

Isolierung und Charakterisierung
von hNLP, einem humanen
zirkulierenden Peptid

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Biol. Burkhard Kleemeier
geboren am 14.06.68 in Bad Oeynhausen

Februar 1998

Referent: Prof. Dr. Bernd Otto
Abteilung Gentechnologie
Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung,
Hannover

Korreferent: PD. Dr. Walter Müller
Abteilung Physiologische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 05.02.98

Meinen Eltern

Abstract

Hemofiltration is a routine treatment for patients with chronic renal failure to remove substances that are normally cleared by the kidney. A filter membrane with a molecular mass cut-off of 20 kD is used, which virtually excludes plasma proteins. Being available in large quantities, the hemofiltrate is an excellent source of biologically active peptides that circulate in the human blood.

A novel regulatory peptide, named hNLP, was isolated from the hemofiltrate of patients with end stage renal disease. hNLP has a relative molecular mass of 3762 dalton and consists of 34 amino acids including four cysteines linked to disulfide bonds. A search for homology which was performed in the Swiss-Prot, PIR, EMBL and gene bank data bases showed that the sequence is new and does not belong to an already known peptide family. Additionally two other molecular forms of the hNLP circulate in the blood which is the transport medium of many peptide hormones. A fragment of the hNLP was even detected in the urine of healthy probands, probably the peptide is excreted by the kidney. By sequencing of homolog EST-clones and application of the RACE technique the complete sequence of the human and murine cDNA was determined. The human cDNA revealed that the isolated peptides represent C-terminal fragments of a 77-amino acid long precursor. The N-terminal region of the precursor possesses characteristics of a signal peptide. Several mono and dibasic regions indicate the processing of the precursor by prohormone-convertases such as subtilisins. The comparison of the human and the murine NLP showed a sequence identity of 84,4 %. The high sequence conservation refers to an essential function of the discovered peptide in the human organism. The expression of the hNLP gene was studied in several tissues by Northern analysis. Positive bands of the expected size were obtained with RNA extracted from liver, kidney and small intestine. This tissue specific expression is another hint for the regulatory role of the hNLP.

keywords: hemofiltrate, peptide trapping, regulatory peptides

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Integration und Kommunikation in lebenden Systemen	1
1.2	Synthese, Prozessierung und Sekretion von regulatorischen Peptiden.....	2
1.3	Liganden-Rezeptor-Interaktion und Signaltransduktion	4
1.4	Isolierung von biologisch aktiven Peptiden.....	5
1.5	Hämofiltrat als Quelle biologisch aktiver Peptide.....	7
1.6	Peptide-Trapping	9
1.7	Zielsetzung	10
2	Material.....	11
2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	11
2.2	Enzyme.....	12
2.3	Kits.....	12
2.4	Vektoren.....	12
2.5	Mikroorganismen.....	13
2.6	DNA-Größenmarker.....	13
2.7	Oligonukleotide	13
3	Methoden.....	15
3.1	Gewinnung des Hämofiltrates (HF).....	15
3.2	Peptidextraktion aus Hämofiltrat	15
3.2.1	HF-Batchextraktion	15
3.2.2	pH-Stufenelution	16
3.2.3	Präparative Reverse-Phase-Chromatographie	16
3.2.4	Semi-Präparative Kationenaustauscher-Chromatographie	17
3.2.5	Analytische Reverse-Phase-Chromatographie	17
3.2.6	Analytische Kationenaustauscher-Chromatographie	18
3.3	Peptidanalytik.....	18
3.3.1	Massenspektrometrie (MS).....	18
3.3.2	Sequenzierung	19
3.3.3	Kapillarzonelektrophorese (CZE).....	19
3.3.4	Aminosäureanalyse (ASA).....	20
3.3.5	Ellman-Test.....	21
3.3.6	Proteaseverdau	21
3.4	Peptidsynthese.....	21

3.4.1	Synthese des linearen Peptids [Cys(Trt)16,27, Cys(Acm)22,32] NLP(38-77)	21
3.4.2	Selektive Einführung der Disulfidbrücken	22
3.5	Datenbankrecherche	23
3.6	Molekularbiologische Standardmethoden	24
3.6.1	Sterilisation von Lösungen und Materialien	24
3.6.2	Kultivierung von E.coli Stämmen und Klonen	24
3.6.3	Präparation von Plasmid DNA	24
3.6.4	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	25
3.6.5	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	26
3.6.6	Agarosegelelektrophorese von DNA	26
3.6.7	Phenolextraktion	27
3.6.8	Ethanol-fällung	28
3.6.9	PEG-Fällung	28
3.6.10	Aufreinigung von Oligonukleotiden	28
3.7	Klonierung von DNA-Fragmenten	29
3.7.1	Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA	30
3.7.2	Ligation	30
3.7.3	Herstellung transformationskompetenter E.coli Zellen	31
3.7.4	Transformation	31
3.8	Northern Blot	32
3.8.1	RNA-Extraktion	33
3.8.2	Formaldehyd Agarosegelelektrophorese von RNA	33
3.8.3	Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Blotten)	34
3.8.4	Herstellung von Gensonden	35
3.8.5	Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten	35
3.8.6	Reinigung radioaktiv markierter DNA	35
3.8.7	Aktivitätsmessung	36
3.8.8	Hybridisierung	36
3.8.9	Autoradiographie	37
3.9	Southern Blot	37
3.10	Sequenzierung	38
3.10.1	Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs	39
3.10.2	Denaturierende Polyacrylamid-Sequenziergele	39
3.10.3	Elektrophoresebedingungen	40
3.11	Genbank-Screening	41
3.11.1	Herstellung der murinen Cosmidbank	41
3.11.2	Organisation der Cosmidbank	41

