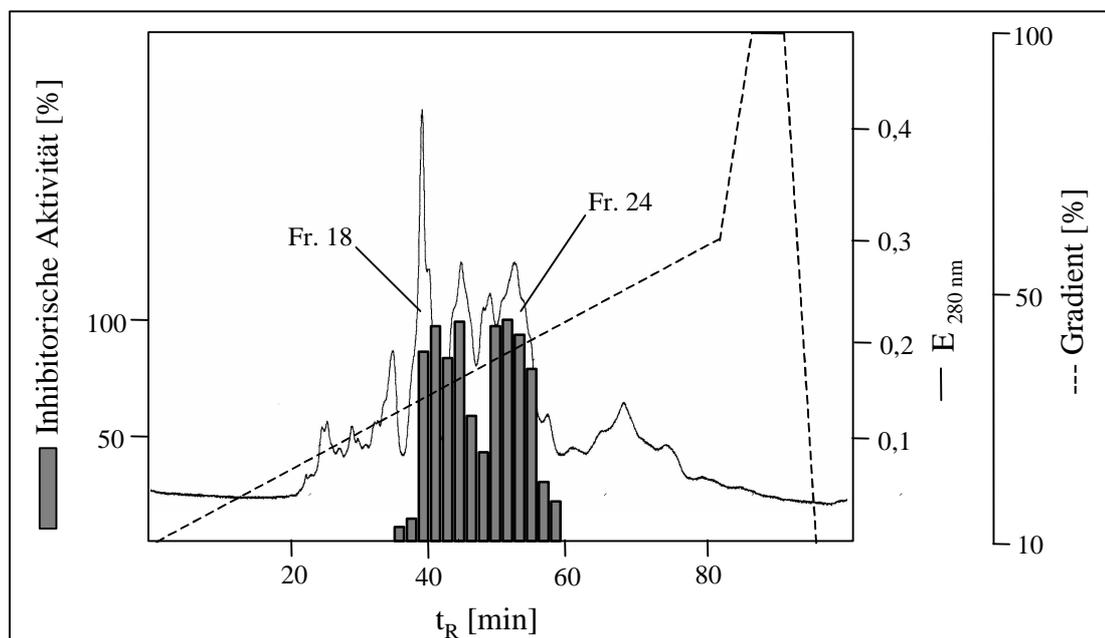


Abbildung 13: Trypsin-inhibitorische Aktivität der Peptidbankfraktionen von pH-Pool 3. 25 ml HF-Äquivalente pro Fraktion, Testbedingungen wie in Kap. 3.1 angegeben.

Die aktiven Substanzen eluierten zwischen der Minute 38 (Fr. 15) und der Minute 59 (Fr. 28). Die höchsten Aktivitäten waren in den Fraktionen 18, 20 und 24 zu detektieren. Für die nachfolgende Isolierung der inhibitorischen Peptide wurden die Fraktionen 18 und 24 gewählt.

Es konnten keine inhibitorischen Aktivitäten gegen Thrombin und Tryptase im Hämofiltrat gefunden werden. Der bekannte Thrombin-Inhibitor α_1 -Antithrombin liegt mit einem Molekulargewicht von ca. 49.000 Da oberhalb der Ausschlußgrenze der Hämofiltration (20 kDa) und ist deshalb nicht in der verwendeten Peptidbank enthalten.

3.4 Chromatographisches Verfahren zur Reindarstellung von inhibitorischen Peptiden

Die optimale chromatographische Reinigungsstrategie für ein Peptid orientiert sich unter anderem an seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften. Eine erste Einschätzung dieser Eigenschaften ist über das Elutionsverhalten bei der Herstellung der Peptidbank möglich (siehe Kap. 1.5). Die in dieser Arbeit zu isolierenden Peptide mit Trypsin-inhibitorischen Aktivitäten stammten aus pH-Pool 3 der CEC-Chromatographie (Elution mit 0,1 M Maleinsäure, pH 5,0), daher sollten sie einen neutralen bis leicht sauren pI besitzen. In der nachfolgenden RP-Chromatographie eluierten sie bei einem Acetonitrilanteil von 30 bis 40 %. Folglich zeichnen sie sich weder durch besonders hydrophile noch hydrophobe Eigenschaften aus. Auf der Basis dieser initialen Betrachtungen erschien eine Kombination von konsekutiven RP- und Kationenaustausch-Chromatographieschritten zur Reindarstellung dieser inhibitorischen Peptide als erfolgversprechend. Dabei wurden in den Reinigungsschritten der unterschiedlichen inhibitorisch aktiven Peptide verschiedenen Materialien eingesetzt, abhängig von dem aus den vorhergehenden Chromatographien ersichtlichen Trennverhalten der Probe. In den letzten Trennschritten wurde analytisches RP-Material verwendet. Dieses Material erhöht durch sehr kleine Poren- und/oder Partikelgröße, in Verbindung mit einem sehr flachen Gradienten von 0,25 % B/min, die Trennleistung.

Im folgenden ist das Trennverfahren beschrieben, welches zur Isolierung der inhibitorischen Peptide aus der HF-Peptidbank verwendet wurde. Die hohe Empfindlichkeit des Testsystems erlaubte es, die Verluste an aktivem Material gering zu halten. In den Tests auf inhibitorische Aktivität in den Fraktionen der einzelnen Chromatographiestufen bei der Isolierung von HF 7665 wurden HF-Äquivalentmengen zwischen 100 ml und 6 l bei einer Ausgangsäquivalentmenge von 1.000 l HF verwendet. Prinzipiell wurden die bei den einzelnen Chromatographieschritten entstandenen inhibitorisch aktiven Fraktionen vereinigt und zur weiteren Trennung einer neuerlichen Chromatographie unterzogen.

Die Aufklärung der Primärstruktur der gereinigten Peptide erfolgte durch N-terminale Sequenzierung mit Hilfe des Edman-Abbaus (Kap. 2.2.3). Die Aminosäuresequenz der ersten 50 Aminosäuren kann mittels dieser Methode bestimmt werden. Diese Abfolge

reicht aus, um die Identität des Peptides eindeutig durch Datenbankvergleich zu ermitteln. Die erhaltenen Peptidsequenzen wurden mit Eintragungen aus der Swissprot-, EMBL-, oder NCBI-Datenbank mit Hilfe des BLAST-Algorithmus verglichen. Bei größeren Peptiden nutzt man zusätzlich die exakte, durch MALDI-TOF-MS oder ESI-MS gemessene molekulare Masse. Auf diese Weise lassen sich nicht sequenzierte C-terminale Aminosäuren des Peptides über Datenbankabfrage zuordnen. Werden bei diesem Vergleich der molekularen Massen Abweichungen festgestellt, die z.B. von Modifikationen verursacht werden können, oder handelt es sich um ein großes Peptid (>10.000 Da), muß eine enzymatische Spaltung des Peptides mit anschließender Trennung der Fragmente über RP-Chromatographie und weiterer Edman-Analytik durchgeführt werden.

3.5 Isolierung von HF 7665

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von HF 7665 diente Fraktion 18 aus dem pH-Pool 3 der Hämofiltrat Peptidbank (s. Kap. 3.3, Abbildung 13).

Den ersten Chromatographieschritt zur Reinigung von inhibitorischen Peptiden aus einer HF-Peptidbankfraktion stellte eine RP-Chromatographie dar. Eine Einwaage von 522 mg der lyophilisierten Peptidbankfraktion (1.000 l HF-Äquivalente) wurde in entionisiertem Wasser gelöst, über eine 0,45 µm Membran filtriert und auf eine präperative RP C-18 Säule aufgetragen. Die gebundenen Peptide wurden dann durch einen linearen Anstieg von ACN im Elutionsmittel (Eluent A: 10 mM HCl; Eluent B: 10 mM HCl in 80 % ACN (v/v)) getrennt von der Säule eluiert. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität in den resultierenden Fraktionen ergab ein Maximum in Fraktion 17 (Abbildung 14A). Die Fraktionen 16 und 17 wurden für den nächsten Chromatographieschritt ausgewählt und vereinigt.

Im zweiten Chromatographieschritt wurde die stationäre Phase beibehalten. Zur Änderung der Trenneigenschaften fand Methanol als flüssige Phase (Eluent B) Anwendung. Der lineare Anstieg des Methanol-Gradienten betrug 1 % B/min. Diese Chromatographie führte zur weiteren Abtrennung verunreinigender Peptide. Maximale

inhibitorische Aktivitäten wurden in den Fraktionen 11 und 12 detektiert (Abbildung 14B). Diese Fraktionen wurden vereinigt und einer weiteren Trennung unterzogen.

Den dritten Reinigungsschritt stellte eine RP Chromatographie mit C-4 Material dar, wodurch die Elutionsbedingungen für die Peptide verändert wurden. Als Elutionsmittel dienten 0,1 % TFA als Eluent A und 0,1 % TFA in 80 % ACN (v/v) als Eluent B. Um die Trennleistung zu erhöhen, wurde ein Gradient von 0,5 % Eluent B/min verwendet. Ein Maximum der Trypsin-inhibitorischen Aktivität konnte in den Fraktionen 25-27, ein weiteres in Fraktion 30 detektiert werden (Abbildung 14C). Die begleitende Analyse aller erhaltenen Fraktionen mit MALDI-TOF-MS zeigte in Fraktion 25 ein Signal von 7665 Da, welches auf die gesuchte LEKTI Domäne HF 7665 hinwies (o. Abb.). Da sich in diesem Reinigungsschritt die inhibitorische Aktivität in zwei verschiedenen Bereichen zeigte, wurden die Fraktionen 25-29 (1. Maximum) getrennt von Fraktion 30 (2. Maximum), siehe Kap. 3.6, einer weiteren Reinigung unterzogen.

Nach diesen drei aufeinanderfolgenden RP-Chromatographieschritten zeigte sich eine breitere Elution der aktiven Substanzen. Im Hinblick auf den erwarteten neutralen bis schwach sauren pI der Peptide wurde als vierter Reinigungsschritt eine Kationenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Die ausgewählten Fraktionen 25-29 wurden auf einer Kationenaustauschersäule mit einem Natriumphosphat-Puffersystem bei einem pH-Wert von 3,5 gebunden und durch linearen Anstieg von NaCl im Elutionspuffer eluiert (Abbildung 14D). Abbildung 14D verdeutlicht die gute Trennung der inhibitorisch aktiven Peptide mit hoher Retentionszeit von den inaktiven mit niedriger Retentionszeit. Wie bereits im vorangegangenen Trennschritt zeigte sich auch hier die Separation von zwei unterschiedlichen Aktivitäten. Die Hauptaktivitäten wurden in den Fraktionen 42-43 sowie 45-47 detektiert. In den Fraktionen 41-43 konnte mittels MALDI-TOF-MS das erwartete HF 7665 gefunden werden. Somit erfolgte die weitere chromatographische Trennung der Fraktionen 41-43 getrennt von den Fraktionen 45-47 (Kap. 3.7).

Die vereinigten Fraktionen 41-43 wurden in einem fünften Schritt über eine RP C-5 Phase chromatographiert. Als Elutionsmittel dienten 0,1 % TFA als Eluent A und 0,1 % TFA in 80 % ACN (v/v) als Eluent B (Abbildung 14E). Nach diesem Chromatographieschritt war die Hauptaktivität der Inhibition in den Fraktionen 33 und

34 lokalisiert. Weiterhin zeigte sich eine schwache Aktivität in Fraktion 36, die separat chromatographiert wurde (Kap. 3.8). Da im MALDI-TOF Massenspektrum von Fraktion 34 zwar ein deutliches Signal von 7665 Da, aber auch noch weitere, von Verunreinigungen stammende Signale detektiert werden konnten (o. Abb.), wurden weitere Isolierungsschritte durchgeführt.

Der sechste Reinigungsschritt wurde mit einer C-18 Phase als RP-Chromatographie durchgeführt. In diesem Schritt wurden die aktiven Fraktionen 33 und 34 aus der fünften Rechromatographie vereinigt und unter Verwendung von 0,06 % TFA als Eluent A sowie 0,05 % TFA in 80 % ACN (v/v) als Eluent B aufgetrennt (Abbildung 14F). Zur besseren Trennung der Peptide wurde ein flacher Gradient mit einer Steigung von 0,5 % B/min gewählt. Auch in diesem Schritt konnten inaktive (Peaks bei 25 min) von aktiven Peptiden in den Fraktionen 35 und 36 effektiv abgetrennt werden. Die Fraktionen 35 und 36 wurden daraufhin einer weiteren Kationenaustausch-Chromatographie unterzogen.

Für diesen siebten Reinigungsschritt auf einer analytischen Kationenaustauschersäule wurde ein Kaliumphosphat-Puffersystem bei pH 4,5 gewählt, da mit Kaliumphosphat prinzipiell eine bessere Trennung im Vergleich zu Natriumphosphat zu erreichen ist (Abbildung 14G). Die Elution erfolgte mit KCl in Puffer B (1 % B/min). Ein flacherer Gradient als 1 % B/min ist in der Kationenaustausch-Chromatographie nicht von Vorteil, da eine Peakverbreiterung eintreten würde. Die stärkste inhibitorische Aktivität konnte in Fraktion 26 detektiert werden, die mit dem Hauptpeak des Chromatogrammes übereinstimmte. Um ein sauberes Produkt zu erhalten, wurde die Fraktion 26 einem abschließenden analytischen RP-Schritt unterzogen.

Der achte und letzte Reinigungsschritt erfolgte mit analytischem RP-Material (Abbildung 14H). Als Elutionsmittel wurden 0,06 % TFA (Eluent A) und 0,05 % TFA in 80 % ACN (v/v) (Eluent B) bei einem Gradienten von 0,25 % B/min gewählt. Das Peptid HF 7665 konnte in Fraktion 22 rein dargestellt werden.

Die molekulare Masse des gereinigten Peptides wurde abschließend mit MALDI-TOF-MS bestimmt (Abbildung 14I). In der MALDI-TOF-MS Messung zeigten sich nur Signale, die auf ein Peptid mit einer Molekularmasse von 7665 Da zurückzuführen

waren. Der Reinheitsgrad des erhaltenen Peptides wurde mit Hilfe der Kapillarzonelektrophorese überprüft. Im Elektropherogramm sollte die Substanz mit mindestens 95 % Reinheit detektierbar sein, im Falle des HF 7665 konnte eine Reinheit von 96,5 % ($\lambda = 214 \text{ nm}$) erreicht werden (Abbildung 14J).

Abbildung 14 (A-H) zeigt die Chromatogramme der einzelnen Reinigungsschritte. Die mit dem entwickelten Test detektierten inhibitorischen Aktivitäten sind durch graue Balken dargestellt. Die jeweiligen Detektionswellenlängen und Extinktionswerte sind an der rechten Ordinate angegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde hier auf eine graphische Angabe des Gradienten verzichtet. Der verwendete Trenngradient sowie der Startzeitpunkt des Trenngradienten (t_{GS}) sind in der jeweiligen Legende angegeben.

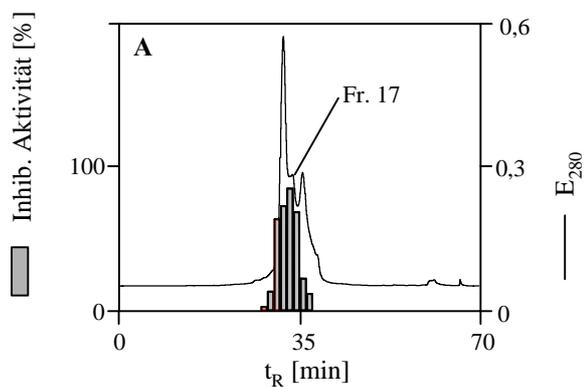


Abbildung 14A: RP-Chromatogr. von Fr. 18, pH-Pool 3 der HF Peptidbank.
Säule: Bakerbond RP C-18, 47 x 300 mm, 300 Å, 15–30 µm.
Eluent A: 10 mM HCl; B: 80 % ACN in 10 mM HCl (v/v). Flußrate: 40 ml/min. Gradient: 10-60 % B in 50 min, $t_{GS} = 10 \text{ min}$.
Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 100 ml.
Fraktion 16 und 17 wurden vereinigt und rechromatographiert (\Rightarrow Abb. 14B).

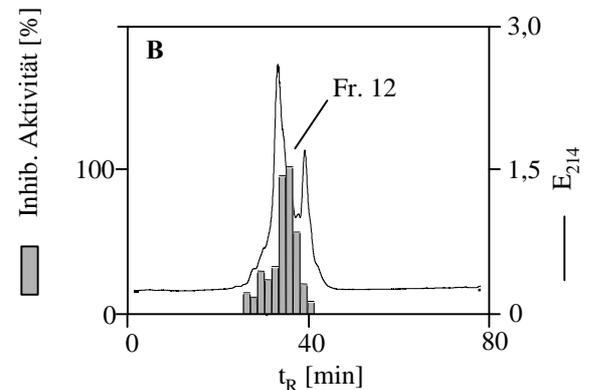


Abbildung 14B: RP-Chromatogr. von Fr. 16+17 des ersten Trennschrittes (Abb. 14A).
Säule: Vydac RP C-18, 47 x 300 mm, 300 Å, 15-30 µm.
Eluent A: 10 mM HCl in 30 % MeOH; B: 10 mM HCl in MeOH. Flußrate: 30 ml/min.
Gradient: 5-65 % B in 60 min, $t_{GS} = 10 \text{ min}$.
Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 150 ml.
Fraktion 11 und 12 wurden vereinigt und rechromatographiert (\Rightarrow Abb. 14C).

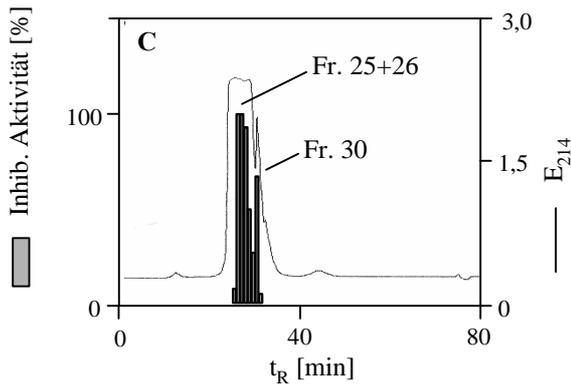


Abbildung 14C: RP-Chromatogr. von Fr. 11 + 12 aus Abb. 14B. Säule: Biotek Silica RP C-4, 20 x 250 mm, 100 Å, 5 µm. Eluent A: 0,1 % TFA; B: 0,1 % TFA in 80 % ACN (v/v). Flußrate: 7 ml/min. Gradient: 25-50 % B in 50 min, $t_{GS} = 10$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 500 ml. Fraktion 25 bis 29 wurden vereinigt und rechromatographiert (\Rightarrow Abb. 14D).

