

Charakterisierung von Serpinen des Flussneunauges (*Lampetra fluviatilis*)

Ein Beitrag zur Genese von Blutgerinnungskontrolle und Blutdruckregulation in Vertebraten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl.-Biotech. Yunjie Wang

Technische Fakultät der Universität Bielefeld

Oktober 2014

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge so sind, wie sie sind.
Aristoteles

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier °° ISO 9706

Danksagung

Für meine Dissertation schulde ich vielen Menschen, die mich in dieser spannenden Phase meiner akademischen Laufbahn begleitet haben, einen herzlichen Dank.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hermann Ragg bedanken. Ihm danke ich insbesondere für die Bereitstellung des interessanten Themas, die tolle Betreuung und für die stetige wissenschaftliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Dierks von der Fakultät für Chemie (Biochemie I) möchte ich mich ganz herzlich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Für die gute Zusammenarbeit und die ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre gilt mein weiterer Dank allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen „Zelluläre Genetik“ und „Zellkulturtechnik“. Hervorgehoben sei insbesondere Frau Dr. Tanja Kutzner, die mich in die Geheimnisse der Laborwelt eingewiesen und wertvolle Hilfe geleistet hat und später als Kollegin ein wichtiger Diskussionspartner war. Mit Hilfe von Frau Dr. Martina Lummer (AG Molekulare Zellphysiologie) konnte ich die Experimente zur konfokalen Fluoreszenzmikroskopie erfolgreich durchführen, wofür ich mich ebenfalls an dieser Stelle bedanken möchte. Darüber hinaus möchte ich Tanja und Martina für ihre guten Ratschläge und die Bereitschaft meine Arbeit zu korrigieren danken. Bei Annemarie und Katharina möchte ich mich für die großzügige Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Gedankt sei außerdem Herrn Prof. Dr. Thomas Noll, Frau Dr. Sonja Siwiora-Brenke, Herrn Dr. Raimund Hoffrogge, Herrn Dr. Heino Büntemeyer und Frau Angelika Schemel für die Diskussionsbereitschaft und die Hilfe bei der Durchführung der Proteinaufarbeitungen.

Ein herzliches Dankeschön auch an Monika und Daniela, die mir durch ihre exzellente Praktikumsbetreuung sehr viel Arbeit abgenommen haben. Danken möchte ich auch meinen Bachelorstudenten Anna, Jean, Patricia und Nils für die gute Zusammenarbeit.

Ganz besonders danken muss ich meinen Eltern, meiner Tante und meinem Onkel, die mich nicht nur stets bestärkt und tatkräftig unterstützt haben, wenn ich an mir gezweifelt habe, sondern mich stets aufbauten und für eine erforderliche Abwechslung sorgten.

Teile dieser Arbeit wurden vorab wie folgt veröffentlicht:

Wang, Y. und Ragg, H. (2011)

An unexpected link between angiotensinogen and thrombin.
FEBS Letters, 585(14): 2395–2399.

Wang, Y., Köster, K., Lummer, M., und Ragg, H. (2014)

Origin of serpin-mediated regulation of coagulation and blood pressure.
PLoS ONE, 9(5): e97879.

Vorträge und Abstracts:

Ragg, H. und Wang, Y. (2011)

How control of thrombin by serpins in vertebrates arose (O-TH-009).
Journal of Thrombosis and Haemostasis, 9 (suppl. 2): 723.
ISTH 2011 - XXIII Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis,
Kyoto, Japan, July 23 – 28, 2011.

Ragg, H. und Wang, Y. (2011)

Angiotensinogen: the multi-faceted nature of an ancient vertebrate serpin.
Oral presentation and Poster,
6th International Symposium on the Chemistry and Biology of Serpins,
Raleigh, North Carolina, USA, October 23 – 26, 2011.

Ragg, H. und Wang, Y. (2013)

Serpins interfering with procoagulant activity and pressure regulation in a basal vertebrate.
Journal of Thrombosis and Haemostasis, 11 (suppl. 2): 853 (PB 3.59-3).
ISTH 2013 - XXIV Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis,
Amsterdam, The Netherlands, June 29 – July 4, 2013.

Ragg, H. und Wang, Y. (2014)

Tracing the roots of coagulation control and blood pressure regulation by serpins.
7th International Symposium on Serpin Biology, Structure and Function,
Leogang, Austria, March 29 – April 2, 2014.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	viii
1 Einleitung	1
1.1 Das Flussneunauge (<i>Lampetra fluviatilis</i>)	1
1.2 Das Renin-Angiotensin-System	3
1.3 Serpine (<i>serine protease inhibitors</i>)	5
1.3.1 Struktur der Serpine	6
1.3.2 Reaktionsmechanismus und Kinetik inhibitorischer Serpine	9
1.3.3 Klassifikation und Evolution der Serpin-Familie	15
1.3.4 Aktivierung der Serpine durch Glykosaminoglykane (GAGs)	17
1.4 Das Blutgerinnungssystem von Vertebraten	22
1.5 Ziele der Arbeit	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.2 Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1 Gesamt-RNA-Isolierung	28
2.2.2 cDNA-Synthese	29
2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus tierischem Gewebe	30
2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
2.2.5 Aufreinigung der PCR-Produkte	35
2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	35
2.2.7 Gelextraktion	37
2.2.8 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	37
2.2.9 Subklonierung	37
2.2.10 Restriktionsspaltung	38
2.2.11 Ligation	38
2.2.12 Plasmidisolierung	38
2.2.13 DNA-Sequenzierung	38
2.2.14 Konstruktion der Expressionsvektoren	39
2.3 Mikrobiologische Methoden	45
2.3.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	45
2.3.2 Herstellung von chemisch kompetenten Zellen	45
2.3.3 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	45
2.3.4 Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	46
2.4 Zellkultur	47
2.4.1 Stammhaltung und Zellpassagierung	47
2.4.2 Expression rekombinanter Proteine in tierischen Zellen	47
2.4.3 Herstellung von Zellextrakten und Zellenüberständen von COS-7-Zellen	49
2.4.4 Kryokonservierung	50
2.5 Chromatographie	51
2.5.1 Ionenaustauschchromatographie	51

2.5.2	Affinitätschromatographie	52
2.6	Isolierung von hLA aus Kulturüberständen	53
2.7	Isolierung und Reinigung von Lfl_SpnV4_1 aus <i>E. coli</i>	55
2.8	Proteinbiochemische Methoden	56
2.8.1	SDS-PAGE	56
2.8.2	Western-Blot	57
2.8.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	59
2.9	Methoden zur Charakterisierung von Serpinen	59
2.9.1	Komplexierungstests	60
2.9.2	Bestimmung der Heparinbindungsfähigkeit der Serpine	61
2.9.3	Enzymkinetik	62
2.10	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	64
2.11	Bioinformatische Methoden	65
2.11.1	DNA-Sequenz-Analyse	65
2.11.2	Protein-Sequenz-Analyse	65
2.11.3	Modellierung der Proteintertiärstruktur	66
3	Ergebnisse	67
3.1	Charakterisierung von Angiotensinogen aus <i>L. fluviatilis</i>	67
3.1.1	Bioinformatische Analyse des Angiotensinogens	67
3.1.2	Produktion von HA-LA und hLA in COS-7-Zellen	70
3.1.3	Heparinbindungsfähigkeit von Angiotensinogen aus <i>L. fluviatilis</i>	71
3.1.4	Nachweis der inhibitorischen Aktivität von Angiotensinogen aus <i>L. fluviatilis</i>	72
3.1.5	Einfluss von Glykosaminoglykanen auf die inhibitorische Aktivität des LA	73
3.1.6	Stabile Expression von hLA in der HEK-293-EBNA-Zelllinie	74
3.1.7	Isolierung und Reinigung von hLA aus Zellkulturüberständen	76
3.1.8	Kinetische Parameter der hLA/Thrombin-Reaktion	77
3.1.9	Tyrosin-Sulfatierung	79
3.2	Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor aus <i>L. fluviatilis</i> und seine Wechselwirkung mit Angiotensin	81
3.3	Charakterisierung von HCII aus <i>L. fluviatilis</i> (LfHCII)	85
3.3.1	Produktion von rekombinantem HA-LfHCII in COS-7-Zellen	85
3.3.2	Bestimmung der Heparinbindungsfähigkeit von HA-LfHCII	85
3.3.3	Hemmung von α -Thrombin durch HA-LfHCII	86
3.4	Charakterisierung der Serpine Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2	87
3.4.1	Herstellung von Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2 in COS-7-Zellen	89
3.4.2	Inhibitorische Aktivität von Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2	90
3.4.3	Herstellung von biologisch aktivem Lfl_SpnV4_1 in <i>E. coli</i>	91
3.4.4	Kinetische Analyse der Hemmung von hFXa durch Lfl_SpnV4_1	93
3.5	Lokalisierung des HCII- und SpnV4_1-Gens im Neunaugen-Genom	96
4	Diskussion	97
4.1	Evolution des Renin-Angiotensin-Systems (RAS)	98
4.2	Thrombin hemmende Serpine aus <i>L. fluviatilis</i>	103
4.3	Evolution der Regulierung des Thrombins	108
4.4	Die Serpine Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2 aus <i>L. fluviatilis</i>	111
4.4.1	Herstellung und Reinigung von biologisch aktivem Lfl_SpnV4_1	112

4.4.2	Lfl_SpnV4_1 ist ein wirksamer Inhibitor von hFXa	112
4.4.3	Lokalisierung des Gens für Lfl_SpnV4_1	115
4.5	Die Regulation der Blutgerinnung ursprünglicher Vertebraten	115
4.6	Ausblick	118
5	Anhang	120
5.1	Materiallisten	120
5.1.1	Chemikalien, Reagenzien, Materialien und Geräte	120
5.1.2	Primer	124
5.1.3	Kits und DNA- bzw. Protein-Marker	125
5.1.4	Antikörper	125
5.1.5	Enzyme, Proteasen, Substrate und Inhibitoren	126
5.1.6	Bakterienstämme, Zelllinien und Kulturmedien	127
5.1.7	Programme und Datenbanken	128
5.2	Proteinsequenzen aus <i>L. fluviatilis</i>	129
5.2.1	Sequenz von Angiotensinogen aus <i>L. fluviatilis</i> (LA)	129
5.2.2	Sequenz von HCII aus <i>L. fluviatilis</i> (LfHCII)	130
5.2.3	Sequenz von Lfl_SpnV4_1	131
5.2.4	Sequenz von Lfl_SpnV4_2	132
5.2.5	Sequenz des LfAGTR1-eGFP-Fusionsproteins	133
5.3	Zur phylogenetischen Analyse verwendete Proteinsequenzen	134
	Literaturverzeichnis	135
	Abbildungsverzeichnis	155
	Tabellenverzeichnis	157
	Abkürzungsverzeichnis	159

Zusammenfassung

Das hämostatische System und der geschlossene Blutkreislauf der Vertebraten mit einer fein ausbalancierten Gerinnungskaskade und einer hochkomplexen Blutdruckregulation haben sich über einen Zeitraum von 500 Millionen Jahren entwickelt. Wichtige prokoagulatorische Komponenten des ursprünglichen Gerinnungssystems wurden bereits identifiziert. Wie dieses System jedoch ursprünglich reguliert wurde, ist unklar. Über die Ursprünge der Blutdruckregulation in Vertebraten ist ebenfalls wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Serpine (Angiotensinogen, HCII und Lfl_SpnV4_1) aus Flussneunaugen, einem stammesgeschichtlich basalen Vertebraten, charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese drei Proteine eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Blutdruck- und des Gerinnungssystems in diesen Tieren und demnach auch in frühen Vertretern der Vertebraten spielten. Das Angiotensinogen der Kiefernäuler ist ein nicht-inhibitorisches Serpin, das als Vorläuferprotein für eine Gruppe von vasoaktiven Hormonen fungiert. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Angiotensinogen aus Flussneunaugen humanes α -Thrombin mit physiologisch relevanter Geschwindigkeit ($k_{inh} = 2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) hemmt. Heparin und Heparansulfat erhöhten die Reaktionsgeschwindigkeit mit einer glockenförmigen Dosisabhängigkeit um den Faktor von ca. 810 bzw. 360, während HCII, ein weiteres Thrombin hemmendes Serpin aus Flussneunaugen, durch Dermatansulfat aktiviert wird. Genomische, biochemische und Proteinsequenz-Daten belegen, dass die beiden Serpine aus einem gemeinsamen Thrombin hemmenden Vorfahren hervorgegangen sind. Das dritte Serpin, Lfl_SpnV4_1, inhibiert den humanen Gerinnungsfaktor FXa ebenfalls mit physiologisch relevanter Geschwindigkeit ($k_{inh} = 7,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Die Interaktion zwischen dem Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor und Angiotensin II aus Neunaugen deutet darauf hin, dass Gerinnungssystem und Blutdruckregulation früh in der Vertebratenevolution über Angiotensinogen verknüpft waren. Diese Befunde liefern zusammen wichtige Hinweise zur Entwicklung der Kontrolle des Gerinnungssystems von Vertebraten, insbesondere unter dem Aspekt, dass Antithrombin III, der zentrale Regulator der Gerinnungskaskade von Kiefernäulern, in Neunaugen anscheinend fehlt.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das Flussneunauge (*Lampetra fluviatilis*)

Neunaugen (*Petromyzontidae*) und Schleimaale (*Myxinoidea*) sind die einzigen lebenden Repräsentanten der kieferlosen Vertebraten (*Agnatha*), deren Vorfahren bereits vor mehr als 500 Millionen Jahren von den anderen Vertebraten (Kiefermäuler, *Gnathostomata*) divergierten (Gess *et al.*, 2006; Janvier, 2006; Smith *et al.*, 2013). Der phylogenetische Stammbaum in Abbildung 1.1 stellt die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Schleimaalen, Neunaugen und Kiefermäulern dar.

Über 40 Arten von Neunaugen werden in drei Familien und neun Gattungen eingeteilt. Moderne Neunaugen haben zahlreiche Merkmale der ursprünglichen Vertebraten beibehalten, obwohl sie auch entwicklungslinienspezifische morphologische und molekulare Eigenschaften aufweisen (Heimberg *et al.*, 2010; Shimeld und Donoghue, 2012). Neunaugen sind daher wichtige Modellsysteme für die Erforschung entwicklungs- und evolutionsbiologischer Zusammenhänge (Osório und Rétaux, 2008).

Die Entschlüsselung des Genoms vom Meerneunauge, *Petromyzon marinus* (*P. marinus*), gibt Einblicke in die frühe Evolution der Vertebraten. Das Genom des gemeinsamen Vorfahren von Neunaugen und Kiefermäulern wurde offenbar zweimal komplett verdoppelt und die grundsätzliche Genomstruktur der Vertebraten bereits sehr früh in der Evolution angelegt (Smith *et al.*, 2013). Das nahe verwandte Flussneunauge (*L. fluviatilis*) kommt in allen größeren Flüssen Europas und dessen Mündungsgebieten sowie in den angrenzenden Meeresgebieten vor. Als anadromer Wanderer hält sich *L. fluviatilis* bis zum Eintritt der Geschlechtsreife vorwiegend im Küstenbereich auf. Dort ernähren sich die Tiere mithilfe ihres bezahnten Saugmauls parasitär von anderen Fischen durch Saugen von Blut sowie Abraspeln von Haut- und Muskelstücken ihrer Opfer. Zugunsten einer andauernden Blutversorgung hemmen spezielle Enzyme im Sekret, die in den Drüsen der Mundhöhle gebildet werden, die Blutgerinnung des Opfers. Im Herbst stellen die geschlechtsreifen Flussneunaugen die Nahrungsaufnahme ein und wandern in die Flüsse zurück. Dort verpaaren sie sich nach der

Winterruhe in den Monaten von Februar bis Mai. Nach drei- bis vierjähriger Larvenzeit, wobei sie sich als Filtrierer ernähren, vollziehen die Larven eine Art Metamorphose zu erwachsenen Flussneunaugen und wandern mit der Strömung zum Meer (Gerstmeier und Romig, 2003; Freyhof, 2013).

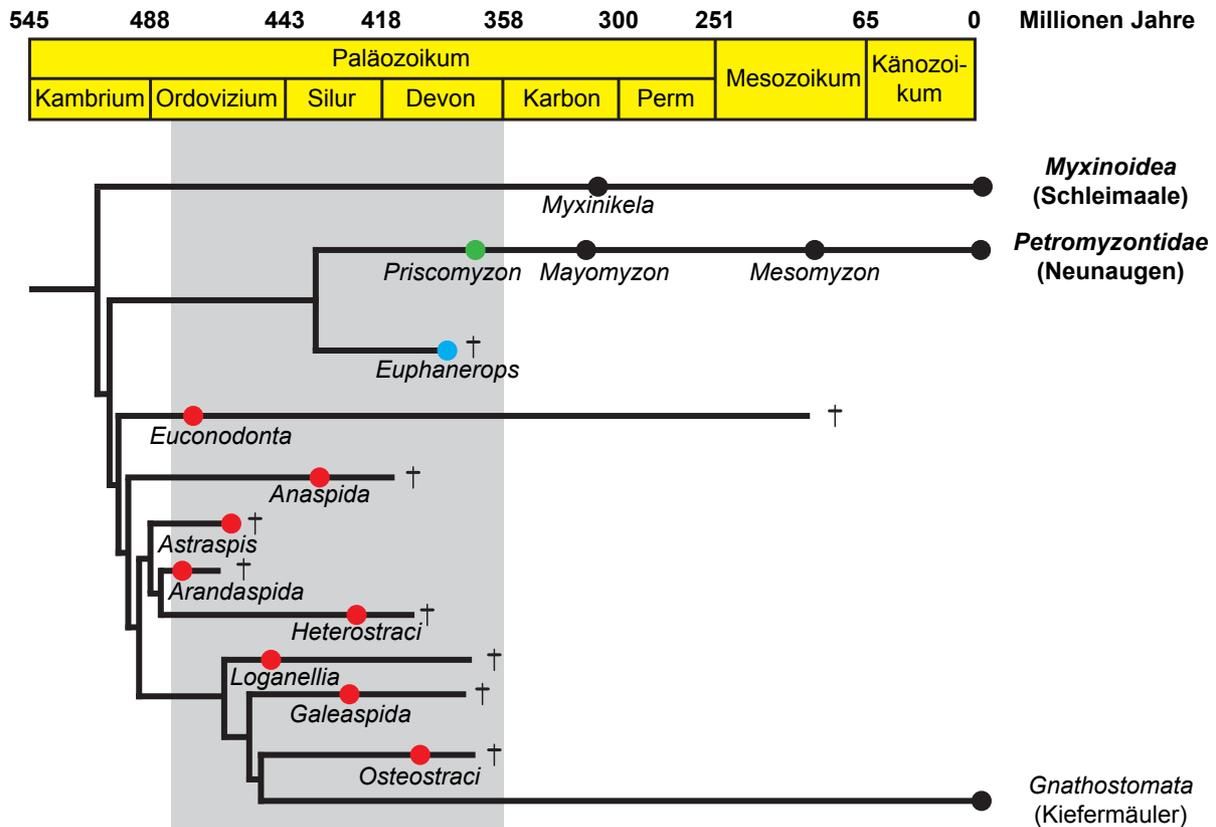


Abbildung 1.1: Phylogenetischer Stammbaum der Vertebraten (modifiziert nach Gess *et al.*, 2006; Janvier, 2006 sowie Shimeld und Donoghue, 2012). Neunaugen und Schleimaale sind die einzigen lebenden Vertreter der kieferlosen Vertebraten, deren Vorfahren vor mehr als 500 Millionen Jahren von den anderen Vertebraten divergierten. Das 360 Millionen Jahre alte Neunauge *Priscomyzon* (grün), das von Gess *et al.* (2006) beschrieben wurde, ist modernen Neunaugen sehr ähnlich. Die Ostracodermi, eine Gruppe ausgestorbener kieferloser Fische, sind in rot dargestellt.

1.2 Das Renin-Angiotensin-System

Über verschiedene Hormone und Enzyme reguliert das Renin-Angiotensin-System (RAS) das Natriumgleichgewicht, das Volumen der extrazellulären Flüssigkeit (EZF) sowie den Nieren- und systemischen Gefäßwiderstand. Somit dient das RAS als eines der wichtigsten blutdruckregulierenden Systeme und spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation und Aufrechterhaltung der Natrium/Kalium-Homöostase (Fyhrquist und Saijonmaa, 2008; Harrison-Bernard, 2009; Benigni *et al.*, 2010; Crowley und Coffman, 2012).

In den frühen 1970er Jahren wurden die Hauptkomponenten des „klassischen“ zirkulierenden RAS in Säugern identifiziert (Skeggs *et al.*, 1976). In der RAS-Kaskade ist Angiotensinogen Ausgangsprodukt und Substrat von Renin, das das Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) vom N-Terminus des Angiotensinogens proteolytisch abspaltet. Ang I wird durch Abspaltung von zwei C-terminalen Aminosäuren durch das *Angiotensin-Converting-Enzyme* (ACE) zu biologisch aktivem Angiotensin II (Ang II) umgewandelt. Die Ang II-Effekte werden durch Bindung an Ang II-Rezeptoren vermittelt, bei denen vorwiegend Typ 1 (AGTR1) und Typ 2 (AGTR2) Rezeptoren unterschieden werden. In den letzten Jahren hat sich das Verständnis des RAS durch den Einsatz von Tiermodellen (wie z. B. Maus) erheblich erweitert. Neben dem systemischen RAS der Zirkulation existieren noch lokale (Paul *et al.*, 2006; Kobori *et al.*, 2007) und intrazelluläre RAS-Systeme (Kumar *et al.*, 2012). In Abbildung 1.2 ist das erweiterte RAS schematisch dargestellt. Neben Ang II zeigen Angiotensin III (Ang III, Ang-[2–8]) und Angiotensin IV (Ang IV, Ang-[3–8]) sowie Angiotensin-[1–7] (Ang-[1–7]) ebenfalls biologische Aktivität.

Ang III wird durch Abspaltung einer N-terminalen Aminosäure aus Ang II durch die Aminopeptidase A (AMPA) erzeugt. Im Prinzip fungiert Ang III ähnlich wie Ang II über die Bindung an AGTR1 und AGTR2. Obwohl Ang II als Haupteffektor des RAS gilt, kann Ang III in einigen AGTR1-vermittelten Wirkungen (wie z. B. bei der Freisetzung von Vasopressin) genauso wichtig oder noch wichtiger sein (Zini *et al.*, 1996). Durch Abspaltung einer N-terminalen Aminosäure von Ang III durch die Aminopeptidase M (AMPM) wird Ang IV gebildet. Durch die Bindung an den Insulin-regulierten Aminopeptidase-Rezeptor (IRAP) (Albiston *et al.*, 2001) spielt Ang IV eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen, wie z. B. bei der Vasodilation in den Nieren und bei der Aktivierung von NF- κ B, die zur Induktion vom Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1), *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), Interleukin-6 (IL-6) sowie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) führt (Chai *et al.*, 2004; Fyhrquist und Saijonmaa, 2008). Ein weiteres Heptapeptid,

Ang-[1-7], kann aus Ang I mithilfe von Neprilysin (NEP) bzw. aus Ang II durch Spaltung mit *Angiotensin-Converting-Enzyme* Typ 2 (ACE2) entstehen. ACE2 spaltet außerdem Ang I und erzeugt daraus das Nonapeptid Angiotensin-[1-9] (Ang-[1-9]), das nach der Spaltung mit NEP und ACE ebenfalls zu Ang-[1-7] umgewandelt wird. Durch die Bindung an den MAS-Rezeptor ist Ang-[1-7] an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt und übt blutgefäßerweiternde und antiproliferative sowie antitrophische Wirkungen aus (Ferrario, 2006; Fyhrquist und Saijonmaa, 2008).

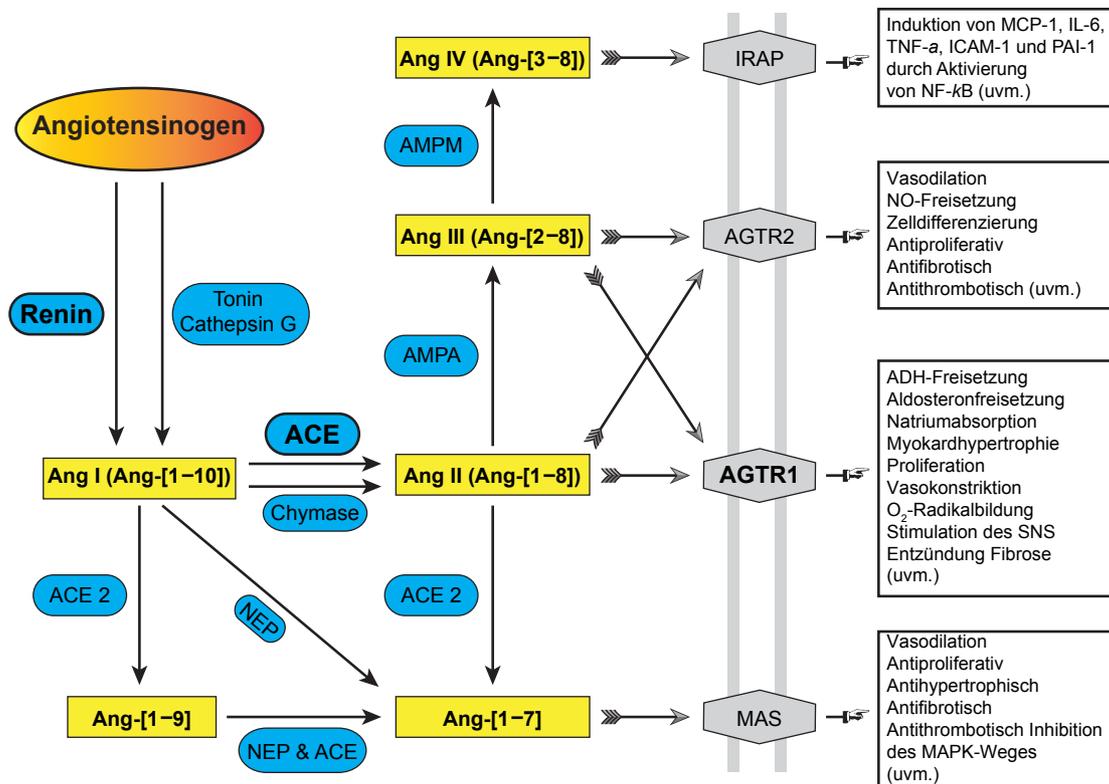


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des RAS (modifiziert nach Fyhrquist und Saijonmaa, 2008; Montecucco *et al.*, 2009 und Kumar *et al.*, 2012). ACE: *Angiotensin-Converting-Enzyme*; ACE 2: *Angiotensin-Converting-Enzyme* Typ 2; NEP: Neprilysin, neutrale Endopeptidase; AMPA und AMPM: Aminopeptidase A und M; AGTR1 und AGTR2: Typ-1- und Typ-2-Angiotensin-II-Rezeptor; IRAP: Insulin-regulierter Aminopeptidase-Rezeptor; MAS: Mas-Onkogen; ADH: antidiuretisches Hormon; ICAM-1: interzelluläres Adhäsionsmolekül-1; IL-6: Interleukin-6; MCP-1: *monocyte chemoattractant protein-1*; MAPK: Mitogen-aktivierte Protein-Kinase; NF- κ B: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*; PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1; SNS: sympathisches Nervensystem; TNF- α : Tumornekrosefaktor- α .

In den meisten Vertebraten, einschließlich in Fischen, wurde das RAS bzw. seine Hauptkomponenten identifiziert (Nishimura und Ogawa, 1973; Wilson, 1984; Kobayashi und Takei, 1996). Es scheint, dass individuelle Komponenten des RAS bereits sehr früh in der Evolution entstanden sind. In einigen Invertebraten, wie z. B. *Theromyzon tessulatum*

(Salzet *et al.*, 1993) und *Erpobdella octoculata* (Salzet *et al.*, 1995), wurden Ang II-ähnliche Peptide sowie Renin-ähnliche und ACE-ähnliche Enzyme identifiziert (Salzet *et al.*, 2001; Salzet und Verger-Bocquet, 2001). Die Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass kein Angiotensinogen-ähnliches Protein in Egeln vorhanden ist. Die Molekülmasse der potentiellen Vorläuferproteine des Ang II-ähnlichen Peptids in *T. tessulatum* beträgt etwa 19 kDa und ist viel kleiner als das Angiotensinogen der Vertebraten mit einer Molekülmasse von ca. 60 kDa (Salzet *et al.*, 1993; Laurent *et al.*, 1995). Von der Existenz eines Knochenfisch-ähnlichen Ang I-Peptid (Kf-Ang I) in Neunaugen wurde berichtet, dessen Herkunft jedoch unklar ist (Rankin *et al.*, 2004). Die cDNA des Angiotensinogens von Neunaugen wurde 2009 identifiziert (Ragg *et al.*, 2009). Als Ausgangsprodukt des RAS spielt Angiotensinogen bei der Blutdruckregulation und bei der Aufrechterhaltung der Elektrolyt- und Volumenhomöostase in Vertebraten eine zentrale Rolle. Untersuchungen des Neunaugen-Angiotensinogens sind daher für das Verständnis der Entstehung und der Evolution des RAS in Vertebraten von großer Bedeutung. Angiotensinogen gehört zur Proteinsuperfamilie der Serinprotease-Inhibitoren (Serpine), das in Kiefernäulern nur als Vorläuferprotein der Angiotensin-Peptide fungiert und keine inhibitorische Aktivität besitzt (Doolittle, 1983; Stein *et al.*, 1989).

1.3 Serpine (*serine protease inhibitors*)

Der Begriff Serpin wurde von Carrell und Travis im Jahr 1985 als Bezeichnung für die Mitglieder einer neu identifizierten Gruppe von strukturell verwandten Proteinen eingeführt (Carrell und Travis, 1985). Sie sind die größte und am weitesten verbreitete Superfamilie von Protease-Inhibitoren. Bis heute wurden über 1500 Serpin-Sequenzen in den Genomen von Organismen aus allen Domänen des Lebens identifiziert (Irving *et al.*, 2002; Law *et al.*, 2006; Huntington, 2011). Die Präsenz von Serpinen in Metazoen, Bakterien und Pflanzen lässt darauf schließen, dass Serpine bereits vor der Tier-Pflanze-Divergenz erschienen sein müssen und sich über einen Zeitraum von 1 bis 1,5 Milliarden Jahren entwickelt haben (Wang *et al.*, 1999; Irving *et al.*, 2000; Ragg *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2004). Je nach Klassifikationssystem lassen sich Serpine aufgrund der möglichen evolutionären Verwandtschaftsbeziehungen in 16 Klassen einteilen (Irving *et al.*, 2000). Serpine von Vertebraten können alternativ mithilfe der hoch konservierten, gruppenspezifischen Exon-Intron-Strukturen ihrer Gene in sechs Gruppen eingeordnet werden (Ragg *et al.*, 2001). Alle Serpine, die bisher röntgenkristallographisch untersucht wurden, weisen eine

hoch konservierte Tertiärstruktur auf, obwohl sie große funktionelle Unterschiede und eine Aminosäure-Identität von zuweilen nur 20 % haben (Gettins, 2002; Roberts *et al.*, 2004). Viele Mitglieder der Serpin-Familie inhibieren Serinproteasen, von denen der Name der Familie abgeleitet wurde. Manche Serpine hemmen jedoch Cysteinproteasen, z. B. CrmA (Komiya *et al.*, 1994). Darüber hinaus gibt es Serpine, die keine inhibitorische Aktivität aufweisen, wie z. B. Corticosteroid-bindendes Globulin (Hammond *et al.*, 1987), Maspin (Zou *et al.*, 1994; Pemberton *et al.*, 1995), HSP47 (Hirayoshi *et al.*, 1991) und wie bereits erwähnt das Angiotensinogen von Kiefernäulern (Abschnitt 1.2).

1.3.1 Struktur der Serpine

Serpine bestehen aus einer singulären Polypeptidkette, die typischerweise ca. 330–500 Aminosäuren umfasst und interne Erweiterungen oder Erweiterungen am N- bzw. C-Terminus aufweisen kann. Die hoch konservierte Tertiärstruktur der Serpine, die aus drei β -Faltblättern (sA-sC) und acht bis neun α -Helices (hA-hI) besteht (Irving *et al.*, 2000; Gettins, 2002; Law *et al.*, 2006), ist in Abbildung 1.3 beispielhaft dargestellt.

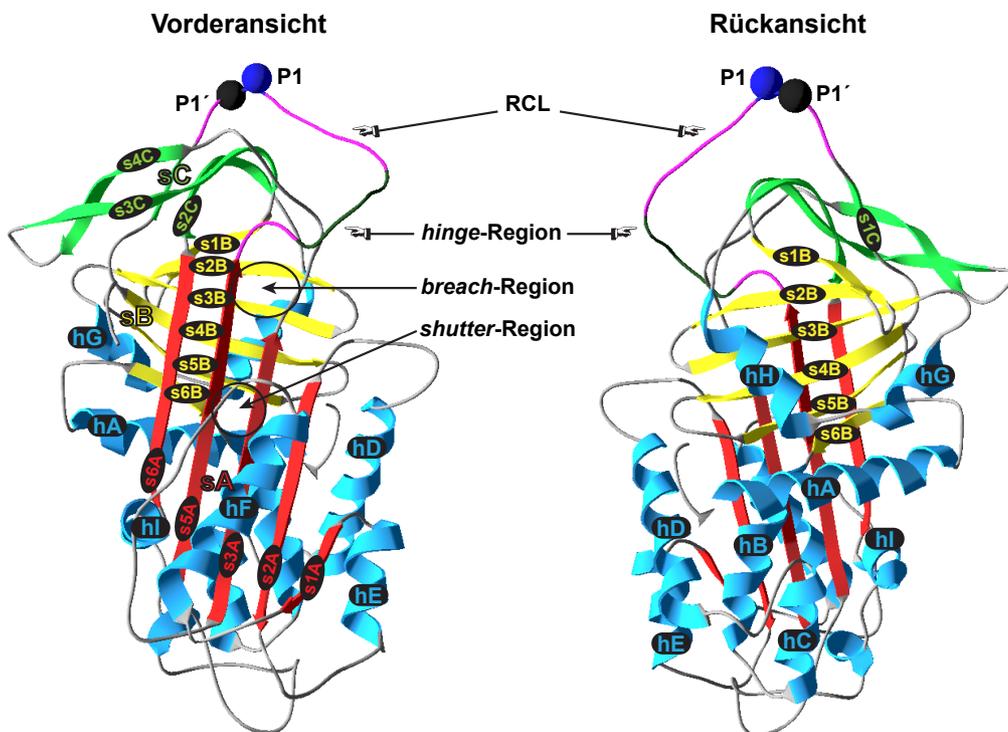


Abbildung 1.3: Tertiärstruktur von Serpinen am Beispiel des nativen humanen α_1 -Antitrypsins (α_1 -AT, PDB-ID: 1QLP (Elliott *et al.*, 2000)). Helices sind hellblau gekennzeichnet, β -Faltblatt sA ist in rot, sB in gelb und sC in grün dargestellt. Der RCL (*reactive centre loop*) ist lila gekennzeichnet, innerhalb welchem die *hinge*-Region in dunkelgrün hervorgehoben ist. Die Aminosäuren an P1 (dunkelblau) und P1' (schwarz) sind in der Kalottendarstellung gezeigt. Die *breach*-Region und die *shutter*-Region, die für die Insertion des RCLs ins β -Faltblatt A zwischen s3A und s5A wichtig sind, sind ebenfalls gekennzeichnet.

Das β -Faltblatt A (in Abbildung 1.3 rot) ist das größte der drei β -Faltblätter und besteht im nativen Serpin aus fünf Strängen, die die lange Achse des Proteins überspannen. Die β -Faltblätter B und C (in Abbildung 1.3 grün bzw. gelb) sind kürzer und bestehen aus sechs bzw. vier Strängen. Alle α -Helices (in Abbildung 1.3 türkis), mit Ausnahme von Helix F, befinden sich an der Rückseite des Serpins. Die Helix F liegt auf der Vorderseite des Serpins über dem β -Faltblatt A und kann eine Rolle bei der Regelung der Öffnung des Faltblatts oder bei der Stabilisierung der nativen Konformation spielen (Yamasaki *et al.*, 2002; Gettins, 2002). Im nativen Zustand liegt die reaktive Schleife (RCL, *reactive centre loop*) eines inhibitorischen Serpins typischerweise exponiert zwischen den β -Faltblattsträngen s5A und s1C vor. Innerhalb dieser Schleife liegt die Spaltstelle P1-P1', die in Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum der Zielprotease steht. Die Nummerierung der Aminosäuren innerhalb des RCLs basiert auf der Nomenklatur von Schechter und Berger (1967). Die Aminosäuren sind ausgehend von der Spaltstelle P1-P1' folgendermaßen nummeriert: Pn-...-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-...-Pn'.

Die Röntgenstrukturanalyse (Carrell *et al.*, 1994; Schreuder *et al.*, 1994) sowie Fluoreszenzstudien (Huntington *et al.*, 1996) von Antithrombin III (ATIII) und die Röntgenstruktur (Baglin *et al.*, 2002) von Heparinkofaktor II (HCII) haben gezeigt, dass die nativen Konformationen der beiden Thrombin-Inhibitoren ungewöhnliche Variationen innerhalb des β -Faltblatts A aufweisen (Abbildung 1.11). Die Aminosäuren P15 und P14 des RCLs (Gly382 und Ser383 in ATIII bzw. Gly430 und Thr431 in HCII) sind als zusätzlicher Strang in das β -Faltblatt A eingelagert (in lila dargestellter kleiner β -Faltblattstrang in Abbildung 1.11), woraus eine partielle Expansion des β -Faltblatts A an der Oberseite resultiert.

Neben der nativen Konformation können Serpine noch weitere Konformationen einnehmen. Eine davon ist die sogenannte gespaltene Form (*cleaved form*, Abbildung 1.4). Nach der Spaltung der P1-P1'-Bindung der inhibitorischen Serpine wird der N-terminale Teil des gespaltenen RCLs als vierter Strang in das β -Faltblatt A integriert. Die Insertion der reaktiven Schleife verursacht die Expansion des β -Faltblatts A und viele weitere kleinere Strukturveränderungen, vor allem in der Anordnung der Helices (Stein und Chothia, 1991; Gettins, 2002). Diese Konformationsänderung wird auch als S→R-Übergang bezeichnet. Dies bedeutet, dass es von dem nativen Zustand, bei dem das Serpin in einer „gespannten“ (*stressed*) Konformation vorliegt, die thermodynamisch metastabil ist, in eine thermodynamisch stabile „entspannte“ (*relaxed*) Struktur wechselt (Bruch *et al.*, 1988).

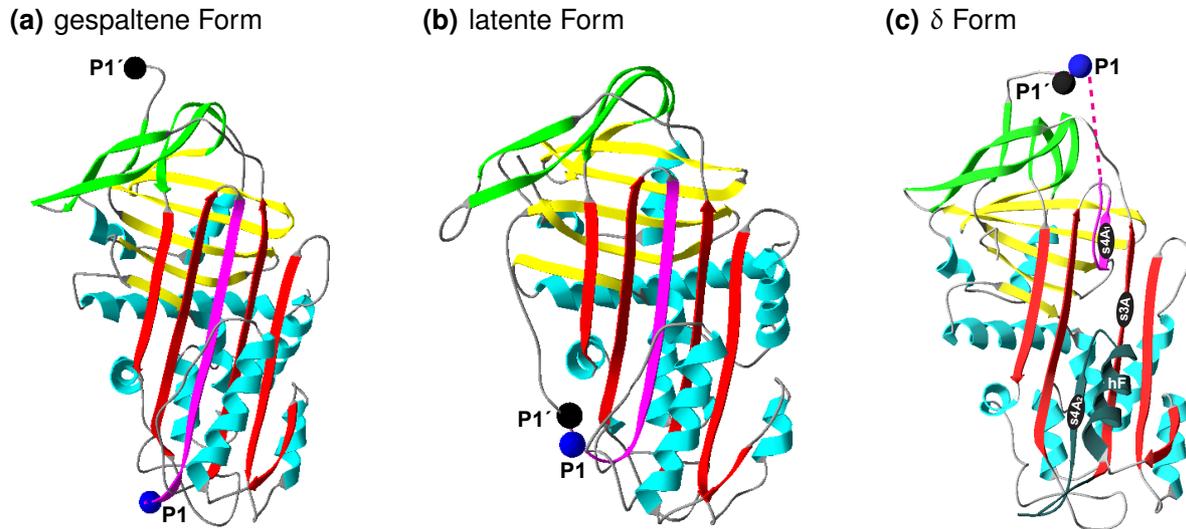


Abbildung 1.4: Drei weitere mögliche Konformationen der Serpine. (a) gespaltene Form, humanes α_1 -Antitrypsin, PDB-ID: 7API (Engh *et al.*, 1989). Bei dieser Konformation wird der RCL (lila) nach der Spaltung der P1 (blau)-P1' (schwarz)-Bindung als s4A in das β -Faltblatt A eingelagert. (b) latente Form, humaner PAI-1, PDB-ID: 1C5G (Tucker *et al.*, 1995). Bei der latenten Form lagert sich der ungespaltene RCL (lila) in das β -Faltblatt A ein. Der β -Faltblattstrang s1C wird dafür aufgelöst. (c) δ Form, humanes α_1 -Antichymotrypsin, PDB-ID: 1QMN (Gooptu *et al.*, 2000). Der RCL (lila) in der δ Form wird nur teilweise bis zu P12 in das β -Faltblatt A integriert (s4A₁). Die Aminosäuren der letzten Windung der α -Helix F (dunkelgrün) bilden dabei eine Verbindung (s4A₂) zum β -Faltblattstrang s3A.

Neben der gespaltenen Form gibt es noch die natürlich vorkommende latente Form (Abbildung 1.4(b)), die zuerst beim humanen PAI-1 beschrieben wurde (Mottonen *et al.*, 1992) und später auch in der heterodimeren Struktur von ATIII beobachtet wurde (Carrell *et al.*, 1994). In dieser Konformation lagert sich der RCL ebenfalls in das β -Faltblatt A ein, bleibt jedoch ungespalten. Dafür wird der β -Faltblattstrang s1C aufgelöst und stellt zusammen mit der C-terminalen Seite des RCLs eine Verbindung vom Boden des β -Faltblatts A zum β -Faltblatt B her (Gettins, 2002). Eine weitere, die sogenannte δ -Konformation (Abbildung 1.4(c)) wurde bei einer natürlich vorkommenden Variante des humanen α_1 -Antichymotrypsins beobachtet. Bei dieser Konformation wird der RCL nur teilweise bis zu P12 in das β -Faltblatt A integriert (s4A₁). Die Stelle, die in der gespaltenen und latenten Form von Aminosäuren der P10–P3-Region des RCLs besetzt wird, wird in der δ Form von den Aminosäuren der letzten Windung der Helix F belegt (s4A₂) und dadurch wird eine Verbindung zum β -Faltblattstrang s3A hergestellt (Gooptu *et al.*, 2000). Dies ist mehr als die Einlagerung der *hinge*-Region des RCLs des nativen ATIII und HCII (Abbildung 1.11), jedoch weniger als die komplette Insertion des RCLs wie beim latenten PAI-1 (Abbildung 1.4(b)). Dies weist darauf hin, dass die Insertion des RCLs über definierte Intermediate mit unterschiedlichem Ausmaß der Einlagerung der Schleife erfolgen kann (Gettins, 2002).

1.3.2 Reaktionsmechanismus und Kinetik inhibitorischer Serpine

Der grundlegende Reaktionsablauf der Interaktion zwischen Serpinen und Serin- bzw. Cysteinproteasen ist ein *branched-pathway*-Mechanismus. In Abbildung 1.5 ist der Reaktionsverlauf dieses Mechanismus schematisch dargestellt. Grundsätzlich besteht der *branched-pathway*-Mechanismus aus zwei Ästen, dem inhibitorischen Pfad und dem Substratpfad. Beide Reaktionsabläufe verlaufen über eine gemeinsame Zwischenstufe. Die Protease erkennt zunächst den RCL des Serpins, insbesondere die P1-P1'-Region, als potentielles Substrat und bildet mit dem Serpin in einer Gleichgewichtsreaktion einen nicht-kovalenten Komplex (Michaelis-Komplex, E·I in Abbildung 1.5). Dieser Komplex wird anschließend durch proteolytische Abspaltung des C-Terminus des Serpins in ein Serpin-Acyl-Protease-Intermediat (Acyl-Intermediat, [E-I] in Abbildung 1.5) umgewandelt.