3.11.3	Kolonie-Screening.....	42
3.11.4	Präparation der Cosmid-DNA	42
3.12	Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
3.12.1	Kolonie-PCR.....	44
3.12.2	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR).....	45
3.12.3	RACE-PCR	46
3.13	Genome Walking.....	47
3.14	Radiation Hybrid Mapping.....	48
4	Ergebnisse.....	49
4.1	Peptide Trapping	49
4.1.1	Isolierung und Strukturaufklärung von hNLP.....	50
4.1.2	Kapillarzonenelektrophorese	53
4.1.3	Massenspektrometrie	53
4.1.4	Analyse der Primärstruktur und der Kettenkonformation (Disulfidbrücken).....	54
4.1.5	Datenbankrecherche	56
4.1.6	Isolierung weiterer Molekülformen des NLPs.....	58
4.2	Sequenzierung der humanen und der murinen NLP cDNA.....	58
4.2.1	Humane cDNA.....	58
4.2.2	Murine cDNA.....	60
4.2.3	5'-RACE der humanen cDNA des NLPs	60
4.3	Gewebeverteilung des NLPs.....	62
4.3.1	RT-PCR Analyse	62
4.3.2	Northern Blot	63
4.4	Klonierung und Sequenzierung des humanen NLP Gens.....	65
4.4.1	Sequenzierung der Promotorregion.....	68
4.4.2	Nukleotidsequenz des humanen NLP Gens.....	68
4.4.3	Sequenzanalyse der Promotorregion des hNLP Gens.....	70
4.5	Chromosomale Lokalisation des hNLP Gens.....	71
4.6	Screening einer murinen Genbank nach dem homologen NLP Gen.....	74
4.6.1	PCR-Screening.....	74
4.6.2	Kolonie-Screening.....	75
4.6.3	Restriktionskartierung des Cosmidclons 127-2.....	76
4.6.4	Subklonieren des mNLP Gens.....	78
4.6.5	Nukleotidsequenz des murinen NLP Gens	78

5	Diskussion	80
5.1	Isolierung des hNLPs aus Hämofiltrat	80
5.2	hNLP, ein cyclisches Peptid.....	81
5.3	Sequenzanalyse der cDNA des hNLP.....	82
5.3	Prozessierung des NLPs	82
5.4	Vergleich der Primärstrukturen des humanen und des murinen NLPs.....	85
5.5	Expressionsmuster des humanen und des murinen NLPs.....	86
5.6	Sequenzanalyse des humanen NLP Gens	87
5.7	Chromosomale Lokalisation des hNLP Gens.....	89
5.8	Knock-out Maus	91
5.9	Biologische Relevanz von hNLP.....	93
6	Zusammenfassung.....	95
7	Literaturverzeichnis.....	97
8.	Abkürzungen	106

1 Einleitung

1.1 Integration und Kommunikation in lebenden Systemen

Die kaum zu überschauende Vielfalt von gleichzeitig oder in gesetzmäßiger Folge und Abhängigkeit ablaufenden Vorgänge in lebenden Organismen "zeigt eine bewundernswerte Regelmäßigkeit und Ordnung, die in der unbelebten Materie nicht ihresgleichen findet" (Schrödinger, 1944).

Im menschlichen und tierischen Organismus sind zwei Kommunikationssysteme, das phylogenetisch ältere endokrine System und das phylogenetisch jüngere Nervensystem, für die Koordination verantwortlich. Ersteres besteht aus spezialisierten Zellen, den endokrinen Zellen, die chemische Signalstoffe bilden und ins Kreislaufsystem abgeben. Diese Hormone werden mit dem Blutstrom in alle Teile des Körpers transportiert, steuern aber nur in bestimmten, jeweils auf sie abgestimmten Zielorganen bzw. -geweben (Targetstrukturen) Stoffwechselforgänge, kinetische oder morphogenetische Prozesse oder beeinflussen das Verhalten. Erfolgt die Bildung der Hormone in besonderen innersekretorischen Drüsen, handelt es sich um glanduläre Hormone, die von den aglandulären Hormonen (Gewebehormonen) unterschieden werden. Neurohormone werden im Perikaryon von Nervenzellen gebildet, im Axon transportiert und häufig in sekretorischen Vesikeln gespeichert. Bei Bedarf werden sie im Bereich eines Neurohämalorgans an das Blut abgegeben. Die Freisetzung der Neurosekrete kann durch chemische oder elektrische Reizung der Nervenzelle geschehen. Anhand der Neurosekretorischen Zellen wird die enge Wechselwirkung zwischen dem Hormonsystem und dem Nervensystem deutlich.