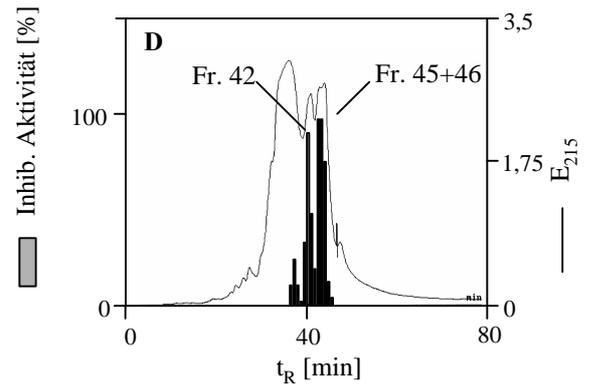


Abbildung 14D: CEC-Chromatogr. von Fr. 25-29 aus Abb. 14C. Säule: Biotek Pepkat, 10 x 125 mm, 1000 Å, 7 µm. Eluent A: 50 mM NaH_2PO_4 pH 3,5; B: 50 mM NaH_2PO_4 , 1,5 M NaCl, pH 3,5. Flußrate: 2 ml/min. Gradient: 0-70 % B in 70 min, $t_{GS} = 0$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 2,5 l. Fraktion 41 bis 43 wurden vereinigt und rechromatographiert (\Rightarrow Abb. 14E).

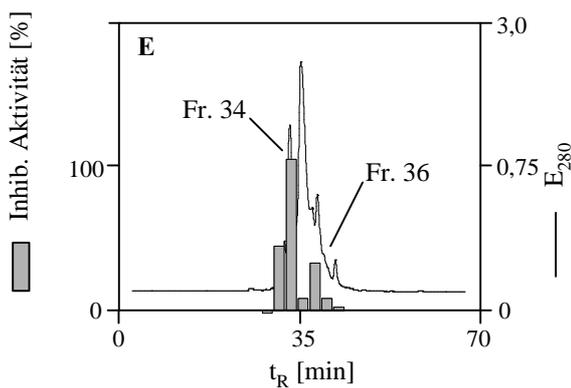


Abbildung 14E: RP-Chromatogr. von Fr. 41-43 aus Abb. 14D. Säule: Phenomenex Jupiter C-5, 10 x 250 mm, 300 Å, 5 µm. Eluent A: 0,1 % TFA; B: 0,1 % TFA in 80 % ACN (v/v). Flußrate: 1,8 ml/min. Gradient: 20-40 % B in 40 min, $t_{GS} = 5$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 4 l. Fraktion 33 und 34 wurden vereinigt und rechromatographiert (\Rightarrow Abb. 14F).

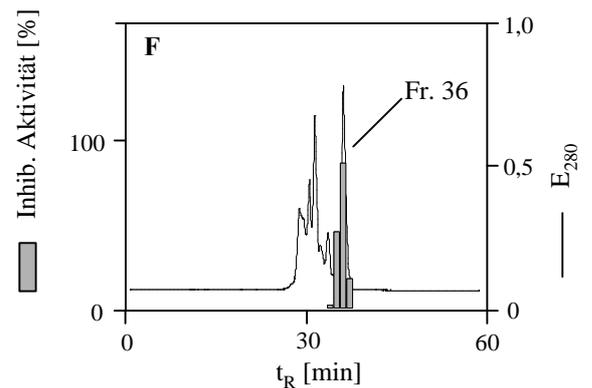


Abbildung 14F: RP-Chromatogr. von Fr. 33+34 aus Abb. 14E. Säule: Phenomenex Aqua C-18, 10 x 125 mm, 300 Å, 5 µm. Eluent A: 0,1 % TFA; B: 0,1 % TFA in 80 % ACN (v/v). Flußrate: 1,8 ml/min. Gradient: 20-40 % B in 40 min, $t_{GS} = 5$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 4,5 l. Fraktion 35 und 36 wurden vereinigt und rechromatographiert (\Rightarrow Abb. 14G).

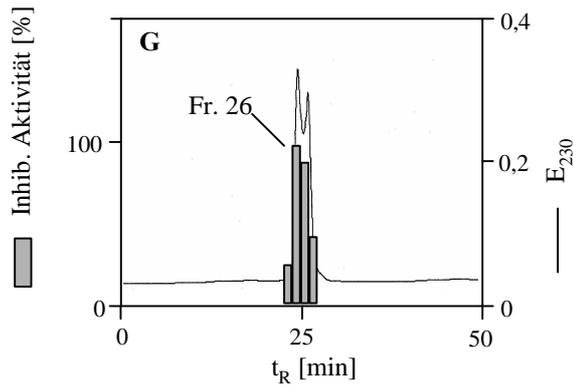


Abbildung 14G: CEC-Chromatogr. von Fr. 35+36 aus Abb. 14F. Säule: Biotek Pepkat, 4 x 125 mm, 300 Å, 5 µm. Eluent A: 50 mM KH₂PO₄, pH 4,5; B: 50 mM KH₂PO₄, 1,5 M KCl, pH 4,5. Flußrate: 0,75 ml/min. Gradient: 0-40 % B in 40 min, $t_{GS} = 0$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 5 l. Fraktion 26 wurde rechromatographiert (⇒ Abb. 14H).

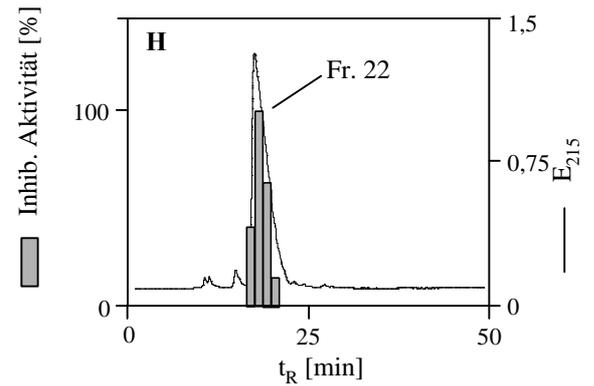


Abbildung 14H: Analytische RP-Chromatogr. von Fr. 26 aus Abb. 14G. Säule: Tosoh, TSK Gel Super-ODS, 4,6 x 100 mm, 300 Å, 2 µm. Eluent A: 0,06 % TFA; B: 0,05 % TFA in 80 % ACN (v/v). Flußrate: 0,7 ml/min. Gradient: 25-35 % B in 40 min, $t_{GS} = 5$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 6 l. Aus Fraktion 22 konnte HF 7665 rein dargestellt werden.

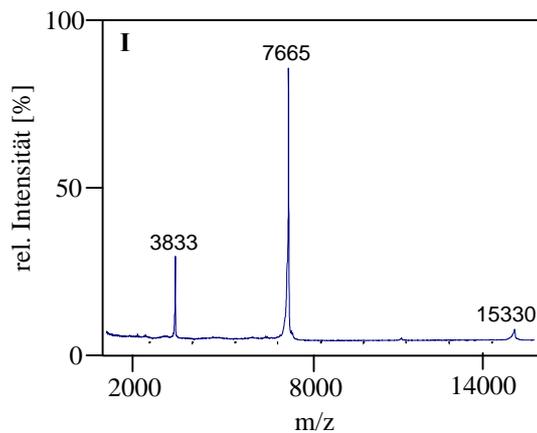


Abbildung 14I: MALDI-TOF Massenspektrum von HF 7665 in Fr. 22 aus Abb. 14H. Die Molekularmasse des gereinigten Peptides beträgt 7665 Da. Weiterhin erscheinen Signale des doppelt geladenen Peptides (m/z : 3833) sowie des Dimers (m/z : 15330).

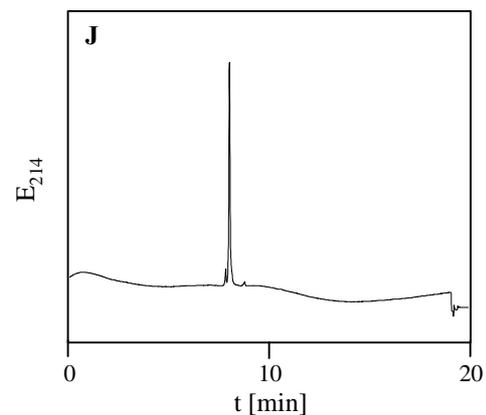


Abbildung 14J: Kapillarzonenelektrophorese zur Reinheitsüberprüfung. Elektropherogramm des gereinigten Peptides HF 7665. Der berechnete Reinheitsgrad beträgt 96,5 %.

In dem hier entwickelten Reinigungsverfahren zur Isolierung Trypsin-inhibitorischer Peptide bewies sich der Wechsel von verschiedenen RP-Phasen mit der Kationenaustausch-Chromatographie als sehr erfolgreiche Methode. Mit Hilfe dieses Trennverfahrens ließen sich die gesuchten aktiven Peptide mit einem Reinheitsgrad von mindestens 95 % aus einer Peptidbankfraktion isolieren.

Abbildung 15 zeigt schematisch das angewandte Verfahren zur Detektion, Reinigung und Identifizierung von Peptiden mit Trypsin-inhibitorischen Eigenschaften aus Peptidbanken.

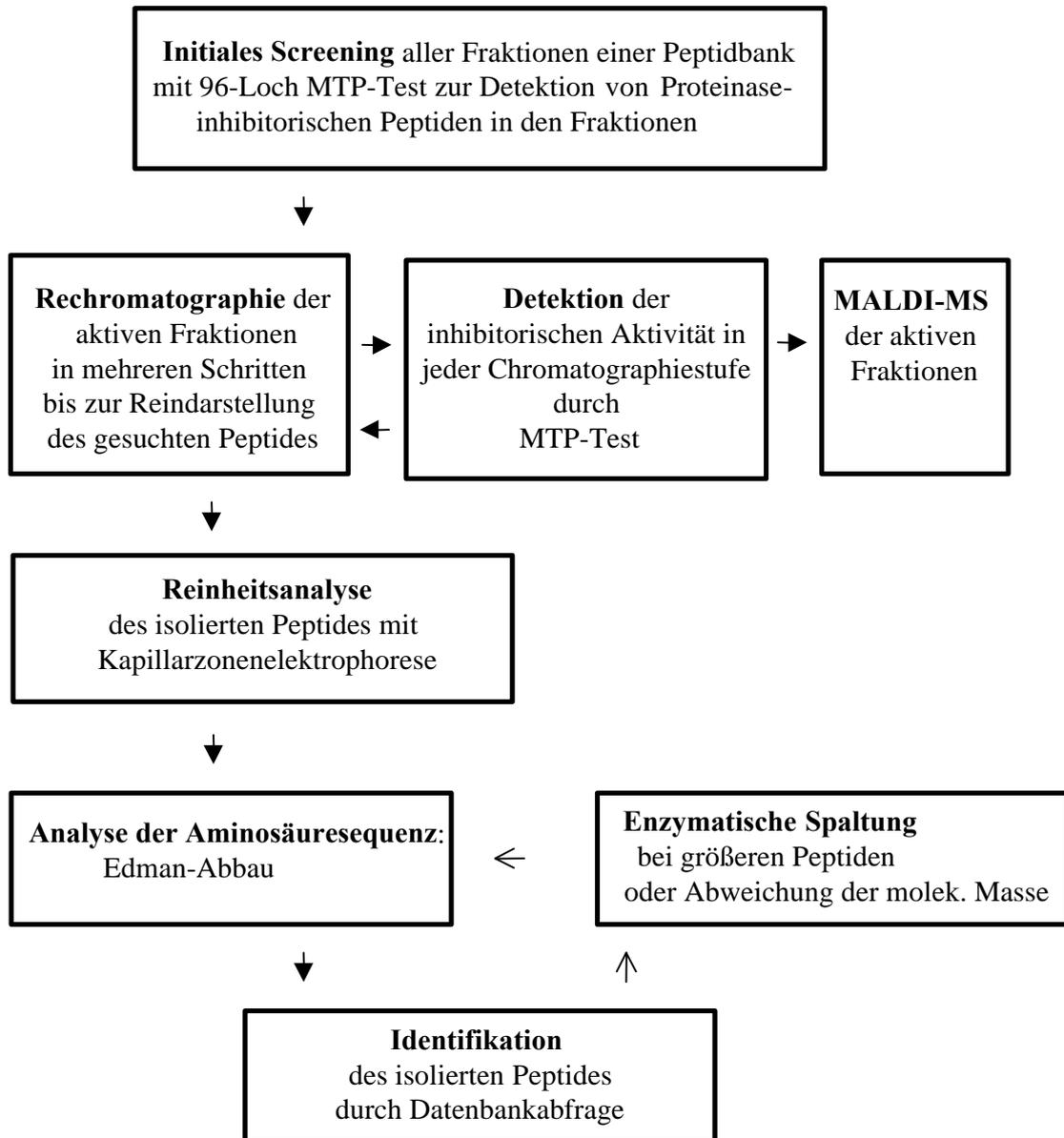


Abbildung 15: Schematische Darstellung des in dieser Arbeit entwickelten Reinigungsverfahrens für Peptide mit Proteinase-inhibitorischer Aktivität aus Peptidbanken.

3.5.1 Identifizierung der 6. LEKTI-Domäne HF 7665

Die im vorhergehenden Kapitel vorgestellte Aufreinigungsstrategie führte zur Isolierung von HF 7665, der 6. Domäne des Multidomänen Serin-Proteinase-Inhibitors LEKTI. Durch Edman-Sequenzierung konnten die ersten 25 Aminosäuren von HF 7665 ermittelt werden. Die Abfolge der restlichen (C-terminalen) Aminosäuren ergab sich aufgrund der Übereinstimmung der gemessenen mit der theoretischen Masse (Abbildung 16). Die 6. LEKTI-Domäne HF 7665 besteht aus 68 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von 7665 Da und besitzt einen pI von 5,9. Da der pI im leicht sauren Bereich liegt, konnte mit der Kationenaustausch-Chromatographie bei Puffer pH-Werten von 3,5 und 4,5 eine effektive Trennung erreicht werden. Für diese Chromatographiemethode sollte der verwendete pH-Wert der Puffer um mindestens eine Einheit unter dem pI des Peptides liegen. Das entwickelte Chromatographieverfahren erwies sich als geeignet, um Proteinase-inhibitorische Peptide aus der Hämofiltrat-Peptidbank zu isolieren.

ESGKATSYAELCNEYRKLVRNGKLACTRENDPIQGPDKVHGNTCSMCEVFFQAESEEKKKKEGESRN
 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----
 10 20 30 40 50 60

Abbildung 16: Aminosäuresequenz von HF 7665
 Das Peptid enthält 68 Aminosäuren, die rot markierten Cysteine sind verbrückt
 (s. Kap. 1.6, Abb. 7). Die Masse des Peptides beträgt 7665 Da.

Die 6. Domäne des Multidomänen Serin-Proteinase Inhibitors LEKTI, HF 7665, wurde 1994 bereits nach ihrem m/z-Signal im MALDI-TOF-MS Spektrum aus Hämofiltrat isoliert. Dabei wurde keine nach dem in Kap. 1.5 vorgestellten Schema erstellte Peptidbank, sondern Fraktionen einer Kationenaustausch-Chromatographie aus 5.000 l HF verwendet (STÄNDKER, 1994, s. Kap. 1.6). Ein dem Peptid HF 7665 entsprechendes massenspektrometrisches Signal konnte in den aktuellen Peptidbankfraktionen nicht nachgewiesen werden. Die Ursache dafür könnte in dem Herstellungsverfahren der Peptidbank aber auch in der biologischen Verfügbarkeit von HF 7665 (geringere Konzentrationen) im Hämofiltrat liegen. Die gezielte Suche nach Proteinase-inhibitorischen Peptiden über ihre biologische Aktivität mit dem hier entwickelten Test führte alternativ zur erneuten Isolierung des Peptides.

HF 7665 ist bereits ausführlich beschrieben und charakterisiert worden (MÄGERT ET AL., 1999; KREUTZMANN, 2000). Dabei konnte eine inhibitorische Aktivität gegen Trypsin nachgewiesen werden, welche auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Weiterhin konnte keine inhibitorische Aktivität gegen die Proteinasen Chymotrypsin, Elastase, tPA, Plasmin, Kallikrein, Faktor Xa und Urokinase detektiert werden (KREUTZMANN, 2000, s. Kap. 1.6). Da in dieser Arbeit auch ein Screening der HF Peptidbank nach Inhibitoren von Trypsinase und Thrombin durchgeführt wurde, wobei keine inhibitorischen Aktivitäten detektiert werden konnten, kann ausgeschlossen werden, daß HF 7665 diese Enzyme inhibiert.

Während der Isolierung von HF 7665 trennten sich im 3., 4. und 5. Chromatographieschritt weitere Substanzen mit inhibitorischer Aktivität von denen des HF 7665 ab. Die anfängliche Koelution ließ eine hohe Homologie der Peptide erwarten, da die physikalischen und chemischen Eigenschaften, welche die chromatographische Trennung bewirken, ähnlich zu sein schienen. Die in Kap. 3.6 bis 3.8 beschriebenen Isolierungen weiterer LEKTI-Domänen aus diesen Fraktionen bestätigte diese Annahme. Eine genaue Charakterisierung der isolierten LEKTI-Domänen findet im Anschluß statt (Kap. 3.11).

3.6 Isolierung von HF 7072

Während der Isolierung der 6. LEKTI-Domäne HF 7665 konnte im dritten Chromatographieschritt eine weitere inhibitorische Aktivität in Fraktion 30 detektiert werden (Kap. 3.5, Abbildung 14C). Aus den Fraktionen 25 bis 29 gelang die Isolierung von HF 7665. Die in Fraktion 30 dieser Chromatographie detektierte Substanz mit inhibitorischer Aktivität wurde ebenfalls isoliert. Dabei entsprachen die vierten und fünften Chromatographieschritte dem bereits erläuterten Reinigungsverfahren und werden deshalb an dieser Stelle nicht erneut beschrieben (Abbildungen 17A und 17B).

Für den sechsten Trennschritt wurde in dieser Reinigung ein analytischer Kationenaustauscher gewählt. Im Gegensatz zur Reinigungsprozedur von HF 7665 zeigte der 5. Schritt in der UV-Detektion keine deutliche Trennung der Substanzen, während in der begleitenden MALDI-TOF-MS Analytik jedoch deutliche Verunreinigungen zu erkennen waren (o. Abb.). Diese Kationenaustausch-Chromatographie wurde mit einem Kaliumphosphat-Puffersystem mit pH 4,5 durchgeführt, eluiert wurde durch einen linearen Anstieg von KCl im Eluenten (Abbildung 17C). Das Chromatogramm zeigt einen deutlichen Hauptpeak in den Fraktionen 38 und 39 und verdeutlicht den erzielten Reinigungseffekt. Die maximale inhibitorische Aktivität wurde in diesen Hauptpeakfraktionen detektiert. Durch diesen Schritt konnten erneut inaktive Substanzen abgetrennt werden.

Der letzte und siebte Trennschritt dieser Reinigung wurde als analytische RP C-18 Chromatographie durchgeführt. Dabei dienten 0,06 % TFA als Eluent A und 0,05 % TFA in 80 % ACN (v/v) als Eluent B (Abbildung 17D). Der Gradient konnte wegen der geringen Poren- und Partikelgröße des verwendeten analytischen Materials auf 0,3 % B/min gesenkt werden. Dieser Chromatographieschritt führte zur Reindarstellung des Peptides HF 7072 in Fraktion 33.

Die Identität und Reinheit wurden wieder mit MALDI-TOF-MS Analytik (Abbildung 17E) sowie Kapillarzonenlektrophorese (Abbildung 17F) überprüft. Die Masse des isolierten Peptides betrug 7072 Da, der Reinheitsgrad 97,5 % ($\lambda = 214 \text{ nm}$).