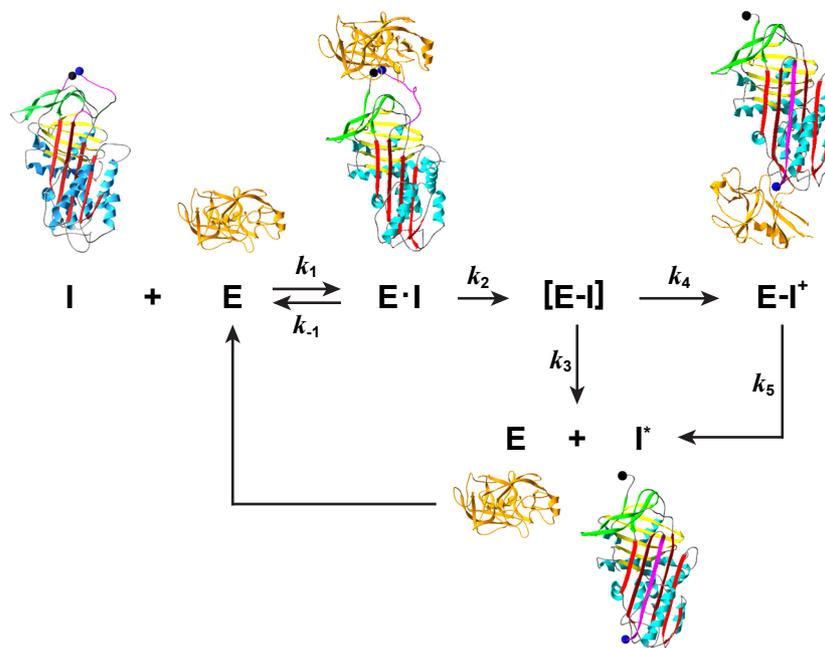


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des *branched-pathway*-Mechanismus inhibitorischer Serpine (modifiziert nach Gettins, 2002; Schechter und Plotnick, 2004 sowie Law *et al.*, 2006). Das Serpin (I) wird zunächst von der Protease (E) als potentielles Substrat erkannt. Dabei wird in einer Gleichgewichtsreaktion ein nicht-kovalenter Michaelis-Komplex (E·I) gebildet (mit den Bildungs- und Dissoziationsraten k_1 und k_{-1}). Nach Spaltung der P1-P1'-Bindung (k_2) wird der Komplex irreversibel in ein Serpin-Acyl-Protease-Intermediat ([E-I]) überführt. Dieses Intermediat kann dann zwei unterschiedliche Reaktionspfade beschreiten. Bei dem inhibitorischen Pfad wird das Intermediat durch die Insertion des RCLs in das β -Faltblatt A (k_4) und eine Konformationsänderung des Serpins irreversibel in einen kovalenten Komplex (E-I⁺) umgewandelt. Die Protease wird dabei auf die gegenüber liegende Seite transportiert. Die Deacylierung des kovalenten Komplexes (k_5) ist bei physiologisch relevanten Reaktionen extrem langsam und der Komplex bleibt stabil. In dem konkurrierenden Substratpfad wird das Intermediat deacyliert (k_3) und das Serpin gespalten (I^{*}). Die Protease bleibt aktiv und kann an weiteren Reaktionen mit Serpinmolekülen teilnehmen.

Im inhibitorischen Pfad wird dieses Intermediat durch Insertion des RCLs (k_4) irreversibel in einen kovalenten Komplex (E-I⁺) überführt. Die Protease wird dabei auf den gegenüberliegenden Pol des Serpins transloziert. Bei physiologisch relevanten Reaktionen erfolgt die Translokation der Protease schnell und vollständig. Das reaktive Zentrum der Protease, die über die Esterbindung kovalent an das Serpin gebunden bleibt, wird dabei deformiert. Die Deacylierung des kovalenten Komplexes (k_5) ist extrem langsam und der Komplex kann bis zu mehreren Wochen und Jahren stabil sein (Calugaru *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001; Schechter und Plotnick, 2004). Sowohl Serpin als auch Protease bleiben inaktiv, die Serpine werden daher als Selbstmord-Inhibitoren (*suicide inhibitor*) bezeichnet. Bei mutierten Serpinen bzw. bei Interaktionen zwischen Serpinen und unphysiologischen Proteasen kann die Rate der Komplex-Deacylierung jedoch höher sein (Plotnick *et al.*, 1997; Calugaru *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001).

Neben der irreversiblen Inhibierung der Protease kann auch eine Konkurrenzreaktion stattfinden (k_3 , Substratpfad), bei welcher die Protease direkt durch Deacylierung des Acyl-Intermediats [E-I] freigesetzt wird und aktiv bleibt. Das Serpin (I^{*}) wird dabei gespalten. Das Verhältnis dieser beiden Reaktionspfade kann mit dem SI-Wert (*stoichiometry of inhibition*, Gleichung 1.1) beschrieben werden. Physiologisch relevante Reaktionen zeichnen sich durch niedrige SI-Werte aus, dabei ist k_4 viel größer als k_3 und somit fungiert das Serpin ausschließlich als Inhibitor. In diesem Fall beträgt der SI-Wert nahezu 1. Das bedeutet, dass um ein Molekül Zielprotease zu inhibieren, etwa ein Molekül Serpin benötigt wird. Dahingegen reagiert das Serpin als Substrat und wird zu großen Teilen gespalten, wenn k_3 viel größer als k_4 ist (Gettins, 2002).

$$SI = \frac{(k_3 + k_4)}{k_4} \quad (1.1)$$

Neben dem SI-Wert ist die Geschwindigkeit der Hemmung von Proteasen ebenfalls ein Maßstab für die Funktion des Serpins. Diese Geschwindigkeit kann durch Messung der apparenten Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung der Inhibition (k_{inh}) festgestellt werden, wenn die Inhibierungsreaktion irreversibel ist und die Assoziation der freien Protease mit dem freien Serpin der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Ein hoher k_{inh} -Wert ist meistens mit einem hohen Grad an Proteasespezifität des Serpins assoziiert. Die Bildung eines nicht-kovalenten Michaelis-Komplexes in der ersten Stufe der gemeinsamen zweistufigen Reaktion des *branched-pathway*-Mechanismus (Abbildung 1.5) kann durch die Konstante K_{inh} in Gleichung 1.2 beschrieben werden, wobei v für die hydrolytische Aktivität der Protease und t für die Zeit steht. $[I]_0$ bezieht sich auf die Initialkonzentration des Serpins.

Die zweite Stufe kann durch die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{Lim} bei Sättigung definiert werden (Kvassman *et al.*, 1998; Schechter und Plotnick, 2004).

$$-\frac{dv}{dt} = \left(\frac{k_{Lim}[I]_0}{K_{inh} + [I]_0} \right) \cdot v, \text{ wobei } K_{inh} = \frac{k_{-1} + k_{Lim}}{k_{-1}} \quad (1.2)$$

Wenn der Inhibitor in großem Überschuss eingesetzt wird, bleibt seine Konzentration $[I]_0$ im Verlauf der Reaktion nahezu konstant. Die Inhibition der Protease verläuft dabei nach pseudo-erster Ordnung (Gleichung 1.2). Der Term in der Klammer ist die apparente Hemmkonstante pseudo-erster Ordnung, k_{obs} . Diese Konstante ändert sich nach der Konzentration des Serpins. Wenn $[I]_0$ kleiner als K_{inh} ist, kann das Geschwindigkeitsgesetz zu einer Form der Reaktion zweiter Ordnung (Gleichung 1.3) vereinfacht werden, wobei k_{Lim}/K_{inh} als k_{inh} definiert ist. Wenn $[I]_0$ extrem hoch ist, ist k_{obs} äquivalent zu k_{Lim} (Schechter und Plotnick, 2004).

$$-\frac{dv}{dt} = \left(\frac{k_{Lim}}{K_{inh}} \cdot [I]_0 \right) \cdot v \quad (1.3)$$

Durch Integration der Gleichung 1.2 bzw. 1.3 wird die Gleichung 1.4 erzeugt, die den Verlust der Aktivität der Protease als Exponentialfunktion der Zeit beschreibt. In dieser Gleichung entspricht v_0 der initialen Aktivität der Protease, während die Aktivität zum Zeitpunkt t als v bezeichnet wird. Der zeitabhängige Verlust der Aktivität von v_0 bis zu $v = 0$ ist daher ein Maß für k_{obs} .

$$v = v_0 \cdot e^{-k_{obs} \cdot t} \quad (1.4)$$

Der Aktivitätsverlust als Funktion der Zeit kann durch manuelle Probenahmen einer einzigen Reaktion zum ausgewählten Zeitpunkt oder durch kontinuierliche Messung, die als *progress-curve*-Methode bezeichnet wird, bestimmt werden. Um die Voraussetzung für eine Reaktion pseudo-erster Ordnung zu erfüllen, wird während der Messung typischerweise ein 10-facher Überschuss an Inhibitor ($[I]_0 \geq 10 \times [E]_0$) verwendet. Um einen hohen SI-Wert auszugleichen, sollte $[I]_0$ größer als $10 \times [E]_0 \times SI$ sein (Schechter und Plotnick, 2004).

Bei der manuellen Methode werden Proben zu definierten Zeitpunkten t aus dem Reaktionsansatz entnommen. Die Reaktionen in den Proben werden sofort nach der Probenahme gestoppt. Die verbleibende Aktivität der Protease (v) in den Proben wird mittels geeigneter Verfahren gemessen. Durch Auftragung der Aktivität gegen die Zeit und eine Anpassung an die Gleichung 1.4 kann der Wert für k_{obs} ermittelt werden. Alternativ kann der natürliche Logarithmus der Proteaseaktivität gegen die Zeit aufgetragen werden. Der k_{obs} -Wert kann durch lineare Regression (Gleichung 1.5) ermittelt werden. Unter der Bedingung, nach

der $[I]_0$ kleiner als K_{inh} ist (Gleichung 1.3), kann die apparente Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung k_{inh} mittels $k_{inh} = k_{obs}/[I]_0$ berechnet werden (Schechter und Plotnick, 2004).

$$\ln\left(\frac{v}{v_0}\right) = -k_{obs} \cdot t \quad (1.5)$$

Alternativ lässt sich die Geschwindigkeitskonstante der Hemmreaktion mit der *progress-curve*-Methode ermitteln (Petersen und Clemmensen, 1981; Schechter und Plotnick, 2004; Huang *et al.*, 2008), obwohl diese Methode ursprünglich für die Bestimmung kinetischer Konstanten einer zweistufigen, irreversiblen *tight-binding*-Inhibition durch kleine Inhibitoren entwickelt wurde (Szedlacsek *et al.*, 1990). Die Reaktion lässt sich vereinfacht durch das in Abbildung 1.6 dargestellte Schema beschreiben. Protease (E), Inhibitor (I) und Substrat (S) werden zusammengemischt und die Akkumulation des Produkts (P), das durch Hydrolyse aus dem Substrat freigesetzt wird, wird verfolgt. Die Umwandlung des Substrats in das Produkt ist typischerweise mit einer Änderung der Extinktion bzw. der Fluoreszenz-Emission verbunden.

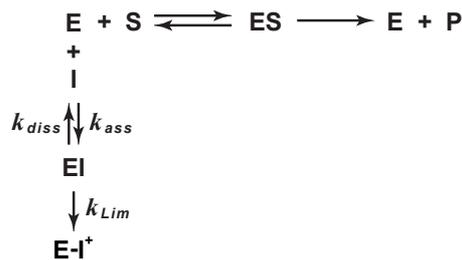


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der *progress-curve*-Methode (modifiziert nach Schechter und Plotnick 2004). Die Hydrolyse des Substrats ist durch den horizontalen Weg durch Enzym (E), Substrat (S), Michaelis-Komplex (ES) und Produkt (P) gekennzeichnet. Der vertikale Weg stellt die minimale kinetische Schrittabfolge für die Inhibition dar, die durch Inhibitor (I), Michaelis-Komplex (ES) und irreversible Entstehung des Protease-Serpin-Komplexes (E-I⁺) gekennzeichnet ist. Die Geschwindigkeit der Komplexbildung bzw. Dissoziation wird als k_{ass} bzw. k_{diss} bezeichnet. Bei k_{Lim} handelt es sich um die Konstante, die die Geschwindigkeit der irreversiblen Bildung des Protease-Serpin-Komplexes beschreibt.

Für einen irreversiblen Inhibitor kann die Produktbildung mit der Zeit (t) durch die Gleichung 1.6 beschrieben werden, wenn ein großer Überschuss an Inhibitor ($[I]_0 \geq 10 \times [E]_0$) eingesetzt wird und die Substratkonzentration während der Reaktion konstant bleibt ($d[S]/dt \approx 0$). Durch eine Anpassung an die Gleichung 1.6 kann für jede eingesetzte Inhibitorkonzentration $[I]_0$ ein entsprechender Wert für k_{obs} ermittelt werden.

$$[P] = [P]_0 + \frac{v_0}{k_{obs}} \cdot (1 - e^{-k_{obs} \cdot t}) \quad (1.6)$$

Aufgrund der Anwesenheit von Substrat ist k_{obs} viel komplizierter durch Gleichung 1.7 definiert.

$$k_{obs} = \frac{k_{Lim} \cdot [I]_0}{K_{ihn} \cdot \left(1 + \frac{[S]_0}{K_M}\right) + [I]_0} \quad (1.7)$$

Wenn $[I]_0$ kleiner als K_{ihn} ist, kann die Gleichung 1.7 zu Gleichung 1.8 vereinfacht werden, wobei k_{Lim}/K_{ihn} als k_{ihn} definiert ist.

$$k_{obs} = \frac{k_{ihn}}{\left(1 + \frac{[S]_0}{K_M}\right)} \cdot [I]_0 \quad (1.8)$$

Wie die Gleichung 1.8 zeigt, stehen k_{obs} und $[I]_0$ in linearem Zusammenhang. Der Wert für k_{ihn} wird durch Auftragung von k_{obs} gegen $[I]_0$ aus der Steigung der Geraden ermittelt (Schechter und Plotnick, 2004). Die Gleichungen 1.7 und 1.8 weisen darüber hinaus darauf hin, dass die Michaelis-Menten-Konstante K_M unter den Versuchsbedingungen für die Berechnung von k_{ihn} bestimmt werden muss. Der K_M -Wert gibt die Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit an. Der Zusammenhang zwischen K_M , der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) und der Reaktionsgeschwindigkeit (v) bei einer bestimmten Substratkonzentration ($[S]$) ist in Gleichung 1.9 beschrieben. Durch Auftragung der Werte für v gegen $[S]$ und Anpassung der Gleichung 1.9 kann der Wert für K_M und v_{max} abgeleitet werden (Michaelis und Menten, 1913).

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (1.9)$$

Das *branched-pathway*-Modell (Abbildung 1.5) erklärt, dass eine schnelle Insertion des RCLs in das β -Faltblatt A ($k_4 \gg k_3$) die wichtigste Voraussetzung für eine effiziente Inhibition ist. Bei inhibitorischen Serpinen zeigt die Länge des RCLs, insbesondere im N-terminalen Bereich, nur eine geringe Variation und beträgt in der Regel 17 Aminosäuren, jedoch sind für einige Serpine wie z. B. für crmA (Renatus *et al.*, 2000), den C1-Inhibitor und das α_2 -Antiplasmin 16 Aminosäuren charakteristisch (Gettins, 2002). Die konservierte Länge des N-terminalen Bereichs des RCLs steht in direktem Zusammenhang mit dem Inhibitionsmechanismus. Die Länge des C-terminalen Bereichs des RCLs ist weniger eingeschränkt und weist 5–9 Aminosäuren auf (Gettins, 2002). Darüber hinaus verfügen inhibitorische Serpine im Vergleich zu nicht-inhibitorischen Serpinen im N-terminalen Bereich des RCLs über eine hoch konservierte Aminosäuresequenz (Abbildung 1.7). Die *hinge*-Region (P15–P9) des RCLs besteht vor allem aus kleinen Aminosäuren, wie z. B. Alanin, Valin, Serin, Threonin oder

Glycin. Davon ist die Position P15 meist mit Glycin, P14 meist mit Threonin oder Serin belegt, während die Positionen P12–P9 meist mit Alanin, Glycin oder Serin besetzt sind (Irving *et al.*, 2000; Gettins, 2002). Es scheint plausibel, dass das Einklappen und die Insertion des RCLs in das β -Faltblatt A durch die kleinen Aminosäuren erleichtert wird (Gettins, 2002). Darüber hinaus wird die Proteasespezifität der Serpine vorwiegend durch die Aminosäuresequenz des RCLs bestimmt. Viele Mutageneseanalysen haben gezeigt, dass die Aminosäure an der P1-Position, an die die Protease bindet, besonders wichtig für die Zielproteasespezifität eines Serpins ist (Gettins, 2002), während bei einigen Serpinen die Proteasespezifität jedoch durch sogenannte *Exosites* zumindest mitbestimmt wird (Abschnitt 1.3.4).

(a) Inhibitorische Serpine

	P15	P14	P13	P12	P11	P10	P9	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
A1 (α_1 -AT)	G	T	E	A	A	G	A	M	F	L	E	A	I	P	M	S	I	P	P
A2	G	T	E	A	T	G	A	P	H	L	E	E	K	A	W	S	K	Y	Q
A3 (α_1 -ACT)	G	T	E	A	S	A	A	T	A	V	K	I	T	L	L	S	A	L	V
A4 (KAL)	G	T	E	A	A	A	A	T	S	F	A	I	K	F	F	S	A	Q	T
A5 (PCI)	G	T	R	A	A	A	A	T	G	T	I	F	T	F	R	S	A	R	L
A10 (ZPI)	G	T	E	A	V	A	G	I	L	S	E	I	T	A	Y	S	M	P	P
B1 (LEI)	G	T	E	A	A	A	A	T	A	G	I	A	T	F	C	M	L	M	P
B2 (PAI-2)	G	T	E	A	A	A	G	T	G	G	V	M	T	G	R	T	G	H	G
B3 (SCCA1)	G	A	E	A	A	A	A	T	A	V	V	G	F	G	S	S	P	T	S
B4 (SCCA2)	G	V	E	A	A	A	A	T	A	V	V	V	V	E	L	S	S	P	S
C1 (ATIII)	G	S	E	A	A	A	S	T	A	V	V	I	A	G	R	S	L	N	P
D1 (HCII)	G	T	Q	A	T	T	V	T	T	V	G	F	M	P	L	S	T	Q	V
E1 (PAI-1)	G	T	V	A	S	S	S	T	A	V	I	V	S	A	R	M	A	P	E
E2 (GDN)	G	T	K	A	S	A	A	T	T	A	I	L	I	A	R	S	S	P	P
F2 (α_2 -AP)	G	V	E	A	A	A	A	T	S	-	I	A	M	S	R	M	S	L	S
G1 (C1-Inh)	G	V	E	A	A	A	A	S	A	-	I	S	V	A	R	T	L	L	V
I1 (Neuroserpin)	G	S	E	A	A	A	V	S	G	M	I	A	I	S	R	M	A	V	L
I2 (MEPI)	G	S	E	A	A	T	S	T	G	I	H	I	P	V	I	M	S	L	A

(b) Nicht-inhibitorische Serpine

	P15	P14	P13	P12	P11	P10	P9	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
A6 (CBG)	G	V	D	T	A	G	S	T	G	V	T	L	N	L	T	S	K	P	I
A7 (TBG)	G	T	E	A	A	A	V	P	E	V	E	L	S	D	Q	P	E	N	T
A8 (AGT)	E	R	E	P	T	E	S	T	Q	Q	L	N	K	P	E	V	L	E	V
B5 (Maspin)	G	G	D	S	I	E	V	P	G	A	R	I	L	Q	H	K	D	E	L
F1 (PEDF)	G	A	G	T	T	P	S	P	G	L	Q	P	A	H	L	T	F	P	L
H1 (HSP47)	G	N	P	F	D	Q	D	I	Y	G	R	E	E	L	R	S	P	K	L

Abbildung 1.7: RCL-Sequenzen von inhibitorischen (a) und nicht-inhibitorischen (b) humanen-Serpinen. Identische Aminosäuren sind schwarz und konservierte grau hervorgehoben.

1.3.3 Klassifikation und Evolution der Serpin-Familie

Bisher wurden über 1500 verschiedene Serpin-Sequenzen aus allen Domänen des *tree of life* identifiziert. Basierend auf Aminosäuresequenzen und unter Berücksichtigung von Röntgenkristallstrukturdaten können Serpine nach ihren evolutionären Verwandtschaftsbeziehungen in 16 Klassen (A–P) eingeordnet werden (Irving *et al.*, 2000). Humane Serpine sind in diesem System in 9 Klassen (A–I) eingeteilt. Die größten Klassen bestehen aus α_1 -AT-ähnlichen und Ovalbumin-ähnlichen Serpinen, die als SERPINA-Subfamilie (10 Mitglieder) bzw. SERPINB-Subfamilie (13 Mitglieder) bezeichnet werden. ATIII und HCII sind jeweils die einzigen Mitglieder der Klassen SERPINC bzw. SERPIND. Die Klassen SERPINE–SERPINI enthalten insgesamt neun Serpine (Gettins, 2002; Van Gent *et al.*, 2003). Alternativ können die Serpine von Vertebraten auf Basis der konservierten Genstrukturen und anderer genetischer Merkmale unter Berücksichtigung von Indel-(Insertion/Deletion)-Positionen in sechs Gruppen (V1–V6) eingeteilt werden (Ragg *et al.*, 2001). Eine Übersicht über die humanen Serpine und ein Vergleich der beiden Klassifikationssysteme bietet die Tabelle 1.1. Die Gruppen V1–V6 beziehen sich auf die Klassifikation nach Ragg *et al.* (2001), die Kategorisierung nach Irving *et al.* (2000) ist daneben zum Vergleich aufgeführt. Die beiden Klassifikationssysteme führen zu einer ähnlichen Gruppierung der Serpine (Gruppe V1 $\hat{=}$ SERPINB, V2 $\hat{=}$ SERPINA, V5 $\hat{=}$ SERPINC und V6 $\hat{=}$ SERPINH), obwohl sie auf unterschiedlichen Informationsquellen basieren. Die Hauptunterschiede bestehen darin, dass die Gruppen V3 und V4 je zwei Klassen von Serpinen und zwar SERPINE und I bzw. SERPINF und G enthalten. HCII, der das einzige Mitglied der SERPIND-Klasse ist, wird zusammen mit SERPINA der Gruppe V2 zugeordnet. Tiefe wurzelnde Klassifikationen der Serpine in Metazoen sind fragwürdig und der evolutionäre Ursprung der Serpine ist ebenfalls unbekannt. Das Klassifikationssystem nach Irving *et al.* (2000) kann die evolutionären Verwandtschaftsbeziehungen der Serpine zwar aufzeigen, es berücksichtigt nicht jedoch die Exon-Intron-Strukturen der Serpin-Gene. Die Exon-Intron-Struktur ist ein wertvolles Kriterium für die Aufklärung der Geschichte der Serpin-Familie und hat eine große Bedeutung für die Schätzungen der phylogenetischen Beziehungen der Vertebraten-Serpine (Atchley *et al.*, 2001; Ragg *et al.*, 2001). Auf Basis der Exon-Intron-Strukturen und diagnostischer Aminosäuresequenz-Positionen (*diagnostic sites*) und unter Berücksichtigung der Aminosäuresequenzen und der Indel-Positionen haben Ragg *et al.* (2001) ein Evolutionsmodell der Vertebraten-Serpine entwickelt (Abbildung 1.8). Diesem Modell nach können die sechs Gruppen der Serpine aus Vertebraten (V1–V6) in zwei Klassen

eingeteilt werden. Auf der Basis konservierter Intronpositionen ist zu vermuten, dass die Gruppen V2, V4 und V6 sich aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt haben und die Gruppen V1, V3 und V5 ebenfalls einen gemeinsamen Vorfahren besitzen. Die Vorfahren der beiden Klassen könnten sich vermutlich wiederum von einem gemeinsamen Vorfahren ableiten lassen.

Tabelle 1.1: Klassifikation der humanen Serpine nach Ragg et al. (2001) und Irving et al. (2000)

Gruppe	SERPIN	Alternativbezeichnung	Chromosomale Lokalisation
V1*	B1	Leukozyten-Elastase-Inhibitor (LEI)	6p25
	B2	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 2 (PAI-2)	18q21.3
	B3	SCCA1	18q21.3
	B4	SCCA2	18q21.3
	B5	Maspin	18q21.3
	B6	<i>Cytoplasmic antiprotease</i> (CAP)	6p25
	B7	Megsin	18q21.3
	B8	<i>Cytoplasmic antiprotease 2</i> (CAP2)	18q21.3
	B9	<i>Cytoplasmic antiprotease 3</i> (CAP3)	6p25
	B10	Bomapin	18q21.3
	B11	Epipin	18q21.3
	B12	Yukopin	18q21.3
	B13	Hurpin	18q21.3
V2*	A1	α_1 -Antitrypsin (α_1 -AT)	14q32.1
	A3	α_1 -Antichymotrypsin (α_1 -ACT)	14q32.1
	A4	Kallikrein-Inhibitor	14q32.1
	A5	Protein C-Inhibitor (PCI)	14q32.1
	A6	Corticosteroid-bindendes Globulin (CBG)	14q32.1
	A7	Thyroxin-bindendes Globulin (TBG)	Xq22.2
	A8	Angiotensinogen	1q42-q43
	A9	Centerin	14q32.1
	A10	Protein-Z-abhängiger Protease-Inhibitor (ZPI)	14q32.1
	D1	Heparinkofaktor II (HCII)	22q11
V3*	E1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1)	7q21.3-q22
	E2	Protease Nexin-1 (PN-1)	2q33-q35
	I1	Neuroserpin	3q26
	I2	Pancpin	3q26
V4*	F1	<i>Pigment Epithelium-Derived</i> Faktor (PEDF)	17p13.3
	F2	α_2 -Antiplasmin (α_2 -AP)	17pter-p12
	G1	C1-Inhibitor (C1-Inh)	11q11-q13.1
V5*	C1	Antithrombin III (ATIII)	1q23-q25
V6*	H1	<i>Heat Shock Protein 47</i> (HSP47, CBP1)	11p15
	H2	Collagen-bindendes Protein 2 (CBP2)	11q13.5

* Die Gruppen V1–V6 zeichnen sich durch äquivalente Exon-Intron-Strukturen der Gene aus.

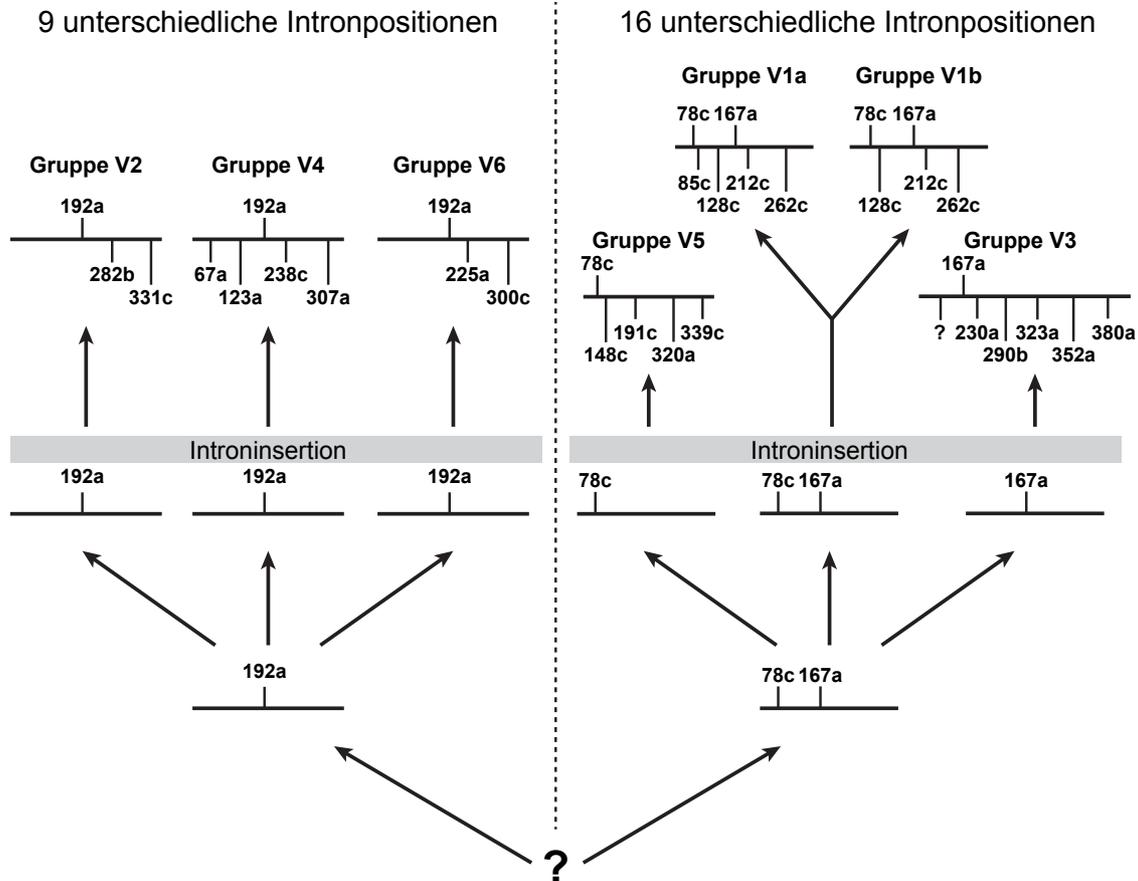


Abbildung 1.8: Evolutionsmodell der Serpine von Vertebraten (modifiziert nach Ragg *et al.* 2001). Die konservierten Intronpositionen der Serpin-Gene, die sich auf die Sequenz des reifen humanen α_1 -AT beziehen, sind mit Zahlen (Aminosäureposition) und Buchstaben (Intronphase a, b bzw. c) angegeben.

1.3.4 Aktivierung der Serpine durch Glykosaminoglykane (GAGs)

Die inhibitorische Aktivität einiger Serpine, wie z. B. ATIII, HCII, PAI-1, PCI, PN-1 und ZPI (Tabelle 1.1), kann durch Bindung an Kofaktoren, wie z. B. Heparin und andere negativ geladene GAGs, reguliert werden (Huntington, 2003; Patston *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2011). GAGs sind Bestandteile vieler biologischer Makromoleküle und sind in tierischen Geweben weit verbreitet. Sie sind lange lineare Polysaccharide, die aus wiederholenden Disaccharideinheiten bestehen. Die einzelne Disaccharideinheit ist jeweils aus einem Aminozucker (N-Acetylglukosamin bzw. N-Acetylgalaktosamin) und einer Uronsäure (Glukuronsäure oder Iduronsäure) aufgebaut (Raman *et al.*, 2005). Aufgrund der Zusammensetzung der Disaccharideinheiten werden GAGs in verschiedene Gruppen unterteilt. Chondroitinsulfate bilden eine der Gruppen, die aus zwei sich abwechselnden Zuckern, β -1,3-verknüpftem N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) und β -1,4-gebundener D-Glukuronsäure (GlcA), besteht. In diese Gruppe wird auch

Dermatansulfat (DS, Abbildung 1.9) eingeordnet (auch als Chondroitinsulfat B bezeichnet), obwohl es anstelle von GlcA häufig eine L-Iduronsäure (IdoA) besitzt. DS-haltige Proteoglykane (DS-PGs) kommen in der extrazellulären Matrix (EZM) der Bindegewebe, vorwiegend der Haut, sowie der Arterienwände, Sehnen und Knorpeln vor und sorgen u. a. für die Gewebeelastizität. Außerdem fungiert DS offensichtlich als endogenes Antithrombotikum (Trowbridge und Gallo, 2002).

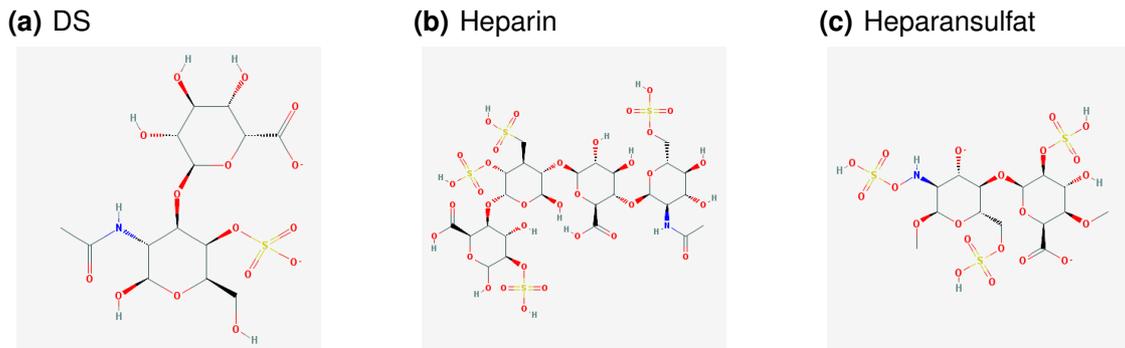


Abbildung 1.9: Beispielhafte Darstellung der Disaccharideinheiten von (a) DS (PubChem. CID 32756), (b) Heparin (PubChem. CID 22833565) und (c) Heparansulfat (PubChem. CID 53477714).

Eine weitere Gruppe wird von Heparin und Heparansulfat gebildet. Die beiden GAGs sind strukturell sehr ähnlich. Sie sind aus einer variablen Anzahl von Disaccharideinheiten, die aus Uronsäure und D-Glucosamin bestehen, aufgebaut (Rabenstein, 2002). Diese Einheiten enthalten häufig Acetylgruppen oder O- bzw. N-Sulfatgruppen als Modifikation (Abbildung 1.9). Heparin ist eine hoch sulfatierte Variante des Heparansulfats. Im Vergleich zu Heparansulfat ist beim Heparin die Anzahl von N-Sulfatgruppen viel größer als die Zahl von N-Acetylgruppen, während der Anteil von O-Sulfatgruppen kleiner ist (Gallagher und Walker, 1985). Heparin wird vor allem in Mastzellen als Heparin-Proteoglykan (Heparin-PG) synthetisiert. Mithilfe spezifischer Proteasen und Endo- β -Glucuronidasen wird Heparin-PG in Heparin überführt. Aufgrund der antikoagulatorischen Aktivität wird Heparin medizinisch angewendet. Die physiologische Rolle von Heparin ist jedoch unklar. Im Gegensatz zu Heparin wird Heparansulfat von nahezu allen Säugetierzelltypen gebildet. Die Heparansulfat-Proteoglykane (HS-PGs) sind auf Zelloberflächen, in Basalmembranen und in der EZM lokalisiert. Als freies GAG kommt Heparansulfat auch intrazellulär vor (Rabenstein, 2002; Knelson *et al.*, 2014). Wegen seiner ubiquitären Verbreitung in Geweben und seiner vielfältigen Strukturen ist Heparansulfat an vielen verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt. Dazu gehören z. B. Zelladhäsion (Lebaron *et al.*, 1988; Takemoto *et al.*, 2013), Regulation von Zellwachstum, Proliferation, Morphogenese der Gewebe und Entwicklung in der frühen Embryogenese

(Bernfield *et al.*, 1999; Lin, 2004) und Angiogenese (Van Wijk und Van Kuppevelt, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Darüber hinaus spielt Heparansulfat bzw. HS-PG bei der Tumorangiogenese und der Proliferation, der Metastasierung sowie der Differenzierung von Tumorzellen eine wichtige Rolle (Gomes *et al.*, 2013; Knelson *et al.*, 2014). *In vivo* fungiert Heparansulfat noch als physiologisches Antithrombotikum, obwohl es im Vergleich zu Heparin eine relativ schwache gerinnungshemmende Aktivität besitzt (Marcum *et al.*, 1986; Rabenstein, 2002; Hänsel und Sticher, 2010, S. 619).

GAGs können über zwei unterschiedliche Mechanismen die Reaktion zwischen Serpinen und Proteasen beschleunigen. Einer davon ist der Brücken-Mechanismus, der auch als *template*-Mechanismus bezeichnet wird. Bei diesem Mechanismus bindet das lineare GAG-Molekül sowohl an das Serpin als auch an das Enzym. Damit werden Inhibitor und Protease in eine geeignete Ausrichtung gebracht, sodass der RCL des Serpins mit dem aktiven Zentrum der Protease produktiv interagieren kann (Gettins, 2002). Ein typisches Beispiel dafür ist der Aktivierungseffekt des Heparins auf die Hemmung von Thrombin durch ATIII (Olson und Björk, 1991; Li *et al.*, 2004). Dieser Mechanismus wurde ebenfalls bei der Inhibition von Thrombin und von aktiviertem Protein C (APC) durch PCI (Li und Huntington, 2008; Li *et al.*, 2008), der Hemmung von Thrombin durch PAI-1 (Ehrlich *et al.*, 1991; Van Meijer *et al.*, 1997), durch PN-1 (Li und Huntington, 2012) und der Inhibition von Faktoren Xa und XIa (FXa und FXIa) durch ZPI (Huang *et al.*, 2011) beschrieben.

Eine Voraussetzung für den Brücken-Mechanismus ist, dass sowohl Serpin als auch Protease GAGs-Bindungsstellen mit geeigneter Oberflächenlokalisierung und Orientierung enthalten müssen. Ein gutes Beispiel dafür ist der ATIII-Thrombin-Heparin-Komplex (Abbildung 1.10), bei dem Heparin (grün) sowohl an ATIII (türkis) als auch an Thrombin (orange) bindet und als Brücke zwischen den beiden Komponenten fungiert. Die Heparin-Bindungsstellen des ATIII sind in rot dargestellt. Ein gemeinsames Merkmal von ATIII, HCII, PAI-1 und PN-1 ist, dass die basischen Aminosäuren ihrer jeweiligen Heparin-Bindungsstellen sich hauptsächlich innerhalb der Helix D befinden (Gettins, 2002). Die Heparin-Bindungsstellen von PCI befinden sich jedoch in der Helix H (Kuhn *et al.*, 1990; Li und Huntington, 2008). Ein Merkmal des Brücken-Mechanismus ist die glockenförmige Abhängigkeit der Inhibitionskonstanten von den Konzentrationen an GAGs. Dies wurde bereits für die Hemmung von Thrombin durch ATIII, PCI (Pratt *et al.*, 1992), PAI-1 (Ehrlich *et al.*, 1991; Patston und Schapira, 1994) und PN-1 (Wallace *et al.*, 1989) nachgewiesen. Wichtig für die Bildung eines produktiven Komplexes ist eine ausreichende Länge der GAGs. Zur Aktivierung der Reaktion zwischen ATIII und Thrombin

muss das Heparin beispielsweise eine Länge von mindestens 18 Saccharideinheiten haben (Lane *et al.*, 1984; Bray *et al.*, 1989). Für die Aktivierung der Hemmung von Thrombin durch HCII bzw. PAI-1 wurde eine Mindestlänge des Heparins von 24 bzw. 14 Saccharideinheiten festgestellt (Gettins, 2002).

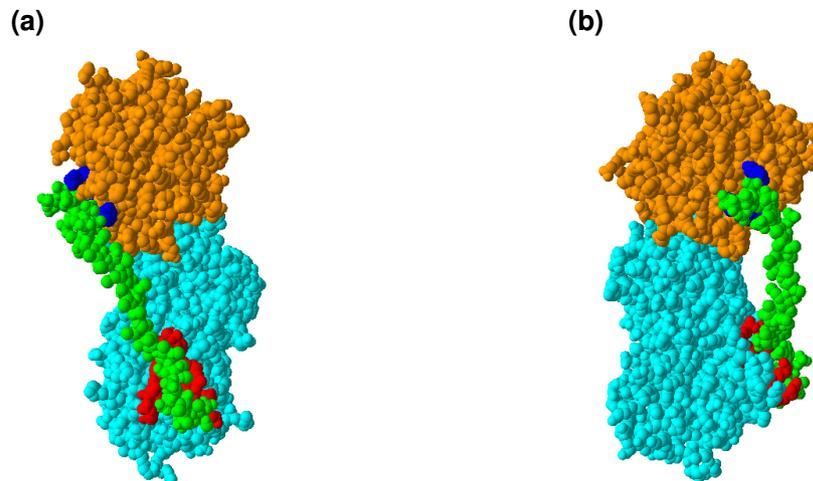


Abbildung 1.10: Kalottenmodell des ATIII-Thrombin-Heparin-Komplexes. Dargestellt sind Seitenansicht (a) und Vorderansicht (b) des ATIII-Thrombin-Heparin-Komplexes mit der PDB-ID-Nummer 1TB6 (Li *et al.*, 2004). ATIII ist in türkis, Thrombin in orange und Heparin in grün dargestellt. Die Heparin-Bindungsstelle des Thrombins ist blau und die des ATIII rot markiert.

Bei der heparin-beschleunigten Inhibition von Thrombin durch HCII und der Hemmung von Faktor IXa (FIXa) und FXa durch ATIII wirken GAGs hauptsächlich über den allosterischen Mechanismus (Gettins, 2002; Baglin *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2006), obwohl der Brücken-Mechanismus auch dazu beiträgt (Rezaie, 1998; Olson *et al.*, 2004; Verhamme *et al.*, 2004). Ein wesentliches Merkmal des allosterischen Mechanismus ist, dass die Konformation der Serpine nach Bindung an GAG verändert wird. Bei der nativen Konformation des ATIII sind die Aminosäuren P15 und P14 des RCLs als zusätzlicher Strang in das β -Faltblatt A eingelagert (Abbildung 1.11). Dabei orientiert sich die Seitenkette der Aminosäure an der P1-Position nach innen und ist somit für die Interaktion mit der Protease nicht verfügbar. Die niedrige, jedoch durchaus messbare Reaktionsgeschwindigkeit in Abwesenheit von GAGs (ca. $7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) deutet jedoch darauf hin, dass die P1-Aminosäure für die Protease zugänglich ist. Daher kann das native ATIII als Ensemble verschiedener Konformationen im schnellen Gleichgewicht betrachtet werden, bei denen die Seitenkette von P1 entweder nach innen oder nach außen zeigt (Huntington, 2011). Die Bindung eines hochaffinen Heparin-Pentasaccharids an ATIII führt unter anderem zur Bildung einer Konformation des ATIII, die eine größere Übereinstimmung mit der nativen Konformation von α_1 -Antitrypsin in

Abbildung 1.3 aufweist. Durch Bindung des Pentasaccharids an ATIII werden die Aminosäuren an den Positionen P15 und P14 aus dem β -Faltblatt A gelöst und der in dieses β -Faltblatt partiell eingelagerte RCL wird exponiert. Die Spaltstelle zwischen P1 und P1' liegt dann für die Reaktion mit der Zielprotease zugänglicher vor (Abbildung 1.11(b)).