Das phylogenetische jüngere Nervensystem setzt sich aus Neuronen zusammen, die über ihre Axone miteinander in Kontakt stehen. Die Signalübertragung erfolgt hier über elektrische Impulse und Neurotransmitter, wobei letztere durch den synaptischen Spalt zur Empfängerzelle diffundieren und dort eine Änderung des Membranpotentials hervorrufen.

Nerven- und Hormonsysteme unterscheiden sich jedoch in der Art der Informationsübertragung. Das neuronale Kontrollsystem kommt mit wenigen und relativ unspezifischen Transmittersubstanzen aus, da die Anatomie der Nervenschaltungen die Spezifität gewährleistet. Die Hormone nutzen einen gemeinsamen Transportweg - nämlich das Kreislaufsystem - und wirken auf ihre Zielzellen ein; die Spezifität der Information wird in der chemischen Natur des Signals verschlüsselt.

Neben dieser klassischen Hormondefinition treten andere Hormone nicht in die Blutbahn ein, sondern wirken nur lokal über die interstitielle Flüssigkeit auf die eigene oder auf benachbarte Zellen (auto- bzw. parakriner Mechanismus).

Die Hormone gehören den unterschiedlichsten Stoffklassen an. Zu ihnen zählen die Steroide (Sexualhormone, Mineralocorticoide, Glucocorticoide u.a.), biogene Amine und Aminosäurederivate (Thyroxin, Adrenalin, Melatonin u.a.) sowie Peptide und Proteine (Insulin, Glucagon, Sekretin, Gastrin u.a.) (Karlson, 1982). Die zahlenmäßig größte Gruppe stellen die Peptide und Proteine dar. So handelt es sich bei den Hormonen des Gastrointestinaltraktes und des Hypothalamus-Hypophysen-Systems ausschließlich um Peptide und Proteine. Auch bei der interzellulären Kommunikation im hämatopoetischen System und im Immunsystem spielen Peptide und Proteine als Cytokine eine zentrale Rolle. Unter dem Oberbegriff Cytokine fassen Hopkins und Rothwell (1995) folgende Peptid- bzw. Proteinfamilien zusammen: Interleukine, Chemokine, Tumornekrose-Faktoren, Interferone, Koloniestimulierende Faktoren, Wachstumsfaktoren, Neurotrophine und Neuropoietine.

1.2 Synthese, Prozessierung und Sekretion von regulatorischen Peptiden

Die Biosynthese der regulatorischen Peptide verläuft nach den Prinzipien der Proteinbiosynthese über die Aktivierung ihrer Gene. Dabei wird zunächst durch die Transkription der DNA ein Primärtranskript gebildet, das dann durch Capping, Polyadenylierung und Splicing in eine reife mRNA überführt wird. Nach der Ausschleusung der mRNAs aus dem Zellkern in das Cytoplasma werden sie an den Ribosomen des rauhen Endoplasmatischen Retikulums (rER) in eine Folge von Aminosäuren translatiert. Die sekretorischen Peptide weisen an ihrem N-terminus ein Signalpeptid auf, das durch Wechselwirkung mit einem Signal Recognition Particle (SRP) und einem SRP-Rezeptor (Docking-Protein) die Anlagerung der Ribosomen am endoplasmatischen Retikulum bewirkt. Das lipophile Signalpeptid dringt in die Membran ein und wird im Lumen des ER proteolytisch abgespalten. Danach erfolgt die Translokation der wachsenden Peptidkette durch die ER-Membran (vektorielle Translation). Das Signalpeptid eines Präproteins fungiert somit als topogenes Signal in der Zelle (Blobel, 1980; Walter et al., 1984).

Sekretorische Peptide und Proteine werden in der Regel im rauhen Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat cotranslational oder posttranslational modifiziert, bevor sie in sekretorische Vesikel verpackt und durch Exocytose aus der Zelle ausgeschleust

werden. Zu den häufigsten posttranslationalen Modifikationen gehören die Disulfidbrücken-Bildung, die Ausbildung der Tertiärstruktur, die proteolytische Spaltung und die enzymatische Modifizierung von Aminosäureresten (Wold, 1981). Beispiele für die kovalente Modifikation einzelner Aminosäurereste in einer Polypeptidkette sind die Glykosylierung, die N-terminale Acetylierung, die C-terminale Amidierung sowie die Sulfatierung von Tyrosinresten (Baeuerle und Huttner, 1987).