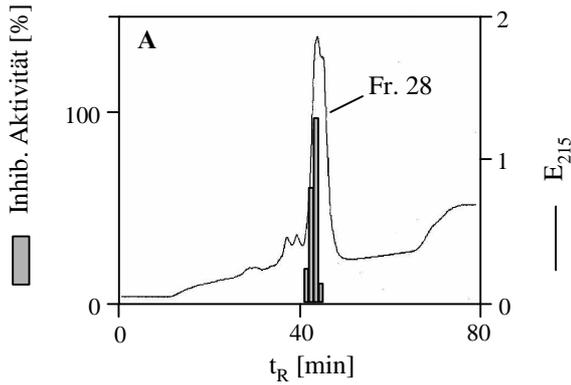


Abbildung 17A: CEC-Chromatogr. von Fr. 30 aus Abb. 14C. Säule: Biotek Pepkat, 10 x 125 mm, 1000 Å, 7 µm. Eluent A: 50 mM NaH₂PO₄; B: 50 mM NaH₂PO₄, 1,5 M NaCl, pH 3,5. Flußrate: 2 ml/min. Gradient: 0-70 % B in 70 min, $t_{GS} = 0$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 1,5 l. Fraktion 27 und 28 wurden vereinigt und rechromatographiert (⇒ Abb. 17B).

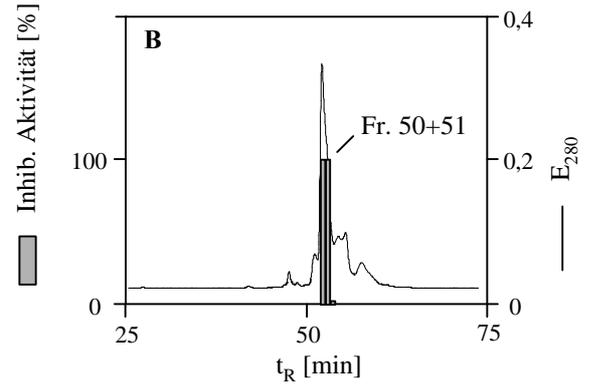


Abbildung 17B: RP-Chromatogr. von Fr. 27+28 aus Abb. 17A. Säule: Phenomenex Aqua RP C-5, 10 x 250 mm, 300 Å, 5 µm. Eluent A: 0,1 % TFA; B: 0,1 % TFA in 80 % ACN (v/v). Flußrate: 1,8 ml/min. Gradient: 15-50 % B in 70 min, $t_{GS} = 5$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 2 l. Fraktion 50 und 51 wurden vereinigt und rechromatographiert (⇒ Abb. 17C).

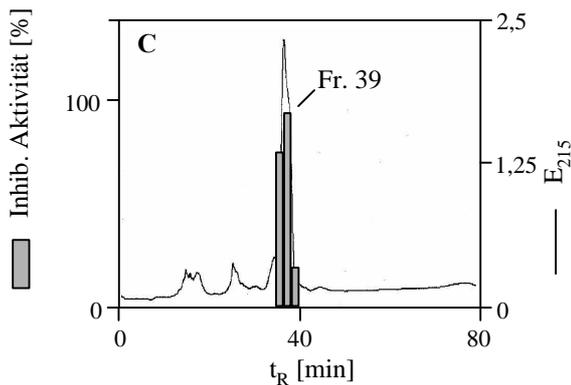


Abbildung 17C: CEC-Chromatogr. von Fr 50+51 aus Abb. 17B. Säule: Biotek Pepkat, 4 x 125 mm, 300 Å, 5 µm. Eluent A: 50 mM KH₂PO₄, pH 4,5; B: 50 mM KH₂PO₄, 1,5 M KCl, pH 4,5. Flußrate: 0,75 ml/min. Gradient: 0-70 % B in 70 min, $t_{GS} = 0$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 2,25 l. Fraktion 38 und 39 wurden vereinigt und rechromatographiert (⇒ Abb. 17D).

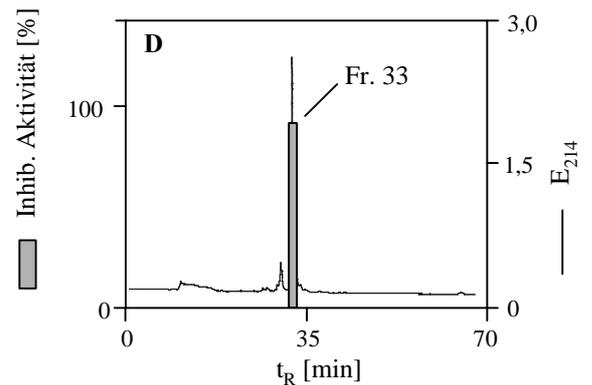


Abbildung 17D: RP-Chromatogr. von Fr. 38+39 aus Abb. 17C. Säule: Phenomenex Jupiter RP C-18, 4,6 x 250 mm, 300 Å, 5 µm. Eluent A: 0,06 % TFA, B: 0,05 % TFA in 80 % ACN (v/v). Flußrate: 0,5 ml/min. Gradient: 25-25 % B in 60 min, $t_{GS} = 10$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 2,5 l. Aus Fraktion 33 konnte HF 7072 rein dargestellt werden.

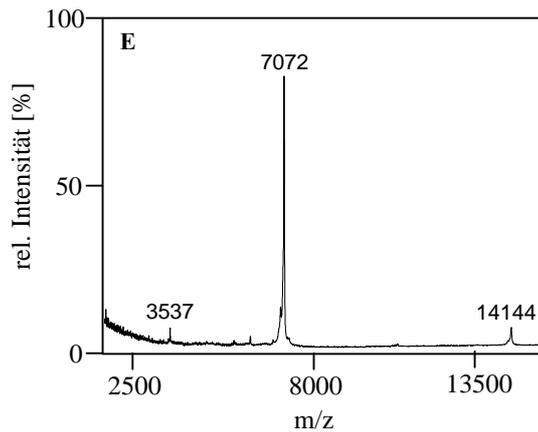


Abbildung 17E:
MALDI-TOF-Massenspektrum von HF 7072. Die Molekularmasse des gereinigten Peptides beträgt 7072 Da. Weiterhin wurden Signale des doppelt geladenen Peptides (m/z 3537) sowie des Dimers (m/z 14144) detektiert.

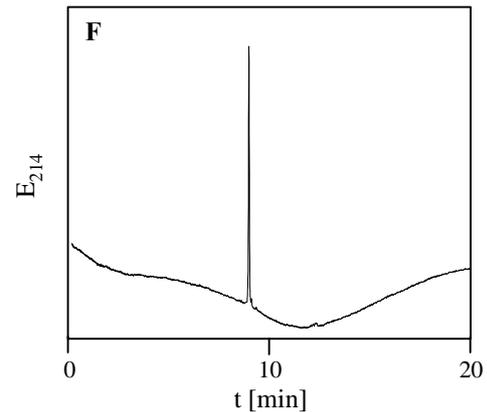


Abbildung 17F:
Kapillarzonenelektrophorese zur Reinheitsüberprüfung. Elektropherogramm des gereinigten Peptides HF 7072. Der berechnete Reinheitsgrad beträgt 97,5 %.

3.6.1 Identifizierung der 5. LEKTI-Domäne HF 7072

Durch die anschließende Aufklärung der Primärstruktur des isolierten Peptides mittels Edman-Abbau konnten die ersten 20 Aminosäuren ermittelt und der entsprechenden 5. Domäne von LEKTI zugeordnet werden. Die isolierte 5. LEKTI-Domäne wies jedoch eine Differenz in der mit MALDI-TOF-MS bestimmten Molekularmasse (7072 Da) von -28 Da zur theoretischen Masse (7100 Da) auf. Allgemein kann die Ursache für Differenzen in der Molekularmasse ein Aminosäureaustausch (Mutation), oder eine Modifikation des Peptides sein. Zur Strukturaufklärung wurde das Peptid mit Chymotrypsin proteolytisch gespalten, die entstandenen Fragmente mittels einer analytischen μ -HPLC über eine RP C-18 Säule getrennt und anschließend durch Edman-Abbau sequenziert. Chymotrypsin spaltet bevorzugt C-terminal zu den Aminosäuren Phe, Tyr und Trp, teilweise auch C-terminal zu Leu. Von den sechs theoretisch möglichen Fragmenten, die mit Hilfe des Programmes Sherpa™ bestimmt wurden (Tabelle 13), konnten durch Edman-Sequenzierung vier Fragmente der 5. LEKTI-Domäne sequenziert werden. Darunter auch ein Fragment in dem ein Valinrest an Position 44 der theoretischen Sequenz gegen einen Alaninrest ausgetauscht war. Die Differenz der Molekularmasse zwischen Ala und Val beträgt 28 Da und entspricht der detektierten Differenz.

Tabelle 13: Spaltung von HF 7072 durch Chymotrypsin.

Angegeben sind sowohl die theoretischen Sequenzen der Fragmente (erstellt mit Sherpa™), als auch die durch Edman-Abbau sequenzierten Fragmente.

Der ausgetauschte Aminosäurerest (V → A) in Pos. 44 ist rot dargestellt.

Position der AS	Sequenz (Theoretisch nach Sherpa™)	Sequenz der durch Edman-Abbau bestimmten Fragmente
1-5	EIVKL	EIVKL
6-9	CSQY	-
10-18	QNQAKNGIL	-
20-38	CTRENDPIRGPDKMHGNL	CTRENDPIRGPDK
39-45	CSMCQVY	CSMCQAY
47-62	QAENEEKKKAEARARN	QAENEEKKKAEA

Eine anschließende Überprüfung der Mutation über molekularbiologische Sequenzierung der cDNA bestätigte zusätzlich die isolierte Sequenz der 5. LEKTI-Domäne. Der Eintrag in die Datenbank ist vermutlich auf einen Sequenzierungsfehler zurückzuführen. Damit ergibt sich folgende Sequenz der 5. LEKTI-Domäne HF 7072 (Abbildung 18) :

EIVKLCSQYQNQAKNGILFCTRENDPIRGPDKMHGNLCSMCQAYFQAENEEKKKAEARARN
 ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
 10 20 30 40 50 60

Abbildung 18: Aminosäuresequenz von HF 7072 (62 AS).
 Die verbrückten Cysteine sind rot markiert (s. Abb. 7).
 Die Mutation (V→A) ist blau gekennzeichnet (Pos. 44).

HF 7072 enthält 62 Aminosäuren und weist einen pI von 8,2 auf. Der pI ist damit wesentlich basischer als der von HF 7665 (pI 5,9). Dieser basische pI war maßgeblich für die effiziente Trennung mittels der Kationenaustausch-Chromatographie, da sich basische Peptide mit dieser Chromatographietechnik besser trennen lassen als saure.

3.7 Isolierung von HF 7638

Im vierten Reinigungsschritt der Isolierung von HF 7665 (CEC) konnten voneinander unabhängige inhibitorische Aktivitäten detektiert werden (Kap. 3.5, Abb. 14D). Während die inhibitorische Aktivität aus den Fraktionen 41-43 durch HF 7665 hervorgerufen wurde, wird im folgenden die Isolierung der inhibitorischen Substanz aus den Fraktionen 44 und 45 beschrieben (Abb. 19 A-D).

Die Isolierung von HF 7638 erfolgte analog zum für HF 7665 erstellten Schema mit je einer RP-Chromatographie im fünften und sechsten Reinigungsschritt (Abbildung 19A und 19B), einer Kationenaustausch-Chromatographie als siebtem (Abbildung 19C) und einer achten, abschließenden analytischen RP-Chromatographie (Abbildung 19D). Durch diese letzte Separation konnte HF 7638 aus den Fraktionen 21 und 22 rein gewonnen werden.

Auch für dieses Peptid wurden Identität und Reinheit mit MALDI-TOF-MS (Abbildung 19E) und Kapillarzonenoelektrophorese (Abbildung 19F) überprüft. Das MALDI-TOF Spektrum zeigte Signale, die von einem Peptid mit einem Molekulargewicht von 7638 Da erzeugt wurden. Verunreinigungen waren nicht zu erkennen. Aus dem Elektropherogramm ließ sich ein Reinheitsgrad von 97 % berechnen ($\lambda = 214$ nm).

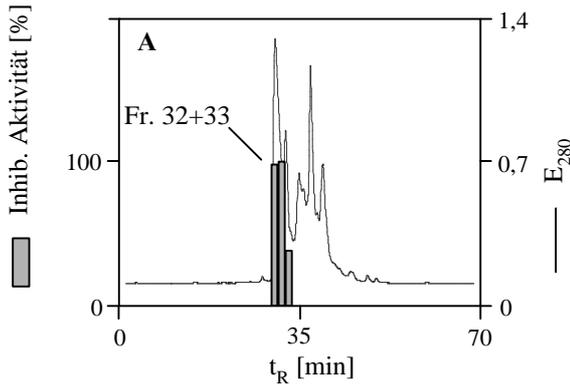


Abbildung 19A: RP-Chromatogr. von Fr. 44+45 aus Abb. 14D. Säule: Phenomenex Jupiter C-5, 10 x 250 mm, 300 Å, 5 µm. Eluent A: 0,1 % TFA; B: 0,1 % TFA in 80 % ACN (v/v). Flußrate: 1,8 ml/min. Gradient: 20-40 % B in 40 min, $t_{GS} = 10$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 2,7 l. Fraktion 32 und 33 wurden vereinigt und rechromatographiert (\Rightarrow Abb. 19B).

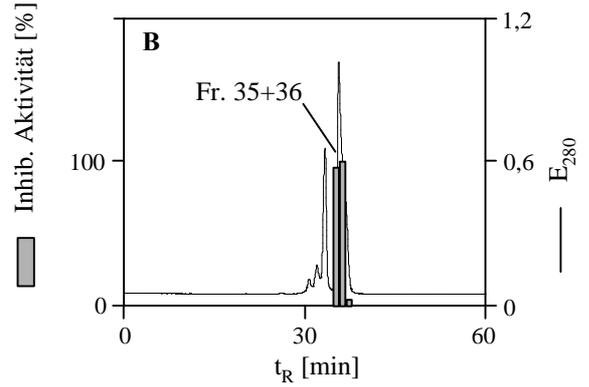


Abbildung 19B: RP-Chromatogr. von Fr. 32+33 aus Abb. 19A. Säule: Phenomenex Aqua C-18, 10 x 125 mm, 300 Å, 5 µm. Eluent A: 0,1 % TFA; B: 0,1 % TFA in 80 % ACN (v/v). Flußrate: 1,8 ml/min. Gradient: 20-40 % B in 40 min, $t_{GS} = 10$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 3 l. Fraktion 35 und 36 wurden vereinigt und rechromatographiert (\Rightarrow Abb. 19C).

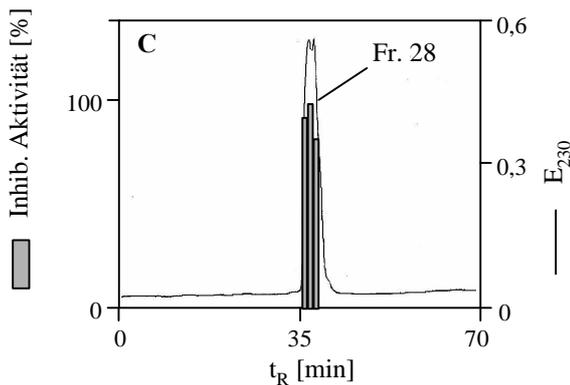


Abbildung 19C: CEC-Chromatogr. von Fr. 35+36 aus Abb. 19B. Säule: Biotek Pepkat, 4 x 125 mm, 300 Å, 5 µm. Eluent A: 50 mM KH_2PO_4 ; B: 50 mM KH_2PO_4 , 1,5 M KCl, pH 4,5. Flußrate: 0,75 ml/min. Gradient: 0-40 % B in 40 min, $t_{GS} = 0$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 3,5 l. Fraktion 27 bis 29 wurden vereinigt und rechromatographiert (\Rightarrow Abb. 19D).

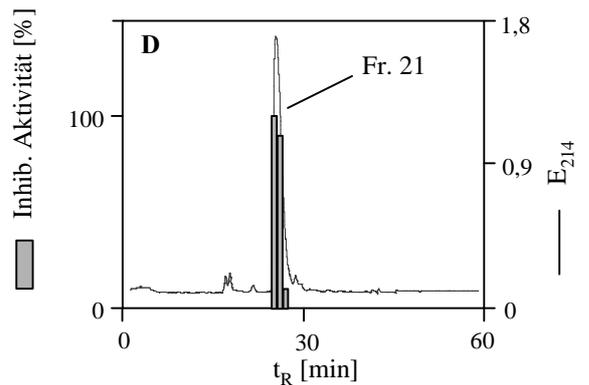


Abbildung 19D: RP-Chromatogr. von Fr. 27-29 aus Abb. 19C. Säule: Tosoh, TSK Gel Super-ODS, 4,6 x 100 mm, 300 Å, 2 µm. Eluent A: 0,06 % TFA; B: 0,05 % TFA in 80 % ACN (v/v). Flußrate: 0,7 ml/min. Gradient: 25-35 % B in 40 min, $t_{GS} = 5$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 3,5 l. Aus Fraktion 21 und 22 konnte HF 7638 rein dargestellt werden.

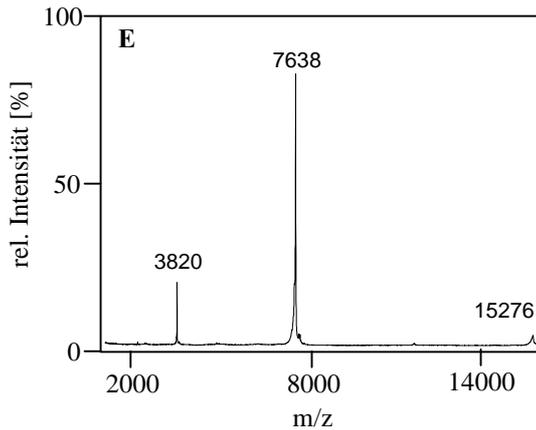


Abbildung 19E: MALDI-TOF-Massenspektrum von HF 7638. Die Molekularmasse des gereinigten Peptides beträgt 7638 Da. Weiterhin konnten Signale des doppelt geladenen Peptides (m/z 3820) sowie des Dimers (m/z 15276) detektiert werden.

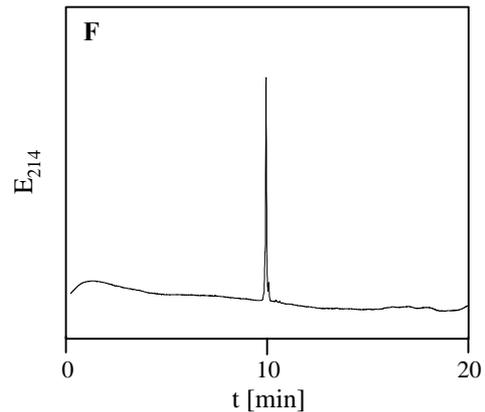


Abbildung 19F: Kapillarzonelektrophorese zur Reinheitsüberprüfung. Elektropherogramm des gereinigten Peptides HF 7638. Der berechnete Reinheitsgrad beträgt 97 %.