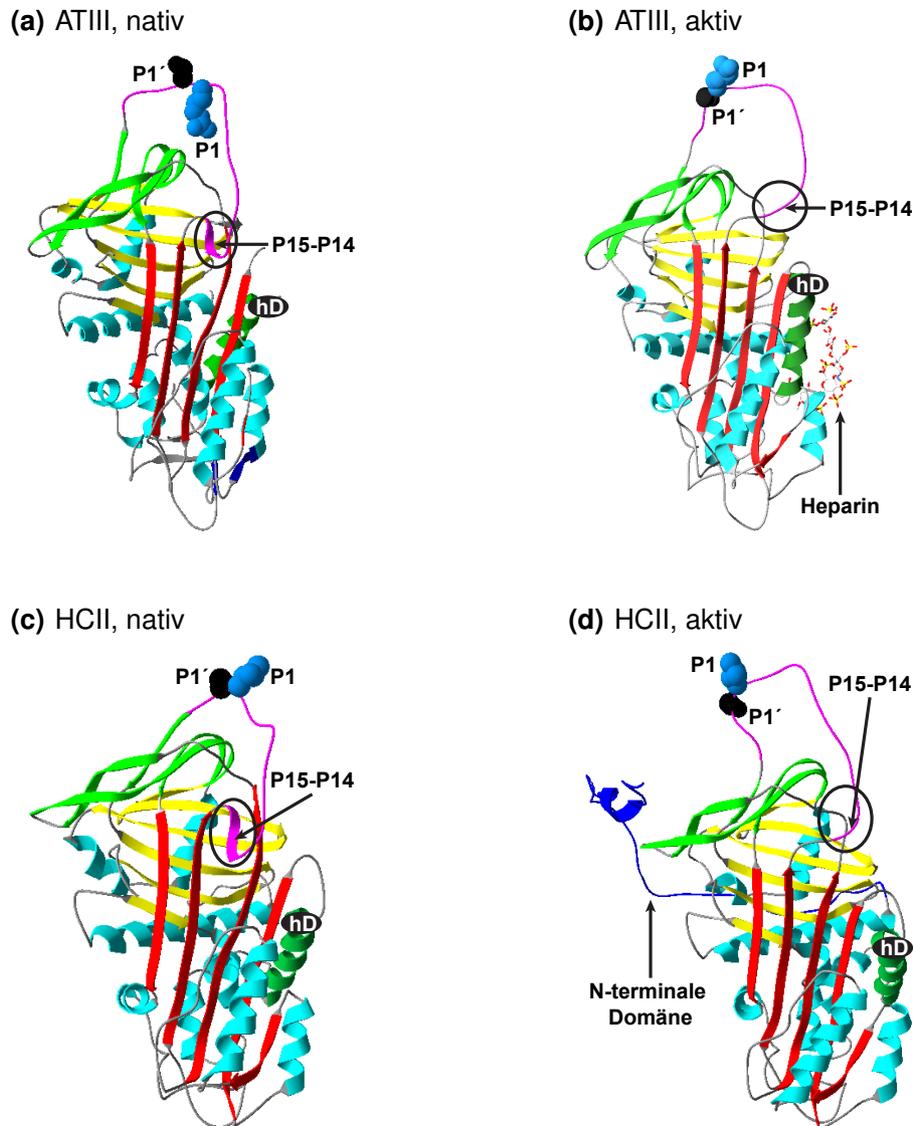


Abbildung 1.11: Struktur der nativen und der aktivierten Konformationen von ATIII und HCII. Die Modelle wurden mit dem PDB-Viewer auf Basis der in der PDB-Datenbank abgelegten PDB-Datei für (a) das native humane ATIII, PDB-ID: 1ATH (Schreuder *et al.*, 1994), (b) das aktivierte humane ATIII, PDB-ID: 2GD4 (Johnson *et al.*, 2006), (c) der native humane HCII, PDB-ID: 1JMJ und (d) der aktivierte humane HCII, PDB-ID: 1JMO (Baglin *et al.*, 2002) erstellt. Die als β -Faltblattstrang in β -Faltblatt A eingelagerten Aminosäuren P15 und P14 sind durch ein Oval markiert. P1 ist in hellblau, P1' in schwarz, Helix D in dunkelgrün und der RCL in lila dargestellt. Die N-terminale Erweiterung des aktivierten humanen HCII ist in dunkelblau markiert. Weder Struktur noch Position der N-terminalen Domäne von nativem HCII konnten bei der Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden.

Bei HCII führt die Bindung an GAGs ebenfalls zu einer Konformationsänderung. Die bei der nativen Konformation in das β -Faltblatt A integrierten Aminosäuren P15 und P14 werden herausgelöst und der RCL wird exponiert (Abbildung 1.11). Die beiden GAG-bindenden Thrombininhibitoren HCII und ATIII weisen jedoch beträchtliche Unterschiede zueinander auf. HCII enthält am N-Terminus eine ca. 80 Aminosäuren umfassende Domäne, die im nativen HCII-Molekül möglicherweise intramolekular mit der Helix D assoziiert ist (Ragg *et al.*, 1990a; Ragg *et al.*, 1990b; Van Deerlin und Tollefsen, 1991). Diese Domäne besitzt zwei negativ geladene, nahezu identische Bereiche, die dem C-Terminus des Blutegel-Proteins Hirudin ähnlich sind. Letzteres kann an die *Exosite I* des α -Thrombins binden und damit die Protease inhibieren (Braun *et al.*, 1988; Grütter *et al.*, 1990). Durch Bindung von GAGs an HCII wird die intramolekulare Assoziation gestört, die N-terminale Domäne wird dabei exponiert (Abbildung 1.11(d)) und kann ebenfalls an die anionenbindende *Exosite I* von Thrombin binden. Dadurch wird die Ausbildung eines Michaelis-Komplexes zwischen den Reaktionspartnern begünstigt (Baglin *et al.*, 2002). Im Gegensatz zum ATIII kann neben Heparin auch DS die Hemmung von Thrombin durch HCII aktivieren (Tollefsen *et al.*, 1983). Neben dem allosterischen Mechanismus wurde ein Einfluss eines Brücken-Mechanismus bei der DS- bzw. Heparin-aktivierten Reaktion zwischen Thrombin und HCII detektiert (Verhamme *et al.*, 2004). Im Vergleich zum ATIII ist die Heparinaffinität von HCII relativ niedrig (Eckert und Ragg, 2003). Darüber hinaus besitzt HCII an der P1-Position ein „unkonventionelles“ Leucin anstelle von Arginin wie bei ATIII oder bei vielen Thrombinsubstraten (Ragg, 1986).

Da Thrombin, FIXa, FXa und FXIa im Blutgerinnungsprozess eine zentrale Rolle spielen, fungieren deren Inhibitoren, die Serpine ATIII, HCII, PCI, PN-1 und ZPI, als essentielle Regulatoren des Blutgerinnungssystems (Rau *et al.*, 2007; Bouton *et al.*, 2012).

1.4 Das Blutgerinnungssystem von Vertebraten

Blutgerinnung bei Menschen und anderen Säugetieren ist ein fein ausbalancierter kaskadenartiger Prozess, an dem mehr als zwanzig extrazelluläre Proteine beteiligt sind. Fast die Hälfte dieser Proteine sind Serinproteasen, die in inaktiver Form im Blut vorliegen und aus ihren Vorläuferproteinen in eine aktive Form überführt werden müssen (Doolittle, 2009). Das Blutgerinnungssystem des Menschen ist in Abbildung 1.12 schematisch dargestellt. Über zwei verschiedene Wege, intrinsischer und extrinsischer Pfad genannt, kann der Blutgerinnungsprozess aktiviert werden. Bei dem intrinsischen Weg wird die Blutgerinnung nach der Aktivierung von Faktor XII (FXII) durch den Kontakt von Plasma mit negativ

geladenen Oberflächen wie z. B. Glas unter Beteiligung von Präkallikrein (PK) und hochmolekularem Kininogen (HMWK, *high molecular weight kininogen*) initiiert. Der aktivierte Faktor FXIIa kann anschließend die Umwandlung von FXI in FXIa katalysieren (Colman, 1984). Wenn eine ausreichende Menge an FXIa erzeugt wird, könne in Gegenwart z. B. von Dextransulfat autokatalytisch weiterer FXI aktiviert werden (Naito und Fujikawa, 1991). FXIa aktiviert darüber hinaus FIX. Die aktivierte Form FIXa kann anschließend zusammen mit Faktor VIIIa (FVIIIa) in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen und Phospholipiden (PL) die Aktivierung von Faktor X (FX) katalysieren (Davie *et al.*, 1991).

Trotz der wichtigen Rolle von FXII bei der Blutgerinnung *in vitro* ist ein FXII-Mangel nicht mit hämorrhagischen Störungen assoziiert (Ratnoff und Colopy, 1955; Davie *et al.*, 1991; Pauer *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Aktivierung von FXI *in vivo* unabhängig von FXII, PK und HMWK ist (Davie *et al.*, 1991). Daher wurde angenommen, dass die von FXII initiierte Fibrinbildung keine Bedeutung für die normale Hämostase *in vivo* hat (Pauer *et al.*, 2004). Vor kurzem wurde jedoch festgestellt, dass der Gerinnungsfaktor FXII *in vivo* durch das von Mastzellen sezernierte Heparin und durch Polyphosphate (PolyP), welche von Thrombozyten freigesetzt werden, aktiviert werden kann (Müller *et al.*, 2009; Oschatz *et al.*, 2011). Dies verbindet die primäre Hämostase mit der sekundären Hämostase und stellt ein neues Paradigma für die Behandlung thromboembolischer und entzündlicher Erkrankungen dar (Van Der Meijden *et al.*, 2009; Renné *et al.*, 2012).

Beim extrinsischen Weg wird die Blutgerinnung durch den sogenannten Gewebefaktor (*tissue factor*, TF) initiiert. TF ist der Rezeptor auf der Zellmembran für FVIIa. Im Fall einer Verletzung der Blutgefäße assoziiert der im Plasma zirkulierende FVII bzw. der in geringen Konzentrationen vorliegende FVIIa mit TF. Der TF/FVIIa-Komplex kann die Umwandlung von FVII zu FVIIa aktivieren und damit seine eigene Bildung beschleunigen. Der TF/FVIIa-Komplex aktiviert außerdem noch die Faktoren FIX und FX. Zusammen mit FVa, Ca^{2+} -Ionen und PL bildet FXa den Prothrombinase-Komplex, der die Spaltung und Aktivierung von Prothrombin unter Bildung von α -Thrombin (FIIa) katalysiert. Das biologisch aktive α -Thrombin kann seinerseits die Faktoren FV, FVIII und FXI aktivieren. Somit wird der intrinsische Weg ebenfalls aktiviert und die Bildung des α -Thrombins verstärkt und beschleunigt (Davie *et al.*, 1991). Thrombin, ein Schlüsselenzym des Blutgerinnungssystems, katalysiert die Umwandlung des fadenförmigen löslichen Fibrinogens in das aktivierte Fibrin. Nach der Aggregation und Polymerisierung des Fibrins wird ein weicher Thrombus gebildet. Mithilfe des durch Thrombin

aktivierten FXIIIa wird Fibrin durch Bildung von Isopeptidbindungen quervernetzt und der Thrombus damit stabilisiert (Naski *et al.*, 1991).

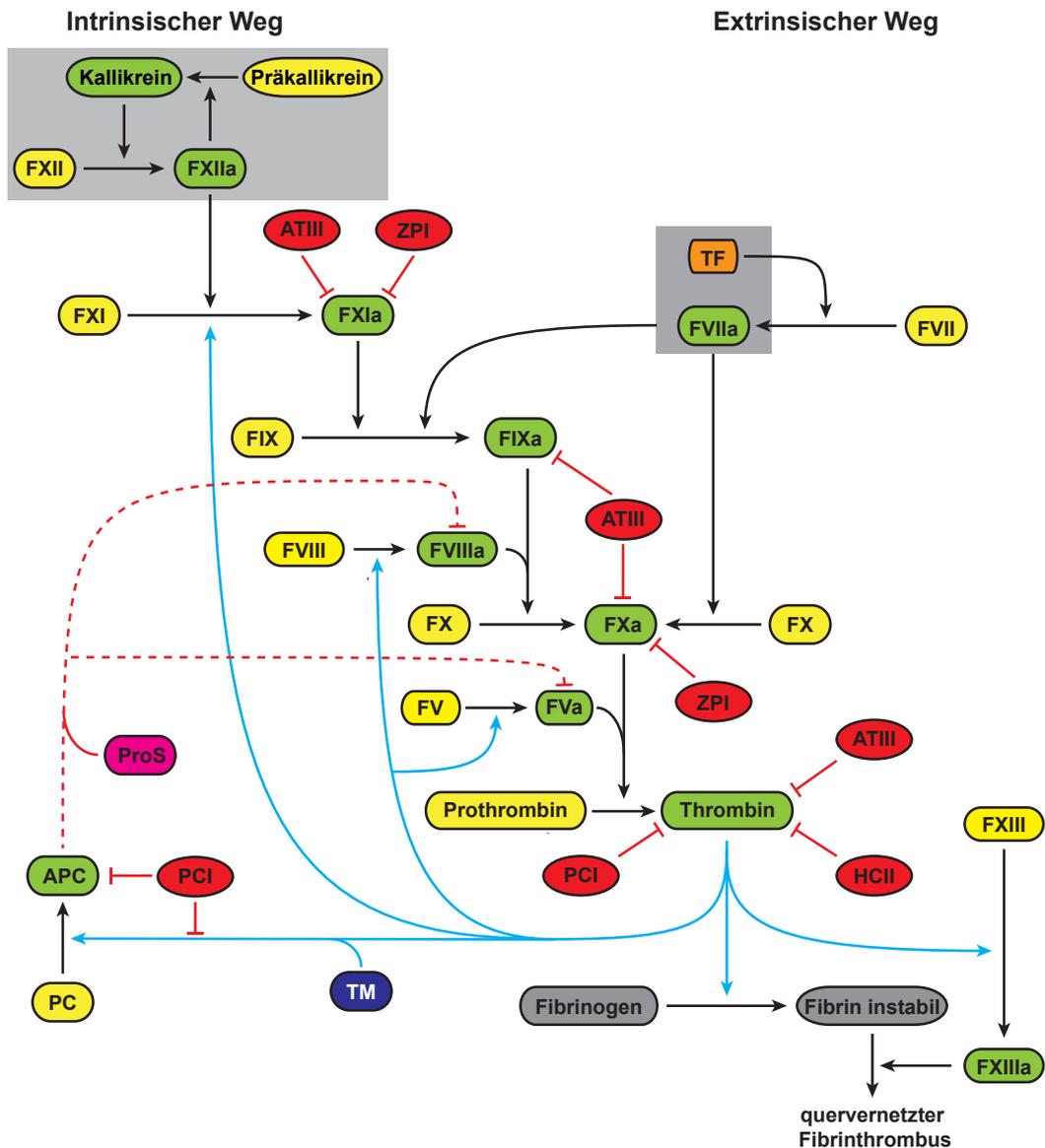


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung des Blutgerinnungssystems beim Menschen. Nicht-aktivierte Formen der Enzyme sind in gelb, aktivierte Formen in grün dargestellt. Serpine und inhibitorische Aktivitäten sind rot markiert. Die Aktivitäten von Thrombin sind durch hellblaue Linien und die hemmende Aktivität von APC durch rote gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Darstellung ist nach Davie *et al.*, 1991; Rau *et al.*, 2007; Lefkowitz, 2008 und Doolittle, 2009 modifiziert. Aus Übersichtsgründen sind die notwendigen Kofaktoren, wie Ca^{2+} -Ionen, HMWK, PL, Protein Z, Vitronektin und GAGs nicht dargestellt.

In der Umgebung des Blutgerinnsels wird die Bildung des Thrombins durch den Protein-C-Weg kontrolliert (Esmon, 2003). Thrombin wird durch Assoziation mit Thrombomodulin (TM), einem integralen Membranprotein, auf der Endothelzelloberfläche gebunden. Das an TM gebundene Thrombin ist in der Lage, Protein C (PC) zu seiner aktivierten Form (APC)

zu spalten (Stearns-Kurosawa *et al.*, 1996). In Kombination mit Protein S (ProS) und in Gegenwart von PL und Ca^{2+} -Ionen kann das APC die Aktivität von FVa und FVIIIa inhibieren, womit die weitere Bildung des Thrombins im nicht-geschädigten Bereich des Endothels limitiert wird (Lu *et al.*, 1996; Esmon, 2003).

Wie bereits erwähnt, spielen Serpine bei der Blutgerinnung des Menschen eine wichtige regulatorische Rolle. Die Aktivität des Thrombins, das ein Schlüsselenzym des Blutgerinnungssystems ist, kann durch ATIII und HCII gehemmt werden. Darüber hinaus können PCI, PAI-1 und PN-1 zur Kontrolle von Thrombin beitragen (Rau *et al.*, 2007; Huntington, 2013). Als wichtigster Regulator kann ATIII außer das Thrombin auch die Gerinnungsfaktoren FIXa, FXa und FXIa inaktivieren (Olson *et al.*, 2004). Als weiterer Inhibitor von FXa und FXIa dient das Serpin ZPI (Han *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011). Von einer Hemmung von FXa (Evans *et al.*, 1991) und FXIa (Knauer *et al.*, 2000) durch PN-1 wurde ebenfalls berichtet. Die proteolytische Aktivität von APC wird hauptsächlich durch PCI reguliert. Darüber hinaus weisen α_1 -AT (Heeb und Griffin, 1988), PAI-1 (Rezaie, 2001) und PN-1 (Hermans und Stone, 1993) ebenfalls eine APC-hemmende Aktivität auf. Die Rolle dieser Serpine im Blutgerinnungssystem ist jedoch nicht völlig geklärt (Rau *et al.*, 2007).

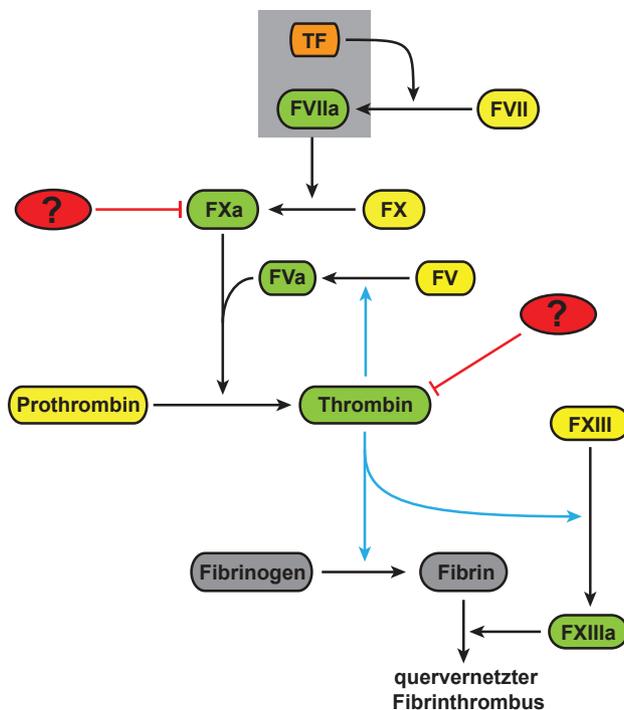


Abbildung 1.13: Schematische Darstellung des hypothetischen Blutgerinnungssystems in Neunaugen. Diese Darstellung ist nach Arbeiten von Doolittle *et al.*, 2008 und Ponczek *et al.*, 2012 modifiziert.

Wann und wie ein so komplexes, fein ausbalanciertes kaskadenartiges Blutgerinnungssystem entstanden ist, ist noch unklar. Durch bioinformatische Analysen des Neunaugen-Genoms, der ESTs (*expressed sequence tags*) und der cDNA-Sequenzen wurden jedoch einige ursprünglichen Komponenten des Systems identifiziert und darauf basierend ein relativ einfaches Schema der Blutgerinnung der ursprünglichen Vertebraten (Abbildung 1.13) wurde vorgeschlagen (Doolittle *et al.*, 2008; Ponczek *et al.*, 2012). Die verfügbaren Daten deuten darauf hin, dass die multifaktorielle Blutgerinnungskaskade sich Schritt für Schritt aus einem einfachen Ensemble von Faktoren entwickelte (Davidson *et al.*, 2003; Doolittle, 2009). Die zwei wichtigen Schlüsselenzyme des Blutgerinnungssystems, Thrombin und FXa, können in Neunaugen als Vertreter ursprünglicher Vertebraten identifiziert werden (Doolittle *et al.*, 2008; Kimura *et al.*, 2009; Ponczek *et al.*, 2012). Ein Vorfahr des Prothrombins kann sogar in Schleimaalen (Banfield *et al.*, 1994) und in Lanzettfischchen (Ponczek *et al.*, 2012) identifiziert werden. Wie die Blutgerinnungsenzyme in ursprünglichen Vertebraten reguliert werden, ist jedoch unklar. Vor allem scheint ATIII, der Hauptinhibitor von Thrombin und FXa in Kiefermäulern, in Neunaugen nicht vorhanden zu sein (Ragg *et al.*, 2009; Doolittle, 2011). Darüber hinaus fehlt in Neunaugen auch ZPI, ein weiterer Inhibitor von FXa.

1.5 Ziele der Arbeit

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) spielt eine zentrale Rolle in der Blutdruckregulation sowie bei der Aufrechterhaltung der Elektrolyt- und Volumenhomöostase bei Säugetieren. Als wichtige Komponenten des Systems gelten die Angiotensin-Peptide und ihr Vorläufermolekül, das Angiotensinogen. In Flussneunaugen (*L. fluviatilis*), einem Repräsentanten der ursprünglichen kieferlosen Vertebraten, wurde ebenfalls Angiotensinogen identifiziert. Es scheint daher, dass wichtige Voraussetzungen für die Entstehung eines funktionsfähigen RAS bereits sehr früh in der Evolution der Vertebraten entstanden ist. Die Funktionen bzw. Eigenschaften des Angiotensinogens in Flussneunaugen sind ungeklärt, während in Kiefermäulern Angiotensinogen ein nicht-inhibitorisches Serpin ist und ausschließlich als Vorläufer für eine Gruppe von Hormonpeptiden dient. Angiotensinogen aus Flussneunaugen kommt aufgrund der kleinen Aminosäuren in der *hinge*-Region des RCLs jedoch als Protease-hemmendes Serpin in Frage.

In Neunaugen wurden Gene einiger wichtiger Blutgerinnungsfaktoren, wie z. B. für FX und Prothrombin, identifiziert. Dies deutet darauf hin, dass das Blutgerinnungssystem wie das RAS sich sehr früh in der Evolution der Vertebraten entwickelt hat. In Kiefermäulern spielen Serpine eine wichtige regulatorische Rolle im Blutgerinnungssystem. Dort hemmen ATIII und ZPI die Schlüsselenzyme des Systems, u. a. Thrombin und/bzw. FXa. Die beiden Serpine scheinen allerdings in Neunaugen nicht vorhanden zu sein. Wie das Blutgerinnungssystem in Neunaugen reguliert wird, ist somit unklar.

Neben Angiotensinogen wurden Gene für einige weitere Serpine von Flussneunaugen, wie z. B. für HCII und SpnV4 isoliert. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob diese Serpine inhibitorische Aktivität besitzen und welche Zielproteasen, vor allem welche Blutgerinnungsenzyme, sie hemmen können. Dafür sollen Komplexierungstests und biochemische Parameter ihrer Funktion analysiert werden. Ein Beitrag zum Verständnis der Entwicklung der Kontrolle des Gerinnungssystems von Vertebraten könnte somit geliefert werden. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob und welche zellulären Reaktionen das Angiotensin-Peptid des Flussneunauges hervorrufen kann, die für das Verständnis des Funktionsmechanismus des RAS in Neunaugen und seiner Entwicklung während der Vertebratenevolution von großer Bedeutung sind.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

Für die Herstellung von Puffern bzw. wässrigen Lösungen wurde das Wasser mittels einer Milli-Q[®]-Anlage (Merck Millipore) deionisiert und filtriert. Wenn es als Zusatz für enzymatische Reaktionen verwendet wurde, wurde es zusätzlich autoklaviert. Im Folgenden wird so behandeltes Wasser als dH₂O bezeichnet. Alle verwendeten Chemikalien, wenn nicht anders angegeben, waren von höchstmöglichem Reinheitsgrad und stammten von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich, Roche Diagnostics, Serva oder Roth. Für alle Versuche wurden sterile Gefäße und Pipettenspitzen eingesetzt. Medien, Puffer für Bakterien bzw. Zellkulturen und Lösungen, die in enzymatischen Versuchen eingesetzt wurden, wurden durch Filtration bzw. Autoklavieren sterilisiert.

Spezialchemikalien, Reagenzien, Enzyme, *Kits*, Bakterienstämme, Zelllinien sowie weitere Materialien und Geräte sind im Text erwähnt bzw. im Anhang (Abschnitt 5.1) aufgeführt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Gesamt-RNA-Isolierung

Gesamt-RNA aus tierischen Zellen bzw. Geweben wurden nach einer Modifikation der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987; Chomczynski und Sacchi, 2006) unter Verwendung der Extraktionslösung TRI-Reagenz (Tabelle 2.1) isoliert. Zur Isolierung wurden zunächst die Zellen einmal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS-Puffer) gewaschen oder die tierischen Gewebe in einem vorgekühlten Mörser unter Beimischung von Trockeneis fein zerrieben. Anschließend wurden ca. 5×10^6 kultivierte Zellen oder ca. 30 mg tierisches Gewebe mit 1 mL TRI-Reagenz zur Lyse versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden die nicht löslichen Bestandteile durch eine 10-minütige Zentrifugation ($12000 \times g$, 4 °C) entfernt. Nach Zugabe von 200 µL Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) zum Überstand wurde die Probe 3 min lang heftig geschüttelt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (15 min, $12000 \times g$, 4 °C)

wurde die obere wässrige Phase vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Extraktionsschritt wurde solange wiederholt bis keine weiße Interphase mit DNA und Protein sichtbar war. Die RNA wurde durch Zugabe von 0,5 Volumina Isopropanol und 10-minütiger Inkubation bei RT gefällt. Nach Zentrifugation (o. g. Bedingungen) wurde das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen (5 min Inkubation und 5 min Zentrifugation bei 4 °C, 7500 × g). Die RNA wurde anschließend bei RT für ca. 15 min getrocknet und in 50 µL Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC-Wasser) aufgenommen. Die RNA-Proben wurden entweder direkt für die cDNA-Synthese (Abschnitt 2.2.2) verwendet oder bei –80 °C gelagert.

Tabelle 2.1: Lösungen für die Isolierung von Gesamt-RNA

Lösung	Zusammensetzung
TRI-Reagenz	3,05 g Ammoniumthiocyanat 9,44 g Guanidiniumthiocyanat 5,75 mL Glycerin (87 %) 3,33 mL 3 M Natriumacetat (NaAc), pH 8,0 40 mL DEPC-Wasser pH 5,0 einstellen mit Essigsäure bei 121 °C 45 min autoklavieren 38 mL Roti [®] -Aqua-Phenol
DEPC-Wasser	0,1 % (v/v) DEPC in Wasser 1 h bei 37 °C rühren zweimal bei 121 °C 45 min autoklavieren
PBS-Puffer	137 mM Natriumchlorid (NaCl) 2,7 mM Kaliumchlorid (KCl) 5,4 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) pH 7,2 einstellen mit Phosphorsäure

2.2.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese ist ein Prozess, durch den komplementäre DNA (cDNA) mittels einer reversen Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, aus RNA (wie mRNA und ncRNA) synthetisiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde cDNA aus isolierter Gesamt-RNA (Abschnitt 2.2.1) mit dem *First Strand cDNA Synthesis Kit* der Firma Fermentas (jetzt

Thermo Fisher Scientific) nach den Herstellerangaben (Tabelle 5.6) synthetisiert. In diesem Kit wurde die M-MuLV reverse Transkriptase, eine genetisch modifizierte Version der reversen Transkriptase des Moloney-Maus-Leukämie-Virus, eingesetzt (Thermo Scientific, 2011a). Die synthetisierte cDNA wurde für die weiteren Versuche in 2 µL-Aliquots bei –20 °C gelagert.

2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus tierischem Gewebe

Zur Isolierung genomischer DNA aus tierischem Gewebe wurde eine Modifikation der Methode von Strauss (Strauss, 2001) angewendet. Die verwendeten Gewebe wurden zunächst in einem vorgekühlten Mörser unter Beimischung von Trockeneis fein zerrieben und anschließend wurde jeweils 100 mg Gewebepulver mit 1 mL PK-Puffer (Puffer für Proteinase K, Tabelle 2.2) versetzt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 55 °C unter langsamem Schwenken und Schütteln wurde die Probe auf 37 °C abgekühlt. Anschließend wurde RNase A (Endkonzentration 0,2 mg/mL) dazu gegeben und die Probe eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 0,2 mg/mL) und weiterer dreistündiger Inkubation bei 55 °C unter langsamem Schwenken und Schütteln wurden die unlöslichen Bestandteile durch eine 10-minütige Zentrifugation entfernt. Wenn nicht anders erwähnt, erfolgten alle Zentrifugationsschritte jeweils bei 13000 rpm und Raumtemperatur in der Mikrozentrifuge „Zentrifuge Pico 17“ (Tabelle 5.3). Der Überstand wurde jeweils vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen PCIA (Phenol (TE-gesättigt)/Chloroform/Isoamylalkohol, 25/24/1) versetzt. Um die Scherkräfte zu minimieren, wurden alle Mischungsvorgänge langsam, aber gründlich durch mehrmaliges Invertieren durchgeführt. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Extraktionsschritt solange wiederholt bis keine weiße Interphase mehr sichtbar war. Anschließend wurde der wässrige Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) versetzt. Nach 10-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand mit 0,1 Volumen 3 M NaAc und 2,5 Volumen 99%igem Ethanol in einem neuen Reaktionsgefäß zur Fällung der DNA gemischt und 20 min zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70%igem Ethanol (2 min Inkubation und 20 min Zentrifugation) wurde die DNA bei RT an der Luft getrocknet und anschließend in 100 µL Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer, Tabelle 2.2) aufgenommen und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die isolierte genomische DNA wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C aufbewahrt.

Tabelle 2.2: Lösungen für die Isolierung genomischer DNA

Lösung	Zusammensetzung
PK-Puffer	100 mM Tris 5 mM EDTA 0,2 % SDS (w/v) 200 mM NaCl pH 8,5 einstellen mit HCl; bei 121 °C 45 min autoklavieren
TE-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0 einstellen mit HCl; bei 121 °C 45 min autoklavieren

2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Amplifizierung definierter DNA-Fragmente *in vitro* (Mullis *et al.*, 1986). Dabei werden die DNA-Fragmente durch Verlängerung zweier Primer mithilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase in mehreren Zyklen (25–35) vervielfältigt. Die Primer sind jeweils komplementär zu einem DNA-Strang und flankieren die Ziel-DNA-Fragmente. Jeder Zyklus beginnt mit der Denaturierung der DNA bei 95–98 °C (Denaturierungsschritt). Anschließend wird die Temperatur auf 50–72 °C abgekühlt, damit die Primer mit den *template*-Strängen hybridisieren können (*Annealing*-Schritt). Bei der Elongation erfolgt die Synthese der komplementären Stränge durch die DNA-Polymerase bei einer Temperatur zwischen 68 °C und 72 °C (Saiki *et al.*, 1988; Eckert und Kunkel, 1991). Temperaturen und Reaktionsdauern bei jedem Schritt sind abhängig von den verwendeten DNA-Matrizen, Primern, Puffern und Polymerasen (Rychlik *et al.*, 1990; Mülhardt, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode zur Amplifikation gezielter Bereiche von cDNA, genomischer DNA, Plasmiden (Standard-PCR, Abschnitt 2.2.4.1) sowie für die Kolonie-PCR (Abschnitt 2.2.4.2) und zur gerichteten Einführung von Mutationen in *template*-DNA (PCR-Mutagenese, Abschnitt 2.2.4.3) eingesetzt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer und DNA-Polymerasen sind in Tabellen 5.4 und 5.5 bzw. 5.9 aufgelistet.

2.2.4.1 Standard-PCR

Für die Standard-PCR wurden die in Tabelle 2.3 beschriebenen Komponenten und das in Tabelle 2.4 beschriebene Amplifikationsprogramm verwendet. Bei den PCR-Reaktionen, die sequenzexakte DNA-Amplifikate liefern müssen, wurde *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus*

furiosus bzw. *Pfu/Taq* Gemische (1/9) oder die *Phusion*[®] *High-Fidelity* DNA-Polymerase von NEB verwendet. Wenn der G/C-Gehalt der zu amplifizierenden DNA-Fragmente sehr hoch war, wurde *Q5*[®] *High-Fidelity* DNA-Polymerase eingesetzt.

Tabelle 2.3: Standard-PCR-Ansatz

Komponente (ggf. Konzentration)	Endkonzentration
Puffer (5 × oder 10 ×)	1 ×
Primer (10 μM)	0,4 μM
dNTPs (10 mM je dNTP)	0,2 mM je dNTP
DNA-Polymerase	0,02 bis 0,05 U/μL
<i>template</i> -DNA	{ <ul style="list-style-type: none"> cDNA: ca. 5 ng/μL genomische DNA: ca. 4 ng/μL Plasmid: ca. 0,01 ng/μL
dH ₂ O	bis zum gewünschten Volumen auffüllen

Tabelle 2.4: Standard-PCR-Programm

Zykluszahl	Temperatur	Zeit	Schritt
1 ×	95 °C (98 °C für <i>Phusion</i> DNA-Polymerase)	3 min	Initiale Denaturierung
25–35 ×	95 °C bzw. 98 °C	30 s	Denaturierung
	variabel	20–40 s	<i>Annealing</i>
	72 °C	variabel	Elongation
1 ×	72 °C	5–10 min	Finale Elongation
1 ×	4 °C	∞	Lagerung

2.2.4.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR-Methode wurde zur Charakterisierung von *E. coli*-Klonen durchgeführt. Dafür wurde die *Taq*-Polymerase der Firma qARTA bio Inc. bzw. der Firma NEB verwendet. Als *template* wurde ein kleiner Teil einer Bakterien-Einzelkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze abgenommen und in den PCR-Reaktionsansatz (Tabelle 2.5) überführt. Durch Erhitzen auf 95 °C wurden die Zellen aufgeschlossen, die DNA freigesetzt und denaturiert (Tabelle 2.6). In

Tabellen 2.5 und 2.6 sind der Kolonie-PCR-Reaktionsansatz und das Kolonie-PCR-Programm dargestellt.

Tabelle 2.5: Kolonie-PCR-Ansatz

Komponente (ggf. Konzentration)	Volumen
Puffer (10 ×)	2 µL
Primer (10 µM)	je 0,8 µL
dNTPs (10 mM je dNTP)	0,4 µL
DNA-Polymerase	0,2 µL
<i>template</i>	Teil einer Einzelkolonie
dH ₂ O	auf 20 µL auffüllen

Tabelle 2.6: Kolonie-PCR-Programm

Zyklenzahl	Temperatur	Zeit	Schritt
1 ×	95 °C	15 min	Freisetzung der DNA und initiale Denaturierung
35 ×	95 °C	30 s	Denaturierung
	variabel	20–40 s	<i>Annealing</i>
	72 °C	variabel	Elongation
1 ×	72 °C	5–10 min	Finale Elongation
1 ×	4 °C	∞	Lagerung

2.2.4.3 PCR-Mutagenese

Die PCR-Mutagenese wurde zum Einfügen von ortsspezifischen Punktmutationen in zirkulärer DNA (Plasmid) verwendet. Das PCR-basierte Verfahren ist eine Modifikation des Verfahrens nach Weiner *et al.* (1994) und der *QuickChange-Site[®]-Directed-Mutagenesis*-Methode von Stratagene (Agilent Technologies, 2013). Dabei werden ein oder mehrere zueinander komplementäre Primerpaare verwendet, die die gewünschten Mutationen tragen. Für die PCR-Mutagenese wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet. Die Komponenten des Mutagenese-Ansatzes sind in Tabelle 2.7 aufgeführt und das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 2.8 beschrieben.

Tabelle 2.7: Ansatz für die PCR-Mutagenese

Komponente (ggf. Konzentration)	Volumen/Menge
Puffer (10 ×)	5 µL
Primer (10 ng/µL)	je 12 µL
dNTPs (10 mM je dNTP)	1 µL
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	2 µL
Plasmid-DNA	50 ng
dH ₂ O	auf 50 µL auffüllen

Tabelle 2.8: Programm für die PCR-Mutagenese

Zyklenzahl	Temperatur	Zeit	Schritt
1 ×	95 °C	4 min	Initiale Denaturierung
18 ×	{ 95 °C variabel 68 °C	1 min	Denaturierung
		1 min	<i>Annealing</i>
		variabel	Elongation
		(2 min/kb, wenn die PCR-Produkte ≤ 2 kb, sonst 1 min/kb)	
1 ×	68 °C	10 min	Finale Elongation
1 ×	4 °C	∞	Lagerung

Nach erfolgter PCR wurden die PCR-Produkte mit dem *GeneJET™ PCR Purification Kit* aufgereinigt (Abschnitt 2.2.5) und für 2 h bei 37 °C mit *DpnI* (Tabelle 5.9) gemäß den Herstellerangaben inkubiert. Das Restriktionsenzym *DpnI* spaltet spezifisch methylierte G^{me6}ATC-Sequenzen in den bakteriellen Ausgangsplasmiden (Vovis und Lacks, 1977), die jedoch nicht in den durch PCR neu synthetisierten Plasmiden vorkommen. Anschließend wurden 5 µL des Restriktionsansatzes in 50 µL kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (Abschnitt 2.3.3). Die Mutationen wurden nach der Plasmidisolierung (Abschnitt 2.2.12) durch die DNA-Sequenzierung (Abschnitt 2.2.13) überprüft.

2.2.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung des *GeneJET™ PCR Purification Kits* (Tabelle 5.6) der Firma *Thermo Fisher Scientific* gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt, wenn sie anschließend für Restriktionsspaltungen (Abschnitt 2.2.10) sowie Subklonierung (Abschnitt 2.2.9) eingesetzt werden sollten. Dazu wurde die zu reinigende DNA bei hoher Salzkonzentration an eine spezielle Silikamembran gebunden (Vogelstein und Gillespie, 1979), wobei niedermolekulare Produkte, Primer, dNTPs, Enzyme und Salze aus dem PCR-Ansatz bzw. der Reaktionsmischung entfernt werden können (Thermo Scientific, 2013).

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Eine Agarose-Gelelektrophorese dient dazu, Nukleinsäuren (RNA bzw. DNA) nach ihrer Größe und ihrer Konformation zu trennen. Aufgrund ihres negativ geladenen Phosphodiesterückgrats wandern die Makromoleküle in einem Gleichspannungsfeld mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten, die umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molekülmasse sind, zur Anode (Thorne, 1966; Aaij und Borst, 1972). Für die Trennung und Analyse der DNA wurden die Agarosegele durch Aufkochen von Agarose in TAE-Puffer (Tabelle 2.9) hergestellt. Die Konzentration der Agarose richtet sich nach den erwarteten Größen der aufzutrennenden DNA-Moleküle. Für DNA-Fragmente, deren Größen zwischen 10 kb und 100 bp liegen, wurden 0,8–2,0%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 4 V/cm bis 10 V/cm in TAE-Puffer. Zur Größenabschätzung der DNA-Fragmente wurde parallel ein geeigneter DNA-Längenstandard (Tabelle 5.7) aufgetragen.

Zur Überprüfung der Qualität extrahierter RNA (Abschnitt 2.2.1) wurde eine Elektrophorese mit denaturierenden, Formaldehyd-haltigen Gelen (Tabelle 2.9) nach einer Modifikation der Methode von Sambrook (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt. Vor der Auftragung wurden 2 µL der RNA-Probe (bis zu 20 µg) mit 2 µL 10 × MOPS-Puffer (Tabelle 2.9), 4 µL 12,3 M Formaldehyd und 10 µL Formamid versetzt und bei 65 °C für 15 min inkubiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde die RNA-Lösung mit 2 µL 10 × RNA-Ladepuffer (Tabelle 2.9) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 5 V/cm in 1 × MOPS-Puffer.

Tabelle 2.9: Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

Lösung	Zusammensetzung
TAE-Puffer (1 ×)	40 mM Tris 40 mM Essigsäure 1 mM EDTA
DNA-Ladepuffer (10 ×)	50 % Glycerin (v/v) 0,1 % SDS (w/v) 0,1 % Bromphenolblau (w/v) 100 mM EDTA in 10 × TAE-Puffer
MOPS-Puffer (10 ×)	200 mM MOPS 20 mM NaAc 10 mM EDTA pH 7,0
RNA-Ladepuffer (10 ×)	50 % Glycerin (v/v) 0,1 % Bromphenolblau (w/v) 10 mM EDTA in DEPC-Wasser
1,5%ige Formaldehyd- Agarosegel	1,5 g Agarose in 72 mL dH ₂ O aufkochen Abkühlen auf ca. 55 °C 10 mL 10 × MOPS-Puffer 18 mL 37%ige Formaldehyd-Lösung (12,3 M)

Nach der Elektrophorese wurden die Agarose-Gele in einem 0,5%igen Ethidiumbromidbad für 10 min gefärbt und im Wasserbad für 10 min entfärbt. Durch Bestrahlung mit UV-Licht wurden die Banden der Nukleinsäuren sichtbar und mit dem Gel-Dokumentationssystem der Firma Vilber Lourmat (Abschnitt 5.1) fotografiert. Für weitere Verwendungen wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (Abschnitt 2.2.7).

2.2.7 Gelextraktion

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das *GeneJET™ Gel Extraction Kit* der Firma *Thermo Fisher Scientific* gemäß den Herstellerangaben (Tabelle 5.6) verwendet. Die Reinigungsmethode basiert darauf, dass DNA-Moleküle in Gegenwart von chaotropen Salzen an die Silikamembranen binden (Vogelstein und Gillespie, 1979; Thermo Scientific, 2012b). Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µL dH₂O statt mit 50 µL Elutionspuffer, wenn die DNA für die weitere Verwendung, wie z. B. für die Ligation (Abschnitt 2.2.11) oder Subklonierung (Abschnitt 2.2.9), ankonzentriert werden musste.

2.2.8 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurden photometrisch mit dem *Nano-Photometer™ P 300* (Tabelle 5.3) der Firma *Implen GmbH* gemäß den Herstellerangaben (Implen, 2011) bestimmt. Als Grundlage für die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren dient das Lambert-Beer'sche Gesetz (Gleichung 2.1):

$$E_{\lambda} = \lg\left(\frac{I_0}{I_1}\right) = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (2.1)$$

Hierbei ist I_0 die Intensität des eingestrahnten Lichtes und I_1 die Intensität des transmittierten Lichtes. Die Extinktion des Materials für Licht der Wellenlänge λ (E_{λ}) ist proportional zur Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit (c) und der Schichtdicke der durchstrahlten Lösung (d). ε_{λ} ist der dekadische Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ . Die Nukleinsäuren haben ein Extinktionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) und Proteine bei 280 nm (OD_{280}). Eine Lösung mit der OD_{260} von 1,0 in einer Quarzküvette mit der Schichtdicke von 1 cm entspricht einer Konzentration von 50 µg/mL doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/mL einzelsträngiger RNA. Durch den Quotienten aus OD_{260} und OD_{280} kann abgeschätzt werden, ob eine Nukleinsäurelösung mit Proteinen verunreinigt ist. Bei reinen DNA-Lösungen liegt das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} über 1,8 und bei reinen RNA-Lösungen über 2,0 (Sambrook und Russell, 2001; Barbas III *et al.*, 2007; Implen, 2011).

2.2.9 Subklonierung

PCR-Produkte wurden durch Subklonierung gesichert. Dafür wurden das *TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing* der Firma *Invitrogen™* (jetzt: *Life Technologies™*) und das *CloneJET™*

PCR Cloning Kit der Firma *Thermo Fisher Scientific* (Tabelle 5.6) verwendet. Die Klonierung erfolgte gemäß den Herstellerangaben (Invitrogen™, 2012; Thermo Scientific, 2012a).

2.2.10 Restriktionsspaltung

Die Spaltung von PCR-Amplifikaten, Plasmid-DNA sowie genomischer DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen (Tabelle 5.9) der Firmen *Thermo Fisher Scientific* und *New England Biolabs* (NEB) in den vom Hersteller empfohlenen und mitgelieferten Puffersystemen durchgeführt. Anschließend wurden die Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.6) aufgetrennt. Für Klonierungen wurden die Zielfragmente nachfolgend durch Gelextraktion (Abschnitt 2.2.7) aufgereinigt.

2.2.11 Ligation

Für die Ligation eines DNA-Fragments in einen geschnittenen Vektor über überhängende Enden wurde die T4 DNA-Ligase (Tabelle 5.9) verwendet. Das Insert wurde mit dem Vektor in einem molaren Vektor/Insert-Verhältnis von 1 : 3 bis 1 : 6 in den vom Hersteller gelieferten Puffersystemen gemäß Herstellerprotokoll versetzt. Nach Zugabe von T4 DNA-Ligase wurde der Ansatz bei 22 °C für ca. 1 h inkubiert und 5 µL davon wurden anschließend in 50 µL chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen transformiert (Abschnitt 2.3.3). Der Ligationserfolg wurde nach der Plasmidisolierung (Abschnitt 2.2.12) durch Restriktionsspaltung (Abschnitt 2.2.10) und DNA-Sequenzierung (Abschnitt 2.2.13) überprüft.

2.2.12 Plasmidisolierung

Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde mittels *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Tabelle 5.6) gemäß dem Herstellerprotokoll (Thermo Scientific, 2011b) isoliert. Hierbei wurde die Plasmid-DNA nach Freisetzung durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979) und Adsorptionschromatographie mit einer Silikamembran (Vogelstein und Gillespie, 1979) gereinigt. Mit diesem *Kit* konnten bis zu 20 µg Plasmid-DNA aus 4 mL LB-Übernachtskultur (Abschnitt 2.3.1) isoliert werden.