Die Ausbildung der Oligosaccharidketten wird z.T. bereits während der vektorialen Translation im Lumen des rER begonnen und im Golgi-Apparat vollendet (N-Glykosylierung) oder findet ausschließlich im Golgi-Apparat statt (O-Glykosylierung). Die N-glykosidischen Ketten sind an Asparaginreste des Sequenzmotivs Asn-X-Thr/Ser gebunden. Nicht jedes Glykosylierungsmotiv wird jedoch glykosyliert (Hirschberg und Snider, 1987). Für die O-Glykosylierung ist kein Sequenzmotiv erforderlich, sie kann an Serin- und Threoninresten der Polypeptidkette erfolgen. Bei einigen Hormonen, wie z.B. dem Thyrotropin und dem Choriongonadotropin beeinflusst die Glykosylierung deren Affinität zu ihrem Rezeptor (Kobata, 1992).

Die posttranslationalen Modifikationen sind oft für die biologische Aktivität der Peptide von entscheidender Bedeutung. Für Gastrin (Rehfeld, 1981) und Substance P (Escher et al., 1982) ist bekannt, daß nur die Moleküle mit einem C-terminalen Amid biologisch aktiv sind. Beim β -Endorphin handelt es sich nur bei der acetylierten Form um das biologisch aktive Peptid (Glembotski, 1982). Von Gastrin und Cholecystokinin sind mehrere Varianten vorhanden, die sich in ihrer Kettenlänge und im Sulfatierungsmuster unterscheiden. Diese strukturellen Unterschiede wirken sich auch auf die biologische Aktivität der Peptide aus (Mutt, 1982).

Die Bindung eines Hormons an seinen Rezeptor ist durch eine hohe Spezifität und eine große Affinität gekennzeichnet. Die dreidimensionale Struktur ist ein wesentlicher Faktor bei dieser Liganden-Rezeptor-Interaktion. Disulfidbrücken, die zwischen Cysteinresten durch die Protein-Disulfid-Isomerase im ER-Lumen gebildet werden, tragen maßgeblich zur Ausbildung und Stabilisierung bestimmter Peptid- und Proteinkonformationen bei (Freedman, 1989). Bei Peptiden und Proteinen mit mehreren Cysteinen sind zahlreiche Kombinationen der Disulfidbrücken-Anordnung möglich. Dennoch wird in vivo nur eine der vielen Möglichkeiten realisiert. Da eine Vorhersage aus der Aminosäuresequenz nicht möglich ist, muß die Anordnung der Disulfidbrücken experimentell bestimmt werden.

1.3 Liganden-Rezeptor-Interaktion und Signaltransduktion

Regulatorische Peptide entfalten ihre Wirkung indirekt auf die Zielzelle, indem sie nach Bindung an Rezeptoren der Zellmembran die Synthese eines intrazellulären second messengers induzieren, der dann seinerseits erst den physiologischen Effekt bewirkt. Die Rezeptoren für die regulatorischen Peptide sind in der Regel integrale Membranproteine. Ihre extrazelluläre Domäne bildet den Hauptanteil des Membranproteins. Sie enthält die Ligandenbindungsstelle und trägt Oligosaccharidgruppen. Die Transmembrandomäne tritt entweder als einfache α -Helix auf oder sie kommt in mehrfachen, zusammengelagerten Helices vor. Homologien zwischen Rezeptoren sind in diesem Bereich besonders ausgeprägt, z.B. sind die G-Protein gekoppelten Rezeptoren durch sieben Transmembranhelices gekennzeichnet (Dohlmann et al., 1987). Die intrazelluläre Domäne ist für die Signaltransduktion besonders wichtig. Hier besitzen manche Rezeptoren eine Tyrosin-Kinase- oder eine Guanylatcyclase-Aktivität (Ullrich und Schlessinger, 1989; Garbers, 1989). Andere Rezeptoren leiten mittels ihrer intrazellulären Domäne das Hormonsignal über zwischengeschaltete Elemente, sogenannte G-Proteine (GTP-bindende Proteine), in die Zelle weiter (Gilman, 1987; Rodbell, 1992). G-Proteine wiederum können, je nach Zelltyp eine Reihe von membrangebundenen Enzymen modulieren. Zu diesen Enzymen gehören die Adenylatcyclase, die Phospholipase C und die Phospholipase A₂.

Da die Bindung eines Peptidliganden an seinen spezifischen Rezeptor die Bildung von vielen second messenger Molekülen auslöst, ist die Signaltransduktion mit einer enormen Verstärkung des Signals verbunden. Man kennt bisher drei second messenger Systeme:

1. Zyklische Nukleotide, wie cAMP und cGMP, die von der membranständigen Adenylatcyclase bzw. einer Guanylatcyclase gebildet werden. Das bei der Aktivierung der Adenylatcyclase aus ATP gebildete cAMP bindet an eine cAMP-abhängige lösliche Protein-Kinase, die - auf diese Weise aktiviert - zahlreiche zelluläre Proteine phosphoryliert und dadurch in ihren Aktivitäten beeinflusst (Taylor, 1989). Ein Kaskadenmechanismus setzt ein, der durch eine Phosphodiesterase, die cAMP in inaktives AMP umwandelt, und natürlich auch durch entsprechende Phosphatasen unterbrochen werden kann.