3.7.1 Identifizierung der mutierten 6. LEKTI-Domäne HF 7638

Auch HF 7638 wurde mit Hilfe des Edman-Abbaus sequenziert, um seine Primärstruktur aufzuklären. Bei dieser Sequenzierung ergab sich eine Aminosäuresequenz, die mit der schon beschriebenen 6. LEKTI-Domäne HF 7665 übereinstimmte, mit Ausnahme des Asparaginrestes (N) in Position 13. Dieser ist in dem gereinigten Peptid HF 7638 durch einen Serinrest (S) ersetzt (Abbildung 20).

Die durch Edman-Abbau bestimmte Aminosäuresequenz des isolierten HF 7638 lautet:

ESGKATSYAEL**C**SEYRKLVRNGKLA**C**TRENDPIQGPDKVHGNT**C**SM**C**EVFFQAE^{EEEE}KKKKEGESRN
 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----
 10 20 30 40 50 60

Abbildung 20: Aminosäuresequenz von HF 7638 (68 AS)
Die verbrückten Cysteine sind rot markiert (s. Abb. 7),
der durch einen SNP ausgetauschte Serinrest an Position 13 blau.

HF 7638 besteht in Übereinstimmung mit HF 7665 aus 68 Aminosäuren und weist einen pI von 5,9 auf. Der Aminosäureaustausch von Asparagin gegen Serin bewirkt die beobachtete Differenz von 27 Da im Molekulargewicht.

Von der 6. LEKTI-Domäne konnten folglich zwei verschiedene Formen (HF 7665 und HF 7638) isoliert werden. Die unterschiedlichen Sequenzen lassen sich durch eine Mutation in der für dieses Peptid kodierenden DNA erklären. Eine solche Mutation wird auch als „single nucleotide polymorphism“ (SNP) bezeichnet. SNPs sind einzelne Basenpaar-Positionen in genomischer DNA, an denen unterschiedliche Sequenzalternativen (Allele) existieren können (BROOKES, 1999). Der Austausch einer Base bewirkt einen Aminosäureaustausch im exprimierten Peptid oder die Blockierung der Bildung eines Peptides. Der Austausch einer einzelnen Aminosäure in einem Peptid kann die physiologische Funktion stark beeinflussen. SNPs können somit auch als Marker für bestimmte Krankheiten dienen (WEISS, 1998). Der hier beobachtete Austausch der Aminosäure N gegen S bzw. ein SNP in der DNA ist auch bei Patienten mit chronischer Pankreatitis in dem Inhibitor PSTI beschrieben worden (WITT ET AL., 2000). Dabei vermuten die Autoren eine verminderte inhibitorische Aktivität des mutierten PSTI gegenüber der Zielproteinase Trypsin. Der Austausch von N gegen S in der 6. LEKTI-Domäne ist vor kurzem *in vivo* bei Patienten mit atopischer Dermatitis molekularbiologisch nachgewiesen worden. Somit liegt die Annahme nahe, daß diese Mutation eine Rolle in der Entstehung dieser Krankheit spielt (WALLEY ET AL., 2001).

3.8 Isolierung von HF 14448

Die Isolierung der dritten und letzten zusätzlichen Substanz mit inhibitorischer Aktivität aus der Aufreinigung von HF 7665 aus pH-Pool 3, Fraktion 18 wird im folgenden beschrieben (Abb. 21 A-D). Es handelte sich dabei um die im fünften Reinigungsschritt in Fraktion 36 detektierte Aktivität (Kap. 3.5, Abb. 14E).

Diese Aufreinigung erfolgte ebenfalls nach dem entwickelten Schema mit einem Wechsel zwischen RP- und Kationenaustauscher-Phasen. Abbildung 21A zeigt den sechsten Reinigungsschritt über RP C-18, während Abbildung 21B den siebten Schritt, eine Kationenaustausch-Chromatographie darstellt.

Der achte Reinigungsschritt erfolgte über eine analytische RP C-18 Phase. Die inhibitorische Aktivität konnte im Hauptpeak detektiert werden, der den Fraktionen 27 und 28 entspricht (Abbildung 21C). Zusätzliche Peaks waren nicht mehr zu erkennen.

Trotzdem zeigte eine Untersuchung der aktiven Fraktionen mit MALDI-TOF-MS noch Verunreinigungen (o. Abb.). Eine an dieser Stelle durchgeführte Sequenzierung der ersten fünf Aminosäuren durch Edman-Abbau ergab als Hauptsequenz den Beginn der 2. LEKTI-Domäne, als Nebensequenz eine N-terminal verkürzte Form dieses Peptides. Da es sich um zwei Peptide mit sehr ähnlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften im Sinne ihres chromatographischen Verhaltens handelte, konnte bis zu diesem Zeitpunkt keine Trennung mit den verwendeten Chromatographiematerialien erreicht werden.

Um dennoch eine Trennung der Substanzen zu erreichen, wurde im neunten Schritt eine spezielle RP-Phase gewählt, die besonders für Peptide und Proteine mit hoher Homologie geeignet ist. Das Chromatogramm zeigte einen breiten Peak bei 33 min, in dem sich die aktiven Substanzen verteilten (Abbildung 21D). Die Hauptaktivitäten konnten in den Fraktionen 33 und 34 detektiert werden. Aus Fraktion 33 konnte HF 14448 rein dargestellt werden.

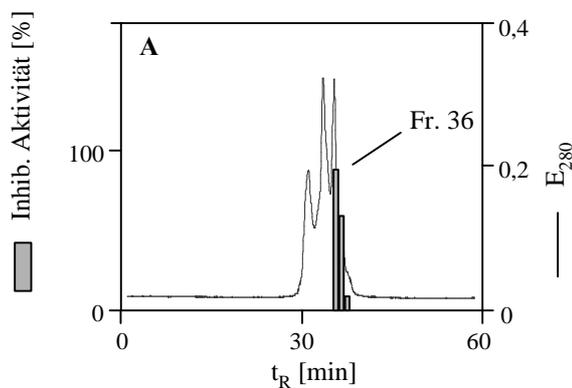


Abbildung 21A: RP-Chromatogr. von Fr. 36 aus Abb. 14E. Säule: Phenomenex Aqua C-18, 10 x 125 mm, 300 Å, 5 µm. Eluent A: 0,1 % TFA, B: 0,1 % TFA in 80 % ACN (v/v). Flußrate: 1,8 ml/min, Gradient: 20-40 % B in 40 min, $t_{GS} = 5$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 5 l. Fraktion 36 und 37 wurden vereinigt und rechromatographiert (\Rightarrow Abb. 21B).

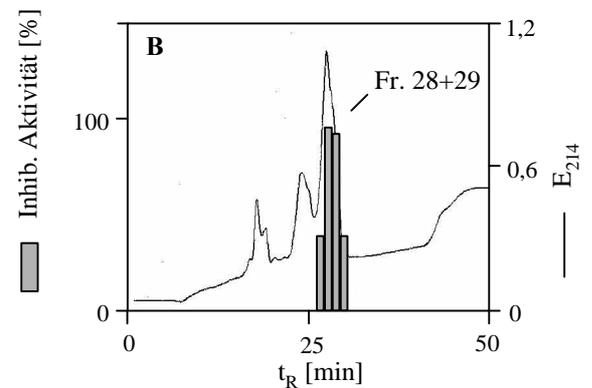


Abbildung 21B: CEC-Chromatogr. von Fr 36+37 aus Abb. 21A. Säule: Biotek Pepkat, 4 x 125 mm, 300 Å, 5 µm. Eluent A: 50 mM KH_2PO_4 , pH 4,5; B: 50 mM KH_2PO_4 , 1,5 M KCl, pH 4,5. Flußrate: 0,75 ml/min, Gradient: 0-40 % B in 40 min $t_{GS} = 0$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 6,6 l. Fraktion 28 und 29 wurden vereinigt und rechromatographiert (\Rightarrow Abb. 21C).

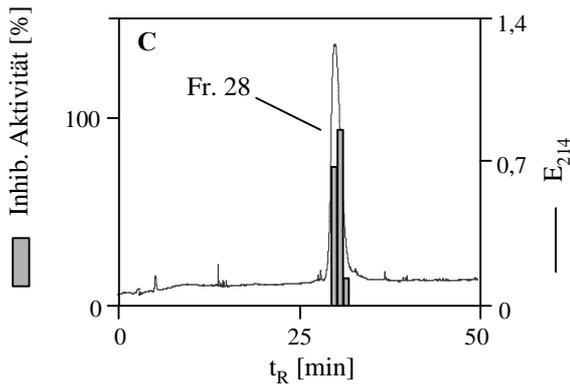


Abbildung 21C: RP-Chromatogr. von Fr. 28+29 aus Abb. 21B. Säule: Tosoh, TSK Gel Super-ODS, 4,6 x 100 mm, 300 Å, 2 µm. Eluent A: 0,06 % TFA; B: 0,05 % TFA in 80 % ACN (v/v). Flußrate: 0,7 ml/min. Gradient: 20-40 % B in 40 min, $t_{GS} = 5$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 8 l. Fraktion 27 und 28 wurden vereinigt und rechromatografiert (\Rightarrow Abb. 21D).

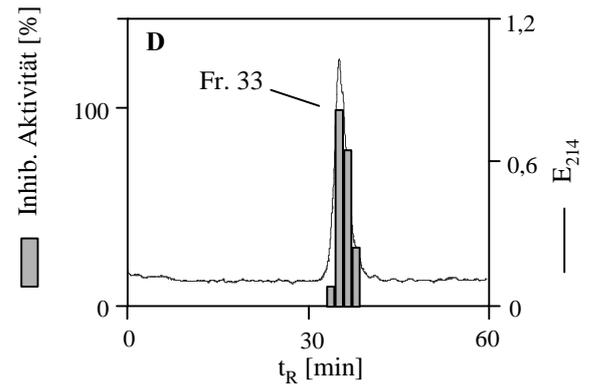


Abbildung 21D: RP-Chromatogr. von Fr. 27+28 aus Abb. 21 C. Säule: YMC J'Sphere ODS-H 80, 4,6 x 250 mm, 300 Å, 4 µm. Eluent A: 0,06 % TFA, B: 0,05 % TFA in 80 % ACN (v/v). Flußrate: 0,7 ml/min. Gradient: 25-37 % B in 50 min, $t_{GS} = 3$ min. Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 10 l. Aus Fraktion 33 konnte HF 14448 rein dargestellt werden

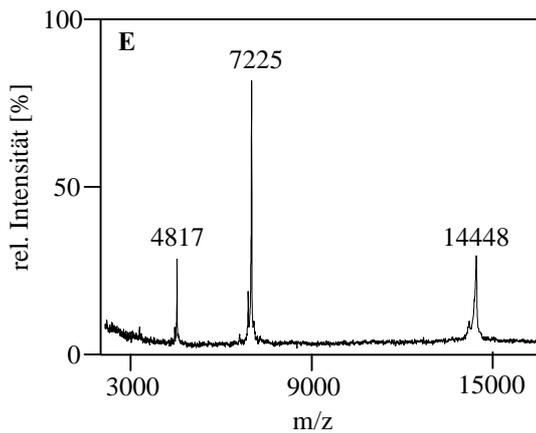


Abbildung 21E: MALDI-Massenspektrum von HF 14448. Die Molekularmasse des gereinigten Peptides beträgt 14448 Da. Weiterhin konnten Signale des doppelt geladenen (m/z 7225) sowie des dreifach geladenen Moleküliions (m/z 4817) detektiert werden.

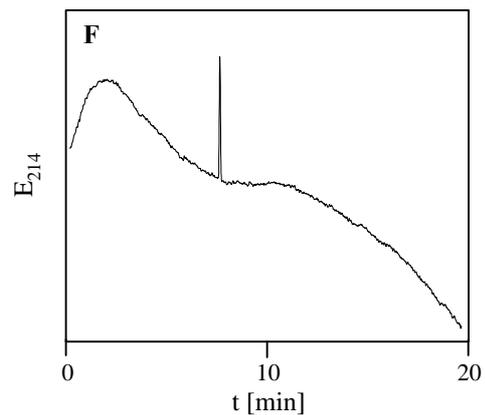


Abbildung 21F: Kapillarzonenelektrophorese zur Reinheitsüberprüfung. Elektropherogramm des gereinigten Peptides HF 14448. Der berechnete Reinheitsgrad beträgt 96 %.

Die Abbildungen 21E und 21F zeigen das MALDI-TOF-Massenspektrum und das Elektropherogramm von HF 14448. Das MALDI-TOF-Massenspektrum hatte große Ähnlichkeit mit den Spektren der zuvor gereinigten kleineren LEKTI-Domänen, z.B. HF 7665 (Abbildung 14I, Kap. 3.5.). In diesem Fall stellte jedoch das Signal bei m/z 14448 kein Dimer dar, sondern das einfach geladenen Molekülionensignal. Deutlich wurde dieses nur in Zusammenhang mit den Signalen bei m/z 7225 und 4817, die nur auf ein doppelt bzw. dreifach geladenes Molekülion zurückgeführt werden konnten. Das Elektropherogramm zeigte nur geringe Intensität, da von diesem Peptid nur sehr geringe Substanzmengen in der Peptidbank vorlagen und isoliert werden konnten. Die Reinheit ließ sich dennoch zu 96 % bestimmen.

3.8.1 Identifizierung der verbundenen 2. und 3. LEKTI-Domänen HF 14448

Die Primärstruktur eines Peptides dieser Größe konnte nicht vollständig in einer Edman-Sequenzierung aufgeklärt werden. Die Korrelation über das gemessenen Molekulargewicht wäre in diesem Fall nicht eindeutig. Die Edman-Sequenzierung zeigte die ersten 20 Aminosäuren der 2. LEKTI-Domäne, die hohe Molekularmasse von 14448 Da, die näherungsweise dem Molekulargewicht von zwei Domänen entspricht, gab einen Hinweis darauf, daß zwei verbundene Domänen (2. und 3.) vorliegen könnten. Deshalb wurde das Peptid gemäß der in Kap. 2.2.5. beschriebenen Methode nach Reduzierung der Cysteinbrücken mit der Endoproteinase GLU-C enzymatisch gespalten. GLU-C spaltet selektiv C-terminal von Glutaminsäureresten. Eine mit dem Programm Sherpa™ durchgeführte theoretische Spaltung des vermuteten Peptides ergab die in Tabelle 14 angegebenen Fragmente. Neben dem bereits sequenzierten N-Terminus konnten nach Spaltung und anschließender HPLC-Trennung fünf weitere Fragmente sequenziert werden. Diese Fragmente deckten sowohl den Mittelteil als auch die C-terminale Region des Peptides ab (Tabelle 14). Durch diese Sequenzierungen und das ermittelte Molekulargewicht ergab sich die Primärstruktur von HF 14448 (Abbildung 22). Dabei handelt es sich um die ungetrennten LEKTI-Domänen 2 und 3.

Tabelle 14: Spaltung von HF 14448 durch Endoproteinase GLU-C.

Angegeben sind sowohl die theoretischen Sequenzen der Fragmente (erstellt mit Sherpa™), als auch die durch Edman-Abbau sequenzierten Fragmente.

Position der AS	Sequenz (Theoretisch nach Sherpa™)	Sequenz der durch Edman-Abbau bestimmten Fragmente
1-13	HLARAPKATAPTE	HLARAPKATAPTE
14-23	LNCDDFKKGE	-
24-35	RDGDFICPDYYE	-
36-54	AVCGTDGKTYDNRCALCAE	AVCGTDGKTYDNRCALCAE
55-67	NAKTGSQIGVKSE	NAKTGSQIGVKSE
70-76	CKSSNPE	-
77-97	QDVCSAFRPFVDRGRLGCTRE	GRLGCTRE
98-118	NDPVLGPDGKTHGNKCAMCAE	NDPVLGPDGKTHGNKCAMCAE
119-123	LFLKE	-
126-130	NAKRE	-

Die Aminosäuresequenz des isolierten Peptides HF 14448 ist in Abbildung 22 angegeben:

```

HLARAPKATAPTELNCDDFKKGERDGFICPDYYEAVCGTDGKTYDNRCALCAENAKTGSQIGVKSEGECC
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          10          20          30          40          50          60          70

KSSNPEQDVCSAFRPFVDRGRLGCTRENDPVLGPDGKTHGNKCAMCAELFLKEAENAKREGET
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          80          90         100         110         120         130

```

Abbildung 22: Aminosäuresequenz von HF 14448 (133 AS).
Die verbrückten Cysteinreste sind rot markiert (s. Abb. 7).

HF 14448 besteht aus 133 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 14448 Da. Der pI des isolierten Peptides beträgt 5,8.

Bei der N-terminalen Domäne (2. LEKTI-Domäne) handelt es sich um einen Inhibitor mit sechs nach dem Kazal Typ verbrückten Cysteinresten. Die C-terminale Domäne (3. LEKTI-Domäne) besitzt nur vier verbrückte Cysteinreste und entspricht damit dem Schema der LEKTI-Domänen 4 bis 14 (s. Kap. 1.6.). Beispiele für andere Inhibitoren, die aus zwei verbundenen Domänen bestehen, sind Bikunin, welches bereits in Kap. 1.3.2.2 beschrieben wurde, oder der C2-Inhibitor der Tabakpflanze *Nicotiana glauca* (LEE ET AL., 1999). Synthetische Inhibitoren mit zwei aktiven Zentren werden zudem

bereits als Medikamente eingesetzt, von besonderer Bedeutung sind Inhibitoren der HIV-Proteinase. Diese liegt in ihrer aktiven Form als Homodimer vor, besitzt also zwei aktive Zentren und kann dementsprechend durch einen ebenfalls aus zwei Domänen bestehenden Inhibitor sehr selektiv inhibiert werden (MILLER ET AL., 1989).

3.9 Zirkulierende LEKTI-Domänen

Aus Fraktion 18 des pH-Pools 3 konnten insgesamt vier LEKTI-Domänen mit Trypsin-inhibitorischer Aktivität isoliert werden, von denen drei Domänen (HF 7072, Domäne 5; HF 7638, Domäne 6 (N→S); und HF 14448, Domänen 2 und 3) erstmals in ihrer zirkulierenden Form isoliert wurden. HF 6478 (Domäne 1) und HF 7665 (Domäne 6) wurden bereits isoliert, mit der erneuten Reinigung von HF 7665 konnten diese Arbeiten bestätigt werden. In Abbildung 23 sind die neu isolierten Domänen graphisch im Zusammenhang des gesamten LEKTI-Proteins dargestellt.