2.2.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von subklonierter bzw. mutierter DNA wurde bei der AG Weishaar (Universität Bielefeld) in Auftrag gegeben. Die verwendeten Sequenzierprimer sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 5.5).

2.2.14 Konstruktion der Expressionsvektoren

Für die rekombinante Herstellung der in dieser Arbeit zu untersuchenden Proteine wurden verschiedene Expressionsplasmide konstruiert. Aus den durch reverse Transkription hergestellten cDNA-Pools oder den Plasmiden mit entsprechenden cDNA-Inserts wurden die zu klonierenden Zielfragmente mit spezifischen Primern, die eine geeignete Restriktionsschnittstellen enthalten, amplifiziert. Nach der Spaltung der PCR-Amplifikate und der Ziel-Vektoren mit passenden Restriktionsenzymen (Abschnitt 2.2.10) wurden die Insert- und Vektor-Fragmente durch Gelextraktion gereinigt (Abschnitt 2.2.7), ligiert (Abschnitt 2.2.11) und in *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (Abschnitt 2.3.3). Aus den Einzelkolonien wurden Flüssigkulturen angezogen (Abschnitt 2.3.1) und die Plasmide isoliert (Abschnitt 2.2.12). Die Integrität der Expressionskassetten wurde durch Restriktionsspaltung (Abschnitt 2.2.10) und Sequenzierung (Abschnitt 2.2.13) überprüft.

2.2.14.1 Expressionsvektoren für Angiotensinogen aus *L. fluviatilis*

Für die Untersuchung der biochemischen Eigenschaften von Angiotensinogen aus *L. fluviatilis* (LA) wurden zwei Varianten des Proteins konstruiert und rekombinant in COS-7-Zellen (Tabelle 5.14) exprimiert. Bei der ersten Variante (hLA) wurde die native Flussneunaugen-Angiotensin II-Sequenz zum humanen Angiotensin II mutiert. Bei der zweiten Variante (HA-LA) ist anstelle des eigenen Signalpeptids das Signalpeptid der humanen Protein-Disulfid-Isomerase (PDI-Signalpeptid) und ein Hämagglutinin-tag (HA-tag, Aminosäuresequenz: YPYDVPDYA) vorhanden. Für die Expression von HA-LA wurde der Expressionsvektor p288 (Abbildung 2.1) konstruiert. Durch die Amplifikation der LA-cDNA mit der Primerkombination LampAng_KpnI_oSP/AngioBamHI_neu (Tabelle 5.4) wurde das Fragment mit flankierenden Restriktionsschnittstellen für *KpnI* und *BamHI* versehen und konnte in die MCS (*multiple cloning site*) des Leervektors p287 (Abbildung 2.1) eingefügt werden. Für die Expression von hLA in COS-7-Zellen wurde der Expressionsvektor p298 (Abbildung 2.1) konstruiert. Dazu wurde die vollständige LA-cDNA mit der Primerkombination LampAngio_HindIII_ATG/AngioBamHI_neu (Tabelle 5.4) amplifiziert und das Fragment nach Spaltung mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *BamHI* in das Expressionsplasmid pcDNA3.1(+) (Abbildung 2.1) ligiert. Die native Flussneunaugen-Angiotensin II-Sequenz wurde anschließend durch PCR-Mutagenese (Abschnitt 2.2.4.3) mit der Primerkombination Ang_LampZuHum_f/Ang_LampZuHum_r (Tabelle 5.4) zum humanen Angiotensin II mutiert.

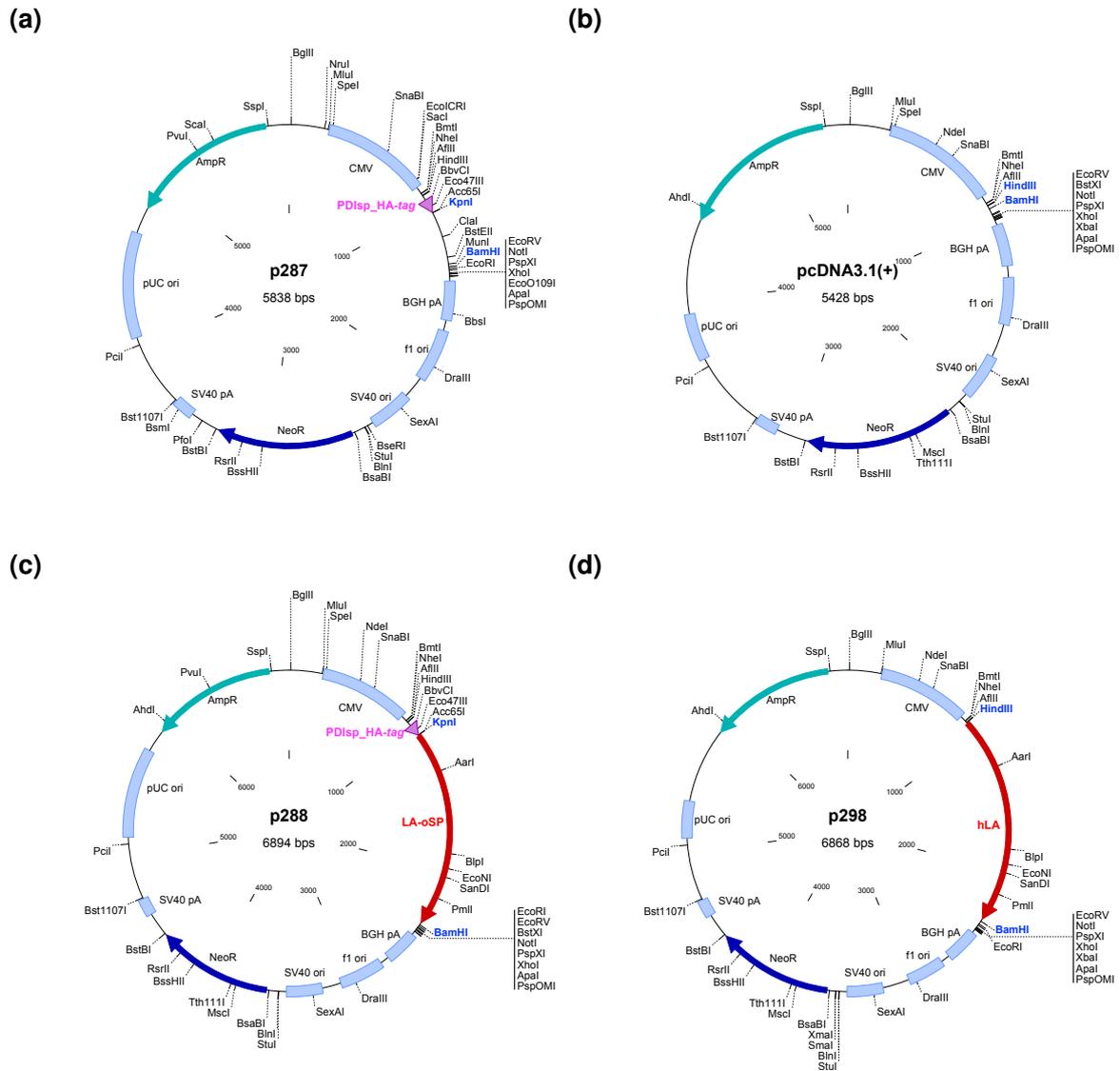


Abbildung 2.1: Aufbau der Plasmide p287, pcDNA3.1(+), p288 und p298. (a): Leervektor p287 wurde für Herstellung von Fusionsprotein mit PDI-Signalpeptid und HA-tag am N-Terminus konstruiert. (b): Leervektor pcDNA3.1(+) der Firma *Life technologies*TM. (c): Plasmid p288 wurde für die Expression von HA-LA in COS-7-Zellen konstruiert. (d): Plasmid p298 wurde für die Expression von hLA in COS-7-Zellen konstruiert. PDIsP_HA-tag: PDI-Signalpeptid und Hämagglutinin-tag, oSP: ohne eigenes Signalpeptid, CMV: früher Promotor des humanen Cytomegalie-Virus, BGH pA: Polyadenylierungssignal des Rinderwachstumshormons (*bovine growth hormone*), f1 ori: f1-Replikationsursprung für die DNA-Einzelstrangproduktion, SV40 ori: Replikationsursprung aus Simian Virus 40, NeoR: bakterielles Neomycin-Resistenzgen, SV40 pA: SV40-Polyadenylierungssignal, pUC ori: Replikationsursprung des pUC-Plasmids, AmpR: bakterielles Ampicillin-Resistenzgen.

Zur stabilen Expression der Variante hLA in HEK-293-EBNA-Zellen wurde die für diese Variante kodierende DNA aus dem Plasmid p298 ausgeschnitten und in den Leervektor pCEP4 der Firma *Life technologies*TM überführt (Plasmid p308, Abbildung 2.2).

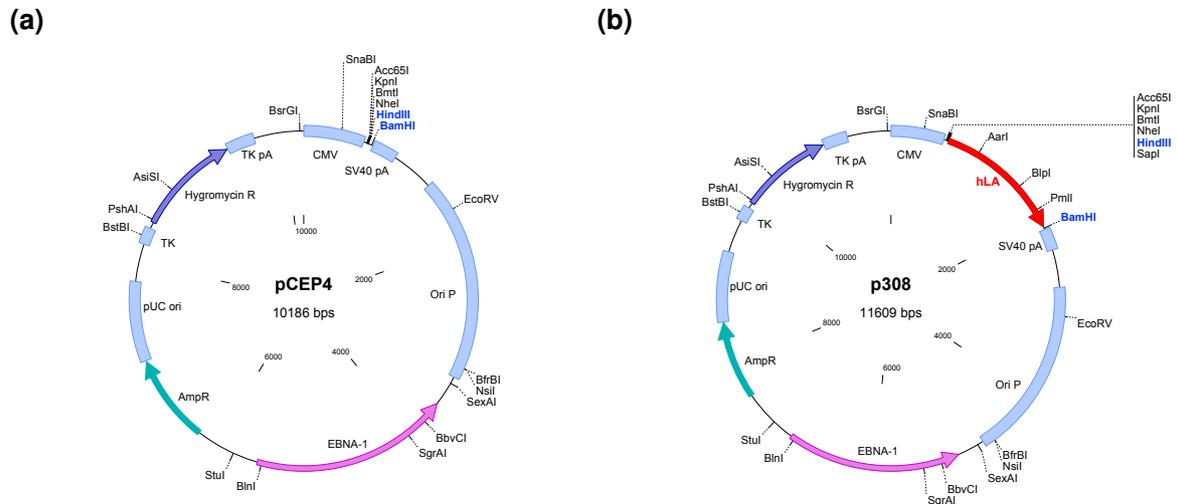


Abbildung 2.2: Aufbau der Plasmide pCEP4 und p308. (a): Leervektor pCEP4 der Firma *Life technologies*TM. (b): Plasmid p308 wurde für die Etablierung hLA stabil exprimierender HEK293-EBNA-Zelllinien konstruiert. oriP: Epstein-Barr-Virus (EBV)-Replikationsursprung, EBNA-1: EBV-Nuclear Antigen-1, TK: Promotor der Thymidinkinase des Herpes-simplex-Virus, Hygromycin R: Hygromycin-Resistenzgen für die Selektion stabiler Transfektanten, TK pA: Polyadenylierungssignal der Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase.

2.2.14.2 Konstrukte für die Untersuchung der Tyrosin-Sulfatierung

Für die Untersuchung der Tyrosin-Sulfatierung von LA wurden zwei Expressionsvektoren (Abbildung 2.3) konstruiert, die auf dem Plasmid pcDNA3.1(+) (Abbildung 2.1) basieren und die cDNA des LA inklusive eines *c-myc-tags* am C-Terminus enthalten. Dazu wurde die vollständige, native LA-cDNA mit der Primerkombination LampAngio_HindIII_ATG/Lang_c-Myc_BamHI_1 (Tabelle 5.4) amplifiziert. Nach Aufreinigung (Abschnitt 2.2.5) wurde das PCR-Produkt als *template* mit der Primerkombination LampAngio_HindIII_ATG/Lang_c-Myc_BamHI_2 amplifiziert und das Fragment nach Spaltung mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *BamHI* (Tabelle 5.9) in das Expressionsplasmid pcDNA3.1(+) (Abbildung 2.1) ligiert. Dieses Konstrukt wurde als p397 bezeichnet. Durch PCR-Mutagenese (Abschnitt 2.2.4.3) mit der Primerkombination LfAng-Y24F-f/LfAng-Y24F-r (Tabelle 5.4) wurde die Aminosäure Tyrosin an Position 24 zu Phenylalanin mutiert. Das neu entstehende Konstrukt wurde p398 genannt.

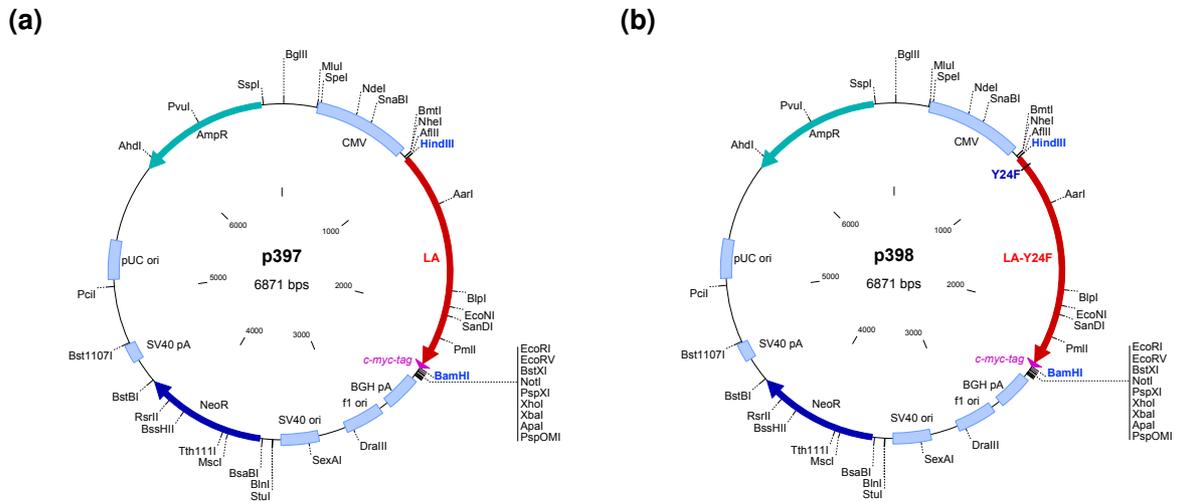


Abbildung 2.3: Aufbau der Plasmide p397 und p398. Die Elemente der Vektoren entsprechen denen der in Abbildung 2.1 beschriebenen Elemente. LA: Angiotensinogen aus *L. fluviatilis*; LA-Y24F: Tyrosin an Position 24 von LA wurde zu Phenylalanin mutiert. Der *c-myc-tag* dient zur Detektion der Proteine im Western-Blot mit einem *Anti-c-myc*-Antikörper.

2.2.14.3 Expressionsvektor für das LfAGTR1-eGFP-Fusionsprotein

Für die Untersuchung der Interaktion zwischen dem Angiotensin II-Peptid (Lfl_Ang II) und dem Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor aus *L. fluviatilis* (LfAGTR1) wurde der Expressionsvektor p408 (Abbildung 2.4) konstruiert. Da Bereiche mit hohem G/C-Gehalt in der LfAGTR1-Sequenz vorhanden sind, wurde eine *codon-* und G/C-Gehalt optimiertes Fusionskonstrukt für den Rezeptor und *enhanced green fluorescent-Protein* (eGFP) am C-Terminus in Auftrag gegeben (Firma *Life technologies™*). Das optimierte DNA-Fragment wurde nach Spaltung mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xba*I in den Leervektor pcDNA3.1(+) (Abbildung 2.1) ligiert.

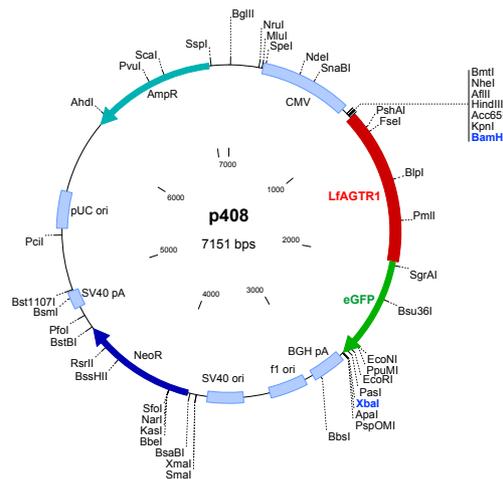


Abbildung 2.4: Aufbau des Plasmids p408. Das Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein, das aus dem Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor aus *L. fluviatilis* (LfAGTR1, in rot dargestellt) und dem *enhanced green fluorescent-Protein* (eGFP, in grün dargestellt) besteht.

2.2.14.4 Expressionsvektor für HCII aus *L. fluviatilis*

Die cDNA-Sequenz von HCII aus *L. fluviatilis* (LfHCII) wurde von Sabrina Farrokh in ihrer Masterarbeit identifiziert. Um das Protein rekombinant in COS-7-Zellen zu exprimieren und mittels Western-Blot zu detektieren, wurde der Expressionsvektor p335 (Abbildung 2.5) konstruiert. Durch die PCR-Amplifikation der LfHCII-cDNA mit der Primerkombination LampHCII_oSP_BamHI/HCII_r1 (Tabelle 5.4) wurde das Fragment mit flankierenden Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI und *Eco*RI versehen und konnte direkt in die MCS des Leervektors p290 (Abbildung 2.5) eingefügt werden. Das von diesem Konstrukt kodierte Protein wurde als HA-LfHCII bezeichnet.

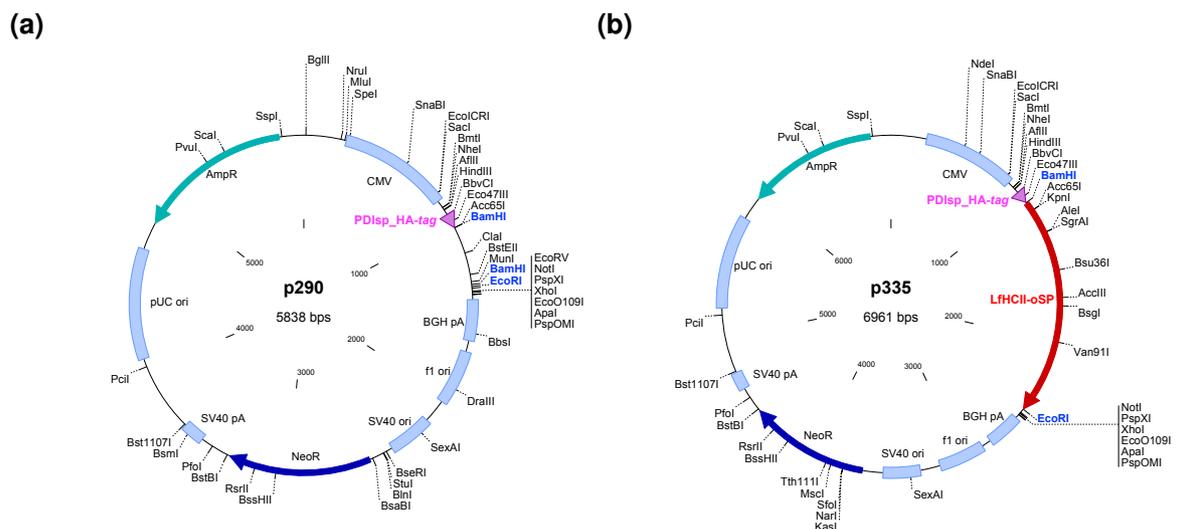


Abbildung 2.5: Aufbau der Plasmide p290 und p335. (a): Im Vergleich zum p287 wurde bei dem Leervektor p290 eine Restriktionsschnittstelle für *Bam*HI durch PCR-Mutagenese an der Position der *Kpn*I-Schnittstelle eingebaut. (b): Das Konstrukt p335 kodiert für ein Fusionsprotein, das aus LfHCII, dem HA-tag und dem PDI-Signalpeptid anstelle des eigenen Signalpeptids besteht.

2.2.14.5 Expressionsvektoren für Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2

Für die Expression von Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2 in COS-7-Zellen wurden die Expressionsvektoren p355 und p349 konstruiert (Abbildung 2.6). Durch die PCR-Amplifikationen der Lfl_SpnV4_1- und Lfl_SpnV4_2-cDNA mit den Primerkombinationen SpnV4_1_osp_KpnI+/SpnV4_1_BamHI- bzw. SpnV4_2_osp_KpnI+/SpnV4_2_BamHI- wurden die Fragmente mit flankierenden Restriktionsschnittstellen für *Kpn*I und *Bam*HI versehen und konnte in die MCS des Leervektors p287 (Abbildung 2.1) einligiert werden.

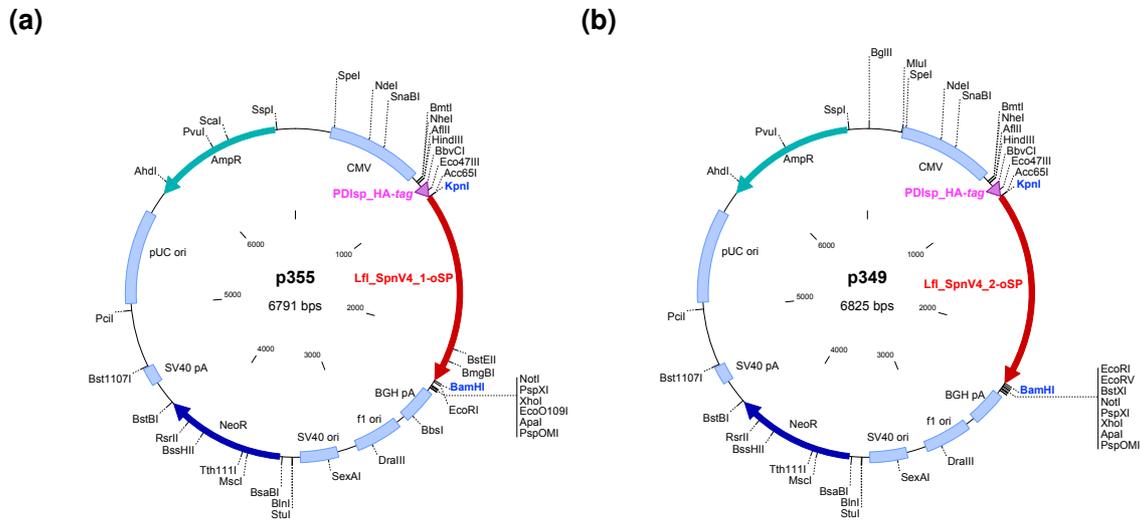


Abbildung 2.6: Aufbau der Plasmide p355 und p349. Die beiden Konstrukte kodieren für Lfl_SpnV4_1 (a) bzw. Lfl_SpnV4_2 (b) mit PDI-Signalpeptid und HA-tag am N-Terminusus.

Zur Expression von Lfl_SpnV4_1 in *E. coli* wurde der Expressionsvektor p403 (Abbildung 2.7) konstruiert. Durch die PCR-Amplifikation der Lfl_SpnV4_1-cDNA einschließlich der Sequenzen für den HA-tag (Plasmid p355 als *template*) mit der Primerkombination NdeI-His-Haem+/SpnV4_1_BamHI- (Tabelle 5.4) wurde am 5'-Ende die Sequenz für den His₍₆₎-tag eingefügt. Das Fragment wurde mit den Restriktionsschnittstellen für NdeI und BamHI versehen. Nach der Spaltung mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wurde das Fragment in den Vektor pKM263 (Abbildung 2.7) einkloniert.

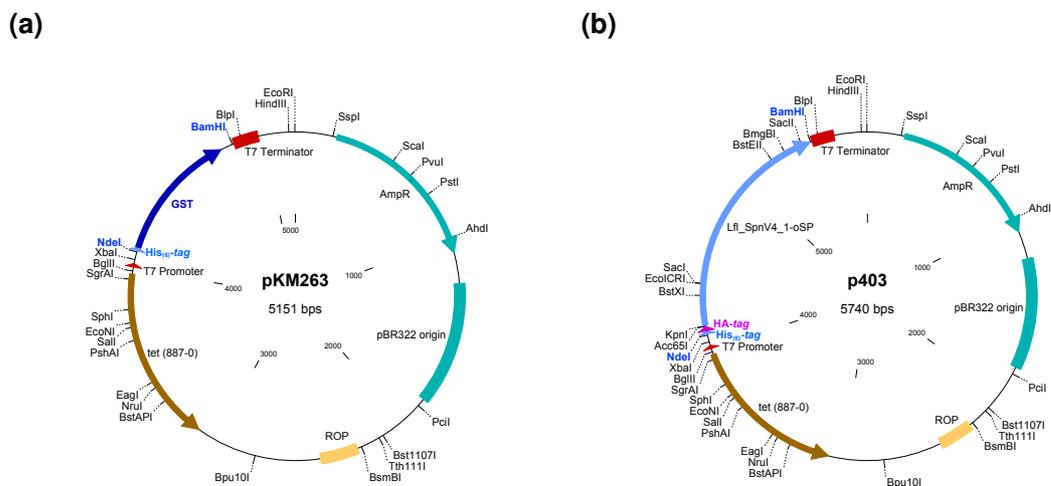


Abbildung 2.7: Aufbau der Plasmide pKM263 und p403. (a): Leervektor pKM263 von EUROSCARF kodiert für einen His₍₆₎-tag und einen Glutathion-S-Transferase (GST)-tag. (b): Das Plasmid p403 wurde für die Expression des Lfl_SpnV4_1 in *E. coli* BL21(DE3) konstruiert. Für den Nachweis und die Reinigung des Serpins wurden am 5'-Ende der cDNA Sequenzen für den HA- und His₍₆₎-tag eingefügt.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgte in LB-Flüssigmedium, das gegebenenfalls mit einem Antibiotikum versetzt wurde (Tabelle 5.13). Für die Plasmidpräparation wurden die Einzelkolonien von den Kulturplatten mit sterilen Pipettenspitzen abgenommen und in 4 mL LB-Flüssigmedium mit passendem Antibiotikum überführt. Die Kulturen wurden in Rollerkulturen (bei 50 rpm) oder Schüttelkulturen (bei 200 rpm) bei 37 °C für ca. 16 h inkubiert und anschließend für die Plasmidisolierung (Abschnitt 2.2.12) verwendet. Die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* (Abschnitt 2.3.4) erfolgte im Stamm BL21(DE3) (Tabelle 5.12).

Zur dauerhaften Lagerung von *E. coli*-Stämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurde das Pellet einer 2 mL-Übernachtskultur in 500 µL LB-Flüssigmedium mit 50 % (v/v) Glycerin aufgenommen und bei –80 °C eingefroren.

2.3.2 Herstellung von chemisch kompetenten Zellen

Bakterien der Stämme *E. coli* TOP 10 und BL21(DE3) (Tabelle 5.12) wurden für nachfolgende Hitzeschocktransformationen (Abschnitt 2.3.3) nach der CaCl₂-Methode vorbehandelt (Sambrook und Russell, 2001). Dafür wurden 250 mL LB-Flüssigmedium (Tabelle 5.13) ohne Antibiotikum mit 10 mL einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und die Zellen bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 10 min auf Eis abgekühlt und durch Zentrifugation pelletiert. Wenn nicht anders erwähnt, erfolgten alle Zentrifugationsschritte für 10 min bei 4000 × *g* und 4 °C in der Kühlzentrifuge RC5C der Firma *Sorvall Instruments* (Tabelle 5.3). Das Pellet wurde in 65 mL eiskalter 100 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 13 mL 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 2,6 mL einer Lösung von 85 mM CaCl₂ mit 15 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in 50 µL-Aliquots bei –80 °C aufbewahrt.

2.3.3 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA wurde ein 50 µL-Aliquot chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen vorsichtig mit 100–300 ng DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für ca. 45 s wurde die Mischung für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach

Zugabe von 250 μL SOC-Medium (Tabelle 5.13) wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C und 200 rpm unter Schütteln kultiviert. Abschließend wurden verschiedene Volumina (z. B. 15 μL , 75 μL und die Reste) auf LB-Agar-Platten (Tabelle 5.13), die ein geeignetes Antibiotika enthielten, ausgestrichen und die Platten bei 37 °C für ca. 16 h inkubiert.

2.3.4 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Expression von Lfl_SpnV4_1 in *E. coli* wurde der Stamm BL21(DE3) (Tabelle 5.12) mit dem Expressionsplasmid p403 (Abbildung 2.7) transformiert. Der Leervektor pKM263 (Abbildung 2.7) wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Aus einer Einzelkolonie wurde eine Glycerinkultur (Abschnitt 2.3.1) zur dauerhaften Lagerung angelegt. LB-Amp-Flüssigmedium (20 mL) wurde mit 10 μL Glycerinkultur beimpft und bei 37 °C und 200 rpm über Nacht unter Schütteln in AnzuchtKolben kultiviert. Anschließend wurden 200 mL LB-Amp-Flüssigmedium mit 10 mL der frischen Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD_{600} von 1 kultiviert. Durch Zugabe von 0,5 mM IPTG wurde die Expression des Fusionsproteins induziert. Nach weiterer Kultivierung bei 30 °C für 5 h bzw. bei Raumtemperatur (über Nacht) wurden die Kulturen auf Eis abgekühlt und bei $4000 \times g$ und 4 °C für 10 min in der Kühlzentrifuge RC5C (Tabelle 5.3) zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen und anschließend direkt für weitere Versuche verwendet oder bei –80 °C aufbewahrt.

Tabelle 2.10: Puffersystem für Zellaufschluss und *inclusion bodies*-Solubilisierung

Puffer	Zusammensetzung
Aufschlusspuffer	20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0
Waschpuffer	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, pH 8,0
Solubilisierungspuffer	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 8 M Harnstoff, pH 8,0

Ein mögliches Problem bei der Proteinherstellung in Prokaryoten ist, dass durch die Überexpression des Zielproteins der Faltungsapparat der Zelle überfordert wird und das heterolog exprimierte Protein aggregiert und Einschlusskörper (*inclusion bodies*, IBs) bildet (Baneyx und Mujacic, 2004; Terpe, 2006). Um zu prüfen, ob das Zielprotein unlöslich als IBs in *E. coli* vorliegt, wurde das eingefrorene Zellpellet aus 20 mL Kultur auf Eis aufgetaut und in 1,25 mL Aufschlusspuffer (Tabelle 2.10) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung mit dem *Ultraschalldesintegrator Sonifier*[®] 450 nach Angaben des Herstellers aufgebrochen. Nach 10-minütiger Zentrifugation der Aufschlussuspension bei

4 °C und 10000 rpm wurde das Pellet einmal mit 1,25 mL Aufschlusspuffer und einmal mit 5 mL Waschpuffer (Tabelle 2.10) gewaschen (resuspendiert und bei 4 °C, 10000 rpm für 10 min abzentrifugiert). Nach erneutem Waschen mit 1,25 mL Aufschlusspuffer wurde das Pellet in 1,25 mL Solubilisierungspuffer (Tabelle 2.10) gelöst bzw. suspendiert und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei RT und 13000 rpm wurde der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei RT aufbewahrt. Die Überstände jedes Schrittes wurden mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.8.1) analysiert.

2.4 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Reinraumwerkbank (*Lamine Air* HB2448, Heraeus) durchgeführt. Die Kultivierungen erfolgten im Brutschrank (Begasungsbrutschrank, Modell 3336, *Forma Scientific*) in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.4.1 Stammhaltung und Zellpassagierung

Die verwendeten Zelllinien und Medien sind in Tabellen 5.14 und 5.15 aufgelistet. Alle Zelllinien wurden in Gewebekulturflaschen oder Gewebekulturschalen mit Polystyroloberfläche kultiviert (Tabelle 5.2). Die COS-7-Zellen wurden zur transienten Expression von rekombinanten Proteinen verwendet. Zur Etablierung von Zelllinien, die Zielproteine permanent exprimierten, wurden die Zelllinien HEK-293-wt bzw. HEK-293-EBNA genutzt.

Alle verwendeten Zelllinien wuchsen adhärent und wurden jeweils nach drei bis fünf Tagen 1 : 5 bis 1 : 20 ausverdünnt. Zum Passagieren wurden die konfluenten Zellen mehrmals mit 1 × PBS-Puffer (Tabelle 2.1) gewaschen und anschließend für 1–3 min bei 37 °C mit Trypsin-EDTA Lösung (Tabelle 5.1) trypsiniert und durch leichtes Klopfen von der Flasche gelöst. Durch die Zugabe von serumhaltigem Kulturmedium wurde der Trypsinierungsvorgang gestoppt. Nach der Resuspension in frischem Medium wurden die Zellen in neuen Kulturflaschen ausgesät und im Brutschrank weiterkultiviert.

2.4.2 Expression rekombinanter Proteine in tierischen Zellen

Zur qualitativen Charakterisierung von LA (zwei Varianten: hLA und HA-LA) und LfHCII, Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2 wurden alle Proteine transient in COS-7-Zellen exprimiert und anschließend weiter charakterisiert. Für die Kinetikanalysen von hLA wurde das Protein zunächst in HEK-293-EBNA-Zellen stabil exprimiert (Abschnitt 2.4.2.2). Anschließend wurde

es durch Chromatographie aufgereinigt (Abschnitt 2.6) und weiter untersucht. Für die Analyse der Interaktion zwischen LfAGTR1 und Lfl_Ang II wurde das LfAGTR1-eGFP-Fusionsprotein in HEK-293-wt-Zellen stabil exprimiert und durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

2.4.2.1 Transfektion

Als Transfektion wird das Einschleusen von Fremd-DNA (z. B. Plasmid-DNA) oder RNA in Säugerzellen und anderen eukaryotischen Zellen bezeichnet (Lottspeich und Engels, 2012). Dazu wurden viele Methoden entwickelt und je nach Zellart eignen sich verschiedene Verfahren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Transfektionen mit linearem Polyethylenimin (PEI) durchgeführt (Tabelle 5.1). Als kationisches Reagenz bildet PEI mit negativ geladenen Nukleinsäuren einen Komplex, der nach Bindung an die auf der Zelloberfläche exponierten Proteoglykane durch Endozytose in die Zellen aufgenommen wird (Kopatz *et al.*, 2004; Eliyahu *et al.*, 2005). Im Endosom induziert PEI das Anschwellen und den Zusammenbruch der endolysosomalen Membran mit anschließender Freisetzung der DNA ins Zytoplasma (Boussif *et al.*, 1995; Akinc *et al.*, 2005).

Tabelle 2.11: Lösungen für die Transfektion

Lösung	Zusammensetzung
PEI-Lösung	10 mg PEI (Tabelle 5.1) in 9,6 mL Wasser lösen 220 μ L 1 M HCl zugeben vortexen, bis sich das PEI gelöst hat pH mit NaOH auf 7,0 einstellen und sterilfiltrieren

Die Transfektionen für die transiente Proteinexpression in COS-7-Zellen und für die stabile Proteinexpression in HEK-293-EBNA- bzw. HEK-293-wt-Zellen erfolgten in Kulturschalen bei einer Konfluenz von ca. 70 %. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit 1 \times PBS gewaschen und mit 2 mL serumfreien DMEM-Medium überschichtet. Anschließend wurden 3 μ g Plasmid-DNA mit 50 μ L serumfreien DMEM-Medium und 30 μ L PEI-Lösung (Tabelle 2.11) versetzt. Der Ansatz wurde dann für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 100 μ L serumfreiem DMEM-Medium und 20-minütiger Inkubation wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben und durch Schwenken der Schale gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank weiter kultiviert. Bei transienter Proteinexpression wurden Überstände und Extrakte 48–72 h nach der Transfektion mittels Western-Blot analysiert. Für die stabile Proteinexpression wurden die Zellen mit geeignetem Medium selektiert.

2.4.2.2 Stabile Proteinexpression

HEK-293-EBNA-Zellen exprimieren konstitutiv das EBNA-1-Gen des Epstein-Barr-Virus (EBV). Das EBNA-1-Protein bewirkt über einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus die episomale Replikation von Plasmiden, die den EBV-Replikationsursprung (*oriP*) enthalten (Aiyar *et al.*, 1998; Van Craenenbroeck *et al.*, 2000; Yates *et al.*, 2000). Das in dieser Arbeit verwendete Expressionsplasmid p308 (Abbildung 2.2), das auf dem Vektor pCEP4 basiert, verfügt über diesen Replikationsursprung und weist darüber hinaus eine Hygromycin-Resistenzkassette auf. Die Zellen wurden 48–72 h nach der Transfektion (Abschnitt 2.4.2.1) in Selektionsmedium (Tabelle 5.15) aufgenommen. Das Selektionsmedium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt. Die entstandenen Einzelklone wurden mithilfe von Zellschabern isoliert und in Selektionsmedium expandiert. Die Produktion der rekombinanten Proteine von isolierten Einzelklonen wurden entweder mittels Western-Blot (bei HEK-293-EBNA-Zellen, die mit dem Plasmid p308 transfiziert worden waren) oder durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (bei HEK-293-wt-Zellen, die mit dem Plasmid p408 (Abbildung 2.4) transfiziert worden waren) überprüft. Von allen positiven Klonen wurden Sicherungsbanken angelegt (Abschnitt 2.4.4). Das Passagieren der Zellen erfolgte alle vier bis sechs Tage durch eine 1 : 10-Verdünnung mit Selektionsmedium. Zur Produktion von rekombinatem hLA wurden Einzelklone transfizierter HEK-293-EBNA-Zellen bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend mit serumfreiem DMEM-Medium ohne Antibiotikum überschichtet (2 mL pro 9 cm²). Nach vier Tagen wurden die Überstände geerntet und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (5 min, 5000 × *g*, 4 °C) abgetrennt. Die Überstände wurden bis zur Verwendung bei –20 °C aufbewahrt.

2.4.3 Herstellung von Zellextrakten und Zellenüberständen von COS-7-Zellen

Zwei bis drei Tage nach der Transfektion (Abschnitt 2.4.2.1) wurde der Kulturüberstand abgenommen und die Zelltrümmer durch 10-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C entfernt. Der Überstand wurde sofort für die Analyse verwendet bzw. aliquotiert und bei –20 °C gelagert. Zur Herstellung der Zellextrakte wurden die Zellen zwei Mal mit 1 × PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber von der Kulturschale bzw. Kulturflasche gelöst und in 1 × PBS-Puffer (2 mL pro 9 cm²) aufgenommen. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in Lysepuffer (Tabelle 2.12, 200 µL pro 9 cm²) resuspendiert. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis und 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm wurde der Überstand direkt verwendet oder aliquotiert

und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Prozentual gleiche Anteile der so hergestellten Überstände und Extrakte wurden mittels Western-Blot analysiert.

Tabelle 2.12: Puffer für Herstellung von Zellextrakten

Lösung	Zusammensetzung
Lysepuffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1 % (v/v) Nonidet P-40 pH 7,4 Protease-Inhibitor-Cocktail (Tabelle 5.1) gemäß Herstellerangaben kurz vor der Verwendung zugeben

2.4.4 Kryokonservierung

Zur Aufbewahrung und Sicherung von Zelllinien wurden Kryokulturen von frühen Passagen angelegt. Diese wurden in der Gasphase über flüssigem Stickstoff (ca. $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$) in einem Kryotank (*Chronos Biosafe 350*, Messer-Griessheim) gelagert. Zum Einfrieren wurden die Zellen in einer Kulturflasche (75 cm^2) bis zu ca. 70%iger Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und abzentrifugiert (800 rpm, 3 min). Das Zellpellet wurde in ca. 1,5 mL frisch angesetztem Einfriermedium (DMEM-Medium mit 20 % FCS und 10 % DMSO) aufgenommen. Vor der Überführung in den Kryotank wurden die Zellen zunächst einige Stunden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und anschließend über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Zum Auftauen der Zellen wurde das eingefrorene Röhrchen mit den Zellen in der Hand erwärmt, bis nur noch ein kleiner gefrorener Rest im Röhrchen vorhanden war. Die aufgetaute Zellsuspension wurde anschließend sofort in frischem DMEM-Medium aufgenommen und das zelltoxische DMSO durch Zentrifugation (gleiche Bedingungen wie beim Einfrieren) entfernt. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und in neue Kulturflaschen überführt. Nachdem die Zellen angewachsen waren, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um eventuelle DMSO-Reste zu entfernen.

2.5 Chromatographie

Zur Aufreinigung der in *E. coli* bzw. HEK-293-EBNA-Zellen rekombinant exprimierten Proteine wurden verschiedene chromatographische Verfahren eingesetzt. Das Protein Lfl_SpnV4_1 wurde mittels IMAC-Chromatographie und das Protein hLA durch eine Kombination von Ionenaustauschchromatographie und Heparin-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Darüber hinaus wurde die Heparin-Affinitätschromatographie auch zur Untersuchung der Heparinbindungsfähigkeit von hLA, HA-LA und LfHCII eingesetzt. Zur Ermittlung geeigneter Bedingungen wurden die Chromatographie-Verfahren zunächst in kleinen Volumen manuell und anschließend mit dem FPLC[®]-System (*fast protein liquid chromatography*) in großem Maßstab durchgeführt (Tödtmann, 2004; Eckert, 2005). Bei der manuellen Chromatographie wurden die aufzutrennenden Proben, Waschlösungen sowie Elutionslösungen jeweils manuell auf die stationäre Phase aufgetragen.

2.5.1 Ionenaustauschchromatographie

Mithilfe der Ionenaustauschchromatographie können Stoffe anhand ihrer elektrischen Ladung getrennt werden. In dieser Arbeit wurde Q-Sepharose[™] *Fast Flow* der Firma *GE Healthcare* (Tabelle 5.1) in einer *GE XK 16/20 column* als Trennsäule (Stationäre Phase) verwendet und in Kombination mit der Heparin-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von hLA eingesetzt. Q-Sepharose[™] *Fast Flow* ist ein starker Anionentauscher, der aus quervernetzten 6 % Agarosekügelchen mit quaternären Ammonium Q (starke Anionenaustauschergruppen) besteht (GE Healthcare, 2010). Alle negativ geladenen Proteine der Probenmischung werden durch die Q-Sepharose absorbiert.

Der berechnete isoelektrische Punkt (pI) des Proteins hLA liegt bei einem pH-Wert von ca. 8,9 (Abschnitt 2.11.2), während die pI-Werte von Albumin bei ca. 4,7–5,4 und von Globulin bei ca. 5,4 liegen (Howitt und Prideaux, 1932; Kubota und Ueki, 1968; Kanal *et al.*, 1994). Wenn der pH-Wert des Kulturüberstandes auf 6,5 eingestellt wird, sind Albumin und Globulin sowie alle anderen Proteine, deren pI unter 6,5 liegt, negativ geladen und werden an die positiv geladene Q-Sepharose gebunden, während hLA im Durchlauf bleibt. Der Durchlauf wurde anschließend in der Heparin-Affinitätschromatographie (Abschnitt 2.5.2.1) eingesetzt.

2.5.2 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist ein chromatographisches Trennverfahren, das auf der spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls an den matrixgebundenen Liganden beruht. Durch eine spezifische Wechselwirkung zwischen dem Adsorbent und dem Liganden wird das Zielmolekül selektiv aus einer komplexen Mischung heraus getrennt. Die Elution des adsorbierten Zielmoleküls wird anschließend durch eine kompetitive Verdrängung aus der Bindung bzw. durch eine Konformationsänderung durch Änderung des pH-Werts oder der Ionenstärke erreicht. In dieser Arbeit wurde die Affinitätschromatographie mit Heparin-Sepharose für die Aufreinigung von hLA und für die Analyse der Heparinbindungsfähigkeit von Serpinen durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Metall-Affinitätschromatographie (IMAC, *immobilized metal affinity chromatography*) zur Aufreinigung von N-terminal His₍₆₎-markiertem Lfl_SpnV4_1 verwendet.

2.5.2.1 Heparin-Affinitätschromatographie

Zur Heparin-Affinitätschromatographie wurde eine HiTrap™ Heparin HP-Sepharose-Säule der Firma *GE Healthcare* verwendet. Der Ligand, Heparin, ist kovalent an die Agarosekügelchen gekoppelt. Die wichtigen Eigenschaften der Säule sind in Tabelle 2.13 aufgeführt (*GE Healthcare*, 2007).