2. Auch Calcium-Ionen zählen zu den second messenger Molekülen. Zahlreiche enzymatische und andere Vorgänge in der Zelle werden durch Ca²⁺ beeinflusst. Dabei wirkt dieses Ion in der Regel nicht direkt, sondern in Kombination mit besonderen Ca²⁺ bindenden Proteinen. Das bekannteste dieser Proteine ist das ubiquitäre Calmodulin.

3. Die beiden sekundären Boten Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) (Berridge, 1987) entstehen aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül, dem Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat. Dieses nur in sehr geringer Konzentration vorkommende Phospholipid der Plasmamembran wird durch die Phospholipase C hydrolytisch gespalten. IP₃ ist wasserlöslich und kann so ungehindert in das Cytoplasma diffundieren. Dort löst es die Freisetzung von Ca²⁺ aus, das im Endoplasmatischen Retikulum gespeichert ist.

Diacylglycerol bleibt als Lipid in der Plasmamembran und aktiviert die Protein-Kinase C, die auch noch Ca²⁺ und Phospholipide für ihre Aktivierung benötigt. Vertreter dieser Enzymfamilie üben in der Zelle viele regulatorische Funktionen aus, z.B. aktivieren sie den Na⁺/H⁺-Translokator (Kikkawa und Nishizuka, 1986). Das besondere an dieser Phosphoinositol-Lipid-Kaskade ist, daß gleichzeitig zwei second messenger entstehen, die verschiedene Wirkungsbereiche haben und zusätzlich mit einem dritten second messenger System, dem des Calciums, verknüpft sind.

1.4 Isolierung von biologisch aktiven Peptiden

Mit dem Fortschritt des Humanen Genom Projektes stellt sich die Frage, inwieweit die Peptidisolierung noch sinnvoll ist, da nach Aufklärung der Gensequenzen die entsprechenden Peptidsequenzen deduktiv abgeleitet werden können. Der nächste Schritt wäre dann anhand der Sequenzinformation die entsprechenden bioaktiven Peptide zu synthetisieren. Trotz dieser potentiellen Möglichkeit gibt es doch verschiedene Gründe für die Notwendigkeit der Weiterführung von Peptidisolierungen. Nicht alle biologisch aktiven Peptide werden ribosomal synthetisiert und bei den primären Biosyntheseprodukten erfolgt in vielen Fällen ein nachgeschaltetes, posttranslationales Processing, so daß aus der Gensequenz nur unvollständige Informationen über die tatsächliche Sequenz und Struktur abgeleitet werden können (Mutt, 1983 und 1993).

Der sprunghafte Anstieg der Anzahl neuer regulatorischer Peptide ging mit der Entwicklung chromatographischer Trenntechniken und schnellerer und empfindlicherer Analyseverfahren zur Strukturaufklärung einher, wie z.B. der schrittweisen, N-terminalen Peptidsequenzierung (Edman, 1956; Hewick, 1981) und der automatisierten Aminosäureanalyse (Spackman et al., 1958, Hendrickson et al., 1984). Es konnten zunehmend Peptide isoliert werden, die in weitaus geringerem Maße im Organismus gebildet werden. Ein Überblick über die veröffentlichten Peptidsequenzen bioaktiver Peptide bis 1988 wird in Abbildung 1.1 gezeigt (Sundler & Håkanson 1988).