Signalpeptid:	<u>MKIATVSVLLPLALCLIQDAAS</u>	22
Domäne 1:	<u>KNEDQEMCHEFQAFMKNGLFC</u> <u>PDQKKPFQSLDGMFIN</u> <u>CKATCKMILEKEAKSQKR</u>	79
Domäne 2:	ARHLARAPKATAPELNCDDFFKGERDGGDFICPDYYEAVCGTDGKTYDNRCALCAENAKTGSQIGVKSSEGECKSSN	155
Domäne 3:	PEQDVCSAFRPFVRDGRGLGCTRENDPVLGPDGKTHGNKCAMCAELFLKEAENAKREGETRIRRN	219
Domäne 4:	AEKDFCSEYKQVRNGRLFCCTRENDPVRGPDGRMHGNKCALCAEIPKRRFSEENSKTDQNLGKAEKTKV <u>KR</u>	291
Domäne 5:	<u>EIVKLC</u> <u>SQYQNAKNGILF</u> <u>CTRENDPIR</u> <u>GGDKMHGNLCSMCQAYFQAENEKKAARANKR</u>	355
Domäne 6:	<u>ESGKATSYAELCNEYRKLVRNGKLACTRENDPIQ</u> <u>GGDKVHGNTCSMCEVFFQAEEEEKKEGESRNRK</u>	425
Domäne 7:	QSKSTASFEELCSEYRKSRLNGRLFCCTRENDPIQGGDKMHGNLCSMCEAFFQEEERARAKAKR	489
Domäne 8:	EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPPVRGPDGMHGNKCAMCASVFKLEEEKNDKEEKGVAAEKVKR	560
Domäne 9:	EAVQELCSEYRHYVRNGRLFCCTRENDPIEGLDGIHGNTCSMCEAFFQEEAKEERAEPRAKVKR	625
Domäne 10:	EAEKETCDEFRRLLQNGKLFCTRENDPVRGPDGKTHGNKCAMCAVFKENEERKRKEEDQRN	689
Domäne 11:	AAGHGSSGGGGNTQDECAEYQEQMKNGLSCTRESDPVRDADGKSYNNQCTMCCKALEREAEERKNEYSRSPSN	763
Domäne 12:	GTGSESGKDTCEFRSQMKNGLICTRESDPVRGPDGKTHGNKCTMCCKEKLEREAEKKEDEDRSN	831
Domäne 13:	TGERSNTGERSNDKEDLCREFRSQMKNGLICTRENPPVRGPDGMHGNKCAMCQSFDRANERKKKDEKSSKPSN	910
Domäne 14:	NAKDECCSEFRNYIRNNELICTRENDPVHGADGKPYTNKCYMCRAVFLTEALERAKLQEKPSHVRASQ	977
Domäne 15:	EEDSPDSFSSLDSEMCKDYRVLPRIGYL-CPKDLKPVCGDDGQTYNNPCMLCHENLIRQTNTHIRSTGKCEESSTPGTTAASMPSPDE	1064

Abbildung 23: Aminosäuresequenz des LEKTI-Proteins (nach MÄGERT ET AL., 1999).

Das Signalpeptid ist unterstrichen. Die 15 Domänen sind in Übereinstimmung mit ihrem Cystein-Muster (rot markiert) untereinander dargestellt. Die Peptide HF 6478 (1. Domäne) und HF 7665 (6. Domäne) sind in blau dargestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig isolierten Domänen HF 14448 (2. und 3. Domäne) und HF 7072 (5. Domäne) sind grün dargestellt. Ebenso ist die Mutation (N→S) in der 6. Domäne, die zu HF 7638 führt, grün gekennzeichnet. Unterstrichen sind weiterhin die KR-Spaltstellen für die Prozessierung der Domänen 5 und 6.

In der in Abbildung 23 dargestellten LEKTI-Sequenz ist erkennbar, daß die 5. und 6. Domäne jeweils C-terminal von den Aminosäuren KR anfangen und N-terminal von diesem Motiv enden. Es könnte sich dabei um eine Spaltstelle für eine Proteinase handeln, welche für die Freisetzung dieser Domänen aus dem Gesamtprotein verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu konnte zwischen der 1. und 2. Domäne eine

andere Spaltstelle (KRAR⁸¹) nachgewiesen werden. Der C-Terminus von HF 14448 (2. und 3. Domäne) befindet sich zudem nicht vor der erwarteten Spaltstelle (KR²¹⁰), sondern umfasst C-terminal vier weitere Aminosäuren.

AHMED ET AL. (2001) gelang es, aus Keratinozyten ein weiteres LEKTI Fragment zu isolieren, dessen N-Terminus der 8. Domäne (⁴⁹⁰EAAKE...) entspricht und das ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa aufweist. Auch der N-Terminus dieses Fragmentes ist nach einer KR-Spaltstelle lokalisiert. Aufgrund der Größe des Fragmentes sollten aber bis zu vier Domänen enthalten sein, die weiteren KR-Spaltstellen in diesem Fragment müßten daher übersprungen werden.

Eine exakte Identifizierung der Prozessierung der einzelnen Domänen des LEKTI-Proteins ist erst nach Isolierung weiterer Domänen aus HF oder anderen Geweben möglich. Um erfolgversprechende Quellen zur Isolierung zusätzlicher Domänen zu finden, sollte die pathophysiologische Bedeutung von LEKTI genauer bestimmt werden.

3.10 Isolierung von Bikunin-Fragmenten

Die Reindarstellung der bei der Untersuchung von pH-Pool 3 der HF-Peptidbank nach inhibitorischen Peptiden detektierten Substanz mit starker inhibitorischer Aktivität in Fraktion 24 (Abbildung 13) ist im folgenden beschrieben (Abbildung 24 A-F). Aufgrund des geringeren Peptidgehalts von Fraktion 24 im Gegensatz zu Fraktion 18, aus der die LEKTI-Domänen isoliert werden konnten, wurden für diese Isolierung 20001 HF-Äquivalente verwendet. Demzufolge wurden 480 mg dieser Fraktion in entionisiertem Wasser gelöst, über eine 0,45 µm Membran filtriert und für den ersten Chromatographieschritt eingesetzt. Auch für diese Isolierung wurde prinzipiell das vorgestellte Schema zur Reinigung inhibitorischer Peptide verwendet. Der erste Trennschritt wurde daher auf einer RP C-18 Phase durchgeführt (Abbildung 24A).

Der zweite Schritt dieser Aufreinigung wich von dem erstellten Schema ab, da die Menge des aktiven Materials im ersten Chromatographieschritt kleiner zu sein schien als in der Isolierung von HF 7665. In dieser Chromatographie wurde anstelle der organischen Phase das RP-Material gewechselt und eine kleinere Säulendimension verwendet. Als stationäre Phase wurde RP C-4 Material, als Eluent A 0,1 % TFA, als Eluent B 0,1 % TFA in 80 % ACN (v/v) verwendet (Abbildung 24B). Die Fraktionen 30 und 31 wiesen Proteinase-inhibitorische Aktivität auf, eine große Menge inaktiver Substanzen konnte abgetrennt werden. Die Fraktionen 30 und 31 wurden vereinigt und rechromatographiert.

Für den dritten Trennschritt wurde wiederum ein RP-Material gewählt, in diesem Fall eine C-15 Phase, wodurch andere Trenneigenschaften erreicht wurden. Die verwendeten Elutionsmittel wurden nicht verändert, der Gradient wies eine Steigung von 0,5 % B/min auf (Abbildung 24C). Mit diesem Reinigungsschritt wurde eine effektive Trennung der Substanzen erreicht, das Chromatogramm gliederte sich in zwei Hauptpeaks, von denen der später eluierende die Fraktionen 36 und 37 mit inhibitorischer Aktivität beinhaltete.

Diese Fraktionen wurden für den vierten Chromatographieschritt ausgewählt, der gemäß dem erstellten Schema eine Kationenaustausch-Chromatographie darstellen sollte. Nach der Durchführung dieser Rechromatographie zeigte sich jedoch keine Trennung der

einzelnen Komponenten, aktive Substanzen eluierten über einen breiten Bereich des Chromatogramms (o. Abb.). Die entstandenen Fraktionen wurden daher vereinigt und auf eine RP C-5 Säule aufgetragen. Die Elutionsmittel sowie der Gradient wurden entsprechend dem dritten Chromatographieschritt gewählt. Das Chromatogramm (Abbildung 24D) zeigte nur einen Hauptpeak bei einer Elutionszeit von 48-53 Minuten, darin konnte in Fraktion 41 die Hauptaktivität detektiert werden. Bei der anschließenden MALDI-TOF-MS Untersuchung der entstandenen Fraktionen konnten in Fraktion 41 noch mehrere von Verunreinigungen stammende Signale detektiert werden (o. Abb.).

Die letzten beiden Trennschritte wurden wieder gemäß dem erstellten Reinigungsschema mit einer Kationenaustausch-Chromatographie (Abbildung 24E) und einer abschließenden analytischen RP-Chromatographie durchgeführt (Abbildung 24F). In diesem letzten Chromatographieschritt zeigte sich ein symmetrischer Peak, in der entsprechenden Fraktion 47 konnte inhibitorische Aktivität detektiert werden. Die Untersuchung dieser Fraktion mit MALDI-TOF-MS (Abbildung 24G) zeigte zwei Signale bei m/z 15187 und 15482 sowie die jeweiligen doppelt geladenen Molekülionensignale.

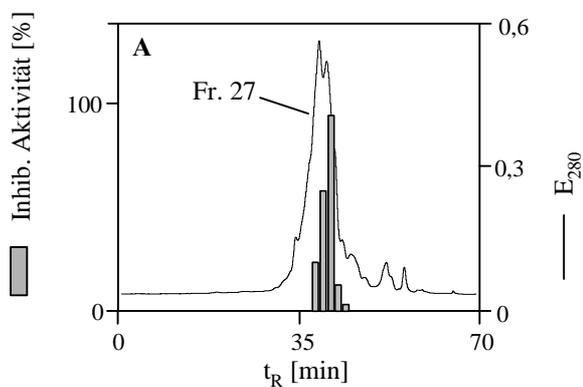


Abbildung 24A: RP-Chromatogr. von Fr. 24 aus pH-Pool 3 (Abb. 13). Säule: Bakerbond RP C-18, 47 x 300 mm, 300 Å, 15-30 µm
Eluent A: 10 mM HCl; B: 80 % ACN in 10 mM HCl (v/v). Flußrate: 40 ml/min.
Gradient: 10-60 % B in 50 min, $t_{GS} = 0$ min.
Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 100 ml.
Fraktion 27 wurde im folgenden Schritt rechromatographiert (\Rightarrow Abb 24B).

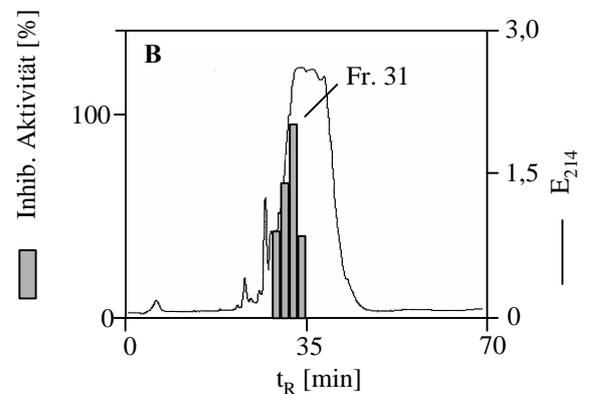


Abbildung 24B: RP-Chromatogr. von Fr. 27 aus Abb. 24A. Säule: Biotek Silica C-4, 20 x 250 mm, 100 Å, 5 µm.
Eluent A: 0,1 % TFA; B: 0,1 % TFA in 80 % ACN (v/v). Flußrate: 7 ml/min.
Gradient: 30-60 % B in 60 min, $t_{GS} = 0$ min.
Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 225 ml.
Fraktion 30 und 31 wurden vereinigt und rechromatographiert (\Rightarrow Abb. 24C).

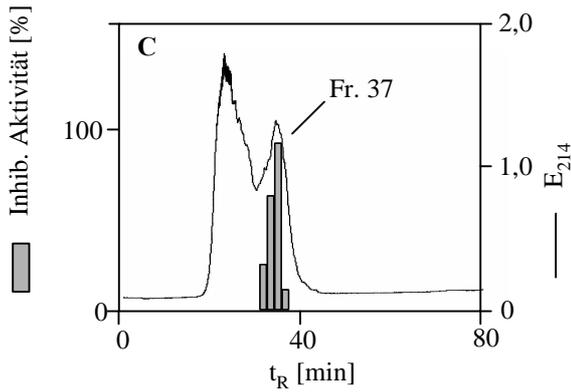


Abbildung 24C: RP-Chromatogr. von Fr. 30+31 aus Abb. 28B. Säule: Pharmacia Source RPC-15, 20 x 125 mm, 300 Å, 5 µm
 Eluent A: 0,1 % TFA; B: 0,1 % TFA in 80 % ACN (v/v). Flußrate: 5 ml/min, Gradient: 20-50 % B in 60 min, $t_{GS} = 10$ min.
 Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 520 ml.
 Fraktion 36 und 37 wurden vereinigt und rechromatographiert (⇒ Abb. 24D).

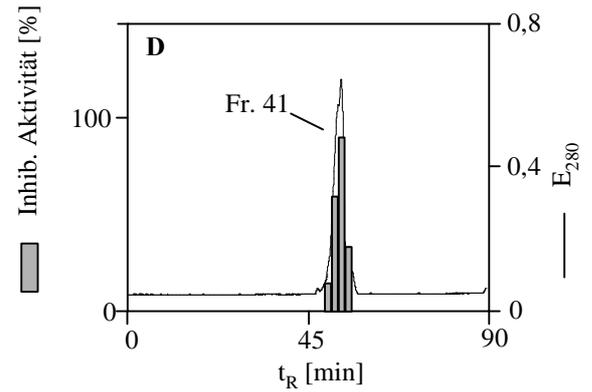


Abbildung 24D: RP-Chromatogr. von Fr. 36+37 aus Abb. 24C. Säule: Phenomenex Jupiter C-5, 10 x 250 mm, 300 Å, 5 µm.
 Eluent A: 0,1 % TFA; B: 0,1 % TFA in 80 % ACN (v/v). Flußrate: 1,8 ml/min, Gradient: 20-50 % B in 60 min, $t_{GS} = 10$ min.
 Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 2 l.
 Fraktion 40 und 41 wurden vereinigt und rechromatographiert (⇒ Abb. 24E)

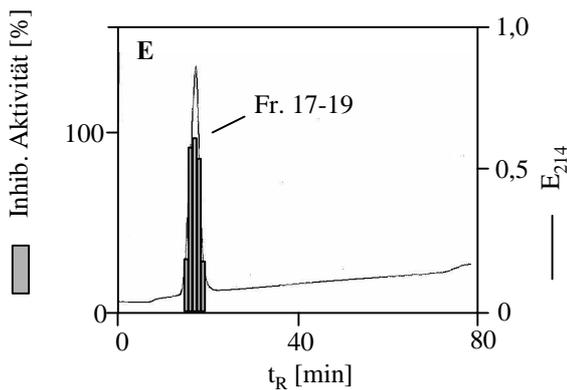


Abbildung 24E: CEC-Chromatogr. von Fr. 40+41 aus Abb. 24D. Säule: Biotek Pepkat, 4 x 125 mm, 300 Å, 5 µm.
 Eluent A: 50 mM KH_2PO_4 , pH 4,5; B: 50 mM KH_2PO_4 , 1,5 M KCl, pH 4,5.
 Flußrate: 0,75 ml/min, Gradient: 0-70 % B in 70 min, $t_{GS} = 0$ min.
 Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 5 l.
 Fraktion 17 bis 19 wurden vereinigt und rechromatographiert (⇒ Abb. 24F).

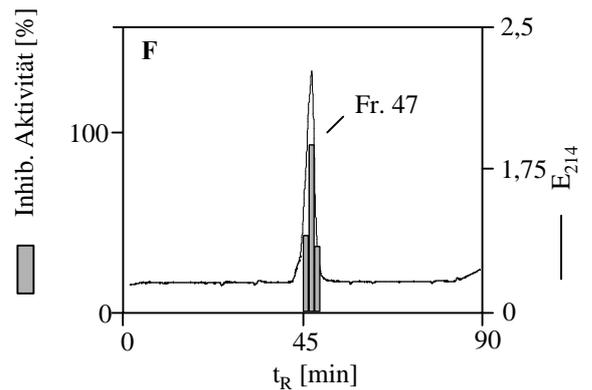


Abbildung 24F: RP-Chromatogr. von Fr. 17-19 aus Abb. 24E. Säule: Phenomenex Jupiter C-18, 4,6 x 250 mm, 300 Å, 5 µm.
 Eluent A: 0,06 % TFA; B: 0,05 % TFA in 80 % ACN (v/v). Flußrate: 0,5 ml/min, Gradient: 30-50 % B in 80 min, $t_{GS} = 5$ min
 Im Inhibitionstest eingesetzte HF-Äquivalentmenge: 7,5 l.
 Fraktion 47 enthielt die inhibitorischen Substanzen.

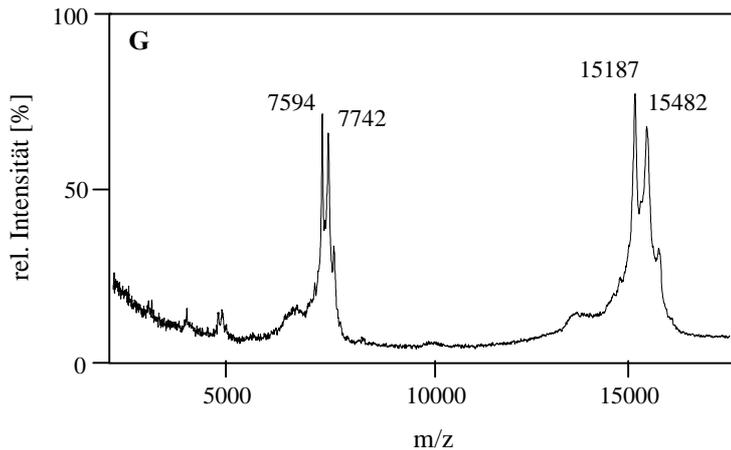


Abbildung 24G: MALDI-MS der inhibitorischen Substanzen aus Fr. 47 (Abb. 26F). Die Signale bei m/z 15187 und m/z 15482 entsprechen den einfach geladenen Molekülonen, bei 7594 und 7742 den doppelt geladenen.

3.10.1 Identifizierung der Bikunin-Fragmente

Durch Edman-Sequenzierung der Substanzen in Fraktion 47 des letzten Reinigungsschrittes konnten zwei Peptide identifiziert werden, die N-terminal verkürzten Fragmenten von Bikunin entsprechen. Da es sich bei Bikunin um einen bekannten Serinproteinase-Inhibitor handelte, wurde auf eine Reindarstellung der beiden Fragmente durch weitere Chromatographieschritte verzichtet. Die in Abbildung 25 gezeigte Aminosäuresequenz entspricht den isolierten Bikunin Fragmenten.

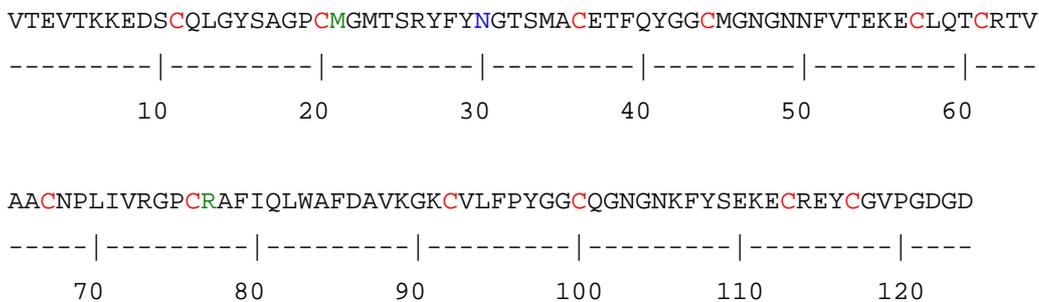


Abbildung 25: Aminosäuresequenz der isolierten Bikunin Fragmente.
 Fragment 1 = 1-124
 Fragment 2 = 4-124
 Die Cysteine sind rot markiert, die Glykosilierungsstelle am Asparagin (Position 30) blau, aktive Zentren (P₁) grün.