Tabelle 2.13: Wichtige Eigenschaften der HiTrap™ Heparin HP-Sepharose-Säule

Matrix	quervernetzte Agarose
Ligand	Heparin
Konzentration des Liganden	10 mg/mL
Durchschnittliche Partikelgröße	34 µm
Max. Gegendruck	0.3 MPa, 3 bar
Empfohlene Durchflussgeschwindigkeit	1 mL/min (1 mL-Säule), 5 mL/min (5 mL-Säule)
Lagerung	in 20%igem Ethanol bei 4 °C

Das immobilisierte Heparin kann auf zwei Arten mit Proteinen wechselwirken: 1) als Affinitätsligand, wie z. B. bei der Interaktion mit Wachstumsfaktoren und ATIII, 2) als Kationenaustauscher aufgrund seines hohen Gehalts an anionischen Sulfatgruppen. In beiden Fällen wird üblicherweise eine Gradientenelution mit Salz zur Desorption verwendet (*GE Healthcare*, 2007).

2.5.2.2 IMAC-Chromatographie

Das Konzept der Metall-Affinitätschromatographie wurde zuerst von Porath *et al.* (1975) formuliert. Es basiert auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen bestimmten Aminosäureseitenketten (wie z. B. von Histidin und in geringerem Maße Cystein und Tryptophan) auf der Oberfläche von Proteinen und Übergangsmetallionen wie Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} und Zn^{2+} . Die Metallionen werden an chelatisierende Liganden, die kovalent an eine Polymermatrix (z. B. Agarose) gekoppelt sind, gebunden. Die IMAC-Verfahren wurden erfolgreich für die Aufreinigung einer Vielzahl von verschiedenen Proteinen und Peptiden verwendet (Sulkowski, 1985; Block *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wurde die IMAC Sepharose™ 6 Fast Flow der Firma GE Healthcare als Matrix und Ni^{2+} -Ionen zur Aufreinigung von N-terminal His₍₆₎-markiertem Lfl_SpnV4_1 eingesetzt. Die wichtigen Eigenschaften der verwendeten Sepharose sind in Tabelle 2.14 aufgelistet (GE Healthcare, 2005). Die Elution erfolgte mit Imidazol, das mit den Histidinen um die Bindungsstelle konkurriert.

Tabelle 2.14: Wichtige Eigenschaften der IMAC Sepharose™ 6 Fast Flow

Matrix	6 hochvernetzte sphärische Agarose
Metallionenkapazität	ca. 15 $\mu\text{mol Ni}^{2+}/\text{mL}$ Agarose
Durchschnittliche Partikelgröße	90 μm
Max. Gegendruck	0.1 MPa, 1 bar
Empfohlene Durchflussgeschwindigkeit	5 mL/min
Lagerung	in 20%igem Ethanol bei 4 °C

2.6 Isolierung von hLA aus Kulturüberständen

Das Protein hLA wurde in HEK-293-EBNA-Zellen stabil exprimiert (Abschnitt 2.4.2.2) und mithilfe des FPLC®-Systems (Tabelle 5.3) gereinigt. Die stabilen hLA-produzierenden Zelllinien wurden in FCS-haltigem DMEM-Medium mit Antibiotikum (Tabelle 5.15) bis zu ca. 70%iger Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit $1 \times \text{PBS}$ gewaschen und in 20 mL serumfreiem DMEM-Medium ohne Antibiotikum im Brutschrank für 4 Tage inkubiert. Das Kulturmedium wurde gesammelt und für 10 min bei $4000 \times g$ und 4 °C in der Kühlzentrifuge RC5C (Tabelle 5.3) zentrifugiert. Die Überstände wurden in 50 mL-Aliquots bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Neben dem Zielprotein enthält der auf diese Weise gewonnene Kulturüberstand trotz Waschen der

Zellen mit PBS noch FCS-Reste. Bovines Serumalbumin (BSA), eine Komponente des FCS, kann an Heparin binden (Hattori *et al.*, 2001). Um vor der Aufreinigung durch die Heparin-Affinitätschromatographie (Abschnitt 2.5.2.1) das Zielprotein von Albumin abzutrennen, wurde eine Ionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose (Abschnitt 2.5.1) durchgeführt. Die bei der Chromatographie verwendeten Puffer sind in Tabelle 2.15 und Tabelle 2.16 aufgelistet. Alle Puffer wurden vor der Verwendung bei 121 °C für 45 min autoklaviert.

Tabelle 2.15: Puffersystem für die Ionenaustauschchromatographie

Puffer	Zusammensetzung
Puffer A	25 mM Na ₂ HPO ₄ , 20 mM NaCl, pH 6,4
Puffer B	25 mM Na ₂ HPO ₄ , 1 M NaCl, pH 6,4
Puffer C	1 M NaCl, 1 M NaOH
Puffer D	250 mM Na ₂ HPO ₄ , 200 mM NaCl, pH 6,4

Die Durchflussgeschwindigkeit bei der Ionenaustauschchromatographie betrug 5 mL/min. Die Säule mit einem Säulenvolumen (*cv*, *column volume*) von 30 mL wurde zunächst mit 10 cv Puffer A equilibriert. Der Kulturüberstand (440 mL) wurde mit 50 mL Puffer D und 5 mL 100 mg/mL Polyethylenglykol (PEG 8000) sowie 5 mL 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt und der pH-Wert auf 6,4 eingestellt. Nach der Auftragung auf die Säule wurde der Durchlauf gesammelt und für die nachfolgende Heparin-Affinitätschromatographie aufbewahrt. Nach dem Waschen mit 3 cv Puffer A und der Elution mit 2 cv Puffer B wurde die Säule mit 10 cv Puffer C regeneriert und in 10 mM NaOH bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2.16: Puffersystem für die Heparin-Affinitätschromatographie

Puffer	Zusammensetzung
Puffer I	100 mM Tris, 10 mM Zitronensäure, 225 mM NaCl, pH 7,4
Puffer II	100 mM Tris, 10 mM Zitronensäure, 3 M NaCl, pH 7,4
Puffer III	1 M Tris, 100 mM Zitronensäure, 2,25 M NaCl, pH 7,4
Puffer TS-PEG	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 g/L PEG 8000, pH 7,4

Die HiTrap™ Heparin HP-Sepharose-Säule (Tabelle 5.1) mit einem Säulenvolumen von 5 mL wurde zunächst mit 10 cv Puffer I equilibriert. Der Durchlauf der Ionenaustauschchromatographie (450 mL) wurde mit 50 mL Puffer III gemischt und auf die HiTrap™ Heparin HP-Sepharose-Säule aufgetragen. Nach dem Waschen mit 10 cv Puffer I wurde

die Säule mit 3 cv einer Mischung von 85 % Puffer I und 15 % Puffer II eluiert. Die Durchflussgeschwindigkeit bei der Heparin-Affinitätschromatographie betrug 2 mL/min. Die Eluate wurde gesammelt und anschließend mittels eines Amicon® Ultra 4 mL-Filters der Firma Merck Millipore (Tabelle 5.2) nach Angaben des Herstellers ankonzentriert und in dem TS-PEG-Puffer umgepuffert. Zum Schluss wurde das aufgereinigte und umgepufferte Protein aliquotiert und bei –20 °C für die weitere Verwendung aufbewahrt. Die Reinheit des isolierten Proteins wurde mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.8.1) überprüft. Die Regeneration der Säule wurde durch Spülen mit 5 cv Puffer II und Equilibrierung mit 10 cv Puffer I erreicht. Abschließend wurde die Säule in 20%igem Ethanol bei 4 °C gelagert.

2.7 Isolierung und Reinigung von Lfl_SpnV4_1 aus *E. coli*

Tabelle 2.17: Puffersystem für die Reinigung von Lfl_SpnV4_1

Puffer	Zusammensetzung
Rückfaltungspuffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 g/L PEG 8000, 10 % Glycerin (v/v), pH 8,0 1 Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette pro 50 mL Puffer
Waschpuffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 g/L PEG 8000, 10 % Glycerin (v/v), 20 mM Imidazol, pH 8,0
Elutionspuffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 g/L PEG 8000, 10 % Glycerin (v/v), 400 mM Imidazol, pH 8,0

Das in *E. coli* produzierte Lfl_SpnV4_1 lag unlöslich in IBs vor. Um dieses Protein aufzureinigen, wurden die IBs aus den Zellen isoliert und das Protein in Solubilisierungspuffer (Tabelle 2.10) denaturiert und gelöst (Abschnitt 2.3.4). Das gelöste, denaturierte Protein (15 mL) mit einer Konzentration von 1 mg/mL wurde bei RT unter Rühren (500 rpm) tropfenweise in 2 L Rückfaltungspuffer (Tabelle 2.17) pipettiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4000 × g und Filtration mit einem Sterilfilter (Minisart®, Porengröße: 0,2 µm) wurde die Lösung auf die mit 10 mL IMAC Sepharose™ 6 Fast Flow gepackte Säule mit einer Geschwindigkeit von 1,5 mL/min aufgetragen. Die Säule wurde vorher mit Ni²⁺-Ionen nach Angaben des Herstellers beladen und mit 10 cv Rückfaltungspuffer equilibriert. Nach dem Waschen mit 10 cv Waschpuffer wurde das Protein mit 4 cv Elutionspuffer (Tabelle 2.17).

Anschließend wurde die Sepharose mit 5 cv 1 M NaOH und 5 cv dH₂O regeneriert und in 20%igem Ethanol bei 4 °C gelagert. Das isolierte Protein wurde aliquotiert und seine Reinheit wurde mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.8.1) überprüft. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Protein bei –20 °C aufbewahrt.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte mittels einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Bei der Vorbereitung werden die Proteine mit SDS, einem anionischen Detergenz, behandelt. SDS lagert sich in einem konstanten Massenverhältnis von 1,4 g SDS je Gramm Protein an die Polypeptidketten an, entsprechend ca. ein SDS-Molekül je zwei Aminosäuren (Weber und Osborn, 1969; Lottspeich und Engels, 2012). Dabei werden fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen zerstört. Die Proteine werden dadurch entfaltet und nehmen eine einheitliche negative Ladung an. Aufgrund dessen erfolgt die Auftrennung der Proteine ausschließlich nach ihrer Molekülmasse. Die Disulfidbrücken können optional durch Reduktion mit Thiolen wie z. B. β -Mercaptoethanol, Dithiothreitol (DTT) bzw. Dithioerythrit (DTE) gespalten werden, um deren Einfluss auf das Wandern der Proteine zu eliminieren.

In dieser Arbeit wurde die SDS-PAGE mit selbst hergestellten diskontinuierlichen Gelen und dem Mini-PROTEAN Elektrophorese-System (Tabelle 5.3) der Firma Bio-Rad bei konstanter Stromstärke von 25 mA je Gel durchgeführt. In Tabelle 2.18 sind die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen und Puffer aufgeführt. Wenn nicht anders erwähnt, wurden nur 4%ige Sammelgele und 10%ige Trenngele verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben 4 : 1 mit 5 \times SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min inkubiert. Anschließend wurden sie bei RT und 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Für die Darstellung der Proteinbanden im Gel wurde das Trenngel nach der Gelelektrophorese mit *PageBlueTM Protein Staining Solution* der Firma *Thermo Scientific* nach Angaben des Herstellers gefärbt und entfärbt (Thermo Scientific, 2012c).

Tabelle 2.18: Lösungen und Puffer für die SDS-PAGE

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Trenngellösung (10 %) für zwei Gele	2,5 mL 1,5 M Tris, pH 8,8 4,85 mL H ₂ O 100 µL 10 % (w/v) SDS 2,5 mL Acrylamid/Bis-Lösung 29 : 1, 40 % 50 µL 50 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) 5 µL Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Sammelgellösung (4 %) für zwei Gele	1,25 mL 0,5 M Tris, pH 6,4 3,2 mL H ₂ O 50 µL 10 % (w/v) SDS 0,49 mL Acrylamid/Bis-Lösung 29 : 1, 40 % 25 µL 50 % (w/v) APS 5 µL TEMED
5 × SDS-Probenpuffer	300 mM Tris, pH 6,8 10 % (w/v) SDS 50 % (v/v) Glycerin 0,15 % (w/v) Bromphenolblau 12 % (v/v) β-Mercaptoethanol
1 × SDS-Laufpuffer	24 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS pH 8,3

2.8.2 Western-Blot

Der Western-Blot ist eine sensitive Nachweismethode zum spezifischen Nachweis von Proteinen. Dabei werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus einem Acrylamidgel auf eine Trägermembran übertragen, immobilisiert und anschließend auf dieser mit spezifischen Antikörpern immunologisch detektiert (Towbin *et al.*, 1979; Burnette,

1981). Im Rahmen dieser Arbeit wurden hydrophobe, inerte Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen (Tabelle 5.2) als Trägermembranen verwendet. Vor dem Transfer wurden die Membranen kurz mit Methanol benetzt und anschließend für mindestens 10 min in Transferpuffer (Tabelle 2.19) equilibriert. Der Transfer der Proteine auf die Membranen erfolgte mit dem *Blotting-System Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell* (Tabelle 5.3) der Firma Bio-Rad nach Angaben des Herstellers bei einer konstanten Spannung von 100 V für 60 min (Bio-Rad, 2012). Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen für den Western-Blot ist der Tabelle 2.19 zu entnehmen. Die Blockierung der Membranen und die Inkubation mit Antikörpern wurden nach dem elektrophoretischen Transfer mit dem *SNAP i.d.[®]* Protein-Detektionssystem der Firma *Merck Millipore* nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurden die Proteinbanden auf den Membranen mit dem *WEST-ZOL[®]* Western-Blot-Detektionssystem der Firma *iNtRON Biotechnology* (Tabelle 5.1) und *Fuji Super RX* Röntgenfilmen (Tabelle 5.2) gemäß den Herstellerangaben durch Chemolumineszenz detektiert und analysiert.

Tabelle 2.19: Lösungen und Puffer für den Western-Blot

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Transferpuffer	12 mM Tris-Base, 96 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol
Blockierlösung	1 % (w/v) BSA und 0,1 % (v/v) Tween 20 in 1 × PBS
Waschlösung	0,1 % (v/v) Tween 20 in 1 × PBS

Falls nicht anders erwähnt, wurde in dieser Arbeit zum Nachweis der HA-getaggten Proteine (HA-LA, LfHCII, Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2) ein Anti-HA-Antikörper und zur Detektion der *c-myc*-getaggten Proteine ein *Anti-c-myc*-Antikörper eingesetzt (Verdünnung 1 : 1000). Der Angiotensin N-10-Antikörper (Verdünnung 1 : 2000) wurde zur Detektion des hLA verwendet. Zur Entwicklung wurden ein HRP-gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG-Antiserum (Verdünnung 1 : 4000) bzw. ein Peroxidase-gekoppelter monoklonaler Anti-Schaf/Ziegen-IgG-Antikörper (Verdünnung 1 : 5000) eingesetzt. Für die Untersuchung der Tyrosin-Sulfatierung wurden ein monoklonaler Anti-Sulfotyrosin-Antikörper (Verdünnung 1 : 2000) zur Detektion und ein HRP-gekoppeltes Anti-Maus-IgG-Antiserum (Verdünnung 1 : 4000) zur Entwicklung verwendet. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5.8 aufgelistet.

2.8.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde in dieser Arbeit vor allem die Gesamtproteinbestimmungsmethode nach Bradford angewendet. Das Bradford-Verfahren basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs *Coomassie* G-250 durch die Komplexbildung mit Proteinen in saurer Lösung von 465 nm nach 595 nm (Bradford, 1976; Compton und Jones, 1985). Der Test erfolgte in den *ratiolab*[®]-Küvetten (Tabelle 5.2) mit dem *Coomassie*[®] *protein assay reagent* der Firma *Pierce Biotechnology* (Tabelle 5.1) und dem *NanoPhotometer*[™] P 300 der Firma *Implen* (Tabelle 5.3) nach Herstellerangaben (*Pierce Biotechnology*, 2002; *Implen*, 2011). Für die Erstellung der Standardkurve wurde der BSA-Standard (2 mg/mL) der Firma *Pierce Biotechnology* (Tabelle 5.1) eingesetzt.

Da Harnstoff das Bradford-Verfahren stören kann (Friedenauer und Berlet, 1989), wurden die Proteinkonzentrationen der in Harnstofflösung gelösten IBs (Abschnitt 2.3.4) mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.8.1) abgeschätzt. Dafür wurden parallel Verdünnungsreihen des BSA-Standards (2 mg/mL) und der in Harnstofflösung gelösten IBs auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nach der SDS-PAGE und dem Färben mit *PageBlue*[™] *Protein Staining Solution* wurden die Protein-Konzentrationen durch Vergleichen der Intensitäten der Proteinbanden abgeschätzt (Vincent *et al.*, 1997; Candiano *et al.*, 2004).

2.9 Methoden zur Charakterisierung von Serpinen

Ein wichtiges Charakteristikum von inhibitorischen Serpinen ist die Bildung von irreversiblen, kovalenten und SDS-stabilen Komplexen mit Proteasen (Gettins, 2002). Zur Charakterisierung der Spezifität der untersuchten Serpine wurden Komplexierungstests und/oder kinetische Tests durchgeführt. Die Komplexierung erfolgte durch die Inkubation der Serpine mit potenziellen Zielproteasen in An- bzw. Abwesenheit von Kofaktoren. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden die Reaktionsprodukte mittels Western-Blot (Abschnitt 2.8.2) analysiert. Die Größe der kovalenten Komplexe entspricht der Summe der Massen der Serpine und deren Zielproteasen abzüglich des üblicherweise ca. 4 kDa großen, abgespaltenen C-Terminus der Serpine. Um die Heparinbindungsfähigkeit von hLA und LfHCII zu bestimmen, wurde die Heparin-Affinitätschromatographie eingesetzt. Die Elution wurde durch einen stufenförmigen bzw. linearen Natriumchlorid-Gradienten erzielt und deren Eluate fraktioniert gesammelt und mittels Western-Blot analysiert. Zur quantitativen Charakterisierung von Inhibierungsreaktionen wurden kinetische Methoden verwendet.

2.9.1 Komplexierungstests

Zur Identifizierung der potenziellen Zielproteasen wurden die rekombinanten, in COS-7-Zellen exprimierten Serpine mit verschiedenen Proteasen bei 25 °C für 0,5–60 min inkubiert (Tabelle 2.20).

Tabelle 2.20: Versuchsbedingungen der Komplexierungstests

Zielprotease	Komplexierungsansätze [Endkonzentrationen]
Cathepsin G	50 µL Zellkulturüberstand 1 µL Cathepsin G [0,3 µg/mL]
α-Chymotrypsin	50 µL Zellkulturüberstand 1 µL α-Chymotrypsin [200 nM]
human Faktor Xa (hFXa)	50 µL Zellkulturüberstand mit bzw. ohne 1 µL Heparin [50 U/mL] oder DS [400–2000 µg/mL] 3 min Inkubation bei 25 °C 1 µL hFXa [2–40 µg/mL]
Plasmin	50 µL Zellkulturüberstand 1 µL Plasmin [1 µg/mL]
α-Thrombin	50 µL Zellkulturüberstand mit bzw. ohne 1 µL Heparin [50 U/mL] oder DS [400–2000 µg/mL] 3 min Inkubation bei 25 °C 1 µL α-Thrombin [6 NIH Units/mL]
Trypsin	50 µL Zellkulturüberstand 1 µL Trypsin [1–20 µg/mL]

Um den Effekt der potenziellen Kofaktoren bzw. Ionen auf die Komplexierung zu untersuchen, wurden diese den Komplexierungsansätzen zugefügt. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend mittels Western-Blot analysiert. Als Negativkontrolle wurden die Überstände von nicht transfizierten bzw. mit Leervektor transfizierten COS-7-Zellen eingesetzt. Ausführliche Informationen über die verwendeten Proteasen sind in Tabelle 5.10 aufgelistet. Alle Proteasen wurden nach Herstellerangaben in sterilem dH₂O oder in geeignetem Puffer gelöst, aliquotiert und bei –20 °C gelagert.

Weil kommerzielle Dermatansulfatpräparationen Verunreinigungen mit Heparin enthalten, wurde das DS vor Verwendung mit Desaminierungslösung (240 mM Natriumnitrit, 10%ige Essigsäure (1,8 M) und 0,1 % (w/v) PEG 8000, frisch angesetzt) behandelt, damit Heparin inaktiviert wurde (Teien *et al.*, 1976; Tollefsen *et al.*, 1983). Dafür wurde DS (3 mg/mL) in der Desaminierungslösung bei RT und im Dunkeln für 2 h inkubiert. Anschließend wurde eine 6-stündige Dialyse bei 4 °C mit *Slide-A-Lyzer*[®] *Dialysis Cassettes* (MWCO 3,5 kDa, *Pierce*) gemäß Herstellerangaben gegen TS-PEG-Puffer (Tabelle 2.16) durchgeführt. Nach der Dialyse wurde das behandelte DS in den Komplexierungstests sowie zur Bestimmung kinetischer Parameter eingesetzt.

2.9.2 Bestimmung der Heparinbindungsfähigkeit der Serpine

Zur Bestimmung der relativen Affinitäten von Heparin-bindenden Serpinen für das immobilisierte GAG wurde die Heparin-Affinitätschromatographie verwendet. Die zur Elution der gebundenen Proteine benötigten Natriumchloridkonzentrationen gelten dabei als Maß für die relative Bindungsaffinität. In Tabelle 2.21 sind die verwendeten Puffer für die Bestimmung der Heparinbindungsfähigkeit aufgeführt. Dazu wurden dem Puffersystem verschiedene Ionen zugefügt, um deren Effekte auf die Bindungsaffinität der Proteine zu Heparin zu untersuchen.

Tabelle 2.21: Puffersystem für die Bestimmung der relativen Heparinbindungsfähigkeit

Puffer	Zusammensetzung
Puffer A	100 mM Tris, 10 mM Zitronensäure, pH 7,4
Puffer B	100 mM Tris, 10 mM Zitronensäure, 2 M NaCl, pH 7,4
Puffer C	100 mM Tris, 10 mM Zitronensäure, 3 M NaCl, pH 7,4

Zunächst wurde eine 1 mL HiTrap[™] Heparin HP-Sepharose-Säule der Firma *GE Healthcare* an die FPLC-Anlage angeschlossen und mit 10 cv Puffer A equilibriert. Anschließend wurden 6 mL Kulturüberstand von transient transfizierten COS-7-Zellen (Abschnitt 2.4.2.1)

mit 660 μL 10 \times Puffer A und 66 μL 100 mg/mL PEG 8000 versetzt und auf die Säule aufgetragen. Nach dem Waschen mit 10 cv Puffer A erfolgte die Elution von der Säule mit 25 cv linear bzw. stufenweise ansteigendem Natriumchloridgradienten (0–50 % Puffer B, entspricht 0–1 M NaCl). Die Eluate wurden fraktioniert gesammelt und mittels Western-Blot (Abschnitt 2.8.2) analysiert. Mit 10 cv Puffer C wurde die Säule regeneriert. Alle Schritte der Chromatographie wurden mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 1 mL/min durchgeführt.

2.9.3 Enzymkinetik

Durch die Stöchiometrie der Inhibierung (SI) und die Geschwindigkeit der Hemmreaktion wird die Effektivität, mit der Serpine ihre Zielprotease hemmen, angezeigt (Abschnitt 1.3.2). Das Verhältnis von Inhibierungs- zu Substratreaktion wird von dem SI-Wert beschrieben, der als die Anzahl von Inhibitormolekülen definiert ist, die benötigt werden, um ein Molekül der Zielprotease zu inhibieren. Die apparente Konstante zweiter Ordnung der Inhibierungsreaktion k_{inh} beschreibt die Geschwindigkeit der Hemmreaktion (Schechter und Plotnick, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden kinetischen Parameter für die Interaktion zwischen hLA und humanem α -Thrombin sowie zwischen Lfl_SpnV4_1 und hFXa untersucht.

Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Hemmreaktion mit α -Thrombin erfolgte mit dem gereinigten rekombinanten hLA aus HEK-293-EBNA-Zellen (Abschnitt 2.6). Diese Inhibierungsreaktionen wurden in Ab- und Anwesenheit von GAGs (Heparin, DS und Heparansulfat) vorgenommen. Als Puffersystem und Lösungsmittel für alle beteiligten Komponenten wurde Puffer TS-PEG (Tabelle 2.16) verwendet. Die Endkonzentrationen an aufgereinigtem hLA und von α -Thrombin im 100 μL -Komplexierungsansatz betragen 50 nM bzw. 5 nM, womit die Voraussetzung der Reaktionskinetik pseudo-erster Ordnung erfüllt wurde. Durch die Zugabe von α -Thrombin wurde die Komplexierungsreaktion initiiert und nach verschiedenen Zeitintervallen durch Zugabe des Substrates Chromozym TH (500 μL , 150 μM) der Firma Roche (Tabelle 5.11) gestoppt. Die Konzentration des verbleibenden α -Thrombins wurde durch dessen enzymatische Aktivität gegenüber Chromozym TH bei 405 nm mit dem *NanoPhotometer*TM P 300 der Firma Implen GmbH nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k_{inh} erfolgte durch die in Abschnitt 1.3.2 beschriebene Methodik.

Um den Effekt von GAGs auf die Reaktionskinetik der Hemmung von α -Thrombin durch hLA zu untersuchen, wurde die Geschwindigkeitskonstante k_{inh} bei verschiedenen Konzentrationen von GAGs in den Reaktionsansätzen, wie oben beschrieben, bestimmt. Der Einfluss von

GAGs auf die Kinetik der Reaktion bzw. der vermutliche Mechanismus der GAG-Aktivierung können anhand der Form der Kurve der Geschwindigkeitskonstanten als Funktion der GAG-Konzentration festgestellt werden (Abschnitt 1.3.4).

Die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung k_{inh} der Hemmung von hFXa durch Lfl_SpnV4_1 (Abschnitt 2.7) wurde mittels der *progress-curve*-Methode (Abschnitt 1.3.2) bestimmt. Die Aktivität des hFXa wurde mit dem Substrat S-2222TM (Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA) (Tabelle 5.11) gemäß Herstellerangabe bestimmt. Der Komplezierungsansatz (1 mL) enthielt Lfl_SpnV4_1 (0–300 nM) und hFXa (10 nM) sowie Substrat S-2222TM ($0,05-1 \times K_M$). Darüber hinaus enthielt der Reaktionsansatz gegebenenfalls noch Heparin (0–100 U/mL) und/oder Ca^{2+} (0–2,5 mM), um deren Effekte auf die Inhibition zu untersuchen.

Das Verfahren der SI-Bestimmung gleicht im wesentlichen den oben beschriebenen kinetischen Methoden. Zur Bestimmung der aktiven Enzymkonzentrationen wurden humanes α -Thrombin mit PPACK (H-D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketon) der Firma Bachem (Tabelle 5.11) und hFXa mit humanem ATIII der Firma Sigma-Aldrich (Tabelle 5.11) titriert, die ihre Zielproteasen in einem 1 : 1-Verhältnis hemmen. Thrombin bzw. hFXa wurden mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen ihres Inhibitors, PPACK bzw. ATIII, versetzt und bei 25 °C für 1 Stunde inkubiert. Die Restaktivität des Thrombins bzw. des hFXa wurde durch die enzymatische Aktivität gegenüber dem Substrat (Chromozym TH für α -Thrombin, S-2222TM für hFXa) und der Bildungsrate von p-Nitroanilin bestimmt. Die Restaktivität der Proteasen wurde anschließend gegen die Konzentrationen ihres Inhibitors aufgetragen. Die Konzentration der aktiven Protease, Thrombin bzw. hFXa, wurde aus dem Schnittpunkt einer linearen Regression an der Abszisse erhalten (Knight, 1995). Eine durch *active-site*-Titration bestimmte Konzentration an humanem α -Thrombin bzw. hFXa wurde mit verschiedenen Konzentrationen an hLA bzw. Lfl_SpnV4_1 bei 25 °C inkubiert. Der nicht-komplexierte Teil des Thrombins bzw. des hFXa wurde, wie oben beschrieben, detektiert und gegen das verwendete Inhibitor/Proteaseverhältnis aufgetragen. Der SI-Wert wurde durch Anpassung einer Geraden an die ersten linear abfallenden Funktionswerte aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse identifiziert.

2.10 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Art der Lichtmikroskopie, die auf dem physikalischen Effekt der Fluoreszenz basiert. Mit dieser Methode können Zellstrukturen, Proteine sowie Nukleinsäuren gezielt detektiert und dargestellt werden. Mithilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wurde die Interaktion zwischen Lfl_Ang II (Aminosäuresequenz: EEDYDERPYMQPF) und dem LfAGTR1 analysiert. Die Visualisierung der Zielproteine erfolgte durch Detektion der Fluoreszenz seiner Variante des grün-fluoreszierenden Proteins (eGFP) für LfAGTR1 und Tetramethylrhodamin (*TMR*) für Lfl_Ang II (*TMR-Lfl_Ang*). Dafür wurde LfAGTR1 am C-Terminus mit eGFP fusioniert (Abbildung 2.4) und in HEK-293-wt-Zellen stabil exprimiert (Abschnitt 2.4.2). Das Peptid Lfl_Ang II bei der chemischen Synthese mit *TMR* am N-Terminus markiert (Firma *GenScript*). Für die Präparation und die Mikroskopie wurden das *Lab-Tek® II Chambered #1.5 German Coverglass System* der Firma *Thermo Scientific* und das *Zeiss LSM780 Inverted Confocal Microscope* der Firma Carl Zeiss eingesetzt. Das Mikroskop besitzt einen 32-Kanal-GaAsP-Detektor mit einer typischen Quanteneffizienz von 45 %, welche bei den klassischen PMT-Detektoren typischerweise 25 % beträgt. Jeder Farbstoff kann bei diesem Mikroskop mit Lasern von 355 nm *True UV* bis 660 nm *Far Red* optimal angeregt werden.

Tabelle 2.22: Zusammensetzung des Inkubationspuffers der Fluoreszenzmikroskopie

Komponente	Konzentration
Hepes	25 mM
NaCl	140 mM
KCl	5 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,9 mM
	pH 7,6
BSA	0,1 % (w/v)
Glucose	0,01 % (w/v)

HEK-293-Zellen, die das Fusionsprotein LfAGTR1-eGFP stabil exprimierten, wurden 1–2 Tage vor dem Mikroskopieren im *Lab-Tek® II Chambered #1.5 German Coverglass System* ausgesät. Nach 15-minütiger Vorinkubation der Zellen bei 4 °C in 500 µL Inkubationspuffer (Tabelle 2.22), der auf dem *Earle's Puffer* basiert (Miserey-Lenkei *et al.*, 2001), wurden die Zellen mit 50 nM bzw. 100 nM Liganden (*TMR-Lfl_Ang*) bei 4 °C für 30 min weiter inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 0 bis 60 min bei 37 °C inkubiert,

zweimal mit eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen und mit Fixierlösung ($1 \times$ PBS mit 4 % Formaldehyd) bei RT für 60 min fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop nach Angaben des Herstellers mikroskopiert. Die eGFP-Fluoreszenz wurde in einem Wellenlängenbereich von 493 nm bis 554 nm nach Anregung mit dem Argon-Laser bei 488 nm detektiert, während die Detektion des TMR-markierten Peptids in einem Bereich von 566 nm bis 685 nm nach Anregung mit 561 nm erfolgte. Alle Bilder der Zellen wurden mit einer Auflösung von 1024×1024 Pixel unter Verwendung eines $63 \times$ Ölimmersionsobjektivs aufgenommen und mit dem Programm *Fiji* und *Adobe Illustrator CS6* bearbeitet und dargestellt.

2.11 Bioinformatische Methoden

2.11.1 DNA-Sequenz-Analyse

Die Analyse von Nukleinsäure-Sequenzdaten wurden mittels der *Online*-Plattform *Molecular Toolkit* durchgeführt. Restriktionsschnittstellen von DNA-Fragmenten und Plasmiden wurden mit dem *Online*-Programm *NEBcutter V2.0* (Vincze *et al.*, 2003) ermittelt. Die Software *Clone Manager ver. 8* der Firma *Scientific & Educational Software* wurde für die Herstellung schematischer Plasmidkarten und die Entwicklung der Klonierungsstrategien eingesetzt. Zur Abschätzung der Schmelztemperatur (T_m) der Primer wurden die *Online*-Programme *Oligo Analysis Tool* und *T_m Calculator* von *New England Biolabs* verwendet. Der Vergleich und die *Alignments* von DNA-Sequenzen wurden mit dem *Online*-Programm *ClustalW2* sowie *Clustal Omega* durchgeführt (Larkin *et al.*, 2007; Sievers *et al.*, 2011). Die Ergebnisse der *Alignments* sowohl der DNA-Sequenzen als auch der Aminosäuresequenzen wurden mithilfe der Software *GeneDoc* (Nicholas *et al.*, 1997) und der Software \LaTeX mit dem *TEXshade*-Paket (Beitz, 2000a) graphisch dargestellt, überprüft und gegebenenfalls optimiert.

2.11.2 Protein-Sequenz-Analyse

Zur Ermittlung der Molekülmasse und des pI-Werts eines Proteins auf der Basis seiner Aminosäuresequenz wurde das *Online*-Programm *Compute pI/Mw tool* verwendet (Gasteiger *et al.*, 2005). Die potentiellen posttranslationalen Modifikationen, wie z. B. die Sulfatierung und Glykosylierung, wurden mittels des *Online*-Servers *Sulfinator* (Monigatti *et al.*, 2002) und *NetNGlyc 1.0* (Blom *et al.*, 2004) sowie *NGlycPred* (Chuang *et al.*, 2012) vorhergesagt. Für die Ermittlung potentieller Signalpeptide auf der Basis der Aminosäuresequenz eines Proteins wurde der *SignalP 4.1 Server* (Petersen *et al.*, 2011) verwendet. Die

Software *MEGA6* (Tamura *et al.*, 2013) wurde für die phylogenetischen Analysen von Serpinen bzw. Angiotensin-II-Rezeptoren aus verschiedenen Organismen eingesetzt. Die zu analysierenden Aminosäuresequenzen wurden in dem integrierten *Alignment Explorer* mit der *Clustal*-Methode aligniert. Die phylogenetischen Stammbäume wurden nach dem *Neighbor-Joining*-Verfahren mit 1000 *Bootstrap*-Replikaten berechnet, konstruiert und graphisch dargestellt (Knoop und Müller, 2009; Hall, 2013). Die Sekundärstruktur des LfAGTR1-Proteins wurde mit dem *Online*-Programm *HMMTOP* vorhergesagt (Tusnády und Simon, 2001) und mit dem *T_EXtopo*-Paket (Beitz, 2000b) in *L^AT_EX* graphisch dargestellt und mit der Software *Adobe Illustrator CS6* bearbeitet und modifiziert.

2.11.3 Modellierung der Proteintertiärstruktur

Die Tertiärstruktur ist von entscheidender Bedeutung für die Funktion und Aktivität eines Proteins. Auf Basis der bekannten Strukturdaten, die in aufwendigen Experimenten durch Röntgenkristallstrukturanalyse bzw. mehrdimensionale NMR (*nuclear magnetic resonance*) ermittelt werden, kann die Struktur eines ähnlichen Proteins vorhergesagt und modelliert werden (Homologie-Modellierung). Dabei wird die Aminosäuresequenz des zu modellierenden Proteins mit den Primärstrukturen ähnlicher, bekannter Proteine verglichen. Die Tertiärstrukturen werden anschließend beruhend auf diesem Sequenzvergleich zugeordnet und abgeleitet. Im Gegensatz zur Homologie-Modellierung setzen die *ab-initio*-Verfahren, die lediglich auf der Anwendung fundamentaler physikalischer Gesetzmäßigkeiten beruhen, keinerlei Wissen über bekannte Tertiärstrukturen voraus. Diese Verfahren sind jedoch mit einem hohen Rechenaufwand verbunden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Tertiärstrukturen der untersuchten Proteine über den *I-TASSER*-Server (*iterative implementation of the threading assembly refinement*) mit der Standardeinstellung modelliert. *I-TASSER* ist eine Modellierungsmethode, die sowohl die Homologie-Modellierung als auch die *ab-initio*-Verfahren verwendet. Bei dieser Methode werden zunächst per *Threading* in der PDB-Datenbank (*Protein Data Bank*) geeignete lokale Tertiärstrukturen bekannter Proteinstrukturen als *templates* identifiziert. Die zu modellierende Struktur wird in Bereiche zerlegt. Die unalignierten Abschnitte werden mithilfe der *ab-initio*-Verfahren aufgefüllt (Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010).

Die modellierten Proteintertiärstrukturen werden anschließend mithilfe der Software *Swiss-PdbViewer 4.10* (Guex und Peitsch, 1997) visualisiert und bearbeitet.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Angiotensinogen aus *L. fluviatilis*

3.1.1 Bioinformatische Analyse des Angiotensinogens

Die cDNA-Sequenz des LA (Abschnitt 5.2.1) wurde im Rahmen einer vorhergehenden Arbeit unserer Arbeitsgruppe identifiziert (Ragg *et al.*, 2009). Das Serpin LA besteht aus einer singulären Polypeptidkette, die 478 Aminosäuren umfasst. Die Analyse der Aminosäuresequenz mit dem Programm *SignalP 4.1* (Abschnitt 2.11.2) zeigte, dass die 20 N-terminalen Aminosäuren (MKLFIVLLAFCAALCSPCVG) eventuell ein Signalpeptid bilden. Deswegen wurden die folgenden bioinformatischen Analysen bzw. die Modellierung der Tertiärstruktur nur mit den restlichen 458 Aminosäuren durchgeführt. Wegen fehlender Röntgenstrukturdaten wurde ein dreidimensionales Modell mittels des *I-TASSER*-Servers (Abschnitt 2.11.3) erstellt, um die Funktionen des Proteins besser zu verstehen. Das vorhergesagte Modell mit dem höchsten *score* (Tabelle 3.1) wurde ausgewählt und mit dem Programm *Swiss-PdbViewer v4.10* visualisiert und dargestellt (Abbildung 3.1). *C-score* ist ein Konfidenzwert für die Schätzung der Qualität der vorhergesagten Modelle von *I-TASSER* und liegt typischerweise im Bereich von -5 bis 2 . Je höher der Wert ist, desto vertrauenswürdiger ist das vorhergesagte Modell. *TM-score* und *RMSD* (*root-mean-square deviation*) sind bekannte Standards zur Messung und Auswertung der strukturellen Ähnlichkeit zwischen zwei Strukturen.

Tabelle 3.1: Die von *I-TASSER* geschätzte Genauigkeit des ausgewählten Modells

Name	C-score	Exp.TM-score	Exp.RMSD	No. of decoys	Cluster density
Modell 1	-0,79	$0,61 \pm 0,14$	$8,9 \pm 4,6$	3057	0,0957

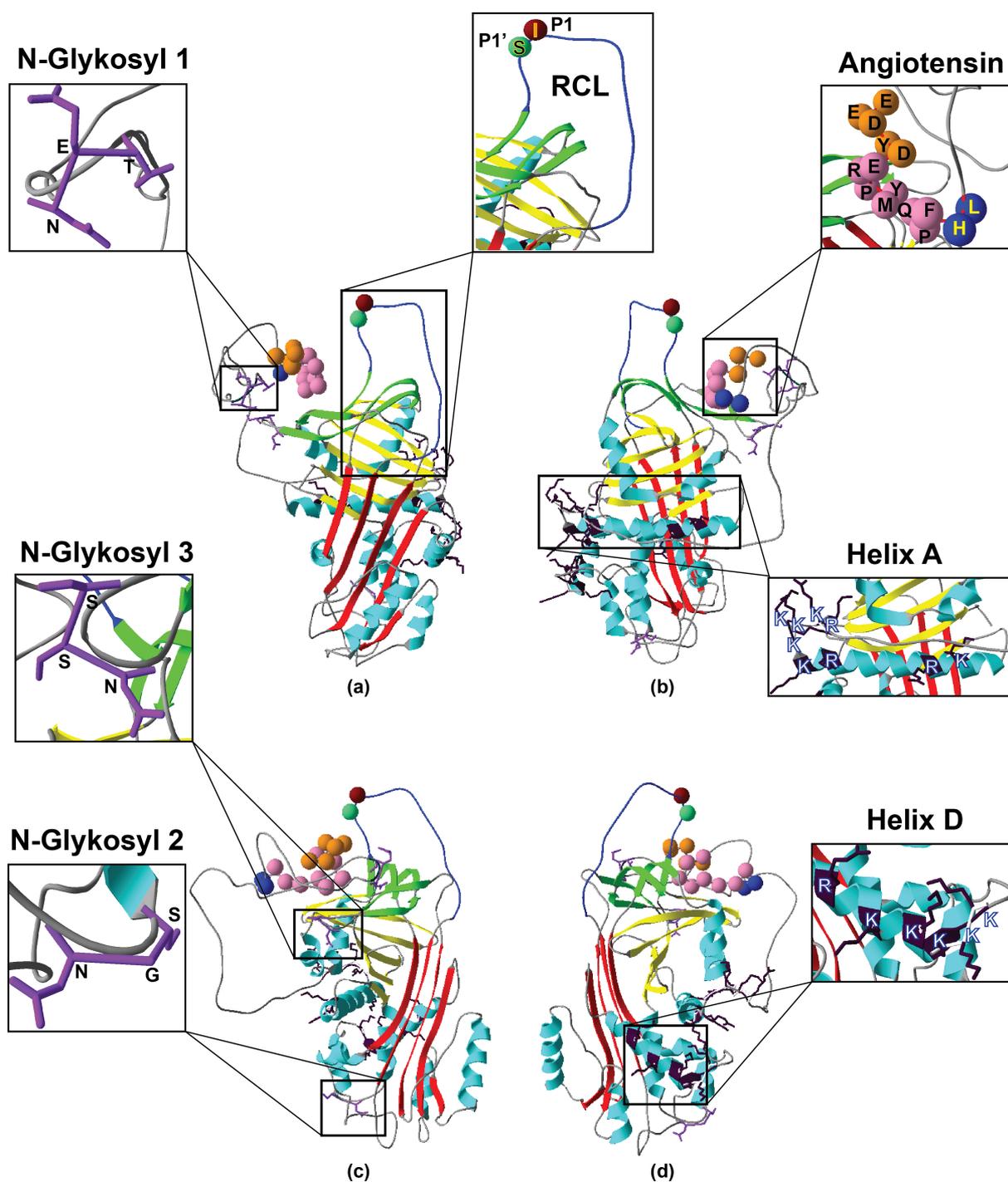


Abbildung 3.1: Modellierung des Angiotensinogens aus *L. fluviatilis*. (a): Serpin Standard-Vorderansicht; (b): Rückansicht; (c) und (d): Seitenansichten. Die α -Helices sind in türkis und die β -Faltblätter A, B, und C in rot, gelb und grün dargestellt. Der RCL ist als blaue Schleife, P1 bzw. P1' als braune bzw. grüne Kugel dargestellt. Die Aminosäuren des Angiotensin-Peptids (EEDYDERPYMQPFHL) sind ebenfalls als Kugeln dargestellt (rechts oben). Die basischen Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) in den Helices A und D sind in dunkellila, die drei potentiellen N-Glykosylierungsstellen (N-Glykosyl 1 bis 3) in helllila dargestellt.

Das Angiotensinogen-Modell zeigt die typische Konformation inhibitorischer Serpine (Abbildung 1.3) mit einem exponierten RCL (blaue Schleife in Abbildung 3.1). Inhibitorische Serpine besitzen im N-terminalen Bereich ihres RCLs eine konservierte Region (*hinge*-Region) mit kleinen Aminosäuren. Dies ermöglicht die Einlagerung des RCLs in das β -Faltblatt A des Serpins, die mit einer irreversiblen Hemmung der gebundenen Zielprotease einhergeht (Abbildung 1.7). Der Vergleich des RCLs (P15–P4') von LA und menschlicher Serpine (Abbildung 3.2) zeigt, dass das LA im Gegensatz zu humanem Angiotensinogen eine für inhibitorische Serpine typische *hinge*-Region aufweist.



Abbildung 3.2: Alignment der RCL-Sequenzen von LA und menschlichen Serpinen. Vergleich der (mutmaßlichen) Positionen P15–P4' von LA und humanen Serpinen, die mit Ausnahme von AGT (humanes Angiotensinogen) inhibitorisch sind. α_1 -AT: α_1 -Antitrypsin, α_1 -ACT: α_1 -Antichymotrypsin, PCI: Protein C-Inhibitor, ZPI: Protein-Z-abhängiger Protease-Inhibitor, ATIII: Antithrombin III, HCII: Heparinkofaktor II, PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1. Identische Aminosäuren sind in schwarz hervorgehoben.