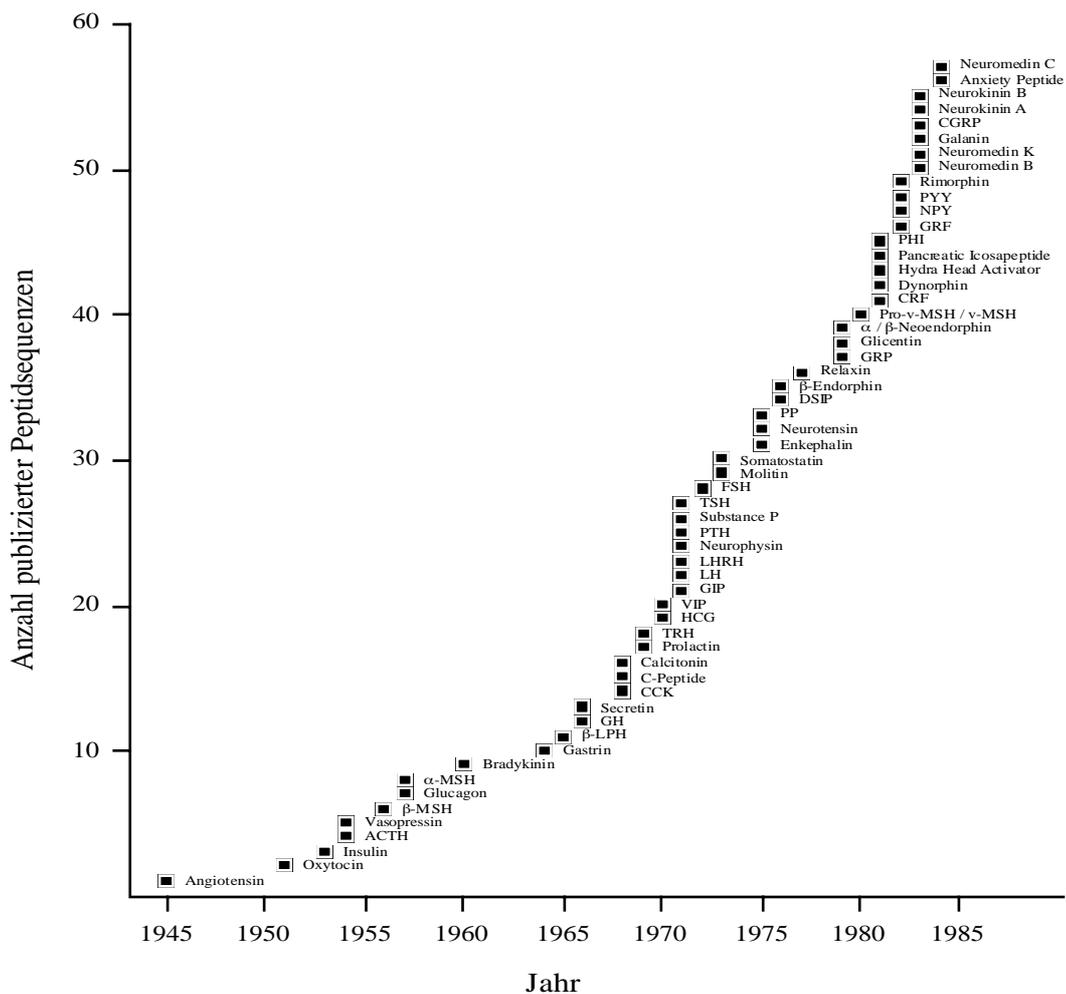


Abb. 1.1 Veröffentlichte Sequenzen biologisch aktiver Peptide bis 1988 im Überblick (Sundler & Håkanson 1988).

Der klassische physiologische Ansatz zur Isolierung von Peptiden ist der Nachweis einer biologischen Aktivität und die Verfolgung dieser bis zur Endaufreinigung und der Strukturaufklärung der dafür verantwortlichen Substanz. Als Assaysysteme werden neben in vivo-Experimenten und isolierten Organen und Geweben in letzter Zeit vermehrt zelluläre Assaysysteme verwendet. Zur gezielten Isolierung von Peptiden mit identischen und ähnlichen Strukturmerkmalen können immunologische Techniken wie ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) und RIA (Radioimmunoassay) eingesetzt werden. Durch kreuzreagierende Antikörper können dabei Peptide einer Familie identifiziert werden. Posttranslationale Modifikationen können chemisch detektiert und zum Screening bestimmter Stoffeigenschaften bei der Isolierung herangezogen werden. Zum Beispiel wurden bei der Suche nach C-terminal amidierten Peptiden NPY, PHI und

PYY isoliert und als hormonale Substanzen charakterisiert (Tatemoto und Mutt 1980, Tatemoto et al. 1982, Tatemoto 1982).

1.5 Hämofiltrat als Quelle biologisch aktiver Peptide

Die Isolierung und Analyse von humanen, biologisch aktiven Peptiden ist nicht nur von Bedeutung für die medizinische Grundlagen-Forschung, sondern auch für die Diagnostik und Therapie menschlicher Erkrankungen. Die zunehmende Kenntnis der vielfältigen Wirkungen bioaktiver Peptide führte zu einem verstärkten pharmakologisch-medizinischen Interesse an dieser Naturstoff-Klasse. In steigendem Maße versucht man, diese endogenen Substanzen als potentielle körpereigene Wirkstoffe zur Normalisierung oder Beeinflussung krankhaft veränderter biochemischer Mechanismen zu gewinnen und gezielt einzusetzen. Von der pharmazeutischen Industrie werden enorme Mengen an Peptiden und Proteinen zum therapeutischen Einsatz hergestellt. Dazu zählen z.B. Erythropoietin zur Behandlung (renaler) Anämien, Faktor VIII zur Therapie der Hämophilie A, das Wachstumshormon Somatotropin zur Behandlung des Zwergwuchses und Interferon- β zur Therapie von Multipler Sklerose.