Als Hauptsequenz konnte ein um 15 AS verkürztes Fragment, als Nebensequenz ein um 18 AS verkürztes Fragment ermittelt werden. Das kürzere Fragment, welches die Nebensequenz verursachte, war in einer Konzentration von 10 % der Hauptkomponente vorhanden. Aufgrund der bekannten Primärsequenz von Bikunin sollten sich daraus Massen von 14509 Da für die Hauptkomponente und 14199 Da für die Nebensequenz ergeben, sofern der C-Terminus vollständig erhalten ist. Signale dieser Größe konnten in der MALDI-TOF-MS nicht detektiert werden, die Signale

lagen mit m/z 15482 sowie m/z 15187 deutlich höher (Abbildung 24G). In den Datenbanken ist für Bikunin eine Glykosilierungsstelle am Asparaginrest angegeben (s. Abbildung 25). Durch Glykosilierung wird die Masse des Peptides erhöht, was in Folge zur Detektion höherer Massen in der MALDI-TOF-MS Analytik führt. Für Bikunin ist die Glykosilierung vollständig aufgeklärt, die Masse der Seitenkette errechnet sich zu 1954 Da (HOCHSTRASSER ET AL., 1981). Die Differenz zwischen den theoretischen Massen und den MALDI-MS Signalen beträgt jedoch nur 973 bzw. 988 Da. Das bedeutet, daß die Bikunin Fragmente auch am C-Terminus verkürzt sein müssen. Eine Massenberechnung mit Sherpa™ ergab eine Übereinstimmung mit den für die Hauptkomponente gemessenen Signalen, wenn C-Terminal 8 AS abgespalten werden. Das Signal im MALDI-Spektrum bei 15482 Da kann damit der Hauptkomponente zugeordnet werden. Das Signal bei 15187 Da läßt sich nicht allein durch die Nebenkompente erklären, da diese im Unterschuß (10 %) vorliegt und das Signal dadurch nicht höher als das der Hauptkomponente sein dürfte. Bei glykosilierten Peptiden tritt in der MALDI-TOF-MS oftmals eine Abspaltung einer Gruppe der Kohlenhydratseitenkette auf. Bikunin trägt am Ende dieser Seitenkette eine Sialinsäuregruppe (NeuAc), welche ein Molekulargewicht von 291 Da aufweist. Das Signal bei 15187 Da kann demzufolge durch eine Überlagerung von Signalen der Nebenkompente (15182 Da) mit Signalen der Hauptkomponente nach Abspaltung des Kohlenhydratrestes (15191 Da) erklärt werden.

Der Inhibitor Bikunin stellt einen Teil eines größeren Proteins, des Inter-Alpha-Trypsin-Inhibitors (ITI) dar. ITI besteht aus drei Teilen, zwei schweren Ketten (heavy chain) und einer leichten Kette (light chain). Diese Ketten sind durch Protein-Glycosaminoglycan-Protein Brücken (PGP cross-link, Chondroitin-sulphate cross-link) miteinander verbunden (ENGHILD ET AL. 1993; MORELLE ET AL, 1994). Bikunin entspricht der leichten Kette dieses Proteins und enthält die aktiven Zentren, die für die inhibitorischen Eigenschaften von ITI verantwortlich sind. Bikunin besteht aus zwei hintereinander liegenden Domänen, die jeweils sechs nach dem Kunitz-Typ verbrückte Cysteinreste enthalten (LASKOWSKI UND KATO, 1980). Die Aufteilung in Abbildung 25 entspricht dieser Aufteilung in zwei Domänen. Das aktive Zentrum (P_1) der ersten Domäne ist ein Methioninrest an Position 21, das der zweiten Domäne ein Argininrest an Position 77. Auch dieser Inhibitor präsentiert die aktiven Zentren in zwei exponierten Schleifen, wie XU ET AL. (1998) durch Strukturanalysen zeigen konnten.

ITI ist ein minores Serumprotein. Bikunin wird *in vivo* durch proteolytische Prozessierung aus ITI freigesetzt und ist in Serum, Urin und im Bronchial- und Nasensekret sowie in der Placenta nachgewiesen worden. Im Serum eines Menschen sind ca. 1 μmol Bikunin enthalten (WACHTER UND HOCHSTRASSER, 1981; HOCHSTRASSER ET AL., 1981; DELARIA ET AL., 1997). Inhibiert werden neben Trypsin auch die Proteinasen Chymotrypsin, Elastase, Cathepsin G, Acrosin und Plasmin (BOST ET AL., 1998). Besonders interessant ist die Inhibierung von Plasmin, da Plasmin an der Invasion von Tumorzellen beteiligt ist. Diese Invasion kann durch ein Fragment des aus Urin isolierten Pendantes von Bikunin, Urinary-Trypsin-Inhibitor (UTI) reduziert werden (KOBAYASHI ET AL., 1994). Auch eine Verbindung zu inflammatorischen Prozessen ist gegeben, da die Expression des für ITI verantwortlichen Gens von Interleukin 6 reguliert wird (BOST ET AL., 1998). Die schweren und die leichte Kette von ITI werden dabei von verschiedenen mRNA synthetisiert und erst später zum vollständigen Inhibitor verbunden. Die leichte Kette wird zusammen mit einem anderen Inhibitor, dem α 1-Mikroglobulin, exprimiert, nach proteolytischer Spaltung dieses Komplexes findet die Verbindung mit den schweren Ketten statt (DIARRA-MEHRPOUR ET AL., 1990; BLOM ET AL., 1999).

Die isolierten Fragmente dieses Inhibitors enthalten beide Domänen, lediglich ein kurzer N-terminaler Teil (AS 1-15 bzw. 1-18 von Bikunin), welcher für die Bindung zu den schweren Ketten verantwortlich ist, sowie 8 C-terminale Aminosäuren wurden abgespalten. Da es sich um einen bekannten Inhibitor handelt, wurde im Rahmen dieser Arbeit auf eine weitere Charakterisierung der Fragmente verzichtet.

3.11 Charakterisierung der Trypsin-Inhibition durch die isolierten LEKTI-Domänen

Zur Charakterisierung der Trypsin-inhibitorischen Aktivität der isolierten LEKTI-Domänen wurden die IC_{50} -Werte bestimmt. Dieser Wert entspricht der Konzentration des Inhibitors, bei der eine 50 %ige Hemmung der Proteinaseaktivität auftritt. Die Messungen wurden als Einzelmessungen in temperierten Küvetten (25 °C) durchgeführt (s. Kap. 2.4.2). Die Konzentrationen von Trypsin (2 µg/ml) und Substrat (L-BAPNA, 200 µg/ml) wurden konstant gehalten, während die Konzentrationen der LEKTI-Domänen variierten. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 26 graphisch dargestellt.

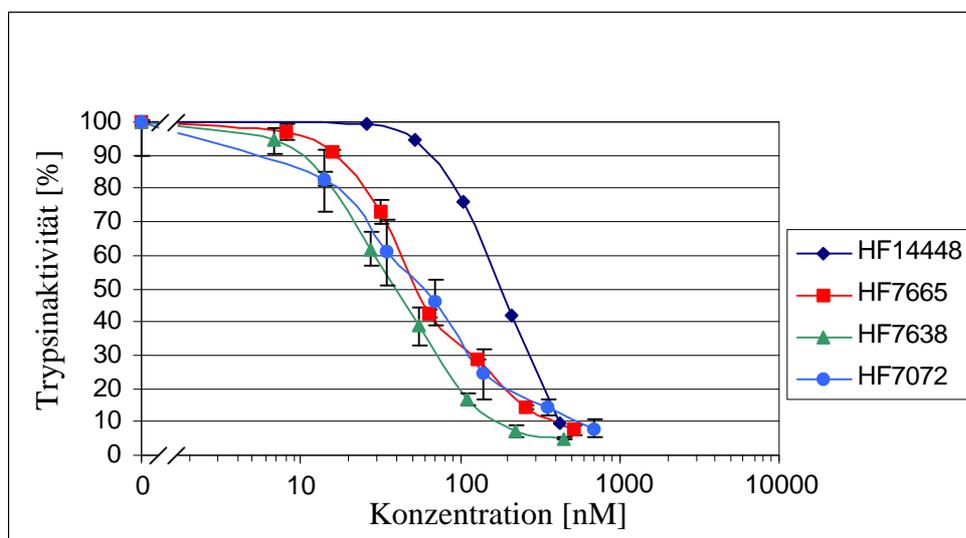


Abbildung 26: Trypsinaktivität unter Einfluß verschiedener Konzentrationen der isolierten LEKTI-Domänen. Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte und Standardabweichung der Doppelbestimmung dar (Ausnahme: Einfachbestimmung bei HF 14448).

Die LEKTI-Domänen HF 7638, HF 7665 und HF 7072 wiesen IC_{50} -Werte im Bereich von 30-60 nM auf, das aus zwei verbundenen Domänen bestehende HF 14448 zeigte einen IC_{50} -Wert von 120 nM. Das Inhibitionsvermögen der drei kürzeren LEKTI Domänen gegenüber Trypsin ist als äquipotent anzusehen, die Abweichungen befinden sich im Rahmen der Meßungenauigkeiten (Inhibitionstest, ASA zur Bestimmung der Peptidkonzentration). Deutlich zu unterscheiden ist jedoch die schwächer inhibitorische Aktivität der längeren Domäne HF 14448, die etwa 50 % im Vergleich zu den kürzeren Domänen beträgt. Bei dem aus zwei Domänen zusammengesetzten Inhibitor HF 14448

ist in Anbetracht der Aminosäuren im jeweiligen aktiven Zentrum (2. Domäne: P₁ Asp; 3. Domäne: P₁ Arg) davon auszugehen, daß nur der C-terminale Teil von HF 14448 (3. Domäne) Trypsin inhibiert. Eine Erklärung für die geringere Hemmwirkung könnte eine mögliche sterische Hinderung des aktiven Zentrums der 3. Domäne durch die verknüpfte 2. Domäne sein. Eine solche sterische Hinderung durch eine verknüpfte Domäne ist auch für Bikunin beschrieben (XU ET AL., 1998)

Eine Berechnung der absoluten Inhibitionskonstante (K_i) fand nicht statt, weil die Verfahren zur Berechnung dieser Größe davon ausgehen, daß der Inhibitor nicht degradiert. Diese Voraussetzung ist bei den LEKTI-Domänen nicht gegeben, wie schon für die 6. Domäne HF 7665 gezeigt werden konnte. Diese Domäne fungiert gegenüber Trypsin als temporärer Inhibitor, HF 7665 wird von Trypsin hydrolysiert (KREUTZMANN, 2000). Um diesen Effekt auch für die 5. Domäne HF 7072 zu überprüfen, wurden Aktivitätstests mit Vorinkubation durchgeführt (Abbildung 27). In diesen Versuchen wurden 500 nM HF 7072 mit 2 µg/ml Trypsin im Meßpuffer (s. Kap. 2.4.2) für die angegebenen Zeiträume vorinkubiert. Für die Messung wurde dann Substrat (200 µM L-BAPNA) zugesetzt und die verbleibende Trypsinaktivität gemessen.

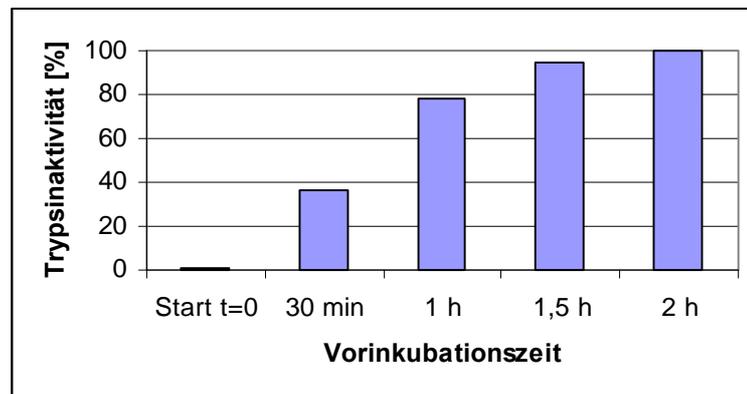


Abbildung 27: HF 7072 als temporärer Trypsininhibitor.
Trypsinaktivität nach Vorinkubation mit 500 nM HF 7072.

Auch in dieser Meßreihe zeigte sich, daß nach zwei Stunden Vorinkubation keine Inhibierung von Trypsin mehr nachgewiesen werden konnte. Auch HF 7072 ist folglich ein temporärer Trypsininhibitor. Dieser Effekt spricht dafür, daß es sich bei Trypsin nicht um die eigentliche physiologische Zielproteinase von LEKTI handelt. Eine temporäre Inhibierung von Proteinase durch Inhibitoren wurde bereits in der Literatur

beschrieben. So ist sowohl α_1 -Proteinase Inhibitor aus humanem Plasma gegenüber Trypsin (Oda et al., 1977), als auch der Metalloproteinase Inhibitor SMPI gegenüber Thermolysin (Seeram et.al., 1997) als temporärer Inhibitor anzusehen.

3.12 Physiologische Relevanz von LEKTI

Die physiologische Bedeutung des Multi-Domänen Serin-Proteinase-Inhibitors LEKTI ist bisher nicht bekannt. Neuere Studien geben allerdings Hinweise auf eine mögliche Funktion des Inhibitors. Durch Expressionsanalysen des LEKTI-Gens wurde gezeigt, daß der Proteinase-Inhibitor LEKTI vor allem in mukösen Epithelien wie der Mundschleimhaut aber auch im Thymus, dem wichtigsten Organ der Immunabwehr im menschlichen Organismus, exprimiert wird (MÄGERT ET AL., 1999). Bei der Untersuchung von Zelllinien konnte in der humanen HaCaT-Zelllinie (Keratinozyten) eine deutliche Expression nachgewiesen werden (KREUTZMANN, 2000). Weiterhin beweist die erfolgreiche Isolierung mehrerer LEKTI Domänen aus Hämofiltrat, daß es sich bei LEKTI um ein sekretorisches Protein bzw. bei den Domänen um sekretorische oder prozessierte zirkulierende Peptide handelt.

Die Expression im Thymus könnte auf eine Beteiligung von LEKTI in inflammatorischen Prozessen über die Inhibition proinflammatorischer leukozytärer Proteinase hindeuten. Eine zu regulierende Proteinase konnte in diesem Zusammenhang noch nicht identifiziert werden, allerdings ergaben Analysen des LEKTI Promotors, daß die LEKTI Transkription durch proinflammatorische Stimuli induziert werden kann (DRÖGEMÜLLER, 1999).

Die hohe Expression des LEKTI-Gens in der Mundschleimhaut könnte auf eine Abwehrfunktion von LEKTI gegenüber Viren und/oder Bakterien hindeuten. Schleimhäute kleiden oft nach außen gerichtete Hohlräume des Körpers wie die Mundhöhle aus und bilden damit die Kontaktstelle zwischen dem menschlichen Organismus und der Außenwelt. Das Milieu ist feuchtwarm und bildet damit einen ausgezeichneten Nährboden für Bakterien aller Art. Es ist bekannt, das bakterielle Proteinase im Körper pathologische Effekte auslösen können, angefangen von der Gewebsdegradation bis zur Beeinflussung biochemischer Kaskaden wie z.B. der

Kallikrein/Kinin-Kaskade (MAEDA UND YAMAMOTO, 1996). Auch LEKTI Domänen wurden in antimikrobiellen Tests eingesetzt, bei den ausgewählten Keimen konnten allerdings keine wachstumshemmenden Eigenschaften gezeigt werden (KREUTZMANN, 2000). Eine Überprüfung inhibitorischer Eigenschaften von LEKTI Domänen gegen bakterielle Proteinasen wurde wegen deren schlechter Verfügbarkeit noch nicht durchgeführt.

Auch Viren benutzen Proteinasen, um in den Wirtsorganismus einzudringen. Eine Inhibition dieser viralen oder vom Wirtsorganismus stammenden Proteinasen könnte eine Infektion verhindern. So konnten BEPPU ET AL. (1997) mit dem humanen Mucus Proteinase Inhibitor (MPI) die Infektiosität des Sendai-Virus *in vitro* ebenso signifikant herabsetzen wie die Replikation von Influenza A Viren *in vivo* in den Lungen von Ratten.

Ein großer Schritt auf dem Weg zur Aufklärung der pathophysiologischen Bedeutung von LEKTI gelang CHAVANAS ET AL. (2000). Sie zeigten, daß Mutationen im LEKTI-Gen, welches von ihnen als SPINK5 bezeichnet wird, ursächlich für die Entstehung des Netherton-Syndromes sind. Als Netherton-Syndrom bezeichnet man eine autosomal rezessive Erbkrankheit, die sich äußerlich durch eine defekte Hauterneuerung und Haarstruktur („Bambus-Haar“) bemerkbar macht. Zu dem Krankheitsbild gehören auch atopische (allergische) Dermatitis, hohe Serumspiegel an IgE und Hypereosinophilie. Insgesamt führt diese Krankheit zu einer hohen postnatalen Mortalität. Die Arbeitsgruppe um Chavanas wies in einem Patientenkollektiv verschiedene Mutationen im LEKTI-Gen nach, damit ist LEKTI der erste Serinproteinase Inhibitor, dem eine Funktion in der Hauterneuerung und in der Verminderung des Schutzeffektes der Haut zuzuschreiben ist. In einer anderen Arbeit wurden weitere Mutationen im LEKTI-Gen gezeigt, unter anderem auch der SNP in der für die 6. Domäne kodierenden cDNA (WALLEY ET AL., 2001). Das daraus hervorgehende Peptid ist in dieser Arbeit als HF 7638 in der zirkulierenden Form isoliert worden. Das Patientenkollektiv dieser Gruppe bestand nicht nur aus Netherton-Syndrom Patienten, sondern auch aus Patienten mit Dermatitis, Asthma sowie hohen IgE-Spiegeln. Da Allergien vielfach auch durch Proteinasen als Allergene erzeugt werden, sind Inhibitoren wie z.B. LEKTI für deren Regulation von Bedeutung. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Walley weisen auf einen allgemeinen Zusammenhang von LEKTI und allergischen Erkrankungen hin und

erschließen damit einen neuen Weg zum Verständnis der biochemischen Vorgänge bei Allergien und zu deren Behandlung.

Eine ähnliche pathophysiologische Rolle von LEKTI bei Krankheiten wie Netherton-Syndrom oder Dermatitis könnte auch in der Regulierung der für die Hautbildung und Erneuerung notwendigen Proteinase liegen (SPRECHER ET AL., 2001). Die Gruppe um Sprecher sieht einen Zusammenhang von Mutationen im LEKTI-Gen und der dadurch fehlenden Regulation der für die Hautbildung notwendigen Serinproteinase in der oberen Hautschicht. Hier wird besonders die von BRATTSAND UND EGELRUD (1999) neu entdeckte Serinproteinase Stratum Corneum Tryptic Enzyme (SCTE) und das verwandte Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme (SCCE) genannt (EGELRUD, 2000). Die oberste Hautschicht des Menschen (*Stratum corneum*) bildet einen wichtigen Schutzschild gegen die Außenwelt. Sie wird aus Korneozyten gebildet, die sich ihrerseits aus Keratinozyten differenzieren. Die Korneozyten werden alle 2 bis 4 Wochen durch proteolytische Prozesse aus dem Stratum Corneum entfernt, was eine Hauterneuerung bewirkt. Dieser Vorgang wird als Desquamation (Abschliffung) bezeichnet. Die dabei beteiligten Proteinase sind das SCCE, welches als inaktives Zymogen vorliegt und von SCTE aktiviert werden kann. Eine fehlerhafte Regulation dieser Proteinase durch ihre Inhibitoren würde zu einer ständigen Hautabschliffung führen, einem Krankheitsbild, wie es bei Netherton-Syndrom und Dermatitis anzutreffen ist. Gerade SCTE als Trypsin-ähnliche Proteinase könnte als eine der physiologischen Zielproteinase in Frage kommen. Tests mit dieser Proteinase konnten bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht durchgeführt werden.