Mit dem *Online*-Server *NetNGlyc 1.0* wurden drei potentielle N-Glykosylierungsstellen (links in Abbildung 3.1) vorhergesagt. Die Analyse der PDB-Dateien der *I-TASSER*-Modellierung mit dem *Online*-Server *NGlycPred* zeigte jedoch, dass die Aminosäure Asparagin (N) an der N-Glykosyl 3-Stelle eventuell nicht glykosyliert wird.

Das Angiotensin-Peptid liegt exponiert am N-Terminus des Proteins vor (rechts oben in Abbildung 3.1, mit der Sequenz EEDYDERPYMQPFHL), so dass es eventuell von Proteasen erkannt und abgespalten werden kann. Eine Prüfung mit dem *Online*-Programm *The Sulfinator* (Abschnitt 2.11.2) zeigte, dass das in saure Aminosäuren eingebettete Tyrosin (Y) des Angiotensin-Peptids sulfatiert werden könnte.

Die basischen Aminosäuren in den Helices A und D (Abbildungen 3.1 und 3.3), die für die Bindung an GAGs eine wichtige Rolle spielen können, befinden sich auf der Oberfläche des Moleküls. Darüber hinaus entspricht die Abfolge der basischen Aminosäuren den Konsensussequenzen „XBBXBX“ oder „XBBBXXBX“, die in vielen Heparin-bindenden

Proteinen auftritt, wobei „X“ eine hydrophobe Aminosäure bezeichnet und „B“ eine basische Aminosäure wie Lysin oder Arginin (Cardin und Weintraub, 1989). Sowohl die Analyse der Aminosäuresequenz als auch die Modellierung des Proteins unterstützen die Vermutung, dass LA im Gegensatz zum humanen Angiotensinogen an Heparin bzw. andere GAGs binden könnte.



Abbildung 3.3: Vergleich der Sequenzen der Helices A und D von Angiotensinogen, HCII und ATIII. Die basischen Aminosäuren (Arginin und Lysin) sind in schwarz hervorgehoben. Helix A und D beziehen sich auf die durch *I-TASSER* vorhergesagte Sekundärstruktur des LA. AGT: humanes Angiotensinogen (NP_000020), LfHCII: HCII aus *L. fluviatilis*; HCII: humaner HCII (X03498); ATIII: humanes ATIII (NP_000479).

3.1.2 Produktion von HA-LA und hLA in COS-7-Zellen

Für die Untersuchung der biochemischen Eigenschaften von LA wurden zwei Varianten des Proteins (HA-LA und hLA, Abschnitt 2.2.14.1) rekombinant in COS-7-Zellen hergestellt. Die native Flussneunaugen-Angiotensin II-Sequenz (EEDYDERPYMQPF) wurde bei der hLA-Variante zum humanen Angiotensin II mutiert. Bei der HA-LA-Variante ist anstelle des eigenen Signalpeptids das PDI-Signalpeptid und ein HA-tag vorhanden. Durch den Vergleich der Eigenschaften der beiden Varianten kann somit untersucht werden, ob der Angiotensinteil eine Rolle für die Aktivität des Neunaugen-Angiotensinogens, insbesondere bei der Hemmung von Proteasen sowie für die Bindung an GAGs, spielt. Mit den Plasmiden p288 und p298 (Abbildung 2.1) wurden zunächst transiente Transfektionen, wie in Abschnitt 2.4.2.1 beschrieben, durchgeführt. Die Zellüberstände und Extrakte (Abschnitt 2.4.3) wurden durch SDS-PAGE (Abschnitt 2.8.1) und Western-Blot (Abschnitt 2.8.2) analysiert, um festzustellen, ob die Proteine erfolgreich exprimiert und ins Medium sekretiert wurden.

In den Spuren 1 und 2 in Abbildung 3.4 wurden jeweils der Überstand und das Zellextrakt der mit dem Plasmid p288 bzw. p298 transfizierten Zellen aufgetragen. Zellüberstand bzw. Zellextrakt der Negativkontrolle wurden in Spur 3 bzw. 4 aufgetragen.

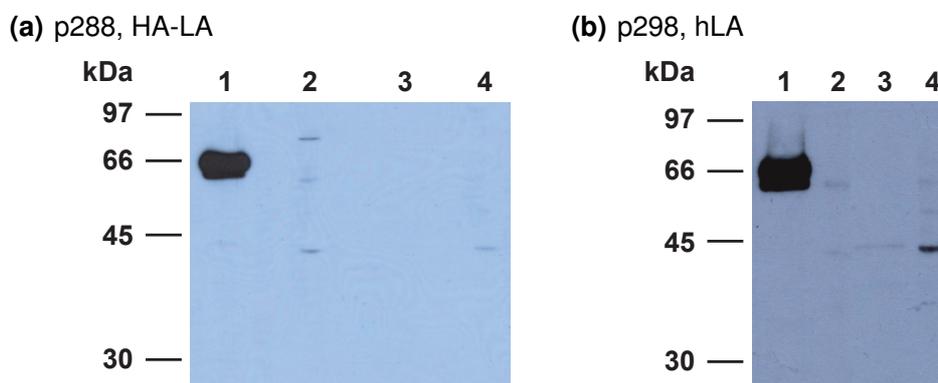


Abbildung 3.4: Western-Blot-Analyse von in COS-7-Zellen hergestellten Angiotensinogen-Varianten HA-LA (a) und hLA (b). Spur 1 und 2: Überstand und Zellextrakte der HA-LA bzw. hLA exprimierenden COS-7-Zellen; Spur 3 und 4: Überstand und Zellextrakte der Negativkontrolle. Die Belichtungszeit des Röntgenfilms betrug 30 s bzw. 1 min. Die Größen der Markerproteine (LMW-Marker) sind am linken Bildrand angegeben.

Das Ergebnis der Western-Blot-Analyse zeigt eindeutig, dass sowohl HA-LA als auch die hLA-Variante in den COS-7-Zellen rekombinant exprimiert und ins Medium sekretiert wurden. Die beiden nach kurzer Belichtung (nicht gezeigt) in den Spuren sichtbare Doppelbande (ca. 65 und 59 kDa) sind vermutlich durch unterschiedliche Glykosylierung bedingt. Die apparente Molekülmasse von HA-LA und hLA beträgt jeweils etwa 65 kDa, was von der berechneten Masse (51 bzw. 52 kDa) des Proteins aufgrund von posttranslationalen Modifikationen abweicht.

3.1.3 Heparinbindungsfähigkeit von Angiotensinogen aus *L. fluviatilis*

Aufgrund der Sequenzanalyse und Modellierung der Tertiärstruktur (Abschnitt 3.1.1) wurde vermutet, dass LA anders als humanes Angiotensinogen an GAGs binden könnte. Diese Hypothese sollte mit dem in Abschnitt 2.9.2 beschriebenen chromatographischen Verfahren überprüft werden. Ein Maß für die Affinität von Angiotensinogen an immobilisiertes Heparin ist die zur Elution benötigte Konzentration an Natriumchlorid. Hierzu wurde die NaCl-Konzentration stufenweise geändert. Die Eluatfraktionen wurden mittels Western-Blot (Abschnitt 2.8.2) untersucht. Um zu überprüfen, ob die Änderung der Angiotensin II-Sequenz bei der hLA-Variante Einfluss auf die Affinität zu Heparin hat, wurde die HA-LA-Variante mitgetestet. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse sind in Abbildung 3.5 dargestellt. Der

größte Anteil, sowohl von HA-LA als auch von hLA, war in den Fraktionen, die 500–700 mM NaCl enthalten, vorhanden. Die zur Elution des Neunaugen-Angiotensinogens benötigte NaCl-Konzentration ist deutlich höher als die zur Elution von humanem HCII erforderliche NaCl-Konzentration, die zwischen 180 mM und 260 mM liegt (Eckert, 2005).

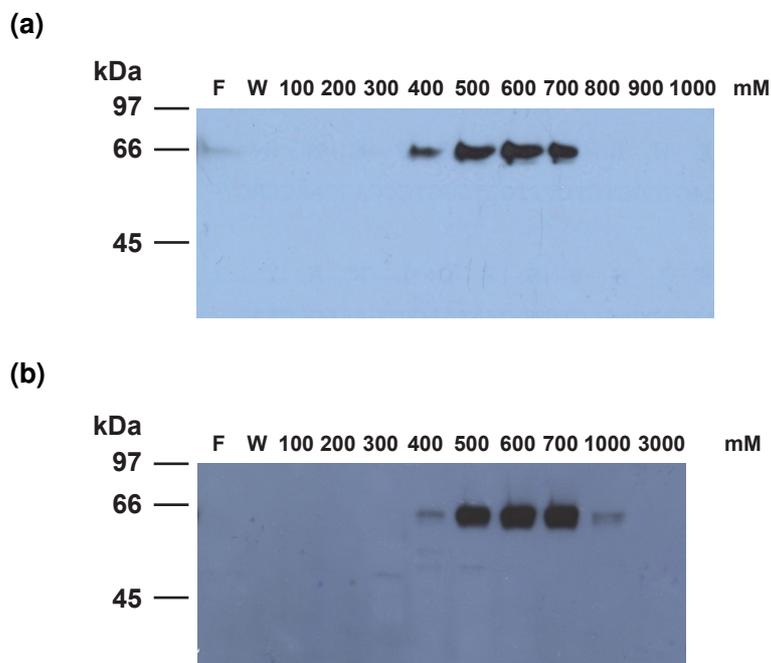


Abbildung 3.5: Western-Blot-Analyse der Heparin-Affinitätschromatographie von HA-LA (a) und hLA (b). Zellüberstände der HA-LA bzw. hLA exprimierenden COS-7-Zellen wurden auf eine HiTrap™ Heparin HP Sepharose-Säule aufgetragen. Durch eine stufenweise Erhöhung der NaCl-Konzentration wurden die Angiotensinogen-Varianten eluiert. Der Nachweis der Proteine in den Eluaten erfolgte im Western-Blot nach einer SDS-PAGE. F, Säulendurchlauf; W, kombinierte Wasch-Fraktionen. Die Belichtungszeit der Röntgenfilme betrug 20 s. Die Größen der Markerproteine (LMW-Marker) sind am linken Bildrand angegeben.

3.1.4 Nachweis der inhibitorischen Aktivität von Angiotensinogen aus *L. fluviatilis*

Nachdem es gelungen war, LA in einem Säugerzell-System zu produzieren, das normalerweise zur Bildung von Proteinen mit korrekter dreidimensionaler Struktur führt (Abschnitt 3.1.2), wurde die Interaktion des Proteins mit den humanen Serinproteasen α -Thrombin, FXa, Plasmin und Cathepsin G sowie Trypsin und α -Chymotrypsin aus Rinderpankreas untersucht. Dazu wurden Komplexierungsversuche mit HA-LA und hLA aus Kulturüberständen transient transfizierter COS-7-Zellen durchgeführt. Die Überstände wurden, wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben, mit den oben genannten Proteasen ohne Zusatz von Kofaktoren inkubiert und die Reaktionsprodukte im Western-Blot analysiert.

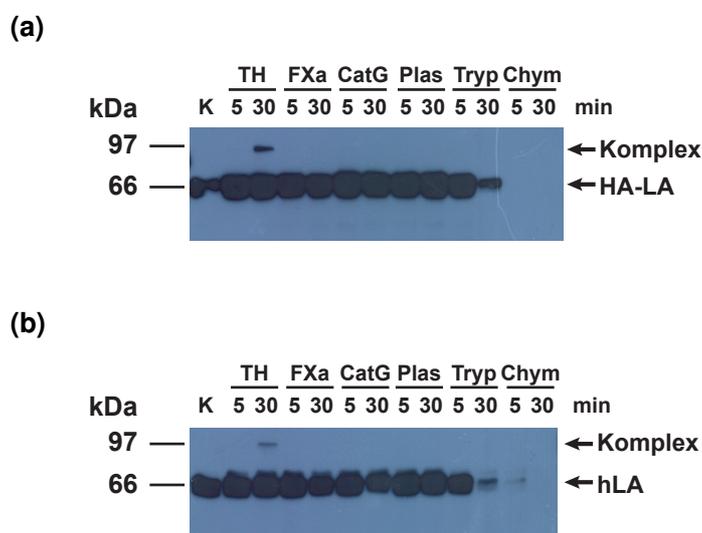


Abbildung 3.6: Western-Blot-Analyse der Komplexbildung von HA-LA (a) und hLA (b) mit verschiedenen Proteasen. TH, humanes α -Thrombin; FXa, humaner Faktor Xa (hFXa); CatG; Cathepsin G aus humanen Leukozyten; Plas, Plasmin aus humanem Plasma; Tryp, Trypsin und Chym, α -Chymotrypsin aus Rinderpankreas; K, Kontrolle ohne Zugabe von Protease. Die Reaktionen wurden jeweils bei 25 °C durchgeführt. Die Belichtungszeit der Röntgenfilme betrug 1 min. Die Größen der Markerproteine (LMW-Marker) sind am linken Bildrand angegeben.

Die Abbildung 3.6 zeigt, dass sowohl HA-LA als auch hLA einen SDS-stabilen Komplex mit humanem α -Thrombin, nicht jedoch mit hFXa, humanem Cathepsin G und Plasmin, bilden können. Trypsin und α -Chymotrypsin aus Rinderpankreas bewirkten einen Abbau der beiden Angiotensinogen-Varianten (Spur Tryp, 30 min; Spur Chym, 5 min und 30 min in Abbildung 3.6). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Angiotensinogen aus *L. fluviatilis* ein GAGs-bindendes Serpin ist, das auf α -Thrombin, jedoch nicht auf hFXa, Cathepsin G und Plasmin inhibitorisch wirkt. Weder der HA-tag noch das Angiotensin-Peptid spielen in diesem Test eine Rolle für die Heparin-Bindung und die Hemmung von α -Thrombin.

3.1.5 Einfluss von Glykosaminoglykanen auf die inhibitorische Aktivität des LA

Nachdem nachgewiesen wurde, dass LA an Heparin binden (Abschnitt 3.1.3) und mit humanem α -Thrombin einen SDS-stabilen Komplex bilden kann (Abschnitt 3.1.4), wurde untersucht, ob Heparin bzw. andere GAGs, wie z. B. DS, die Reaktion mit α -Thrombin beschleunigen können, wie bei der Hemmung von α -Thrombin durch HCII und ATIII zu beobachten ist. Dafür wurden die Komplexbildungsreaktionen, wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben, in Abwesenheit von GAGs oder in Gegenwart von 50 U/mL Heparin bzw. 2 mg/mL DS durchgeführt. Die Abbildung 3.7(a)–(c) zeigt, dass in Abwesenheit von GAGs eine schwache hLA-Thrombin-Komplex-Bande erst nach 10-minütiger Inkubation zu sehen

ist, während in Gegenwart von Heparin oder DS bereits nach 5-minütiger Inkubation deutlich Komplexbildung zu sehen ist. Die Intensität der Komplexbanden nimmt in Abwesenheit von GAGs bzw. in Gegenwart von DS mit der Inkubationszeit stark zu, während die Komplexbildung in Gegenwart von Heparin konstant bleibt. Diese Reaktion wurde daher mit kürzeren Inkubationszeiten weiter untersucht. Die Abbildung 3.7(d) zeigt, dass die Intensität der Komplexbanden bereits nach 1,5-minütiger Inkubation konstant bleibt. Heparin und DS beschleunigen demnach die Komplexbildungsreaktion zwischen hLA und humanem α -Thrombin, wobei der Effekt von Heparin wesentlich größer als der von DS ist.

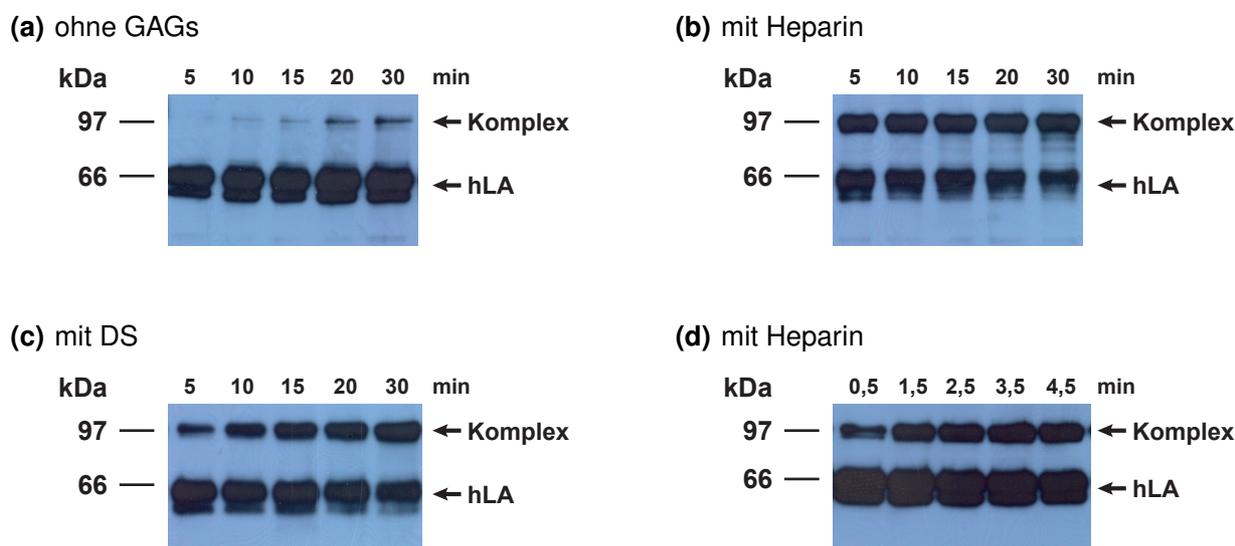


Abbildung 3.7: Western-Blot-Analyse der Komplexbildung zwischen hLA und humanem α -Thrombin. Überstände (20 μ L) von hLA exprimierenden COS-7-Zellen wurden mit humanem α -Thrombin (0,3 NIH Units) für die angegebene Zeit bei 25 °C in Abwesenheit von GAGs (a) oder in Gegenwart von 50 U/mL Heparin (b) bzw. 2 mg/mL DS (c) inkubiert. (d): Komplexbildungsreaktionen in Gegenwart von 50 U/mL Heparin wurden mit kürzerer Inkubationszeit durchgeführt. Die Belichtungszeit des Röntgenfilms betrug 2 min. Die Größen der Markerproteine (LMW-Marker) sind am linken Bildrand angegeben.

3.1.6 Stabile Expression von hLA in der HEK-293-EBNA-Zelllinie

Für weitere Analysen zur Funktion von LA war die Etablierung eines Systems notwendig, das eine Expression von hLA in biologisch aktiver Form und in ausreichender Menge gewährleisten konnte. Dafür wurden rekombinante HEK-293-EBNA-Zellen etabliert, die unter Selektionsdruck kontinuierlich hLA ins Medium sekretieren (Abschnitt 2.4.2.2). Unmittelbar nach dem Start der Selektion mit 400 μ g/mL Hygromycin B setzte ein massives Zellsterben ein. Nach einer Woche waren weniger als 1 % der Zellen der Ausgangspopulation noch adhären. Nach ca. vier Wochen wurden zwölf einzelne Klone identifiziert, vereinzelt und

weiterkultiviert. Zur Analyse des Expressionsniveaus wurden die zwölf Klone für vier Tage in serumfreiem DMEM-Medium kultiviert. Die Kulturüberstände (20 μ L) wurden im Western-Blot analysiert. Abbildung 3.8 zeigt, dass in den Überständen der Klone K1 bis K11 hLA nachweisbar ist. Das Expressionsniveau zwischen den verschiedenen Klonen schwankt deutlich. Lediglich Klon 12 stellte kein hLA her.

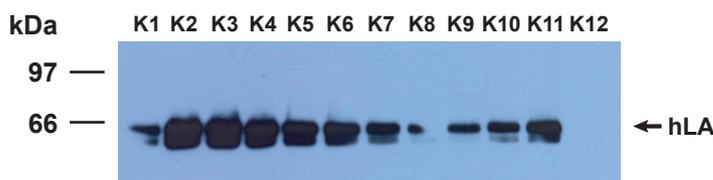


Abbildung 3.8: Analyse der hLA-Expression in verschiedenen HEK-293-EBNA-Klonen. Dargestellt sind Überstände der Klone p308-K1 bis p308-K12. Die Belichtungszeit des Röntgenfilms betrug 1 min. Die Größen der Markerproteine (LMW-Marker) sind am linken Bildrand angegeben.

Nachdem es gelungen war, hLA in den HEK-293-EBNA-Zellen stabil zu produzieren, wurde die biologische Aktivität des rekombinanten Proteins überprüft. Dafür wurden die Überstände, wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben, mit humanem α -Thrombin in Gegenwart von 50 U/mL Heparin bei 25 °C für 10 min inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden mittels Western-Blot analysiert.

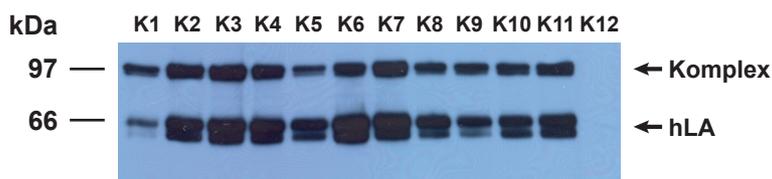


Abbildung 3.9: Analyse der Aktivität von hLA in verschiedenen HEK-293-EBNA-Klonen. Die Aktivität des produzierten hLAs (Abbildung 3.8) wurde durch eine 10-minütige Inkubation der Kulturüberstände bei 25 °C mit humanem α -Thrombin in Gegenwart von 50 U/mL Heparin getestet. Die Belichtungszeit des Röntgenfilms betrug 1 min. Die Größen der Markerproteine (LMW-Marker) sind am linken Bildrand angegeben.

Abbildung 3.9 zeigt, dass das rekombinante hLA aller hLA-exprimierender Klone Komplexe mit humanem α -Thrombin bildet. Die Klone K1 bis K11 wurden durch Kryokonservierung gesichert (Abschnitt 2.4.4). Erneutes Auftauen und Kultivieren einzelner Klone und nachfolgende Analysen der Expression und der biologischen Aktivität zeigten, dass der Einfrier- und Auftauprozess sich nicht negativ auf hLA-Expressionsniveau und -Aktivität auswirkt (nicht gezeigt). Zur Herstellung und Isolierung ausreichender Mengen von hLA wurde der Klon K4 ausgewählt und weiterkultiviert.

3.1.7 Isolierung und Reinigung von hLA aus Zellkulturüberständen

Um hLA in ausreichenden Mengen isolieren und aufreinigen zu können, wurde der Klon K4 zunächst in mehreren Kulturflaschen (175 cm²) mit Selektionsmedium (Tabelle 5.15) bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig dreimal mit 1 × PBS gewaschen und mit serumfreiem DMEM- Medium (20 mL je Kulturflasche) für 4 Tage im Brutschrank kultiviert. Die Kulturüberstände wurden nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 800 × g in neue Gefäße überführt und bei –20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Das rekombinante hLA wurde, wie in Abschnitt 2.6 beschrieben, aus den Zellkulturüberständen isoliert und aufgereinigt. Der Aufreinigungserfolg ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Doppelbanden in Spur 1 repräsentieren wahrscheinlich unterschiedlich glykosylierte Formen des Serpins. Die Konzentration des aufgereinigten Proteins wurde mit dem Bradford-Verfahren (Abschnitt 2.8.3) bestimmt. Aus einem Liter Zellkulturüberstand wurden durchschnittlich 255 µg rekombinantes hLA aufgereinigt.

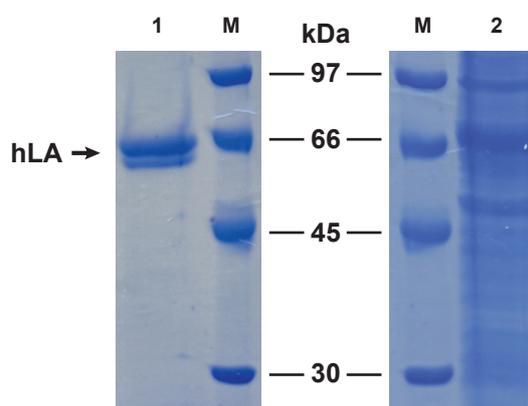


Abbildung 3.10: SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung von rekombinantem hLA. M: LMW-Marker; 1: Aufgereinigtes hLA; 2: Zellkulturüberstand. Es wurden 5 µL Marker und jeweils 40 µL Proben aufgetragen. Die Größen der Markerproteine sind in der Mitte angegeben. Die SDS-Polyacrylamid-Gele (10 %) wurden mit *PageBlue*TM Protein Staining Solution gefärbt.

3.1.8 Kinetische Parameter der hLA/Thrombin-Reaktion

In den vorherigen Abschnitten wurde die Hemmung von humanem α -Thrombin durch LA qualitativ charakterisiert (Abschnitte 3.1.4 und 3.1.5). Um quantitative Aussagen zu erhalten, wurde die apparente Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Inhibition (k_{inh}) in Gegenwart von Heparin, DS oder Heparansulfat bzw. ohne GAG-Zusatz, wie unter Abschnitt 2.9.3 beschrieben, bestimmt. Neben k_{inh} ist der SI-Wert (Stöchiometrie der Inhibierung) ebenfalls ein wichtiger Parameter für die Charakterisierung der Effektivität der Serpine. Niedrige SI-Werte und hohe Inhibitionskonstanten zeichnen Interaktionen von physiologischer Relevanz aus (Abschnitt 1.3.2).

Tabelle 3.2: Hemmung von α -Thrombin durch hLA

GAGs	Konzentration	k_{inh} [$M^{-1}\cdot min^{-1}$]
Ohne GAGs	–	$2,66 \pm 0,06 \times 10^4$
	0,01	$2,74 \pm 0,02 \times 10^4$
	0,1	$3,68 \pm 0,02 \times 10^5$
	1	$9,12 \pm 0,48 \times 10^6$
	4	$1,50 \pm 0,02 \times 10^7$
	6	$1,91 \pm 0,14 \times 10^7$
	8	$2,05 \pm 0,02 \times 10^7$
	10	$2,11 \pm 0,17 \times 10^7$
Heparin [U/mL]	20	$1,34 \pm 0,10 \times 10^7$
	50	$3,36 \pm 0,12 \times 10^6$
	100	$9,90 \pm 0,90 \times 10^5$
	50	$1,35 \pm 0,09 \times 10^5$
	100	$2,07 \pm 0,05 \times 10^5$
	250	$2,23 \pm 0,04 \times 10^5$
	500	$2,06 \pm 0,16 \times 10^5$
DS [$\mu g/mL$]	1000	$2,43 \pm 0,19 \times 10^5$
	2000	$2,72 \pm 0,30 \times 10^5$
	0,1	$1,83 \pm 0,20 \times 10^5$
	1	$3,58 \pm 0,48 \times 10^5$
	10	$1,39 \pm 0,21 \times 10^6$
Heparansulfat [$\mu g/mL$]	100	$9,44 \pm 0,50 \times 10^6$
	200	$5,85 \pm 0,32 \times 10^5$
	500	$3,20 \pm 0,27 \times 10^5$

Die Inhibitionskonstanten der Hemmung von α -Thrombin durch hLA in Abwesenheit und in Gegenwart von GAGs sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Für die Interaktion von hLA mit humanem α -Thrombin ohne GAG-Zusatz wurde eine Konstante von $2,66 \pm 0,06 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ermittelt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten in Gegenwart von GAGs wurden auf $2,11 \pm 0,17 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (mit 10 U/mL Heparin), $2,72 \pm 0,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (mit 2 mg/mL DS) bzw. $9,44 \pm 0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (mit 100 $\mu\text{g/mL}$ Heparansulfat) gestiegen. Die Erhöhung der Geschwindigkeit entspricht einem Faktor von ca. 810, 10 bzw. 360. Die Inhibitionskonstanten der Hemmung von humanem α -Thrombin durch hLA liegen im Bereich physiologisch relevanter Serpin/Protease-Interaktionen ($1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bis $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, nach Gettins, 2002).

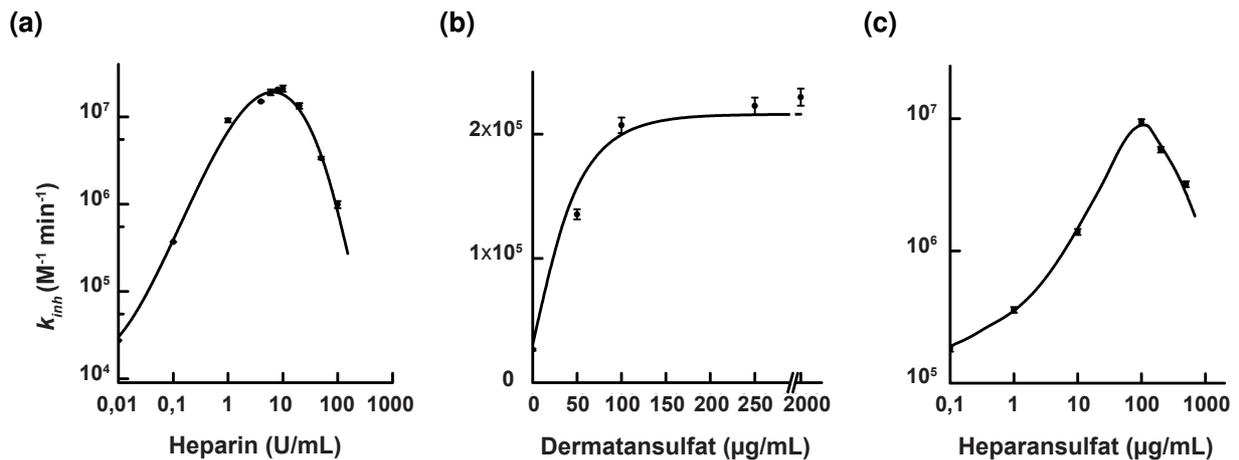


Abbildung 3.11: Abhängigkeit der Hemmung des humanen α -Thrombins durch hLA von der GAG-Konzentration. Die Geschwindigkeitskonstante k_{inh} ist gegen die Konzentration von Heparin (a), DS (b) bzw. Heparansulfat (c) aufgetragen.

Die Diagramme in Abbildung 3.11 zeigen die Inhibitionskonstanten in Abhängigkeit von der Konzentration der GAGs. In Gegenwart von Heparin bzw. Heparansulfat ist k_{inh} eine glockenförmige Funktion der GAG-Konzentration, was ein typisches Merkmal des Brücken-Mechanismus ist (Abschnitt 1.3.4). Mit zunehmender Konzentration von Heparin bzw. Heparansulfat steigt die Reaktionsgeschwindigkeit zunächst an. Die Kurve erreicht ein Maximum (Punkt der höchsten Aktivität) und fällt anschließend bei steigender Konzentration ab. In Gegenwart von DS wird eine sogenannte Sättigungskurve erhalten. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt mit zunehmender Konzentration von DS zunächst stark und danach immer langsamer an, bis sie sich asymptotisch einem Maximalwert nähert.

Zur Quantifizierung des relativen Verhältnisses von Hemm- zu Substratreaktion wurden die SI-Werte in Abwesenheit und in Gegenwart von Heparin und DS, wie in Abschnitt 2.9.3 beschrieben, bestimmt. In Abbildung 3.12 ist ein Beispiel für die Bestimmung der SI-Werte dargestellt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt und daraus die Durchschnittswerte ermittelt. Der SI-Wert für die Interaktion von hLA mit humanem α -Thrombin in Abwesenheit von GAGs beträgt 5,4. In Anwesenheit von 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DS liegt der Wert bei 2,8 und in Gegenwart von 10 U/mL Heparin bei 1,3 (Tabelle 3.3).

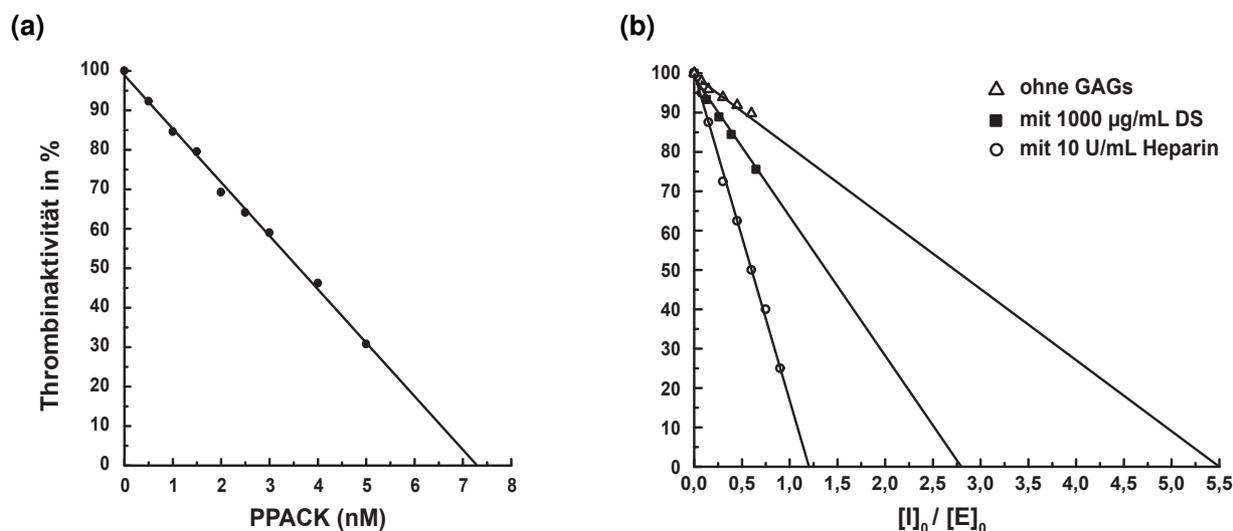


Abbildung 3.12: Beispiel für eine SI-Bestimmung. (a): Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration mittels der *active-site*-Titration mit PPACK; (b): Bestimmung der SI-Werte der Hemmung von humanem α -Thrombin durch hLA in Abwesenheit von GAGs (Δ), in Gegenwart von 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DS (\blacksquare) und mit 10 U/mL Heparin (\circ).

Tabelle 3.3: SI-Werte für die Interaktion von hLA mit humanem α -Thrombin

GAG	SI-Wert
ohne GAG	5,4
1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DS	2,8
10 U/mL Heparin	1,3

3.1.9 Tyrosin-Sulfatierung

Nach Wong und Takei besitzt Angiotensin II (Aminosäuresequenz „EEDYDERPYMQPF“) von japanischen Neunaugen (*Lethenteron japonicum*) vaskuläre Aktivität (Wong und Takei, 2011). Die Sequenz des Pentapeptids „EEDYD“ entspricht dem Konsensus-Signal für die Tyrosin-Sulfatierung (Huttner, 1987), die eine weitverbreitete posttranslationale

COS-7-Zellen wurden mit den beiden Konstrukten p397 und p398 mittels PEI transient transfiziert. Nach 3 Tagen wurden die Überstände im Western-Blot (Abschnitt 2.8.2) analysiert. Als Negativkontrolle diente der Überstand von COS-7-Zellen, die mit dem pcDNA3.1(+)-Leervektor transient transfiziert wurden. Wie der Kontroll-Western-Blot (Abbildung 3.13(a)) zeigt, werden die beiden Proteinvarianten von den COS-7-Zellen etwa gleich gut exprimiert. Eine Detektion mit dem Anti-Sulfo-Tyrosin-Antikörper (Abbildung 3.13(b)) zeigt jedoch deutliche Unterschiede. Bei p397 ist im Vergleich zu der mutierten Variante p398 eine viel stärkere Bande in Höhe des hLA-Proteins zu sehen. Damit wurde gezeigt, dass die Aminosäure Tyrosin im Kontext des 13 Aminosäuren langen Lfl_Ang II-Segments sulfatiert wurde.

3.2 Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor aus *L. fluviatilis* und seine Wechselwirkung mit Angiotensin

Eine Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor ähnliche DNA-Sequenz aus *L. fluviatilis* (LfAGTR1) wurde in einem Projekt unserer Arbeitsgruppe identifiziert (Abschnitt 5.2.5). Dieser Rezeptor besteht aus 352 Aminosäuren (Abbildung 3.14, Abschnitt 5.2.5) und ist etwa 94 % identisch zum Ortholog in *P. marinus*. Aufgrund der phylogenetischen Analyse wurde das Protein in die Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor (AGTR1)-Familie gruppiert (Abbildung 3.15).

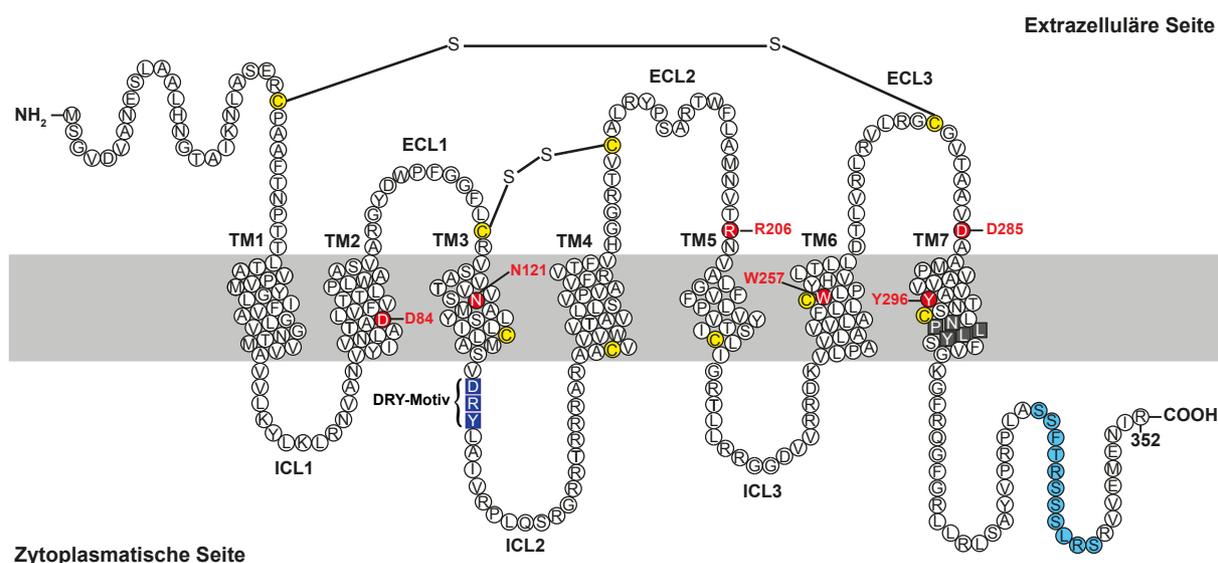


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung der vorhergesagten 2D-Struktur von LfAGTR1. Aminosäurereste, die aus dem humanen AGTR1 abgeleitet sind und an der Liganden-vermittelten Aktivierung und Signaltransduktion beteiligt sein könnten, sind in rot dargestellt. Die entsprechenden Aminosäuren im humanen AGTR1 sind D74, N111, K199, W253, D281 und Y292 (Abbildung 3.16). Die Cystein-Reste sind in gelb dargestellt. Das DRY-Motiv ist in weiß auf blauem Hintergrund hervorgehoben. Die Ser/Thr-reiche Sequenz am C-Terminus ist in türkis dargestellt. ECL1–3: Extrazelluläre Schleife (*extracellular loop*) 1–3; ICL1–3: Intrazelluläre Schleife (*intracellular loop*) 1–3; TM1–7: Transmembransegment 1–7.

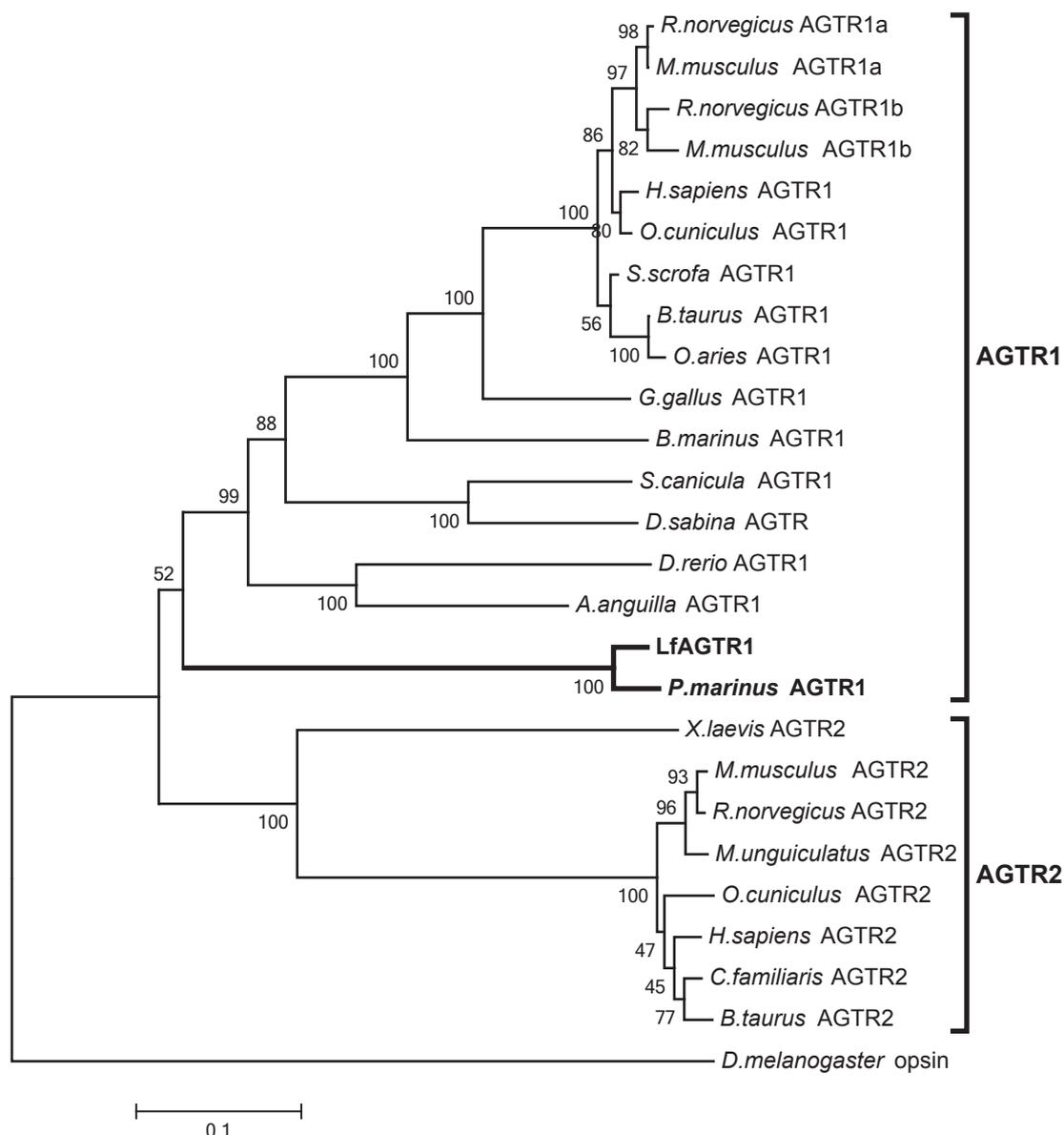


Abbildung 3.15: Phylogenetische Einordnung von LfAGTR1. Das Phylogramm wurde mit *MEGA6* erstellt. Als statistische Methode dient das *Neighbor-Joining*-Verfahren unter Nutzung von *p-distance* als Substitutionsmodell. Der Prozentsatz des Konfidenzintervalls von 1000 *Bootstrap*-Replikaten ist jeweils links vom zugehörigen Knoten angegeben. Die *GenBank*-Zugangsnummern der Proteinsequenzen sind in Tabelle 5.18 aufgelistet. Opsin aus *Drosophila melanogaster* dient hier als Außengruppe.