Zirkulierende Peptide werden entweder direkt in den Blutstrom sezerniert oder diffundieren vom interstitiellen in den intravaskulären Raum. Im Plasma werden in der Regel Spuren aller regulatorischen Peptide gefunden. Für die Isolierung und Charakterisierung systemisch agierender regulatorischer Peptide stellt es damit die umfassendste Quelle dar (Forssmann et al. 1993). Bekannte Peptidhormone kommen im Plasma im mittleren bis unteren picomolaren Bereich vor und besitzen relativ niedrige Molekulargewichte (Kramer et al. 1978, Schepky et al. 1994).

Für die Aufklärung der Primärstruktur eines Peptides werden ca. 50 bis 100 pmol der aufgereinigten Substanz benötigt. Wegen der geringen Plasmakonzentrationen der regulatorischen Peptide, wären für eine Aufarbeitung mehrere 1000 l Plasma erforderlich. Eine weitere Schwierigkeit bei der Verwendung von Plasma als Ausgangsmaterial ergibt sich aus dem ungünstigen Verhältnis zwischen der Gesamtproteinkonzentration und der Konzentration der zirkulierenden Peptide. Es beträgt zum Beispiel $1:10^9$ für Gastrin, einem Peptidhormon mit einer relativen Molekülmasse $M_r = 2115$ und einer mittleren Plasmakonzentration von $c = 30$ pmol/l gegenüber der Proteinkonzentration von 70-80 g/l im Plasma (Andersson et al., 1979). Da Blutplasma vordringlich für die medizinische Versorgung gebraucht wird, mußte eine alternative Peptidquelle gefunden werden.

Als alternative Quelle zur Isolierung humaner, regulatorischer Peptide wird am Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung GmbH (IPF) das Hämofiltrat benutzt, das bei der Blutwäsche niereninsuffizienter Patienten durch arteriovenöse Blutfiltration in großen Mengen anfällt. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, das als weiterentwickelte Methode neben der Hämodialyse 1977 von Quellhorst in die Therapie eingeführt wurde (Quellhorst et al. 1977). Zur Entfernung der harnpflichtigen Stoffe der niereninsuffizienten Patienten werden dabei hauptsächlich Membranfilter mit einer Ausschlußgröße von 20 kDa eingesetzt.

Das Hämofiltrat enthält in der Regel die niedermolekularen Bestandteile des Plasmas bis zu einer relativen Molekülmasse von 10 kDa in vergleichbaren Konzentrationen (Matthaei et al. 1977, Schepky et al. 1994).

Tabelle 1.2 Konzentrationen einiger Peptidhormone im menschlichen Plasma und im Hämofiltrat (Schepky et al. 1994).

Peptidhormone	MW (Dalton)	Konz. im Plasma (pmol/l)	Konz. in HF (pmol/l)
Insulin	5400	93 - 185	179
Endothelin	2492	2,3 ± 3,0	2,7
Gastrin	2115	12 - 53	86,5
Vasopressin	1084	1,9 ± 1,3	3,8
Angiotensin II	1046	0 - 14	38

Ein Peptid/Proteinextrakt aus 50 µl Plasma und 50 ml Hämofiltrat wurden für einen qualitativen Vergleich einer Größenausschlußchromatographie unterworfen (Abb. 1-4.). Nur etwa 0,07 % der Plasmaproteine werden bei der Hämofiltration filtriert. Hämofiltrat stellt eine fast proteinfreie Quelle für die Isolierung zirkulierender biologisch aktiver Peptide dar (Schepky et al. 1994).