In der humanen Epidermis und in Keratinozyten wurden bereits viele regulatorische Proteinase-Inhibitoren nachgewiesen. Neben Serpinen wie Proteinase-Inhibitor 6 (PI 6) und Plasminogen Aktivator Inhibitor I und II (PAI-I/II) (SCOTT ET AL., 1998) wurden auch Inhibitoren des Leukoproteinase-Typs, z.B. SKALP/Elafin und ALP gefunden (ALKEMADE ET AL., 1992; FRANZKE ET AL., 1996). Die Inhibitoren PI 6, SKALP/Elafin und ALP inhibieren neben ihren physiologischen Zielproteinase auch Trypsin und entsprechen mit ihren Trypsin-inhibitorischen Eigenschaften den bisher isolierten und charakterisierten LEKTI-Domänen. Auch andere Kazal-Typ Inhibitoren besitzen eine inhibierende Aktivität gegen Trypsin, so konnte eine Trypsin-Inhibierung durch PSTI (KAZAL ET AL., 1948) und Ovomucoïd-Inhibitor (ZHOU ET AL., 1989) bewiesen werden.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Testsystem im 96-Loch MTP-Format entwickelt, mit dem Proteinase-inhibitorische Peptide mit geringem Zeitbedarf aus einer komplexen Matrix wie einer HF-Peptidbank identifiziert werden können. Dieser Test wurde für die Serinproteinase Trypsin entwickelt und anschließend auf die Proteinase Thrombin und Tryptase adaptiert. In der mit diesem Testsystem untersuchten HF-Peptidbank konnten keine inhibitorischen Aktivitäten gegen Thrombin und Tryptase detektiert werden. Trypsin-inhibitorische Aktivitäten konnten dagegen in vielen Fraktionen der Peptidbank nachgewiesen werden. Um diese Substanzen rein darzustellen, wurde ein Reinigungsschema bestehend aus konsekutiven chromatographischen Schritten entwickelt.

Von den in dieser Arbeit isolierten und identifizierten inhibitorischen Peptiden entsprachen vier Peptide neuen zirkulierenden Domänen des Multidomänen Serinproteinase-Inhibitors LEKTI (s. Kap. 1.6). Es wurde ein Peptid isoliert, welches aus der 2. und 3. verknüpften Domäne besteht (HF 14448), ein Peptid, das die 5. Domäne darstellt (HF 7072), sowie zwei Peptide, die der 6. Domäne entsprechen, HF 7665 und HF 7638. HF 7638 unterscheidet sich von HF 7665 durch den Austausch einer Aminosäure, Asparagin (N) in Position 13 ist gegen Serin (S) ausgetauscht. Diese Modifikation ist auf einen Austausch einer Base in der für LEKTI kodierenden cDNA (SNP) zurückzuführen. Desweiteren konnten mit dem entwickelten Testsystem zwei Fragmente des bekannten Proteinase-Inhibitors Bikunin in HF detektiert und mit dem Reinigungsschema isoliert werden. Bikunin stellt die leichte Kette des Inter- α -Trypsin-Inhibitors dar, und trägt die für die Inhibition verantwortlichen aktiven Zentren (Kap. 3.10.1).

Die isolierten Peptide wurden funktionell durch die Bestimmung ihres IC_{50} -Wertes charakterisiert. Die inhibitorische Aktivität der Einzeldomänen-Inhibitoren HF 7072, HF 7638 und HF 7665 erwies sich als annähernd äquipotent (s. Kap. 3.11). Der Doppeldomänen-Inhibitor HF 14448 hingegen inhibiert Trypsin nur halb so effektiv.

Insgesamt konnten sechs verschiedene Inhibitoren aus den verwendeten HF-Peptidbankfraktionen 18 und 24 (pH-Pool 3) in ihrer zirkulierenden Form isoliert werden. Die große Anzahl weiterer inhibitorischer Aktivitäten in den Fraktionen der Hämofiltrat-Peptidbank lassen die Existenz weiterer, möglicherweise bislang unbekannter Inhibitoren vermuten.

5 Literaturverzeichnis

AHMED, A., KANDOLA, P., ZIADA, G., PARENTEAU, N. (2001) Purification and partial amino acid sequence of proteins from human epidermal keratinocyte conditioned medium. *J. Protein Chem.* **20**: 273-278

ALKEMADE, J.A., MOLHUIZEN, H.O., PONEC, M., KEMPENAAR, J.A., ZEEUWEN, P.L., DE JONGH, G.J., VAN VLIJMEN-WILLEMS, I.M., VAN ERP, P.E., VAN DE KERKHOF, P.C., SCHALKWIJK, J. (1994) SKALP/elafin is an inducible proteinase inhibitor in human epidermal keratinocytes. *J. Cell. Sci.* **107** : 2335-2342.

ANDERER, F.A., HÖRNLE, S. (1966) The disulfide linkages in kallikrein inactivator of bovine lung. *J. Biol. Chem.* **241**: 1568-1572.

ANDREWS, J.L., MELROSE, J., GHOSH, P. (1992) A comparative study of the low-molecular mass serine proteinase inhibitors of human connective tissues. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **373**: 111-118.

ASBOTH, B., POLGAR, L. (1983) Transition-state stabilization at the oxyanion binding sites of serine and thiol proteinases: hydrolyses of thiono and oxygen esters. *Biochemistry.* **22**: 117-122.

BEPPU, Y., IMAMURA, Y., TASHIRO, M., TOWATARI, T., ARIGA, H., KIDO, H.. (1997) Human mucus protease inhibitor in airway fluids is a potential defensive compound against infection with influenza A and Sendai viruses. *J. Biochem. (Tokyo).* **121**: 309-316.

BLAJCHMAN, M.A. (1994) An overview of the mechanism of action of antithrombin and its inherited deficiency states. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* **5**, Suppl. 1: S5-11.

BLOM, A.M., MORGELIN, M., OYEN, M., JARVET, J., FRIES, E. (1999) Structural characterization of inter-alpha-inhibitor. Evidence for an extended shape. *J. Biol. Chem.* **274**: 298-304.

- BODE, W., HUBER, R. (1992) Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* **204**: 433-451.
- BOLOGNESI, M., GATTI, G., MENAGATTI, E., GUARNERI, M., MARQUART, M., PAPAMOKOS, E., HUBER, R. (1982) Three-dimensional structure of the complex between pancreatic secretory trypsin inhibitor (Kazal type) and trypsinogen at 1.8 Å resolution. Structure solution, crystallographic refinement and preliminary structural interpretation. *J. Mol. Biol.* **162**: 839-868.
- BOST, F., DIARRA-MEHRPOUR, M., MARTIN, J.P. (1998) Inter-alpha-trypsin inhibitor proteoglycan family--a group of proteins binding and stabilizing the extracellular matrix. *Eur. J. Biochem.* **252**: 339-346.
- BRATTSAND, M., EGELRUD, T. (1999) Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *J. Biol. Chem.* **274**: 30033-30040.
- BROOKES, A.J. (1999) The essence of SNPs. *Gene.* **234**: 177-186.
- BURGESS, L.E., NEWHOUSE, B.J., IBRAHIM, P., RIZZI, J., KASHEM, M.A., HARTMAN, A., BRANDHUBER, B.J., WRIGHT, C.D., THOMSON, D.S., VIGERS, G.P., KOCH, K. (1999) Potent selective nonpeptidic inhibitors of human lung tryptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 8348-8352.
- CHAVANAS, S., BODEMER, C., ROCHAT, A., HAMEL-TEILLAC, D., ALI, M., IRVINE, A.D., BONAFE, J.L., WILKINSON, J., TAIEB, A., BARRANDON, Y., HARPER, J.I., DE PROST, Y., HOVNANIAN, A. (2000) Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat Genet.* **25**: 141-142.
- COAKLEY, R.J., TAGGART, C., O'NEILL, S., MCELVANEY, N.G. (2001) Alpha1-antitrypsin deficiency: biological answers to clinical questions. *Am. J. Med. Sci.* **321**: 33-41.

- DEADMAN, J. (2000) Proteinase inhibitors and activators strategic targets for therapeutic intervention. *J. Pept. Sci.* **6**: 421-431.
- DELARIA, K.A., MULLER, D.K., MARLOR, C.W., BROWN, J.E., DAS, R.C., ROCZNIAK, S.O., TAMBURINI, P.P. (1997) Characterization of placental bikunin, a novel human serine protease inhibitor. *J. Biol. Chem.* **272**: 12209-12214.
- DIARRA-MEHRPOUR, M., BOURGUIGNON, J., SESBOUE, R., SALIER, J.P., LEVEILLARD, T., MARTIN, J.P. (1990) Structural analysis of the human inter-alpha-trypsin inhibitor light-chain gene. *Eur. J. Biochem.* **191**: 131-139.
- DRÖGEMÜLLER, K. (1999) Charakterisierung des Gens für einen neuen humanen Serinproteinase-Inhibitor VAKTI. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Hannover.
- EGELRUD, T. (2000) Desquamation in the stratum corneum. *Acta. Derm. Venereol. Suppl.* **208**: 44-45.
- ENGHILD, J.J., SALVESEN, G., THOGERSEN, I.B., VALNICKOVA, Z., PIZZO, S.V., HEFTA, S.A. (1993) Presence of the protein-glycosaminoglycan-protein covalent cross-link in the inter-alpha-inhibitor-related proteinase inhibitor heavy chain 2/bikunin. *J. Biol. Chem.* **268**: 8711-8716.
- FORSSMANN, W.G., SCHULZ-KNAPPE, P., MEYER, M., ADERMANN, K., FORSSMANN, K., HOCK, D. AOKI, A. (1993) New peptides from human hemofiltrate. In: *Peptide Chemistry* (Yanaihara, N. ed.) p. 553. ESCOM, Leiden.
- FORSSMANN, W.G. (1996) Prinzipien der Informationsausbreitung und Signalübertragung im endokrinen System durch peptiderge Regulatorsubstanzen. *Nova Acta Leopoldina* **294**: 103-122
- FRANZKE, C.W., BAICI, A., BARTELS, J., CHRISTOPHERS, E., WIEDOW, O. (1996) Antileukoprotease inhibits stratum corneum chymotryptic enzyme. Evidence for a regulative function in desquamation. *J. Biol. Chem.* **271**: 21886-21890.

- GRZESIAK, A., KROKOSZYNSKA, I., KROWARSCH, D., BUCZEK, O., DADLEZ, M., OTLEWSKI, J. (2000) Inhibition of six serine proteinases of the human coagulation system by mutants of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J. Biol. Chem.* **275**: 33346-33352.
- HAUTAMAKI, R.D., KOBAYASHI, D.K., SENIOR, R.M., SHAPIRO, S.D. (1997) Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science.* **277**: 2002-2004.
- HIEMSTRA, P.S., MAASSEN, R.J., STOLK, J., HEINZEL-WIELAND, R., STEFFENS, G.J., DIJKMAN, J.H. (1996) Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect. Immun.* **64**: 4520-4524.
- HOCHSTRASSER, K., SCHONBERGER, O.L., ROSSMANITH, I., WACHTER, E. (1981) Kunitz-type proteinase inhibitors derived by limited proteolysis of the inter-alpha-trypsin inhibitor, V. Attachments of carbohydrates in the human urinary trypsin inhibitor isolated by affinity chromatography. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **362**: 1357-1362.
- KAZAL, L.A., SPICER, D.S., BRAHINSKY, R.A. (1948) Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from the pancreas. *J. Am. Chem. Soc.* **70**: 3034-3040
- KOBAYASHI, H., FUJIE, M., SHINOHARA, H., OHI, H., SUGIMURA, M., TERAO, T. (1994) Effects of urinary trypsin inhibitor on the invasion of reconstituted basement membranes by ovarian cancer cells. *Int. J. Cancer.* **57**: 378-384.
- KREUTZMANN, P. (2000) Identifikation und Charakterisierung eines neuen humanen Multidomänen-Serinproteinase-Inhibitors (LEKTI). Dissertation im Fachbereich Chemie der Universität Hannover.
- KUNITZ, M., NORTHROP, J.H. (1936) Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, trypsin inhibitor and an trypsin inhibitor compound. *J. Gen. Physiol.* **19**: 991-1007

LASKOWSKI, M. JR., KATO, I. (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 593-626.

LAUBER, T. (2000) Expression, Reinigung und strukturelle Charakterisierung des Proteins HF 6478. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth.

LEE, M.C., SCANLON, M.J., CRAIK, D.J., ANDERSON, M.A. (1999) A novel two-chain proteinase inhibitor generated by circularization of a multidomain precursor protein. *Nat. Struct. Biol.* **6**: 526-530.

LEUNG, D., ABBENANTE, G., FAIRLIE, D.P. (2000) Protease inhibitors: current status and future prospects. *J. Med. Chem.* **43**: 305-341.

LOTTENBERG, R., HALL, J.A., BLINDER, M., BINDER, E.P., JACKSON, C.M. (1983) The action of thrombin on peptide p-nitroanilide substrates. Substrate selectivity and examination of hydrolysis under different reaction conditions. *Biochim. Biophys. Acta.* **742**: 539-557.

LUDOLPH-HAUSER, D., RUEFF, F., SOMMERHOFF, C.P., PRZYBILLA, B. (1999) Tryptase, a marker for the activation and localization of mast cells. *Hautarzt.* **50**: 556-561

LUKKONEN, A., LINTULA, S., VON BOGUSLAWSKI, K., CARPEN, O., LJUNGBERG, B., LANDBERG, G., STENMAN, U.H. (1999) Tumor-associated trypsin inhibitor in normal and malignant renal tissue and in serum of renal-cell carcinoma patients. *Int. J. Cancer.* **83**: 486-490.

MAEDA, H., YAMAMOTO, T. (1996) Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **377**: 217-26.

MÄGERT, H.J., STÄNDKER, L., KREUTZMANN, P., ZUCHT, H.D., REINECKE, M., SOMMERHOFF, C.P., FRITZ, H., FORSSMANN, W.G. (1999) LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **274**: 21499-21502.

MILLER, M., SCHNEIDER, J., SATHYANARAYANA, B.K., TOTH, M.V., MARSHALL, G.R., CLAWSON, L., SELK, L., KENT, S.B., WLODAWER, A. (1989) Structure of complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate-based inhibitor at 2.3 Å resolution. *Science* **246**: 1149-52.

MORELLE, W., CAPON, C., BALDUYCK, M., SAUTIERE, P., KOUACH, M., MICHALSKI, C., FOURNET, B., MIZON, J. (1994) Chondroitin sulphate covalently cross-links the three polypeptide chains of inter-alpha-trypsin inhibitor. *Eur. J. Biochem.* **221**: 881-888.

MULLIGAN, M.S., LENTSCH, A.B., HUBER-LANG, M., GUO, R.F., SARMA, V., WRIGHT, C.D., ULICH, T.R., WARD, P.A. (2000) Anti-inflammatory effects of mutant forms of secretory leukocyte protease inhibitor. *Am. J. Pathol.* **156**: 1033-1039.

NEURATH, H. (1984) Evolution of proteolytic enzymes. *Science.* **224**: 350-357.

ODA, K., LASKOWSKI, M., KRESS, L.F., KOWALSKI, D. (1977) Human plasma α 1-proteinase inhibitor: Temporary inhibition and multiple molecular forms of the complex with porcine trypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **76**: 1062-1070

PERLMUTTER, D.H., GLOVER, G.I., RIVETNA, M., SCHASTEEN, C.S., FALLON, R.J. (1990) Identification of a serpin-enzyme complex receptor on human hepatoma cells and human monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 3753-3757.

PERLMUTTER, D.H. (1991) The cellular basis for liver injury in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Hepatology.* **13**: 172-185.

POTEMPA, J., KORZUS, E., TRAVIS, J. (1994) The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* **269**: 15957-15960.

REMOLD-O'DONNELL, E., NIXON, J.C., ROSE, R.M. (1989) Elastase inhibitor. Characterization of the human elastase inhibitor molecule associated with monocytes, macrophages, and neutrophils. *J. Exp. Med.* **169**: 1071-1086.

RICHTER, R., SCHULZ-KNAPPE, P., SCHRADER, M., STÄNDKER, L., JÜRGENS, M., TAMMEN, H., FORSSMANN, W.G. (1999) Composition of the peptide fraction in human blood plasma: database of circulating human peptides. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **726**: 25-35.

RIEWALD, M., SCHLEEF, R.R. (1996) Human cytoplasmic antiproteinase neutralizes rapidly and efficiently chymotrypsin and trypsin-like proteases utilizing distinct reactive site residues. *J. Biol. Chem.* **271**: 14526-14532.

RIEWALD, M., MORGENSTERN, K.A., SCHLEEF, R.R. (1996) Identification and characterization of the cytoplasmic antiproteinase (CAP) in human platelets. Evidence for the interaction of CAP with endogenous platelet proteins. *J. Biol. Chem.* **271**:7160-7167.

ROBERTS, R.M., MATHIALAGAN N., DUFFY, J.Y., SMITH, G.W. (1995) Regulation and regulatory role of proteinase inhibitors. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **5**: 385-436.

SCHECHTER, I., BERGER, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**: 157-162.

SCHEPKY, A.G., BENSCH, K.W., SCHULZ-KNAPPE, P., FORSSMANN, W.G. (1994) Human hemofiltrate as a source of circulating bioactive peptides: determination of amino acids, peptides and proteins. *Biomed. Chromatogr.* **8**: 90-94.

SCHULZ-KNAPPE, P., RAIDA, M., MEYER, M., QUELLHORST, E.A., FORSSMANN, W.G. (1996) Systematic isolation of circulating human peptides: the concept of peptide trapping. *Eur. J. Med. Res.* **1**: 223-236.

SCHULZ-KNAPPE, P., SCHRADER, M., STANDKER, L., RICHTER, R., HESS, R., JURGENS, M., FORSSMANN, W.G. (1997) Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides. *J. Chromatogr. A.* **776**: 125-132.

SCOTT, M.J., HUCKABY, C.S., KATO, I., KOHR, W.J., LASKOWSKI, M. JR., TSAI, M.J., O'MALLEY, B.W. (1987) Ovoinhibitor introns specify functional domains as in the related and linked ovomucoid gene. *J. Biol. Chem.* **262**: 5899-5907.

SCOTT, F.L., COUGHLIN, P.B., BIRD, C., CERRUTI, L., HAYMAN, J.A., BIRD, P.I. (1996) Proteinase inhibitor 6 cannot be secreted, which suggests it is a new type of cellular serpin. *J. Biol. Chem.* **271**: 1605-1612.