Sequenz-Alignments (Abbildung 3.16) zeigten, dass LfAGTR1 mehrere Motive enthält, die für die Funktionen von AGTR1 essenziell sind (Aplin *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2010), wie z. B. das DRY-Motiv, das für die G-Protein-Kopplung wichtig ist. Das Protein enthält außerdem eine Ser/Thr-reiche Sequenz am C-Terminus (Abbildung 3.14), die für die Internalisierung und Desensibilisierung des Membranproteins erforderlich ist. Darüber hinaus sind mehrere Aminosäuren in LfAGTR1 konserviert (Positionen D74, N111, W253, D281 und Y292) bzw. durch konservative Aminosäuresubstitution (Position 199) ersetzt

(Die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäuresequenz des menschlichen Rezeptors AGTR1 (NP_033611.1)), die eine wichtige Rolle bei der Bindung von Angiotensin II und der Liganden-vermittelten Aktivierung von Säugetier-AGTR1 spielen. Die Aminosäure an Position 292, die zur Unterscheidung zwischen AGTR1- und AGTR2-Sequenzen vorgeschlagen wird (Pulakat *et al.*, 2004), ist in LfAGTR1 mit Tyrosin (im Gegensatz zu Phenylalanin in AGTR2) besetzt. Dies stimmt mit dem Ergebnis der phylogenetischen Analyse (Gruppierung als AGTR1- Familienmitglied) überein.

Human_AGTR1	-----MILN S STED G IKR I QDD-CPK A GRHN----YIFV	29
Human_AGTR2	MKGNSTLATT S KNIT S GLHF G LVN I SGN N ESTLNC S OK P SDKH T D	45
LfAGTR1	--MSGVDVANE S LAALHNGTA I KN L ASER C PA A FTNP----TT L T	39
	74	
	↓	
Human_AGTR1	M I P T L Y S I I F V V G I F G N S L V V I V I Y F Y M K L K T V A S V F L L N L A L A D	74
Human_AGTR2	A I P I L Y Y I I F V I G F L V N I V V V T L F C C O K G P K K V S S T Y I F N L A V A D	90
LfAGTR1	A V P V M Y G L I F V A G L V G N T M V V A V V L K Y L K L R N V A N V Y I V N L A T A D	84
	111	
	↓	
Human_AGTR1	L C F L L T L P L W A V Y T A M E Y R W P F G N Y L C K I A S A S V S E N L Y A S V F L L	119
Human_AGTR2	L L L L A T L P L W A T Y Y S Y R Y D W L F G P V M C K V F G S F L T L N M F A S I F F I	135
LfAGTR1	L V F V T L L P L W A A S V A R G Y D W P F G G F L C R V S A T V V S V N M Y A S I L L L	129
	DRY-Motiv	
	⎵	
Human_AGTR1	T C L S I D R Y L A I V H P M K S R L R R T M L V A K V T C I I I W L L A G L A S L P A I	164
Human_AGTR2	T C M S V D R Y Q S V I Y P F L S Q -R R N P W Q A S Y I V P L V W C M A C L S S L P T F	179
LfAGTR1	A C M S V D R Y L A I V R P L Q S R G R R T R R R A R A A C V V V W V T A V L L S V P V A	174
	199	
	↓	
Human_AGTR1	I H R N V F F I E N T N I T V C A F H Y E S O N S-T L P I G L G L T K N I L G F L F P F	208
Human_AGTR2	Y F R D V R T I E Y L G V N A C I M A F P P E K Y A Q W S A G I A L M K N I L G F I I P L	224
LfAGTR1	V E R-V T E V H G G-R T V C A L R Y P S A R --T W F L A M N V T R N V A G F L V P F	215
	253	
	↓	
Human_AGTR1	L I I L T S Y T L I W K A L K K A Y E I O K N K P R N D D I F K I I M A I V L F F F S W	253
Human_AGTR2	I F I A T C Y F G I R K H L L K T N S Y G K N R I T R D Q V L K M A A V L A F I I C W	269
LfAGTR1	L V I V T C Y S L I G R T L L R R---G G D V V R R D K V L P A V L A V V L A F L L C W	257
	281	292
	↓	↓
Human_AGTR1	I P H O I F T F L D V L I Q L G I I R D C R I A D I V D T A M P I T I C I A Y F N N C L N	298
Human_AGTR2	L P F H V L T F L D A L A W M G V I N S C E V I A V I D L A L P F A I L L G T N S C V N	314
LfAGTR1	L P Y H V L T L L D T L V R L R V L R G C G V T A A V D A A M P V A V V V A Y T N S C L N	302
	343	359
Human_AGTR1	P L F Y G F L G K K F K R Y F L Q L L K Y I P P K A K S H S N L S T K M S T L S Y R P S D	343
Human_AGTR2	P E L Y C F V G N R F Q O K L R S V F R V P I T W L Q G K R E S M S C R K S S S L R E M E	359
LfAGTR1	P L L Y S F V G K G F R Q G F G R L L R L S A Y V P R P L A S S F T R S S S I R S R V V E	347
	Ser/Thr-reiche Sequenz	
	⎵	
Human_AGTR1	N V S S S T K K P A P C F E V E	359
Human_AGTR2	T F V S -----	363
LfAGTR1	M E N I R-----	352

Abbildung 3.16: Sequenz-Alignment von LfAGTR1, humanem AGTR1 und AGTR2. Das Alignment wurde mittels ClustalW2 durchgeführt. Die Datenbankeinträge von Human_AGTR1 bzw. Human_AGTR2 in NCBI sind unter NP_033611.1 bzw. NP_000677.2 zu finden.

Um zu überprüfen, ob die Ligandenbindung zu einer Aktivierung des Rezeptors führt, wurde eine stabile HEK293-Zelllinie etabliert, die mit dem Plasmid p408 (Abbildung 2.4) transfiziert worden war und das LfAGTR1-eGFP-Fusionsprotein stabil exprimiert (Abschnitt 2.4.2.2). Die Bindung von Lfl_Ang II wurde mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Abschnitt 2.10) analysiert. Abbildung 3.17 zeigt, dass das Fusionsprotein mit der Plasmamembran assoziiert ist (grüne Fluoreszenz). Die Zugabe von 50 nM Tetramethylrhodamin-markiertem Liganden (*TMR-Lfl_Ang*, *TMR-EEDYDERPYMQPF*) führt schnell zu einer Bindung des Liganden an die Zelloberfläche (rote Fluoreszenz). Die Inkubation von *TMR-Lfl_Ang* mit nicht transfizierten HEK293-Zellen zeigt keine Akkumulation von Liganden an der Membran (nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, dass die Bindung des Peptids *TMR-Lfl_Ang* an die Zellen auf der Interaktion mit dem Rezeptor (LfAGTR1-eGFP-Fusionsprotein) beruht. Nach der schnellen Bildung von Ligand-Rezeptor-*Clustern* an der Zelloberfläche erfolgt anschließend die Internalisierung des Liganden/Rezeptor-Komplexes. Innerhalb von 30 min bilden sich punktförmige intrazelluläre Strukturen, die sowohl *TMR*-markierten Liganden als auch den eGFP-markierten Rezeptor enthalten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Flussneunauge einen AGTR1-ähnlichen Rezeptor besitzt, der durch das Peptid Lfl_Ang II aktiviert wird.

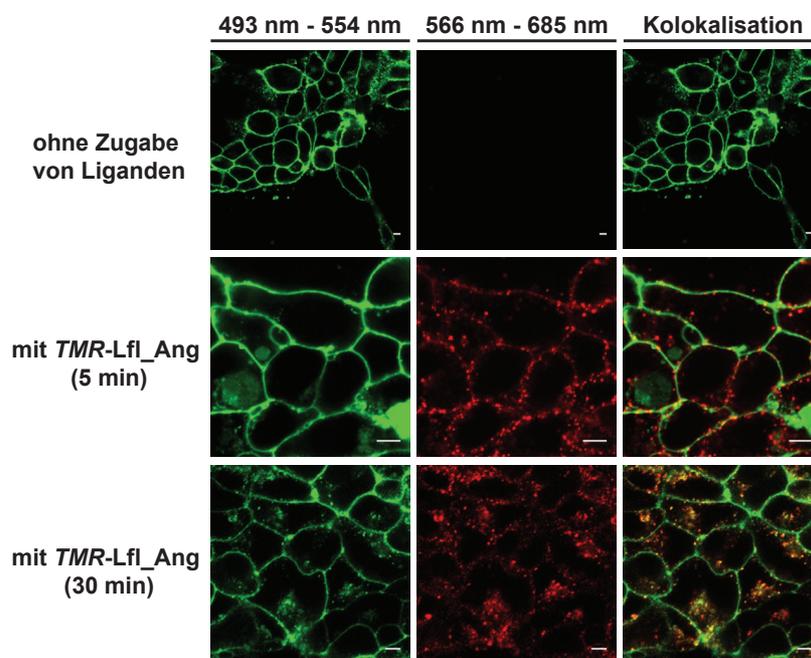


Abbildung 3.17: Internalisierung des eGFP-getaggten LfAGTR1. HEK293-Zellen, die das LfAGTR1-eGFP-Fusionsprotein stabil exprimieren, wurden mit 50 nM Tetramethylrhodamin-markiertem Lfl_Ang II (*TMR-Lfl_Ang*) bei 37 °C stimuliert. Die subzelluläre Verteilung des Rezeptors (grün) und des Liganden (rot) 5 bzw. 30 min nach Zugabe des Liganden sind hier dargestellt. Kurz nach der Stimulation (5 min) sind Rezeptor und Ligand in der Nähe der Plasmamembran und nach längerer Inkubationszeit (30 min) in punktförmigen zytoplasmatischen Strukturen kolokalisiert. Der Balken entspricht 5 µm.

3.3 Charakterisierung von HCII aus *L. fluviatilis* (LfHCII)

3.3.1 Produktion von rekombinantem HA-LfHCII in COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden mit dem Konstrukt p335 (Abbildung 2.5) mittels PEI transient transfiziert (Abschnitt 2.4.2.1). Zellüberstand und Zellextrakt (Abschnitt 2.4.3) wurden mittels Western-Blot (Abschnitt 2.8.2) analysiert. Als Negativkontrolle dienten der Überstand und das Extrakt von COS-7-Zellen, die mit dem Leervektor p290 (Abbildung 2.5) transient transfiziert wurden. In Abbildung 3.18 wird gezeigt, dass das HA-LfHCII rekombinant produziert und ins Medium sekretiert wurde.

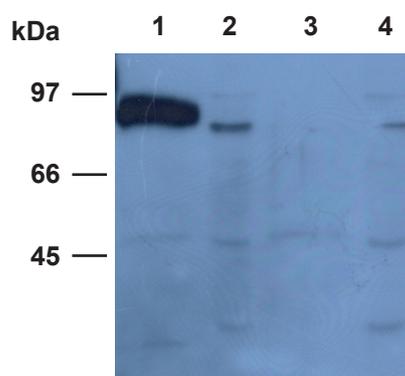


Abbildung 3.18: Western-Blot-Analyse von in COS-7-Zellen rekombinant hergestelltem HA-LfHCII. Spur 1 bzw. 2: Überstand bzw. Zellextrakt der mit dem Plasmid p335 transfizierten Zellen; Spur 3 bzw. 4: Überstand bzw. Zellextrakt der Negativkontrolle. Die Größen der Markerproteine (LMW-Marker) sind am linken Bildrand angegeben.

3.3.2 Bestimmung der Heparinbindungsfähigkeit von HA-LfHCII

Die Heparinaffinität von HA-LfHCII wurde im chromatographischen System, wie in Abschnitt 2.9.2 beschrieben, bestimmt. Die Elution erfolgte durch lineare Erhöhung der NaCl-Konzentration. Mittels Western-Blot (Abschnitt 2.8.2) wurde untersucht, in welchen Fraktionen die Konzentration von HA-LfHCII am höchsten war (Abbildung 3.19). Anhand der elektrischen Leitfähigkeit wurde die NaCl-Konzentration der entsprechenden Elutionsfraktion berechnet. Der größte Anteil an HA-LfHCII befand sich in den Fraktionen, die im Mittel ca. 310–400 mM NaCl enthielten. Die zur Elution von HA-LfHCII benötigte NaCl-Konzentration ist höher als die von humanem HCII, die zwischen 180 mM und 260 mM liegt (Eckert, 2005).

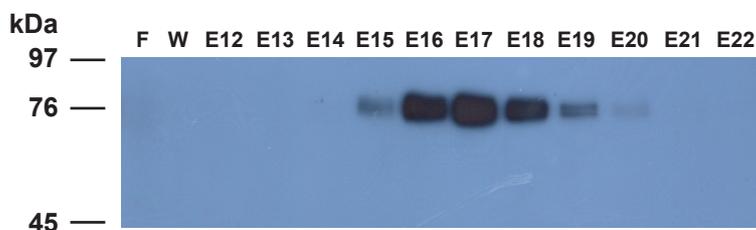


Abbildung 3.19: Western-Blot-Analyse der Heparin-Affinitätschromatographie von HA-LfHCII. Der Zellüberstand wurde auf eine HiTrap™ Heparin HP-Sepharose-Säule aufgetragen und durch lineare Erhöhung der NaCl-Konzentration (0–1000 mM) eluiert. Der Nachweis von HA-LfHCII erfolgte im Western-Blot nach SDS-PAGE. F: Säulendurchlauf, W: kombinierte Wasch-Fraktionen, E12 bis E22: Fraktionen 12 bis 22 der Elution. Laut Leitfähigkeitsmessung betrug die NaCl-Konzentration in den Fraktionen E16 bis E18 ca. 310–400 mM. Die Belichtungszeit des Röntgenfilms betrug 1 min. Die Größen der Markerproteine (LMW-Marker) sind am linken Bildrand angegeben.

3.3.3 Hemmung von α -Thrombin durch HA-LfHCII

Die Reaktion zwischen HA-LfHCII und den humanen Serinproteasen α -Thrombin, FXa, Plasmin sowie Cathepsin G und α -Chymotrypsin aus Rinderpankreas wurde mittels Komplexierungstests (Abschnitt 2.9.1) untersucht. Das Ergebnis zeigt, dass von den getesteten Proteasen HA-LfHCII nur mit humanem α -Thrombin einen SDS-stabilen Komplex bildet (nicht gezeigt).

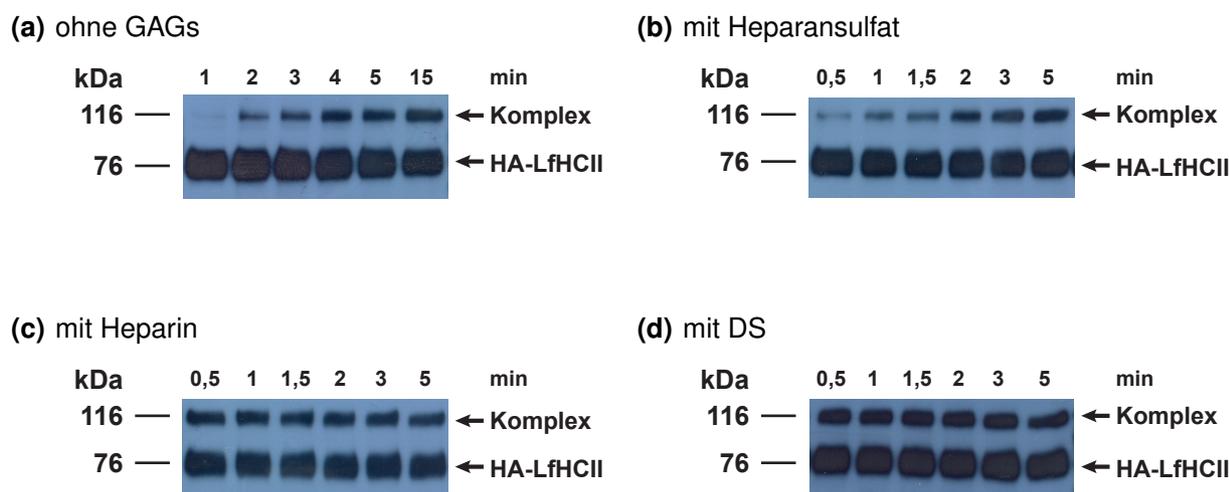


Abbildung 3.20: Western-Blot-Analyse der Komplexierungstests von HA-LfHCII mit humanem α -Thrombin. Der Überstand (20 μ L) einer HA-LfHCII exprimierenden COS-7-Zellkultur wurde mit humanem α -Thrombin (12 NIH-Units/mL) für die angegebene Zeit bei 25 °C in Abwesenheit (a) oder in Gegenwart von 50 μ g/mL Heparansulfat (b) oder 50 U/mL Heparin (c) bzw. 400 μ g/mL DS (d) inkubiert. Die Belichtungszeit der Röntgenfilme betrug 1 min. Die Größen der Markerproteine (LMW-Marker) sind am linken Bildrand angegeben.

Um die Hemmung von humanem α -Thrombin durch HA-LfHCII qualitativ bzw. semi-quantitativ zu charakterisieren, wurde der Zellkulturüberstand transfizierter COS-7-Zellen

(Abschnitt 3.3.1), wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben, in Abwesenheit und in Gegenwart von 50 µg/mL Heparansulfat oder 50 U/mL Heparin bzw. 400 µg/mL DS mit humanem α -Thrombin (12 NIH-Units/mL) inkubiert. Nach definierten Inkubationszeiten wurden Proben entnommen und mittels Western-Blot analysiert. Abbildung 3.20(a) zeigt, dass HA-LfHCII in Abwesenheit von Kofaktoren unter Bildung SDS-stabiler Komplexe mit humanem α -Thrombin reagiert. Sowohl Heparin (Abbildung 3.20(c)) als auch DS (Abbildung 3.20(d)) beschleunigen die Reaktion. Heparansulfat (Abbildung 3.20(b)) kann die Komplexbildung ebenfalls stimulieren, ist jedoch weniger effektiv als Heparin und DS.

3.4 Charakterisierung der Serpine Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2

Zwei weitere Serpine aus *L. fluviatilis*, Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2, wurden untersucht und charakterisiert. Die Lfl_SpnV4_1-cDNA-Sequenz wurde in einer vorhergehenden Arbeit unserer Arbeitsgruppe bereits identifiziert (Ragg *et al.*, 2009). Mit den Primern SpnV4_2_ATG_HindIII+ und SpnV4_2_BamHI- (Tabelle 5.4), die ursprünglich aus der orthologen Sequenz in Meerneunaugen (Zugangsnummer AAC63406.1) und in japanischen Neunaugen (Zugangsnummer: DC614530 und DC612502) abgeleitet wurden, wurde die cDNA-Sequenz des Lfl_SpnV4_2 aus *L. fluviatilis* isoliert. Die cDNA- sowie Aminosäure-Sequenzen dieser beiden Serpine aus Flussneunaugen liegen in der NCBI-Datenbank mit der Zugangsnummer CAX18777.1 bzw. AIE16053.1 vor und sind in Abschnitt 5.2.3 und 5.2.4 aufgeführt.

Durch Vergleich mit der genomischen DNA-Sequenz des Meerneunauges in der *Ensembl*-Datenbank (Pmarinus_7.0) wurde gezeigt, dass die beiden Serpine aus Flussneunaugen die charakteristische Genstruktur der Gruppe V4-Serpine (Abbildung 1.8) aufweisen. Eine phylogenetische Analyse (Abbildung 3.21) mit dem Programm *MEGA6* (die verwendeten Parameter der Analyse sind der Beschriftung der Abbildungen zu entnehmen) hat gezeigt, dass die beiden Flussneunaugen-Serpine eindeutig zur Klasse SERPINF gruppiert werden können, deren Mitglieder nach der Klassifikation von Ragg *et al.* (2001) zur Gruppe V4 gehören (Tabelle 1.1). Das Ergebnis der phylogenetischen Analyse stimmt mit der Genstruktur-Analyse überein.

Die phylogenetische Analyse (Abbildung 3.21) und die Analysen über *blast* (nicht gezeigt) deuteten noch auf die Zugehörigkeit der beiden Flussneunaugen-Serpine zu der Gruppe der PEDF-Sequenzen (SERPINF1, nicht-inhibitorische Serpine) hin. Ein Vergleich der RCL-Sequenzen mit humanen Serpinen (Abbildung 3.22) zeigte jedoch, dass die beiden Serpine aus Flussneunaugen jeweils eine *hinge*-Region besitzen, die für inhibitorische Serpine typisch ist. An der mutmaßlichen P1-Position weist Lfl_SpnV4_1 Arginin (R) auf, ähnlich wie in PCI, ATIII, PAI-1, α_2 -AP und C1-Inh. Lfl_SpnV4_2 besitzt an der mutmaßlichen P1-Position Methionin (M) wie α_1 -AT. Da die Position P1 maßgeblich die Proteasespezifität eines Serpins beeinflusst, ist es interessant zu überprüfen, ob die beiden Serpine inhibitorische Aktivität besitzen und welche Protease ihr Zielenzym ist.

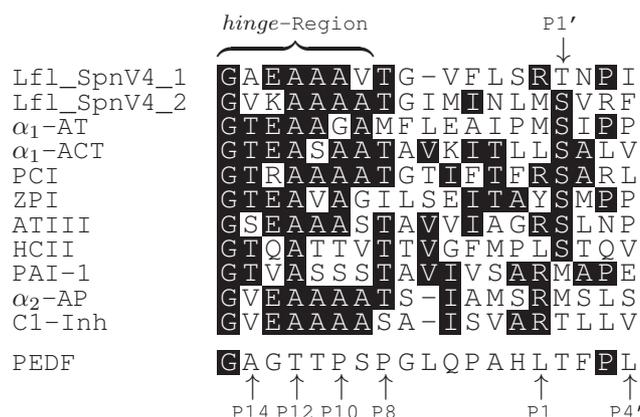


Abbildung 3.22: Alignment der RCLs von Lfl_SpnV4_1, Lfl_SpnV4_2 und humanen Serpinen. Vergleich der (mutmaßlichen) Positionen P15–P4' von Lfl_SpnV4_1, Lfl_SpnV4_2 und humanen Serpinen, die mit Ausnahme von PEDF inhibitorisch sind.

3.4.1 Herstellung von Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2 in COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden transient mit den beiden Konstrukten p355 und p349 (Abbildung 2.6) sowie Plasmid p287 (Abbildung 2.1) als Negativkontrolle transfiziert. Die Zellüberstände und -extrakte (Abschnitt 2.4.3) wurden anschließend im Western-Blot analysiert und in Abbildung 3.23 dargestellt. Die in dem Western-Blot ermittelte apparente Molekülmasse der beiden Proteine (ca. 70 kDa bzw. 55 kDa) weicht auf Grund posttranslationaler Modifikationen von der berechneten Molekülmasse (jeweils ca. 49 kDa) der beiden Serpine ab.

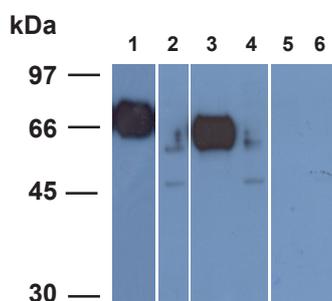


Abbildung 3.23: Western-Blot-Analyse von in COS-7-Zellen hergestelltem Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2. Spur 1, 3 und 5: Überstand der mit dem Plasmid p355 (Lfl_SpnV4_1), p349 (Lfl_SpnV4_2) bzw. mit dem Leervektor p287 (Negativkontrolle) transfizierten Zellen; Spur 2, 4 und 6: Zellextrakte der mit dem Plasmid p355, p349 bzw. p287 transfizierten Zellen. Die beiden Proteine (Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2) enthielten am N-Terminus jeweils einen HA-tag, der zur Detektion im Western-Blot genutzt wurde. Die Belichtungszeit der Röntgenfilme betrug 30 sec. Die Größen der Markerproteine (LMW-Marker) sind am linken Bildrand angegeben.

3.4.2 Inhibitorische Aktivität von Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2

Nachdem es gelungen war, Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2 in COS-7-Zellen rekombinant herzustellen (Abschnitt 3.4.1), wurden ihre möglichen Interaktionen mit den humanen Serinproteasen α -Thrombin, FXa, Plasmin und Cathepsin G sowie Trypsin und α -Chymotrypsin aus Rinderpankreas mittels Komplexierungstests (Abschnitt 2.9.1) untersucht. Die Reaktionsprodukte wurden jeweils mittels Western-Blot analysiert.

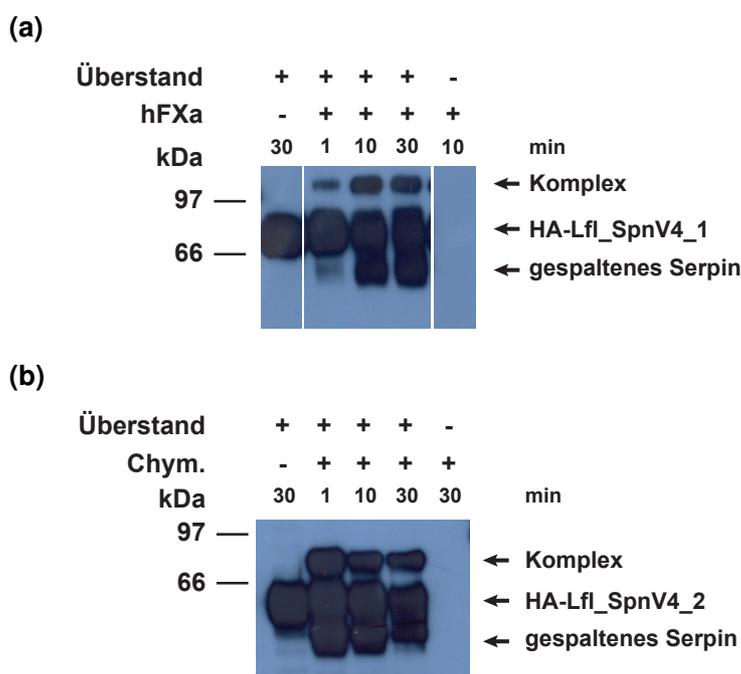


Abbildung 3.24: Western-Blot-Analyse der Komplexierungstest von HA-Lfl_SpnV4_1 (a) und -Lfl_SpnV4_2 (b). Chym.: α -Chymotrypsin aus Rinderpankreas. Die Ansätze wurden für die oben angegebene Zeit bei 25 °C inkubiert. Die Belichtungszeit der Röntgenfilme betrug 2 min. Die Größen der Markerproteine (LMW-Marker) sind am linken Bildrand angegeben.

Die Molekülmasse von hFXa beträgt ca. 46 kDa (Di Scipio *et al.*, 1977) und von α -Chymotrypsin aus Rinderpankreas ca. 25 kDa (Herstellerangabe). Die Lfl_SpnV4_1/hFXa- und Lfl_SpnV4_2/ α -Chymotrypsin-Komplexe waren als Banden bei ca. 115 kDa bzw. 80 kDa zu erkennen (Abbildung 3.24), was etwa der Summe der Molekülmassen von den beiden Serpinen und ihren Proteasen entspricht. Mit humanem α -Thrombin, Plasmin und Cathepsin G konnte weder Lfl_SpnV4_1 noch Lfl_SpnV4_2 unter den getesteten Bedingungen (Abschnitt 2.9.1) SDS-stabile Komplexe bilden. Bei der Komplexierung von Trypsin aus Rinderpankreas mit Lfl_SpnV4_1 bzw. Lfl_SpnV4_2 war nach 1-minütiger Inkubation bei 25 °C jeweils eine schwache Komplexbande erkennbar. Nach längerer Inkubation (5 min) waren die Komplexbanden nicht mehr zu sehen und auch die Serpine Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2 selbst waren degradiert (nicht gezeigt).

3.4.3 Herstellung von biologisch aktivem Lfl_SpnV4_1 in *E. coli*

Als Inhibitor des wichtigen Blutgerinnungsfaktors Xa wurde das Serpin Lfl_SpnV4_1 weiter untersucht. Für die quantitative Analyse wurde der Inhibitor in *E. coli*, wie in den Abschnitten 2.3.4 und 2.7 beschrieben, rekombinant hergestellt, renaturiert und aufgereinigt. Dazu wurde *E. coli* BL21(DE3) mit dem Expressionsvektor p403 (Abbildung 2.7) transformiert und kultiviert. Die Kultur wurde mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.8.1) analysiert. Das Produkt lag als IBs vor (Spur 4–6 in Abbildung 3.25).

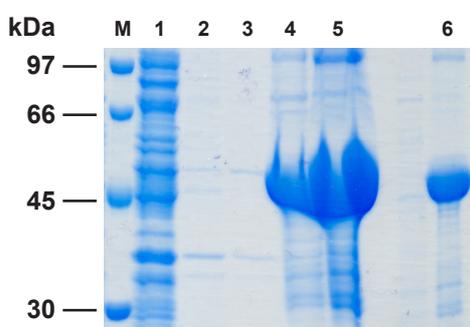
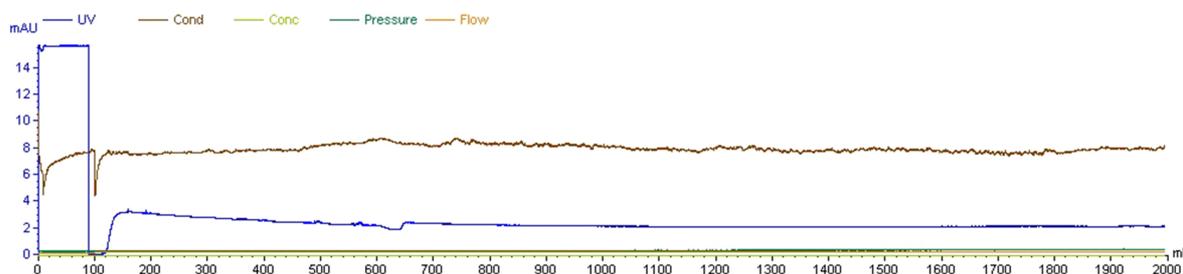


Abbildung 3.25: SDS-PAGE-Analyse der Expression von Lfl_SpnV4_1 in *E. coli* BL21(DE3). Spur 1: 20 µL Überstand des Zelllysats nach Zellaufschluss und Zentrifugation; Spur 2: 20 µL Überstand des ersten Waschens; Spur 3: 20 µL Überstand des zweiten Waschens; Spur 4: 20 µL in 6 M Harnstoff gelöste IBs; Spur 5: 20 µL in 8 M Harnstoff gelöste und entfaltete IBs; Spur 6: 2 µL in 8 M Harnstoff gelöste IBs; M: Proteinmarker (LMW). Die Größen der Markerproteine sind am linken Bildrand angegeben.

Das in 8 M Harnstoff gelöste Protein wurde anschließend, wie in Abschnitt 2.7 beschrieben, rückgefaltet und gereinigt. Der Reinigungsprozess mittels IMAC-Chromatographie ist in Abbildung 3.26 beispielhaft dargestellt. Fraktionen der Chromatographie wurden mittels

SDS-PAGE analysiert. Die Abbildung 3.27 zeigt, dass das in *E. coli* rekombinant hergestellte Serpin erfolgreich aufgereinigt wurde. Die Probe in Spur 5 von Abbildung 3.27 stammt aus der zweiten Elutionsfraktion (110–120 mL in Abbildung 3.26(b)), wo ein Peak des Proteins erscheint.

(a)



(b)

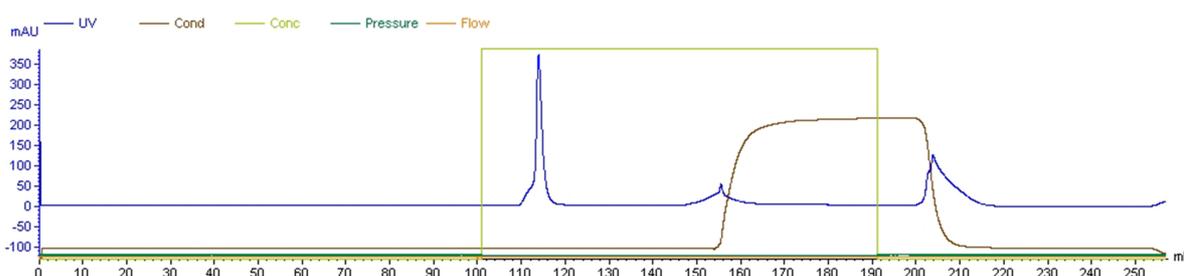


Abbildung 3.26: Reinigung von Lfl_SpnV4_1 mittels IMAC-Chromatographie. (a): Auftragung der rückgefalteten Proteine auf die Ni²⁺-geladene IMAC-Sepharose-Säule (Säulenvolumen (cv): 10 mL); (b): Die Säule wurde mit 10 cv Waschpuffer (0–100 mL) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 4 cv Elutionspuffer (100–140 mL). Anschließend wurde die Säule mit 5 cv 1 M NaOH (140–190 mL) und 5 cv dH₂O (190–240 mL) regeneriert. Zum Schluss wurde die Säule mit 1,5 cv 20%igem Ethanol gewaschen (240–255 mL).

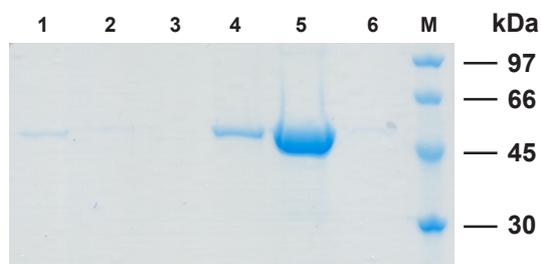


Abbildung 3.27: SDS-PAGE-Analyse der Rückfaltung und Aufreinigung von Lfl_SpnV4_1. Spur 1: Ausgangsmaterial (in Harnstoff gelöstes Protein nach Rückfaltung, Zentrifugation und Filtration, wie in Abschnitt 2.7 beschrieben) vor der Auftragung auf die IMAC-Säule; Spur 2: Säulendurchlauf; Spur 3: kombinierte Wasch-Fractionen; Spur 4–6: erste bis dritte Fraktion der Elution (1 cv pro Fraktion, 100–130 mL in Abbildung 3.26(b)); M: Proteinmarker (LMW). Die Größen der Markerproteine sind am rechten Bildrand angegeben.

Die Konzentration des aufgereinigten Proteins wurde mittels des Bradford-Verfahren (Abschnitt 2.8.3) gemessen. Aus 250 mL *E. coli*-Kultur wurden durchschnittlich ca. 5 mg rückgefaltetes und gereinigtes Lfl_SpnV4_1 gewonnen. Um zu überprüfen, ob das gereinigte Serpin biologisch aktiv war, wurde ein Komplexierungstest mit hFXa durchgeführt und mittels Western-Blot analysiert. Das in Abbildung 3.28 dargestellte Ergebnis zeigt, dass das gereinigte Lfl_SpnV4_1 biologische Aktivität besitzt.

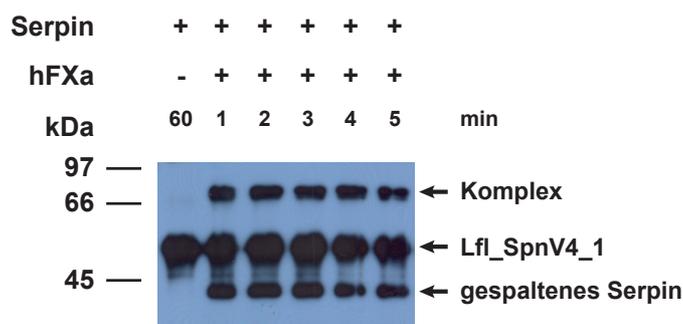


Abbildung 3.28: Überprüfung der biologischen Aktivität des rückgefalteten und gereinigten Lfl_SpnV4_1. Die Ansätze wurden für die oben angegebene Zeit bei 25 °C inkubiert. Die Belichtungszeit des Röntgenfilms betrug 20 sec. Die Größen der Markerproteine (LMW-Marker) sind am linken Bildrand angegeben.

3.4.4 Kinetische Analyse der Hemmung von hFXa durch Lfl_SpnV4_1

Um die Hemmung des hFXa durch Lfl_SpnV4_1 quantitativ zu charakterisieren, wurden die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Inhibition (k_{inh}) und der SI-Wert durch kinetische Messungen (Abschnitt 2.9.3) bestimmt. Die in Abbildung 3.24(a) und Abbildung 3.28 dargestellten Ergebnisse hatten bereits ergeben, dass Lfl_SpnV4_1 SDS-stabile Komplexe mit hFXa bildet, wobei Teile des Serpins auch als Substrat dienen. Um das relative Verhältnis von Inhibierungs- zu Substratreaktion zu quantifizieren, wurde der SI-Wert für die Interaktion bestimmt (Abbildung 3.29). Hierfür wurde, wie in Abschnitt 2.9.3 beschrieben, die Konzentration an hFXa zunächst durch Titration mit humanem ATIII bestimmt (Abbildung 3.29(a)). Anschließend wurde aufgereinigtes Lfl_SpnV4_1 mit hFXa inkubiert und die Restaktivität der Protease durch Zugabe des Substrats S-2222TM gemessen. Für die Interaktion zwischen Lfl_SpnV4_1 und hFXa wurde ein SI-Wert von durchschnittlich 1,9 ermittelt (Abbildung 3.29(b)).

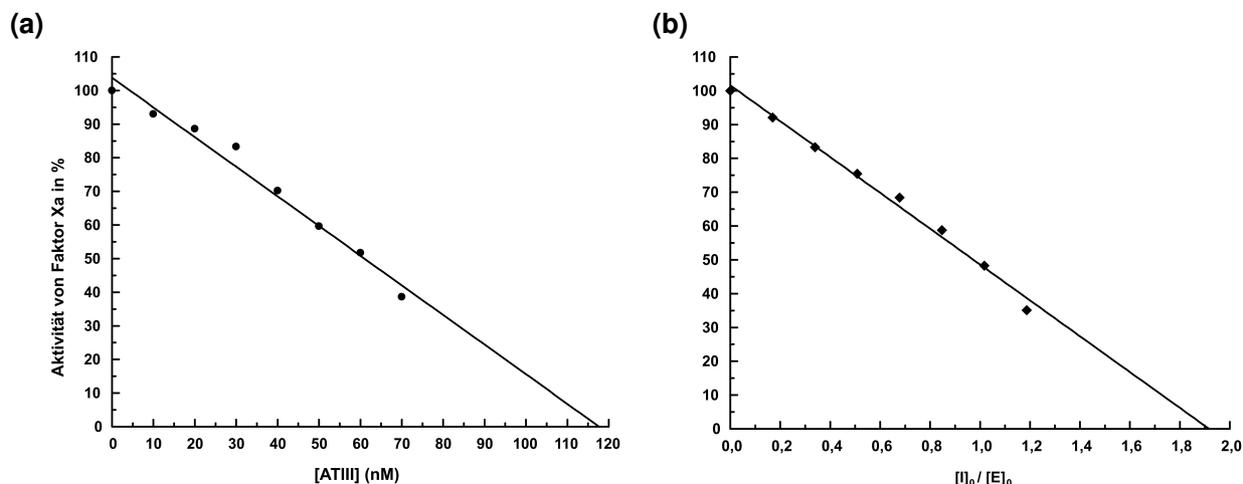


Abbildung 3.29: SI-Wert-Bestimmung für die Interaktion zwischen Lfl_SpnV4_1 und hFXa. (a): Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration mittels der *active-site*-Titration mit humanem ATIII; (b): Bestimmung des SI-Werts der Reaktion zwischen hFXa und Lfl_SpnV4_1. Durch Anpassung einer Geraden an die abfallenden Funktionswerte wurde der SI-Wert aus dem Schnittpunkt mit der x-Achse abgeleitet.

Für die Hemmreaktion wurde mithilfe der *progress-curve*-Methode (Abschnitt 1.3.2) die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung (k_{inh}) ermittelt. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen an aufgereinigtem Lfl_SpnV4_1 mit dem Substrat S-2222TM gemischt und die Reaktionen durch Zugabe von hFXa gestartet. Durch die Inaktivierung von hFXa wird im Laufe der Reaktion die Konzentration der freien Protease gesenkt und weniger Substrat wird umgesetzt. Beispielhafte Verlaufskurven (*progress curves*) für verschiedene Lfl_SpnV4_1-Konzentrationen (0–300 nM) sind in Abbildung 3.30 gezeigt. Je höher die Konzentration des Serpins, desto schneller wird hFXa gehemmt. Das Erreichen eines Grenzwertes zeigt, dass hFXa im Laufe der Reaktion vollständig und irreversibel inhibiert wird. Mittels nichtlinearer Regression (Abschnitt 1.3.2, Gleichung 1.6) wurde für jede Serpinkonzentration die Hemmkonstante pseudo-erster Ordnung k_{obs} bestimmt. Gegen die jeweilige Serpinkonzentration wurden die für jede Reaktion bestimmte k_{obs} aufgetragen (Abbildung 3.30(b)). Die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Inhibierungsreaktion (k_{inh}) wurde mittels linearer Regression (Gleichung 1.8) unter Berücksichtigung des K_M -Wertes (Gleichung 1.9) bestimmt.

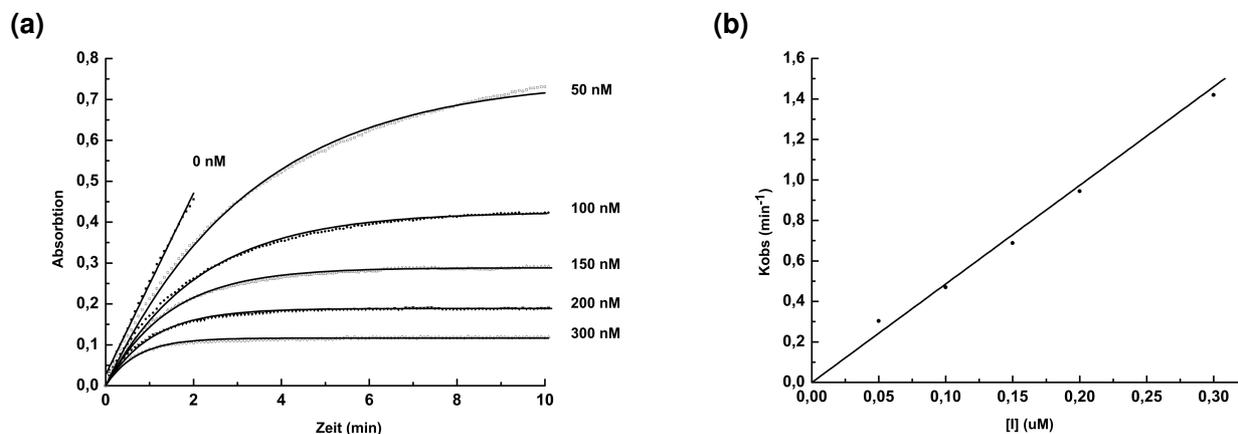


Abbildung 3.30: Beispiel für die Bestimmung von k_{inh} der Reaktion zwischen hFXa und Lfl_SpnV4_1. (a): Verlaufskurven für die Inhibierung von 10 nM hFXa durch Lfl_SpnV4_1 mit $[S] = 0,5 \cdot K_m$ in Abwesenheit von Heparin und Ca^{2+} ; (b): Abhängigkeit der apparenten Hemmkonstanten pseudo-erster Ordnung k_{obs} von der Serpinkonzentration. Aus der Geradensteigung wurde unter Berücksichtigung des K_m -Wertes die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Inhibition (k_{inh}) ermittelt.

Die Messungen wurden jeweils mindestens vier Mal durchgeführt und aus den Mittelwerten die Hemmkonstante berechnet. Die so ermittelten Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung k_{inh} der Inhibition von hFXa durch Lfl_SpnV4_1 in Ab- und Anwesenheit von Heparin bzw. Ca^{2+} sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

Tabelle 3.4: Geschwindigkeitskonstanten für die Hemmung von hFXa durch Lfl_SpnV4_1

Bedingungen	Durchschnittliche k_{inh} [$M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]
ohne Heparin, ohne Ca^{2+}	$7,68 \pm 1,0 \times 10^6$
ohne Heparin, mit 2,5 mM Ca^{2+}	$8,08 \pm 0,5 \times 10^6$
mit 50 U/mL Heparin, ohne Ca^{2+}	$2,76 \pm 0,2 \times 10^7$
mit 50 U/mL Heparin, mit 2,5 mM Ca^{2+}	$2,73 \pm 0,9 \times 10^7$

3.5 Lokalisierung des HCII- und SpnV4_1-Gens im Neunaugen-Genom

Drei Serpine aus *L. fluviatilis*, LA, LfHCII und Lfl_SpnV4_1, wurden als Inhibitoren der Blutgerinnungsfaktoren α -Thrombin bzw. hFXa identifiziert (Abschnitt 3.1 bis Abschnitt 3.4). Interessanterweise sind die beiden Gene, die für HCII und SpnV4_1 kodieren, sowohl im Genom von Meerneunaugen (Abbildung 3.31) als auch im von Flussneunaugen (nicht gezeigt) unmittelbar nebeneinander innerhalb eines Introns des PI4KA (*Phosphatidylinositol 4-kinase α*)-Gens lokalisiert. Die Syntenie der HCII- und PI4KA-Gene ist beim Menschen (*H. sapiens*) und anderen Vertebraten konserviert (Kumar, 2010). Ein Ortholog von SpnV4_1 wurde bei den gegenwärtigen annotierten Genomen von Kiefermäulern nicht detektiert.