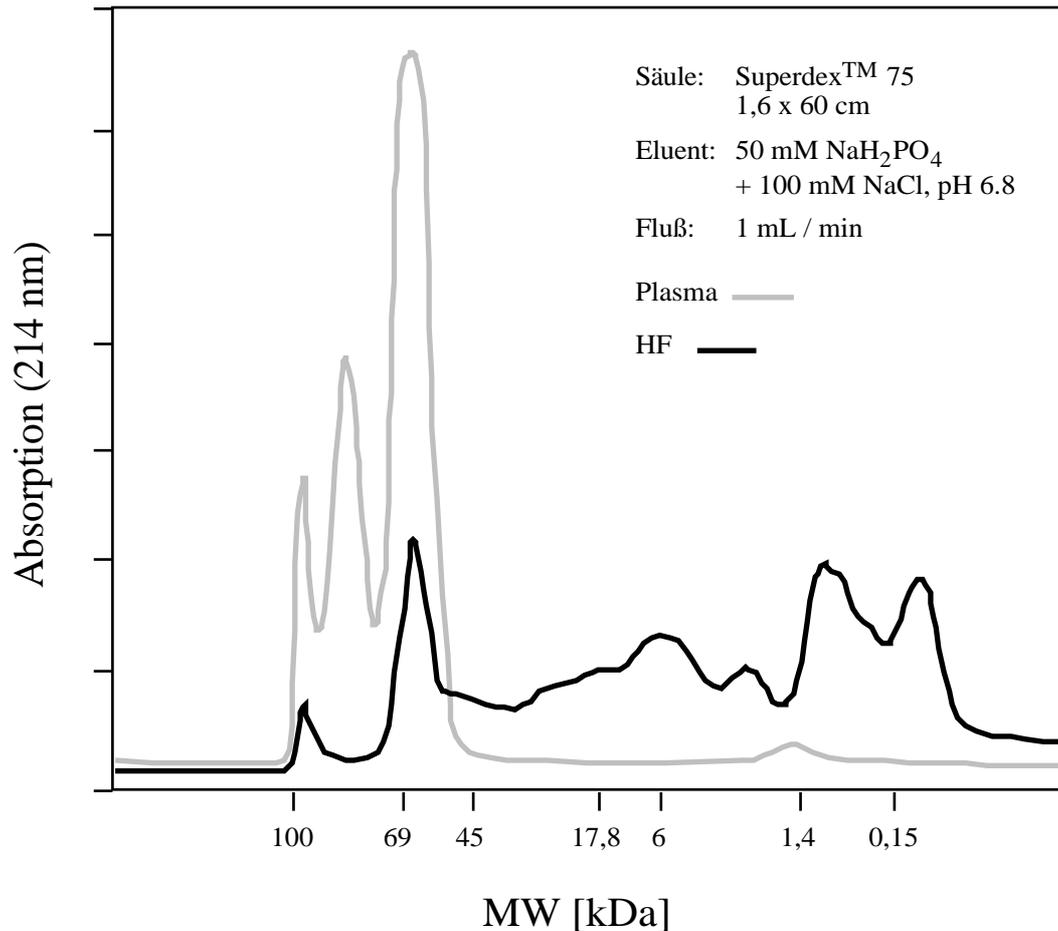


Abb. 1.4. Größenausschlußchromatographie von Peptid/Proteinextrakten aus 50 ml HF und 50 μ l Plasma (Schepky et al. 1994).

1.6 Peptide Trapping

Nach einem standardisiertem Verfahren werden die Peptide aus dem Hämofiltrat durch Kationenaustauschchromatographie extrahiert und anschließend durch eine pH-Stufenelution nach ihrem Ladungsmuster in sieben Pools unterteilt. Danach erfolgt eine Auftrennung der Peptide entsprechend ihrer Hydrophobizität durch Reverse Phase Chromatographie in ca. 300 Fraktionen. Mit dieser Subfraktionierung ist zugleich eine starke Anreicherung der Peptide verbunden. Diese reproduzierbar hergestellte Peptidbank stellt die Grundlage des Peptide Trapping dar (Schulz-Knappe et al., 1996a). Beim Peptide Trapping werden die zirkulierenden, humanen Peptide anhand ihrer Masse und ihres Elutionsverhaltens kartiert. Zu diesem Zweck werden die Fraktionen der Peptidbank mit den modernen Methoden der Massenspektrometrie (LC-ESI-MS und MALDI-MS) analysiert. Dadurch werden alle Peptide einer Fraktion bis in den

pikomolaren Bereich erfaßt. Einzelne Peptide werden chromatographisch aufgereinigt und durch Edman-Abbau sequenziert. Zur Identifikation des isolierten Peptides wird eine Datenbankrecherche bereits durchgeführt, nachdem die ersten N-terminalen Aminosäuren bestimmt wurden. Zeigt der Abgleich der erhaltenen Sequenz mit den zur Verfügung stehenden Datenbanken, daß es sich um ein neues Peptid handelt, wird die vollständige Primärstruktur aufgeklärt. Bisher wurden mit diesem Verfahren etwa 300 Peptide des menschlichen Blutes isoliert und identifiziert (Schulz-Knappe et al., 1996b). Darunter befinden sich erwartungsgemäß sehr viele bekannte Peptide oder Fragmente von Plasmaproteinen. Es wurden aber auch einige neue Peptide entdeckt, deren Sequenz in keiner Datenbank vorhanden war. Es handelt sich also beim Peptide Trapping um eine sehr effiziente Strategie zur Isolierung neuer humaner Peptide, die sehr stark von den technologischen Fortschritten auf den Gebieten der Massenspektrometrie und der Chromatographie profitiert.

1.7 Zielsetzung

Die Aufgabe der Abteilung Präparative Peptid-Chemie am Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung ist die Extraktion und Charakterisierung von Peptiden aus humanem Hämofiltrat zur Erstellung einer Peptidbank. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Isolierung eines neuen Peptides aus dem pH-Pool 6 des Hämofiltrats. Dazu wurden mehrere Peptide aus dem pH-Pool 6 des Hämofiltrats anhand des Peptide Trappings aufgereinigt, ansequenziert und ihre Identität durch Datenbankvergleiche festgestellt. Zur Analyse eines dabei entdeckten neuen Peptides sollten proteinchemische und molekularbiologische Methoden angewendet werden.