SCOTT, F.L., PADDLE-LEDINEK, J.E., CERRUTI, L., COUGHLIN, P.B., SALEM, H.H., BIRD, P.I. (1998) Proteinase inhibitor 6 (PI-6) expression in human skin: induction of PI-6 and a PI-6/proteinase complex during keratinocyte differentiation. *Exp. Cell. Res.* **245**: 263-271.

SEERAM, S.S., HIRAGA, K., ODA, K. (1997) Resynthesis of reactive site peptide bond and temporary inhibition of streptomyces metalloproteinase inhibitor. *J. Biochem.* **122**: 788-794

SEIFE, C. (1997) Blunting nature's Swiss army knife. *Science* **277**: 1602-1603.

SOMMERHOFF, C.P., SOLLNER, C., MENTELE, R., PIECHOTTKA, G.P., AUERSWALD, E.A., FRITZ, H. (1994) A Kazal-type inhibitor of human mast cell tryptase: isolation from the medical leech *Hirudo medicinalis*, characterization and sequence analysis. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **375**: 685-694.

SOMMERHOFF, C.P., BODE, W., PEREIRA, P.J., STUBBS, M.T., STURZEBECKER, J., PIECHOTTKA, G.P., MATSCHINER, G., BERGNER, A. (1999) The structure of the human betaII-tryptase tetramer: fo(u)r better or worse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 10984-10991.

SOMMERHOFF, C.P., BODE, W., MATSCHINER, G., BERGNER, A., FRITZ, H. (2000) The human mast cell tryptase tetramer: a fascinating riddle solved by structure. *Biochim. Biophys. Acta.* **1477**: 75-89.

SOUTHAN, C. (2000) Assessing the protease and protease inhibitor content of the human genome. *J. Pept. Sci.* **6**: 453-458.

SPRECHER, E., CHAVANAS, S., DIGIOVANNA, J.J., AMIN, S., NIELSEN, K., PRENDIVILLE, J.S., SILVERMAN, R., ESTERLY, N.B., SPRAKER, M.K., GUELG, E., DE LUNA, M.L., WILLIAMS, M.L., BUEHLER, B., SIEGFRIED, E.C., VAN MALDERGEM, L., PFENDNER, E., BALE, S.J., UITTO, J., HOVNANIAN, A., RICHARD, G. (2001) The spectrum of pathogenic mutations in SPINK5 in 19 families with Netherton syndrome: implications for mutation detection and first case of prenatal diagnosis. *J. Invest. Dermatol.* **117**: 179-187.

STÄNDKER, L., (1994) Isolierung und Strukturaufklärung neuer Peptide aus humanem Hämofiltrat. Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der Universität Hannover.

STEUBE, K., KUNZ, D. (1988) Struktur und Funktion menschlicher Proteinase-Inhibitoren. *Biologie in unserer Zeit.* 18. Jahrg. **3**: 71-76

STROUD, R.M., KOSSIAKOFF, A.A., CHAMBERS, J.L.(1977) Mechanisms of zymogen activation. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **6**: 177-193.

STRYER, L. (1999) *Biochemie.* 4. neubearb. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

TSCHESCHE, H., KOLKENBROCK, H., BODE, W. (1987) The covalent structure of the elastase inhibitor from *Anemonia sulcata* - a "non-classical" Kazal-type protein. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **368**: 1297-1304.

TWINING, S.S. (1994) Regulation of proteolytic activity in tissues. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**: 315-383.

VEMURI, S., YU, C.T., ROOSDORP, N. (1993) Formulation and stability of recombinant alpha 1-antitrypsin. *Pharm. Biotechnol.* **5**: 263-286.

- WACHTER, E., HOCHSTRASSER, K. (1981) Kunitz-type proteinase inhibitors derived by limited proteolysis of the inter-alpha-trypsin inhibitor, IV. The amino acid sequence of the human urinary trypsin inhibitor isolated by affinity chromatography
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. **362**: 1351-1355.
- WALKER, B., LYNAS, J.F. (2001) Strategies for the inhibition of serine proteases. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 596-624.
- WALLEY, A.J., CHAVANAS, S., MOFFATT, M.F., ESNOUF, R.M., UBHI, B., LAWRENCE, R., WONG, K., ABECASIS, G.R., JONES, E.Y., HARPER, J.I., HOVNANIAN, A., COOKSON, W.O. (2001) Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease.
Nat. Genet. **29**: 175-178.
- WEISS, K.M. (1998) In search of human variation. *Genome Res.* **8**: 691-697.
- WIEDOW, O., SCHRODER, J.M., GREGORY, H., YOUNG, J.A., CHRISTOPHERS, E. (1990) Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* **265**: 14791-14795.
- WITT, H., HENNIES, H.C., BECKER, M. (2000) SPINK1 mutations in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* **120**: 1060-1061.
- XU, Y., CARR, P.D., GUSS, J.M., OLLIS, D.L. (1998) The crystal structure of bikunin from the inter-alpha-inhibitor complex: a serine protease inhibitor with two Kunitz domains. *J. Mol. Biol.* **276**: 955-966.
- YE, S., CECH, A.L., BELMARES, R., BERGSTROM, R.C., TONG, Y., COREY, D.R., KANOST, M.R., GOLDSMITH, E.J. (2001) The structure of a Michaelis serpin-protease complex. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 979-983.
- ZHOU, J.M., LIU, C., TSOU, C.L. (1989) Kinetics of trypsin inhibition by its specific inhibitors. *Biochemistry.* **28**: 1070-1076

6 Anhang

6.1 Geräte und Chemikalien

Waagen:

Analytik-Waage AC 120 S	Sartorius, Göttingen, D
Laborwaage MC-1	Sartorius, Göttingen, D

Thermostaten, Rührer:

Labormixer JKA VF 2	Janke & Kunkel, Staufen, D
Magnetrührer KMO 2	Janke & Kunkel, Staufen, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D

Filtration:

Filterpapier 12 - 25 μm und 7 - 12 μm	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Sterilfilter Minisart 0,2 μm	Sartorius, Göttingen, D

Zentrifuge, Lyophile:

Sigma 2-15	Sigma, Osterode, D
Hetovac VR-1	Heto-Holten, Allerød, DK
Christ Alpha 1-4	Sigma, Osterode, D

Sonstiges:

pH-Meter CG 804	Schott, Hofheim a. Ts., D
Reinstwasseranlage Milli-Q ^{UF} -Plus	Millipore, Eschborn, D
Tiefkühltruhe UF-85-360 T	Colora Meßtechnik, Lorch, D
Vacuumpumpe Aquastop	Van der Heijden, Dörentrup, D
Empore TM 96-well Extraction Disc	3M, St. Paul, MN, USA

Photometer, MTP-Leser:

Photometer DU640	Beckmann, München, D
MRX-II MTP-Reader	Dynex Tech., Chantilly, VA, USA

Chromatographiesysteme:

Biocad 60	PerSeptive Biosystems, Freiburg, D
Kontron:	Kontron, Neufahrn, D
2 Doppelkolbenpumpen Typ 420	
2 Doppelkolbenpumpen Typ 422 S	
2 Doppelkolbenpumpen Typ 430	
Durchflußphotometer Typ 430 / 432	
DAD 440	
Steuercomputer Data-System Typ 450	
Steuersoftware Kontron 2000	
ABI 140 D	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
Fraktionssammler 2110 / 2128	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Edman Sequenzierung:

Procise™ Protein sequencer	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
494 Protein sequencer	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
785 A Absorbance Detector	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
Software 610 A 2.1	Applied Biosystems, Weiterstadt, D

Massenspektrometrie:

ESI-Ion-trap-MS LCQ™	ThermoFinnigan, Egelsbach, D
MALDI-MS LaserTec RBT II	Perseptive Biosystems / Vestec, Houston, Texas, USA
MALDI-MS Voyager DE-Pro	Applied Biosystems, Weiterstadt, D

Kapillarzonenelektrophorese:

Elektrophoresesystem P/ACE™ MDQ	Beckman, München, D
Fused silica capillary TSP 075375	Composite Metal Services Ltd., UK

Aminosäureanalytik:

Aminoquant 1090 II	Hewlett Packard, Ft. Collins, CO, USA
--------------------	---------------------------------------

Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den Firmen Sigma (Deisenhofen, D) und Merck (Darmstadt, D) bezogen. Es wurden ausschließlich Chemikalien und Lösungsmittel in der Reinheitsstufe p.a. verwendet.

Standard-Pufferlösungen:

Tris-HCl-Puffer:	100 mM Tris-HCl, pH 7,4
Ammoniumcarbonatpuffer:	100 mM Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,0
Puffer für Trypsin-Test:	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,01 % (v/v) Triton X-100
Puffer für Thrombin-Test:	50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 227 mM NaCl, 0,01 % (v/v) Triton X-100
Puffer für Tryptase-Test:	50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM NaCl, 0,01 % (v/v) Triton X-100

Matrixlösung für MALDI-MS:

2,5 mg CHC
2,5 mg Fucose
250 µl 0,1 % TFA (v/v)
250 µl ACN

Enzyme:

Trypsin, TPCK behandelt (aus Rinderpankreas) E.C. Nr. 3.4.21.4	Fluka, Deisenhofen, D
Thrombin (aus Rinderplasma) E.C. Nr. 3.4.21.5	Sigma; Deisenhofen, D
Tryptase, humane Lunge, Rekombinant aus <i>Pichia Pastoris</i> E.C. Nr. 3.4.21.59	Promega, Madison, WI, USA
Endoproteinase GLU-C, sequencing grade (aus <i>Staphylococcus aureus</i> V8) E.C. Nr.: 3.4.21.19	Roche, Mannheim, D
Chymotrypsin, sequencing grade (aus Rinderpankreas) E.C. Nr.: 3.4.21.1	Roche, Mannheim, D
Chromogene Substrate:	
L-BAPNA	Sigma, Deisenhofen, D
Chromozym [®] TH	Roche, Mannheim, D

6.2 Computer, Programme und Statistik

Zur Erstellung dieser Dissertation diente ein Personal-Computer mit Programmen zur Text und Graphikbearbeitung (Microsoft[®] Office , Adobe Photoshop, und Corel Draw). Zum Durchsuchen öffentlicher Datenbanken wurde der NCBI-Server und der BLAST-Algorithmus verwendet. Daten wurden statistisch mit Microsoft[®]-Excel 97 ausgewertet. Als Standardabweichung (SD) wurde angegeben:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_{\text{Mittelwert}})^2}{n - 1}}$$

mit y_i = Einzel-Meßwerte; $y_{\text{Mittelwert}}$ = Summe der Einzel-Meßwerte; n = Anzahl der Replika

6.3 Publikationen

Stand: 02/2002

Originalarbeiten:

Uhrigshardt, H., Walden, M., John, H. und Anemueller, S. *Purification and characterization of the first archeal aconitase from the thermoacidophilic Sulfolobus acidocaldarius*. European Journal of Biochemistry, 2001, **268**: 1760-1771.

Sunkomat, J., Krämer, C., Witte, J., Walden, M., Forssmann, W.G., Schmidt, B., Böger, R., Tsakis, D., Drexler, H. und Schieffer, B. *Anti-inflammatory and anti-aggregatory properties of the Angiotensin II Type 1 Antagonist Losartan*. Circulation Research (Akzeptiert, in Druck)

Uhrigshardt, H., Walden, M., John, H., Petersen, A. und Anemueller, S. *Evidence for an operative glyoxylate cycle in the thermoacidophilic crenarchaeon Sulfolobus acidocaldarius*. European Journal of Biochemistry. (Akzeptiert, in Druck)

Übersichtsartikel:

Mägert, H.J., Kreutzmann, P., Ständker, L., Walden, M., Drögemüller, K. und Forssmann, W.G. *LEKTI: A multidomain serine proteinase inhibitor with pathophysiological relevance*. Int. J. Biochem. Cell. Biol. (Akzeptiert, in Druck)

Mägert, H.J., Kreutzmann, P., Drögemüller, K., Ständker, L., Adermann, K., Walden, M., John, H., Korting, H.C. und Forssmann, W.G. *The 15-domain serine proteinase inhibitor LEKTI: Biochemical properties, genomic organisation, and pathophysiological role*. European Journal of Medical Research(Akzeptiert, in Druck).

Walden, M., Kreutzmann, P., Drögemüller, K., John, H., Forssmann, W.G. und Mägert, H.J. *Biochemical features, molecular biology, and clinical relevance of the human 15-domain serine proteinase inhibitor LEKTI*. (Eingereicht bei: Biological Chemistry).

Publizierte Abstrakta:

Sunkomat J., Krämer C., Luchtefeld M., Walden M., Forssmann WG., Schmidt B., Böger R., Tsakis D., Drexler H., Schieffer B. *Losartan inhibits cyclooxygenase-2-dependent generation of pro-inflammatory and pro-aggregatory prostaglandins via its EXP3179 metabolite*. Congress of the American Heart Association 2000. Veröffentlicht in: *Circulation*, (2000) Suppl. II, p. 433

Sunkomat J., Krämer C., Walden M., Forssmann WG., Schmidt B., Noller H., Drexler H., Schieffer B. *Losartan als Entzündungshemmer? –Rolle des Metaboliten M6 bei Infammationsprozessen*. 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 27.-29. April 2000. Veröffentlicht in: *Zeitschrift für Kardiologie* (2000) **89** Issue17, Suppl. 5

Sunkomat J., Krämer C., Noller H., Schmidt B., Walden M., Forssmann WG., Drexler H., Schieffer B. *Blockade der Thromboxan A₂-vermittelten Thrombozytenaggregation durch den Losartan Metaboliten EXP3179*. 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 27.-29. April 2000. Veröffentlicht in: *Zeitschrift für Kardiologie* **89** (2000) Issue17, Suppl. 5

Mägert H.J., Kreutzmann P., Drögemüller K., Ständker L., Walden M., Forssmann WG. *LEKTI: A human lympho-epithelial multidomain serine proteinase inhibitor with pathophysiological relevance*. 27th FEBS Meeting, June 30 – July 5, 2001 Lisbon, Portugal. Veröffentlicht in: *European Journal of Biochemistry*, (2001) **268** (S1):195.

Nicht publizierte Abstrakta:

Walden, M., Raida, M., John, H. und Forssmann, W.G. *Identification of peptides from human hemofiltrate by combined liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry*. Posterpräsentation auf dem GBM Workshop „Bioanalytik für junge Wissenschaftler“ Schloss Rauischholzhausen, 02.-04. November 1999

Raida, M., Walden, M., Arndt, S., Seiler, P., Ständker, L., Meyer, M. und Forssmann, W.G. *Characterisation of Peptide Banks by Mass Spectrometric Methods*. Posterpräsentation auf der 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied topics, Dallas, Texas (USA), 13.-17. Juni 1999

Walden, M., Kreutzmann, P., Drögemüller, K., John, H., Forssmann, W.G. und Mägert, H.J. *Biochemical features, molecular biology, and clinical relevance of the human 15-Domain serine proteinase inhibitor LEKTI*. Posterpräsentation auf dem 2nd General Meeting of the International Proteolysis Society (IPS) associated with the International Conference on Protease Inhibitors (ICPI), München, 31.Oktober bis 04.November 2001

Vorträge

Walden, M. *Massenspektrometrie in der Protein- und Peptidanalytik*. Vortrag auf Einladung von Prof. T. Scheper im Rahmen des Technisch-Chemischen Kolloquiums am 20.04.2001, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover.

Miterfinderrechte an Patenten

Neue Verbindungen zur Behandlung inflammatorischer und kardiovaskulärer Krankheiten. Erfinder: Drexler, H., Schieffer, B. Walden, M., Schmidt, B. Forssmann, W.G. Europ. Pat. Nr.: PCT/EP 01/05043

Humanes zirkulierendes LEKTI-Fragment HF 7072 und seine Verwendung. Erfinder: Walden, M., Ständker, L., Kreutzmann, P., Forssmann, W.G. Deutsche Pat. Nr.: 100 21 615.3

Neue Vorrichtungen für quantitative Massenspektrometrie: Die PICK-Kanalbeschleunigungstechnik mit Hochfrequenz- und Spannungsmodulation. Erfinder: Forssmann, W.G., Walden, M., John, H. Deutsche Pat. Nr.: 101 34 652.2

6.4 Lebenslauf

Name: Michael Walden

Geburtsdatum: 24.10.1967

Geburtsort: Bremen

Familienstand: Ledig

Schulischer Werdegang: 1974 – 1978 Grundschule Witzlebenstraße, Bremen
1978 – 1980 Orientierungsstufe Wilhelm-Leuschner-Straße, Bremen
1980 – 1984 Sekundarstufe I SZ Parsevalstraße, Bremen
1984 – 1987 Sekundarstufe II SZ Im Holter Feld, Bremen
1987 Abitur

Wehrdienst: 1987 – 1989 Soldat auf Zeit (SaZ 2), Luftwaffe,
Stabsbatterie FlaRakRegiment 2, Bremervörde

Studium: WS 1989/90 Studienbeginn Chemie/Diplom Universität Hannover
SS 1998 Diplomprüfung
WS 1998/99 Diplomarbeit im Institut für Technische Chemie der
Universität Hannover, Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Scheper.
*Aufbau einer Qualitätskontrolle für die isolierten
Molkeproteine Lactoferrin und Lactoperoxidase.*

Dissertation: 02.1999 Beginn der Dissertation im Niedersächsischen Institut für
Peptidforschung, heute IPF PharmaCeuticals GmbH.
Wissenschaftliche Leitung: Prof. Dr. Dr. W.G. Forssmann.
*Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung von
zirkulierenden Proteinase-inhibitorischen Peptiden.*

Tag der Promotion: 08. Februar 2002

Danksagung

Für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in den Forschungslaboratorien der IPF PharmaCeuticals GmbH, Hannover zu erstellen, sowie für die Überlassung des interessanten Themas, möchte ich dem wissenschaftlichen Direktor Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. W.G. Forssmann danken.

Herrn Prof. Dr. T. Scheper vom Institut für Technische Chemie der Universität Hannover danke ich für die Übernahme des Referates, Herrn Prof. Dr. W. Müller vom Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover für die Übernahme des Koreferates.

Besonderer Dank gilt dem ehemaligen Leiter der Abteilung Analytische-Peptid-Chemie im IPF, Herrn Dr. Manfred Raida, für die Einweisung in die Geheimnisse der Massenspektrometrie, sowie dem derzeitigen Leiter, Herrn Dr. Harald John, für die sehr gute Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit sowie für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Peter Kreutzmann und Herrn PD Dr. Hans-Jürgen Mägert für die fachliche Unterstützung im Rahmen der LEKTI-Arbeitsgruppe.

Allen Mitarbeitern der Abteilung 2, Frau Dr. Susann Arndt, Frau Jutta Barras-Akhnoukh, Frau Stefanie Schulz sowie Frau Sandra Schäfer und auch der ehemaligen Mitarbeiterin Frau Dr. Petra Seiler vielen Dank für die große Unterstützung und das besonders gute Arbeitsklima. Auch allen anderen Mitarbeitern des IPF, besonders Frau Dr. Cornelia Liepke und Herrn Dr. Dirk Motzkus, danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung meiner Arbeit.

Ganz herzlicher Dank an meine Familie, die mir diesen Weg erst ermöglicht hat und mich immer unterstützt, sowie an meine Freundin Conny und an alle Freunde und Bekannte, die für das angenehme private Umfeld gesorgt haben.