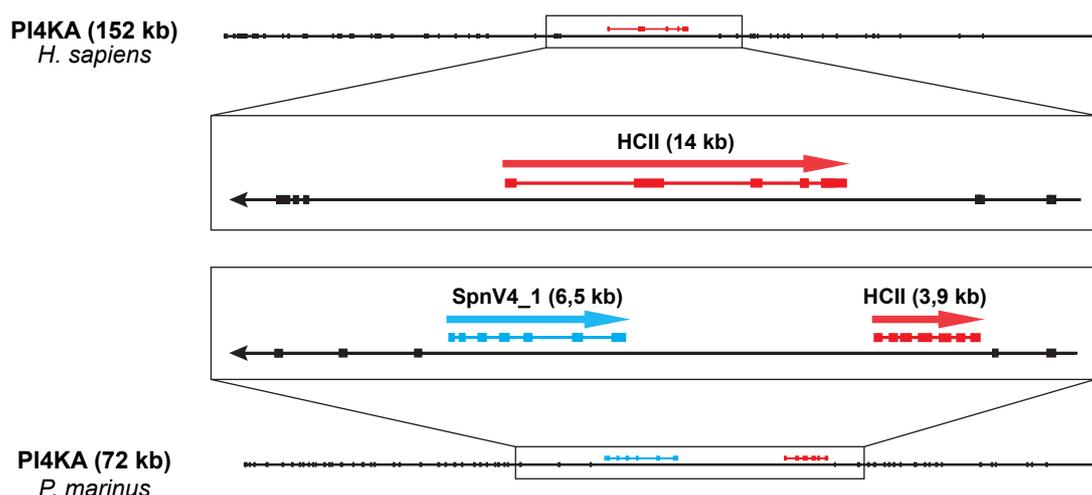


Abbildung 3.31: Schematische Darstellung der konservierten Syntenie der Gene für HCII und PI4KA. Sowohl bei Neunaugen als auch bei Menschen ist das HCII-Gen (rot markiert) anti-parallel innerhalb eines Introns des PI4KA (*Phosphatidylinositol 4-kinase α*)-Gens lokalisiert. In Neunaugen liegt in unmittelbarer Nähe zum HCII-Gen innerhalb des selben Introns noch das SpnV4_1-Gen (türkis markiert). Bei Menschen und anderen Vertebraten wurde nur das HCII-Gen beibehalten. Die genomische Anordnung wurde aus dem Genom von *H. sapiens* (*Ensembl Genome Browser Release 75, GRCh37*, Zugangsnummer für PI4KA-Gen: ENSG00000241973) und *P. marinus* (*Pmarinus_7.0*, Zugangsnummer für PI4KA-Gen: ENSPMAG00000008040) abgeleitet. Die Exon-Intron-Struktur des HCII-Gens von Neunaugen wurde auf der Basis der cDNA-Sequenz von LfHCII (Abschnitt 5.2.2) modifiziert. Die genomische Sequenz von Lfl_SpnV4_1, ein Ortholog des SpnV4_1-Gens in *L. fluviatilis*, wurde bereits in der NCBI-GenBank hinterlegt (Zugangsnummer: FM991712). Exons sind hier als ausgefüllte Rechtecke dargestellt.

Kapitel 4

Diskussion

Neunaugen sind stammesgeschichtlich basale Wirbeltiere, die sich vor mehr als 500 Millionen Jahren von den Kiefernäulern (*Gnathostomata*) getrennt und sich seither kaum verändert haben (Janvier, 2006; Smith *et al.*, 2013). Diese Tiere können als Modell zur Untersuchung der Entwicklung komplexer Eigenschaften dienen, die bei der Evolution der Wirbeltiere entstanden sind, wie z. B. der Blutgerinnung oder des von Endothelzellen ausgekleideten Kreislaufsystems (Monahan-Earley *et al.*, 2013). Auf Basis bioinformatischer Analysen des Genoms der Neunaugen wurden ursprüngliche prokoagulatorische Komponenten des Gerinnungssystems der Vertebraten identifiziert. Die verfügbaren Daten weisen darauf hin, dass in Neunaugen im Vergleich zu den Kiefernäulern ein relativ einfaches Blutgerinnungssystem vorhanden ist. Die multifaktorielle Kaskade prokoagulatorischer Proteine des *Gnathostomata* hat sich schrittweise aus einem einfachen Satz gerinnungsfördernder Faktoren entwickelt (Doolittle *et al.*, 2008; Doolittle, 2009; Kimura *et al.*, 2009). Die zwei wichtigsten Gerinnungsenzyme, Thrombin und FXa, konnten sogar bis zu den ursprünglichen Chordata (*Branchiostoma*) verfolgt werden (Ponczek *et al.*, 2012). Die Mechanismen zur Regulation der beiden Enzyme in Neunaugen und somit in der initialen Phase der Entwicklung des Gerinnungssystems sind bis heute unklar. ATIII, der Hauptinhibitor von Thrombin und FXa in Kiefernäulern, scheint in Neunaugen nicht vorhanden zu sein (Ragg *et al.*, 2009; Doolittle, 2011). Darüber hinaus wurde ZPI, ein weiteres FXa hemmendes Serpin (Han *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2008), ebenfalls nicht in Neunaugen gefunden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Serpine (LA, LfHCII, Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2) aus *L. fluviatilis*, dem europäischen Flussneunauge, näher charakterisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass LA und LfHCII Thrombin hemmende Serpine sind und Lfl_SpnV4_1 eine Anti-FXa-Aktivität besitzt. Mit der vorliegenden Arbeit kann daher geklärt werden, wie die beiden wichtigen Blutgerinnungsenzyme, Thrombin und FXa, in der ursprünglichen Gerinnungskaskade inhibiert wurden. Neben seiner Thrombin hemmenden Aktivität fungiert LA auch als Vorläuferprotein einer Hormonfamilie (Angiotensine), die eine wichtige Rolle bei der Modulation des arteriellen Blutdrucks und der Osmolarität der extrazellulären

Flüssigkeit spielt (Fyhrquist und Saijonmaa, 2008; Crowley und Coffman, 2012). Somit geben die Ergebnisse Aufschluss über die Vernetzung von Blutgerinnung und Druckregulierung ursprünglicher Vertebraten.

4.1 Evolution des Renin-Angiotensin-Systems (RAS)

Die Flussneunaugen haben eine anadrome Lebensweise. Das bedeutet, dass sie aus dem Meer in Süßgewässer wandern und dort an geeigneten Laichplätzen ihre Eier legen. Die jungen Neunaugen wandern ins Meer zurück und leben dort bis zum Eintritt der Geschlechtsreife. Während der Wanderung verändern sich die Lebensbedingungen, vor allem der Salzgehalt des Wassers, sehr stark. In Abbildung 4.1 sind Osmolarität und Konzentrationen von Na^+ -, Cl^- -, sowie Mg^{2+} -Ionen im Plasma, der proximal-tubulären Flüssigkeit und der Harnleiter-Flüssigkeit Süß- und Meerwasser-adaptierter Flussneunaugen graphisch dargestellt. Im Vergleich zum Plasma und der proximal-tubulären Flüssigkeit sind Osmolarität und Ionen-Konzentrationen in der Harnleiter-Flüssigkeit während der Anpassung zwischen Süß- und Meerwasser signifikant verändert. Dies deutet darauf hin, dass in Flussneunaugen ein System vorhanden sein muss, das den osmotischen Druck und den Wasserverlust effizient reguliert.

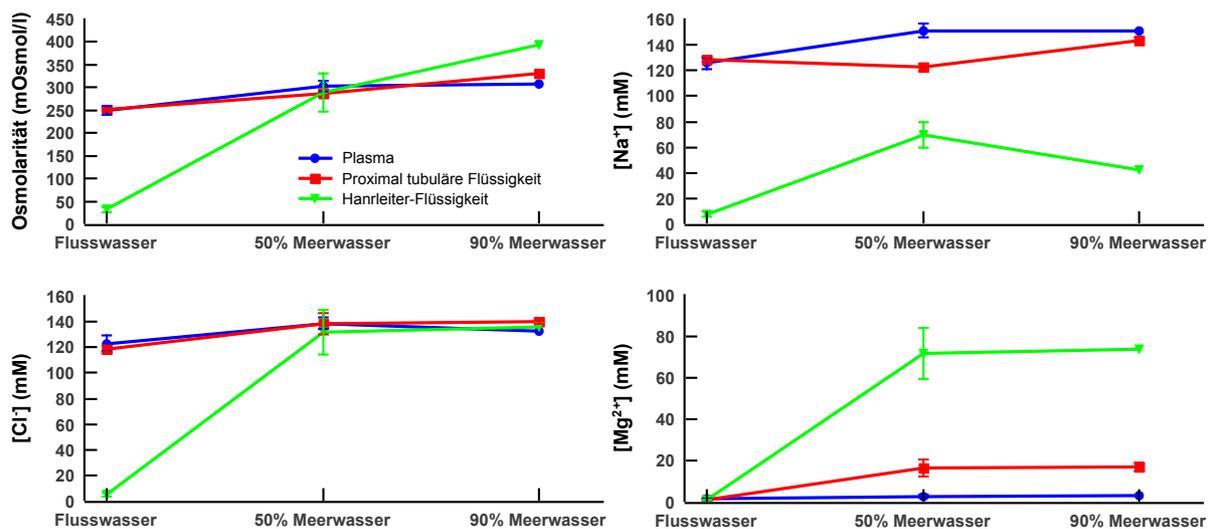


Abbildung 4.1: Osmolarität und Konzentration von Na^+ -, Cl^- -, und Mg^{2+} -Ionen in Süß- und Meerwasser-adaptierten Flussneunaugen. Die Daten der Grafik wurden aus der Tabelle des Buchs *The biology of lampreys* übernommen (Hardisty und Potter, 1981, Seite 251). Daten für das Plasma sind in blau, für die proximal-tubuläre Flüssigkeit in rot und für die Harnleiter-Flüssigkeit in grün dargestellt.

Das Renin-Angiotensin-System (RAS), das die zentrale Rolle in der Blutdruckregulation und der Aufrechterhaltung der Elektrolyt- und Volumenhomöostase spielt, wurde in den meisten Vertebraten einschließlich in Fischen identifiziert (Nishimura, 1978; Wilson, 1984; Kobayashi und Takei, 1996). Seit Jahrzehnten wurde angenommen, dass das RAS zuerst in Knochenfischen entstanden ist (Nishimura *et al.*, 1973; Nishimura und Ogawa, 1973; Nishimura, 1978; Bentley, 1982). Die Isolierung von Angiotensin I-Peptid aus dem gebänderten Hundshai (*Triakis scyllium*) und die Identifizierung der cDNA von Angiotensinogen in Rochen (*Dasyatis akajei*, *Leucoraja erinacea*) sowie im Elefantenhai (*Callorhynchus milii*) und im Hundshai weisen darauf hin, dass das RAS sich jedoch bereits in dem Knorpelfisch entwickelt haben könnte (Takei *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2009).

Das in Flussneunaugen (Rankin *et al.*, 2004) und in Meerneunaugen (Takei *et al.*, 2004) identifizierte Knochenfisch-ähnliche Angiotensin I (Kf-Ang I) mit der Aminosäuresequenz NRVYVHPFTL wurde als Nachweis für die Existenz eines RAS in Rundmäulern verwendet (Brown *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2009). Die minimal wirksame Dosis von Kf-Ang II (NRVYVHPF) in Neunaugen war jedoch außergewöhnlich hoch (ca. 10^{-7} mol · kg⁻¹) und Kf-Ang I zeigte in dieser Dosis keinen Effekt. Aus 1 mL Plasma war die relative Ausbeute von Kf-Ang I in Neunaugen (ca. 1 pmol/mL) im Vergleich zum Alligator (ca. 222 pmol/mL) sehr niedrig (Rankin *et al.*, 2004). Diese Daten weisen darauf hin, dass das Kf-Ang II kein natives Hormon in Neunaugen zu sein scheint. Weitere Forschungen haben gezeigt, dass diese Kf-Angiotensine ein Teil der endokrinen Mimikry-Strategie des Neunauges oder Kontamination durch Blutsaugen sein können (Wong *et al.*, 2012) und wenig mit der Regulation des Blutdrucks in Neunaugen zu tun haben (Wong und Takei, 2011). Darüber hinaus wurde in Neunaugen kein Vorläuferprotein für die Kf-Angiotensine gefunden. Stattdessen wurde eine Angiotensinogen-cDNA in Flussneunaugen (Ragg *et al.*, 2009), Meerneunaugen und japanischen Neunaugen (Wong und Takei, 2011) identifiziert, deren N-Terminus eine große Ähnlichkeit zu der Angiotensin II-Sequenz von Kiefernäulern aufweist (Abbildung 4.2). Alle Aminosäuren der N-terminalen Sequenz, die für die Interaktion zwischen Angiotensin II und AGTR1 und für die Aktivierung des Rezeptors in Säugetieren wichtig sind (z. B. die Positionen 2, 4, 6 und 8 in DRVYIHPF) (Miura *et al.*, 2003), sind in Flussneunaugen (ERPVMQPF) entweder identisch oder durch konservative Substitutionen ersetzt. Im Vergleich zu dem klassischen Oktapeptid Angiotensin II in Kiefernäulern enthält das Angiotensin-Peptid in Neunaugen am N-Terminus noch fünf zusätzliche Aminosäuren mit der Sequenz EEDYD.

Das 13 Aminosäuren umfassende Peptid der Flussneunaugen (EEDYDERPYMQPF) wird als Lfl_Ang II bezeichnet.

	Ang II von Neunaugen
<i>Lampetra fluviatilis</i>	E E D Y D E R P Y M Q P F H L
<i>Petromyzon marinus</i>	E E D Y D D R P Y M Q P F H L
<i>Lethenteron japonicum</i>	E E D Y D E R P Y M Q P F H L
<i>Callorhynchus milii</i>	-----N R P H I H P F L L
<i>Triakis scyllium</i>	-----N R P Y I H P F Q L
<i>Dasyatis akajei</i>	-----D R P Y I H P F F L
<i>Leucoraja erinacea</i>	-----Y R P Y I H P F S L
<i>Danio rerio</i>	-----N R V Y V H P F N L
<i>Takifugu rubripes</i>	-----N R V Y V H P F S L
<i>Gallus gallus</i>	-----D R V Y V H P F S L
<i>Rattus norvegicus</i>	-----D R V Y I H P F H L
<i>Homo sapiens</i>	-----D R V Y I H P F H L

Ang II von *Gnathostomata*

Abbildung 4.2: Vergleich der Sequenzen von Angiotensin II aus verschiedenen Organismen. Konservierte Aminosäuren sind in weiß auf schwarzem Hintergrund hervorgehoben, durch konservative Substitutionen ersetzte Aminosäuren sind durch grauen Hintergrund markiert.

Unter der Annahme, dass das Lfl_Ang II die Sequenz des ancestralen Angiotensins bewahrt hat, können die möglichen Veränderungen im Angiotensin II während der Evolution wie in Abbildung 4.3 gezeigt, dargestellt werden. Die fünf zusätzlichen Aminosäuren EEDYD könnten nach der Divergenz des Neunauges verloren gegangen sein. Es könnte jedoch auch umgekehrt der Fall sein, dass diese fünf Aminosäuren in der Neunauge-Linie neu erworben wurden. Nach der Divergenz der Neunaugen scheinen die Aminosäuren Methionin an Position 5 und Glutamin an Position 6 durch Isoleucin bzw. Histidin substituiert worden zu sein (Nummerierung nach der klassischen Oktapeptid Angiotensin II-Sequenz). In der Knorpelfisch-Linie wurde Asparaginsäure an Position 1 bei Haien und Elefantenhai durch Asparagin substituiert, während sie im Rochen (*Leucoraja erinacea*) durch Tyrosin anstelle von Asparagin ausgetauscht wurde. Tyrosin an Position 4 beim Elefantenhai wurde durch Histidin substituiert. Nach der Divergenz von Knorpelfischen scheint Prolin an Position 3 durch Valin ersetzt worden zu sein. Neben der Substitution von Asparaginsäure durch Asparagin an Position 1 wurde in Knochenfischen Isoleucin an Position 5 durch Valin ausgetauscht. Dieselbe Substitution kommt auch bei Vögeln vor. Für alle diese Substitutionen reicht jeweils eine Transversion bzw. Transition aus. Interessant ist, dass in Fischen Asparaginsäure an Position 1 hauptsächlich durch Asparagin ersetzt wurde. Die Vasopressor-Aktivität von [Asp1]-Ang I in Vögeln und Mäusen ist viel höher als die von [Asn1]-Ang I (Watanabe *et al.*, 1977; Takei und Hasegawa, 1990) und in Aalen ist es umgekehrt (Rankin *et al.*, 2004). Die Aminosäure an Position 1 scheint artspezifisch zu sein. Dies weist ebenfalls darauf hin, dass

das in Neunaugen identifizierte Kf-Ang I eventuell eher mit ihrer parasitären Lebensweise zusammenhängt.

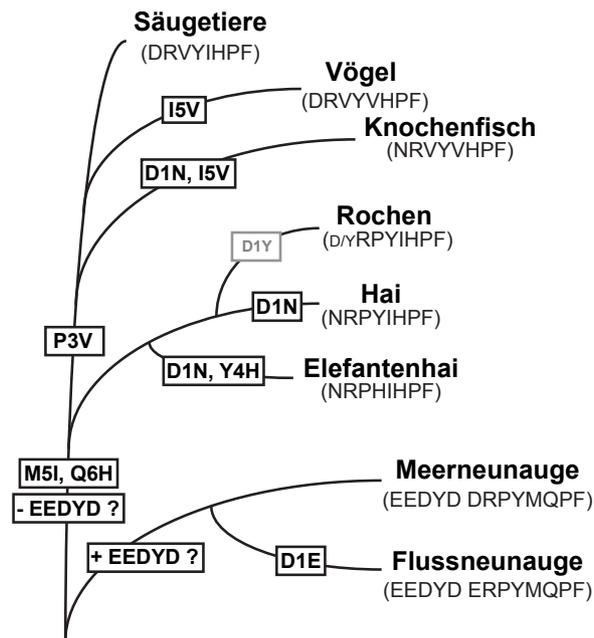


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der möglichen Veränderungen in Angiotensin II-Sequenzen während der Evolution.

Der in Abschnitt 3.2 beschriebene G-Protein-gekoppelte Rezeptor (GPCR), LfAGTR1, ist phylogenetisch mit der AGTR1-Familie assoziiert (Abbildung 3.15). Mehrere Aminosäurereste, die in Säugetieren für die Rezeptoraktivierung und Signaltransduktion wichtig sind, sind im LfAGTR1 konserviert (Abbildungen 3.14 und 3.16). Die Interaktionen zwischen Rhodamin-markiertem Lfl_Ang II (*TMR-Lfl_Ang*) und dem in HEK-293-Zellen exprimierten LfAGTR1-EGFP-Fusionsprotein führen zur Endozytose und der Bildung von intrazellulären Strukturen, die aus dem Ligand und dem Rezeptor bestehen (Abbildung 3.17). Die in diesen Versuchen verwendeten Konzentrationen an Liganden sind dabei mit den in homologen Säugersystemen effektiven Konzentrationen vergleichbar. Die Kinetik der Internalisierung ist ebenfalls ähnlich (Hunyady *et al.*, 2002). Darüber hinaus kann die Injektion von Lfl_Ang II mit einer Konzentration von 100–1000 pmol/kg eine Herz-Kreislauf-Reaktion in Neunaugen hervorrufen (Wong und Takei, 2011). Alle diese Befunde zeigen, dass Lfl_Ang II ein natives Hormon der Neunaugen ist und ein funktionaler Angiotensin/AGTR1-Signaltransduktionspfad, der eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Blutdruckes in Kiefermäulern spielt, auch in Neunaugen vorhanden ist.

Für Versuche zur Interaktion mit LfAGTR1 sowie für die Injektion in Neunaugen wurde jeweils das Peptid Lfl_Ang II eingesetzt, das fünf Aminosäuren (EEDYD) mehr als das

klassische Angiotensin II der Kiefernmäuler enthält (Abbildung 4.2). Eine Deletion dieser fünf Aminosäuren kann die Tertiärstruktur dieses Peptids stark beeinflussen und zum Verlust der Vasoaktivität führen (Wong und Takei, 2011). Warum diese fünf zusätzlichen Aminosäuren für die Interaktion zwischen Lfl_Ang II und LfAGTR1 bzw. für die Auslösung der Herz-Kreislauf-Reaktion in Neunaugen wichtig sind, ist noch unklar. Möglicherweise trägt die Sulfatierung der Aminosäure Tyrosin (Y) im Kontext des 13 Aminosäuren langen Lfl_Ang II-Segments (Abschnitt 3.1.9) zur Interaktion zwischen Lfl_Ang II und dem Rezeptor bei. Um zu klären, ob die EEDYD-Sequenz bei der Interaktion zwischen Lfl_Ang und LfAGTR1 eine Funktion hat, bzw. über welchen Mechanismus sie die Interaktion beeinflusst, werden weitere Untersuchungen benötigt.

Der Mechanismus der Entstehung von Angiotensin-Peptiden aus Neunaugen-Angiotensinogen ist nicht bekannt. Der klassische Weg in Säugetieren ist die Abspaltung des Dekapeptids Angiotensin I durch die Aspartylprotease Renin am N-Terminus des Angiotensinogens. Durch Proteolyse von zwei C-terminalen Aminosäuren mittels ACE wird das Oktapeptid Angiotensin II aus Angiotensin I erzeugt. Orthologe von Renin konnten im Genom von Meerneunaugen nicht identifiziert werden, während ein ACE-Gen (*Ensembl*-Zugangsnummer: ENSPMAG00000007309) in den Neunaugen vorhanden zu sein scheint. Eine *Angiotensin-Converting-Enzyme*-ähnliche Aktivität (ACELA) wurde bei Flussneunaugen hauptsächlich im Gehirn detektiert (Cobb *et al.*, 2002). ACE-homologe Enzyme wurden auch in Insekten identifiziert (Lamango und Isaac, 1994; Cornell *et al.*, 1995; Wijffels *et al.*, 1996; Ribeiro und Mather, 1998). Diese Enzyme können außer Angiotensin I jedoch auch andere Substrate spalten. Es ist daher unklar, ob es alternative Pfade, wie auch in Säugern (Benigni *et al.*, 2010) und/oder einen noch unbekanntem Mechanismus für die Entstehung der Angiotensin-Peptide in Neunaugen gibt.

Neunaugen sind die bisher ursprünglichsten bekannten Metazoen mit einem funktionellen Angiotensin/AGTR1-System. Es ist unklar, wann dieses System sich zuerst entwickelt hat. Angiotensin-ähnliche Sequenzen wurden in einigen Blutegelein (*Theromyzon tessulatum*, *Eropbdella octoculata*), jedoch in einem Nicht-Serpin-Zusammenhang, identifiziert (Salzet *et al.*, 1993; Salzet *et al.*, 1995; Salzet und Verger-Bocquet, 2001). In einer anderen Blutegel-Spezies, *Helobdella robusta*, scheinen allerdings keine Angiotensin-verwandten Sequenzen vorhanden zu sein. Dies kann durch DNA-Transfer erklärt werden, der eventuell durch das lange „Überleben“ von Fremd-DNA in parasitären Blutegelein begünstigt wird (Schnell *et al.*, 2012). In anderen Metazoen, einschließlich der frühen Wirbeltiere, könnten die

Angiotensin-Sequenzen ebenfalls durch die Aufnahme von genetischem Material entstanden und anschließend entlang dieser Linie mit einem Serpin-Gerüst als Träger konserviert worden sein. Jedoch ist es auch möglich, dass diese Hormonsequenzen anzestral waren und in einigen Linien verloren gegangen sind.

4.2 Thrombin hemmende Serpine aus *L. fluviatilis*

Da keine kommerziellen Antikörper für den Nachweis von Angiotensinogen aus *L. fluviatilis* (LA) zur Verfügung standen, wurde eine humanisierte Variante (hLA) des Proteins hergestellt, welche anstelle der eigenen Angiotensin II-Sequenz (EEDYDERPYMQPF) das humane Angiotensin II (DRVYIHPF) mit den fünf zusätzlichen Aminosäuren EEDYD am N-Terminus enthält. Somit kann das rekombinant hergestellte hLA mit dem kommerziell erhältlichen *Angiotensin N-10*-Antikörper (Tabelle 5.8) detektiert werden. Darüber hinaus wurde noch eine weitere Variante hergestellt (HA-LA), die anstelle des eigenen Signalpeptids das Signalpeptid der humanen Protein-Disulfid-Isomerase (PDI-Signalpeptid) und ein Hämagglutinin-tag (HA-tag) zum Nachweis im Western-Blot enthält. Der Unterschied der beiden Varianten zum nativen LA ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Durch den Vergleich der biochemischen Eigenschaften der beiden modifizierten Varianten (Abschnitte 3.1.2 bis 3.1.4) konnte gezeigt werden, dass der Angiotensinteil keine Rolle für die Heparinbindungsfähigkeit und die Hemmaktivität des LA spielt. Die kinetische Charakterisierung der Hemmung von α -Thrombin wurde ausschließlich mit der hLA-Variante durchgeführt.

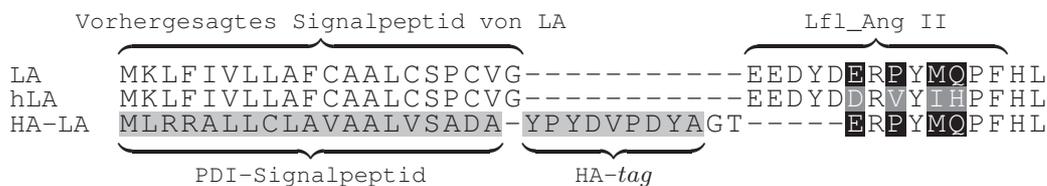


Abbildung 4.4: Teil des Sequenz-Alignments von LA, hLA sowie HA-LA. Lfl_Ang II: Angiotensin II aus *L. fluviatilis*; PDI-Signalpeptid: Signalpeptid der humanen Protein-Disulfid-Isomerase; HA-tag: Hämagglutinin-tag;

Um das Spektrum an Zielproteasen von Neunaugen-Angiotensinogen zu bestimmen, wurde eine Reihe von Proteasen mittels Komplexierungstests auf Wechselwirkung mit dem Inhibitor überprüft. Keine der getesteten Proteasen mit Ausnahme von Thrombin, konnte einen SDS-stabilen Komplex mit hLA und HA-LA bilden (Abschnitt 3.1.4). In Gegenwart von 10 U/mL Heparin oder 2 mg/mL DS bzw. 100 μ g/mL Heparansulfat beträgt die Inhibitionskonstante (k_{inh}) der Hemmung von humanem α -Thrombin durch hLA ca.

$2,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $2,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bzw. $9,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, was ca. 810-fach, 10-fach bzw. 360-fach höher als in Abwesenheit der entsprechenden GAGs ist. Darüber hinaus verkleinert sich der SI-Wert in Gegenwart von GAGs (Abschnitt 3.1.8). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass LA ein effizienter Inhibitor von humanem α -Thrombin ist und GAGs (besonders Heparin und Heparansulfat) die Hemmreaktion aktivieren und beschleunigen können.

Neben Angiotensinogen wurde ein weiteres α -Thrombin hemmendes Serpin aus *L. fluviatilis*, LfHCII, identifiziert (Abbildung 3.20). Sowohl Sequenz-Vergleiche als auch die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass LfHCII und der humane HCII sehr ähnlich sind. Der humane HCII wurde in den vergangenen Jahren bereits qualitativ und quantitativ gut untersucht und charakterisiert (Tollefsen *et al.*, 1983; Ragg *et al.*, 1990a; Ragg *et al.*, 1990b; Van Deerlin und Tollefsen, 1992). Wegen der Ähnlichkeit der beiden Proteine wurde die Interaktion zwischen LfHCII und humanem α -Thrombin in dieser Arbeit daher nicht quantitativ untersucht.

Durch bioinformatische Analysen des Neunaugen-Genoms wurden einige ursprüngliche Komponenten des Gerinnungssystems einschließlich Prothrombin identifiziert (Doolittle *et al.*, 2008; Ponczek *et al.*, 2012). In Thrombin von Neunaugen sind die wichtigen strukturellen Merkmale, wie z. B. der 60-loop, die anionenbindenden Exosites I und II und der Na^+ -loop, die bei der selektiven Interaktion der Protease mit Kofaktoren, makromolekularen Substraten und Inhibitoren in Säugetieren eine entscheidende Rolle spielen, vorhanden (Bode *et al.*, 1992; Davie und Kulman, 2006; Di Cera, 2007; Ponczek *et al.*, 2012). Die spezifische Wechselwirkung von Angiotensinogen und HCII aus Neunaugen mit der humanen Protease kann durch diese gemeinsamen strukturellen Merkmale erklärt werden. Viele Eigenschaften des humanen Thrombins sind auch für das Neunaugen-Ortholog zu erwarten. In Neunaugen sollte daher Thrombin ebenfalls durch Angiotensinogen und HCII gehemmt werden. Die maximale Geschwindigkeit der Hemmung von humanem α -Thrombin durch hLA ($k_{inh} = 2,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) ist niedriger als die für den DS aktivierten humanen HCII (ca. $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) (Tollefsen *et al.*, 1983; Brinkmeyer *et al.*, 2004) und die für das Heparin aktivierte ATIII (ca. $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) (Pratt *et al.*, 1992). Es ist bekannt, dass die Herkunft der Kofaktoren und Proteasen die Reaktionskinetik von Serpinen beeinflussen kann (Pratt *et al.*, 1989). So könnte k_{inh} der Reaktion zwischen Thrombin und LA höher sein, wenn der Kofaktor und die Protease ebenfalls aus *L. fluviatilis* stammen würden.

Für die Proteasespezifität der Serpine sind die Aminosäuren des RCLs, vor allem die Aminosäuren an der P1-Position im Vergleich zu den Nachbarpositionen (P6 bis P4')

besonders wichtig (Gettins, 2002). Ein Vergleich mit den RCL-Sequenzen von humanem HCII und ATIII deckt die Basis der Thrombin hemmenden Aktivität der beiden Neunaugen-Serpine auf (Abbildung 4.5). Die RCL-Sequenzen von LA und LfHCII sind insgesamt sehr ähnlich. Sie weisen die typische Sequenz des RCLs inhibitorischer Serpine auf (Abbildung 1.7). Kleine Aminosäurereste in der *hinge*-Region (P15-P9) des RCLs von LA und LfHCII erlauben die Insertion des RCLs ins β -Faltblatt A, was die Basis des Inhibitionsmechanismus der Serpine ist (Abschnitt 1.3.2). Im Gegensatz wird die Insertion des RCLs des humanen Angiotensinogens durch die großen Aminosäuren in der *hinge*-Region verhindert (Abbildung 4.5). Ähnlich wie der humane HCII besitzen LfHCII und LA an der P1-Position ebenfalls eine hydrophobe Aminosäure (Leucin bzw. Isoleucin). Bei humanem ATIII wird diese Position der Aminosäuresequenz, wie in den meisten Substraten von Thrombin, von Arginin besetzt (Davie und Kulman, 2006). Das Serin (S) an der P1'-Position in ATIII spielt bei der Stabilisierung des nicht-kovalenten Komplexes eine wichtige Rolle (Olson *et al.*, 1995). In LA und LfHCII wird diese Position der Aminosäuresequenz von Serin bzw. Threonin (T) besetzt. Threonin ist neben Serin eine weitere polare, ungeladene Aminosäure, die eine aliphatische Hydroxylgruppe besitzt. Die beiden Aminosäuren an der P1'-Position in LA und LfHCII könnten ebenfalls für die Stabilisierung des nicht-kovalenten Protease-Inhibitor-Komplexes von großer Bedeutung sein.

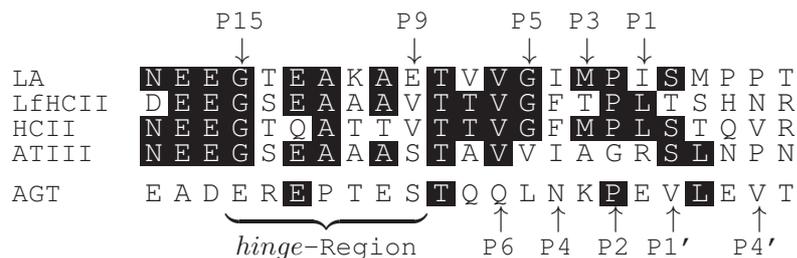


Abbildung 4.5: Vergleich der RCL-Sequenzen von Angiotensinogen, HCII und ATIII. Hervorgehoben sind die konservierten Aminosäurereste. LA und LfHCII: Angiotensinogen und HCII aus *L. fluviatilis*; AGT: humanes Angiotensinogen (NP_000020); HCII: humaner HCII (NP_000176); ATIII: humanes ATIII (NP_000479).

Die Abbildungen 3.5 und 3.19 zeigen, dass diese beiden Neunaugen-Serpine, die jeweils mehrere basische Aminosäuren in Helix A bzw. Helix D (Abbildung 3.3) enthalten, tatsächlich an Heparin binden können, ähnlich wie humaner HCII und humanes ATIII. Dies lässt vermuten, dass GAGs die Reaktion zwischen α -Thrombin und den beiden Neunaugen-Serpinen mit einem ähnlichen Mechanismus wie beim humanen HCII bzw. ATIII aktivieren und beschleunigen können. Die glockenförmige Abhängigkeit der Inhibitionskonstanten von

der Heparin- und Heparansulfat-Konzentration (Abbildung 3.11) lässt vermuten, dass die Thrombin hemmende Aktivität des LA in Gegenwart dieser GAGs über den Brücken-Mechanismus aktiviert wird (Abschnitt 1.3.4). Dieser Effekt wurde bereits für die Hemmung von α -Thrombin durch ATIII, PCI (Pratt *et al.*, 1992), PAI-1 (Ehrlich *et al.*, 1991; Patston und Schapira, 1994) und PN-1 (Wallace *et al.*, 1989) nachgewiesen. Bei niedrigen Konzentrationen an Heparin bzw. Heparansulfat binden sowohl Thrombin als auch Angiotensinogen an dieselben GAG-Moleküle (Abbildung 4.6(a)), wodurch die Interaktion zwischen dem Serpin und seinem Zielenzym beschleunigt wird. Dieser Effekt nimmt immer weiter zu, bis die optimale Konzentration erreicht ist. Bei weiter ansteigenden Konzentrationen der GAGs binden Angiotensinogen und Thrombin an verschiedene GAG-Moleküle, wodurch der beschleunigende Effekt unterdrückt wird (Abbildung 4.6(b)).

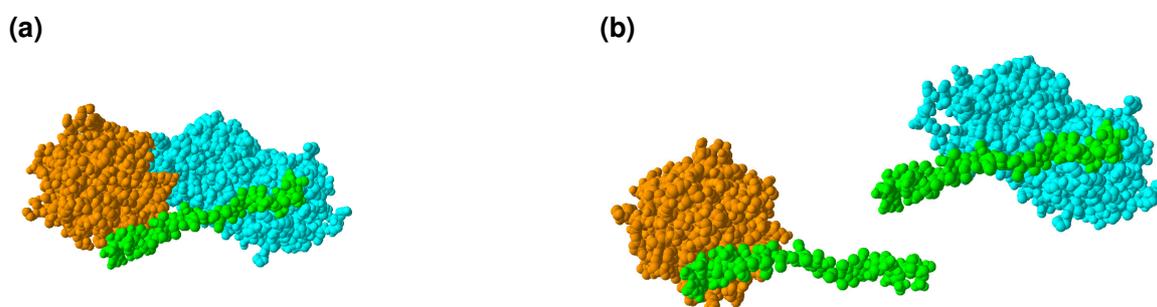


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der Abhängigkeit der Inhibitionsbeschleunigung von der Konzentration der GAGs. (a): Bei niedrigen Konzentrationen an GAGs binden sowohl Angiotensinogen (türkis) als auch Thrombin (orange) an dieselben GAG-Moleküle (grün). (b): Bei höheren Konzentrationen an GAGs binden Angiotensinogen und Thrombin an verschiedene GAG-Moleküle.

Neben dem Brücken-Mechanismus können GAGs noch über den allosterischen Mechanismus die Interaktion zwischen Serpin und seiner Zielprotease beschleunigen. Bei diesem Mechanismus werden die Konformationen der Serpine durch Bindung an GAGs verändert. Das hat zur Folge, dass die Serpine eine höhere Reaktivität gegenüber den Zielproteasen besitzen. Im Fall von PAI-1 (Li *et al.*, 2007), PN-1 (Li und Huntington, 2012) und PCI (Li *et al.*, 2008) fungieren GAGs (z. B. Heparin) nur über den Brücken-Mechanismus und lösen keine Konformationsänderung der Serpine aus. Die Konformationen von ATIII (Li *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2006) und HCII (Ragg *et al.*, 1990a; Ragg *et al.*, 1990b; Baglin *et al.*, 2002) können jedoch durch Bindung an GAGs verändert werden. Um festzustellen, ob die Bindung an Heparin bzw. Heparansulfat die Konformation des Neunaugen-Angiotensinogens ändert, werden weitere Untersuchungen, wie z. B. Bestimmung der Tertiärstruktur in Abwesenheit und in Gegenwart von Heparin und Heparansulfat, benötigt.

Im Gegensatz zu Heparin hat DS keinen aktivierenden Effekt auf die Hemmung von α -Thrombin durch ATIII (Kindness *et al.*, 1981; Gettins, 2002). Jedoch kann DS die Interaktion zwischen Thrombin und HCII über den allosterischen Mechanismus ca. 10^3 -fach beschleunigen (Tollefsen *et al.*, 1983; Ragg *et al.*, 1990a; Ragg *et al.*, 1990b; Van Deerlin und Tollefsen, 1991; Sheehan *et al.*, 1994). Die Sättigungskurve in Abbildung 3.11(b) zeigt, dass durch Bindung an DS die Reaktion zwischen LA und humanem α -Thrombin beschleunigt wird. Allerdings wird die Inhibitions geschwindigkeit durch DS nur ca. 10-fach erhöht. Im Vergleich zu humanem HCII (ca. 1000-fach) ist der DS-Effekt auf LA sehr gering. Bei der DS aktivierenden Reaktion zwischen Thrombin und HCII spielen die negativ geladenen Hirudin-ähnlichen Bereiche AR1 und AR2 am N-Terminus des Inhibitors eine wichtige Rolle (Ragg *et al.*, 1990b; Van Deerlin und Tollefsen, 1991; Bauman und Church, 1999). Der Vergleich der N-terminalen Sequenzen zeigt, dass LA ähnlich wie ATIII im Gegensatz zu LfHCII und humanem HCII keine AR1- und AR2-Bereiche am N-Terminus enthält (Abbildung 4.7). Davon ausgehend wurde vermutet, dass DS daher einen qualitativ unterschiedlichen Effekt auf die Hemmung von Thrombin durch LfHCII und LA hat. Dieser Unterschied konnte in den Komplexierungstests (Abbildungen 3.7(c) und 3.20(d)) nachgewiesen werden.

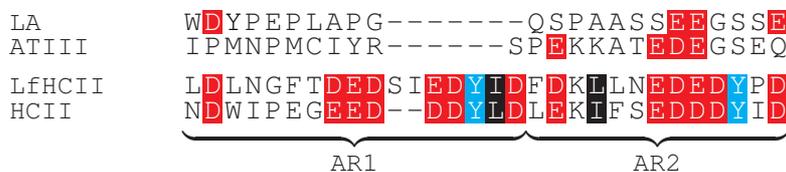


Abbildung 4.7: Vergleich der N-terminalen Sequenzen von LA, LfHCII und humanem HCII. LA und LfHCII: Angiotensinogen bzw. HCII aus *L. fluviatilis*; ATIII: humanes ATIII (NP_000479); HCII: humaner HCII (X03498). AR1 und AR2: die negativ geladenen Bereiche im N-Terminus von HCII. Die sauren Aminosäuren Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E) sind in weiß auf rotem Hintergrund, die hydrophoben Aminosäuren Leucin (L) und Isoleucin (I) sind auf schwarzem Hintergrund hervorgehoben. Tyrosinreste (Y), die sulfatiert werden können, sind mit türkischem Hintergrund dargestellt.

In Bezug auf die Rolle der GAGs bei der Hemmung von Thrombin verhält sich LfHCII ähnlich wie HCII der Säugetiere, während Neunaugen-Angiotensinogen eher der Reaktion von ATIII mit Thrombin ähnelt. Konservierung der RCL-Sequenzen und der Hirudin-ähnlichen N-terminalen Domäne von HCII in Vertebraten (Ragg *et al.*, 2009) und die Ähnlichkeit der RCL-Sequenz zwischen Neunaugen-Angiotensinogen und HCII der Vertebraten spiegeln die Konservierung der gegenseitigen Abhängigkeit von der Protease und ihren Inhibitoren für die produktive Interaktion wider.

4.3 Evolution der Regulierung des Thrombins

Konkordanzen auf Proteinebene, einschließlich der ähnlichen RCL-Sequenzen und der langen, N-terminalen Extensionen (trotz ihrer geringen Ähnlichkeit), weisen auf die gemeinsame Abstammung des LA und LfHCII hin. Die basische Region in Helix D von LA und LfHCII (Abbildung 3.3) und ihre hohe Affinität zu Heparin stellen einen weiteren Hinweis zur Verwandtschaft der beiden Serpine dar. Eine phylogenetische Analyse mittels in *MEGA6* implementierter Programme (*Neighbor-Joining*-Methode) ist in Abbildung 4.8 dargestellt. Darüber hinaus wurden die Analysen mit drei weiteren phylogenetischen Methoden (*Maximum Parsimony*, *Maximum Likelihood* und *Minimum Evolution*) durchgeführt (nicht gezeigt). Bei allen diesen Analysen kamen ähnliche Stammbäume heraus. Die Ergebnisse der phylogenetischen Analysen sprechen eindeutig gegen Homoplasie (konvergente Evolution) und weisen darauf hin, dass Angiotensinogen und HCII aus einem gemeinsamen Vorfahren (wie in Abbildung 4.9 dargestellt) entstanden sein könnten (Ragg und Preibisch, 1988; Atchley *et al.*, 2001). Dies unterstützt die Klassifizierung und das Evolutionsmodell nach Ragg *et al.* (2001), bei dem Angiotensinogen und HCII gemeinsam in die V2-Gruppe eingeordnet werden (Tabelle 1.1 und Abbildung 1.8).

Der Nachweis der Thrombin hemmenden Aktivität des Neunaugen-Angiotensinogens hat eine große Bedeutung für das Verständnis der Evolution der Thrombin-Regulierung. Datenbankrecherchen zeigten, dass ATIII weder in Meerneunaugen (*P. marinus*) noch in japanischen Neunaugen (*L. japonicum*) vorhanden zu sein scheint. Der experimentelle Versuch unserer Arbeitsgruppe ATIII-cDNA in *L. fluviatilis* zu detektieren, war ebenfalls nicht erfolgreich. Es scheint, als ob Angiotensinogen und HCII die Schlüsselemente der Hemmung des Thrombins in Neunaugen darstellen. Offenbar wurde die Hemmung von Thrombin ursprünglich durch einen Vorfahren der Gruppe-V2-Serpine kontrolliert (Abbildung 4.9). Durch Duplikation eines ancestralen V2-Serpin-Gens mit Thrombin hemmender Aktivität sind Angiotensinogen und HCII entstanden. Ob das Angiotensin-Peptid ein integraler Bestandteil dieses Inhibitors war, ist jedoch unklar (Abschnitt 4.1). Die Entstehung eines inhibitorischen Angiotensinogens aus einem nicht-inhibitorischen Serpin in Neunaugen ist wenig wahrscheinlich, da dazu mehrere Änderungen, insbesondere die Bildung eines flexiblen, insertierbaren RCLs notwendig sind.

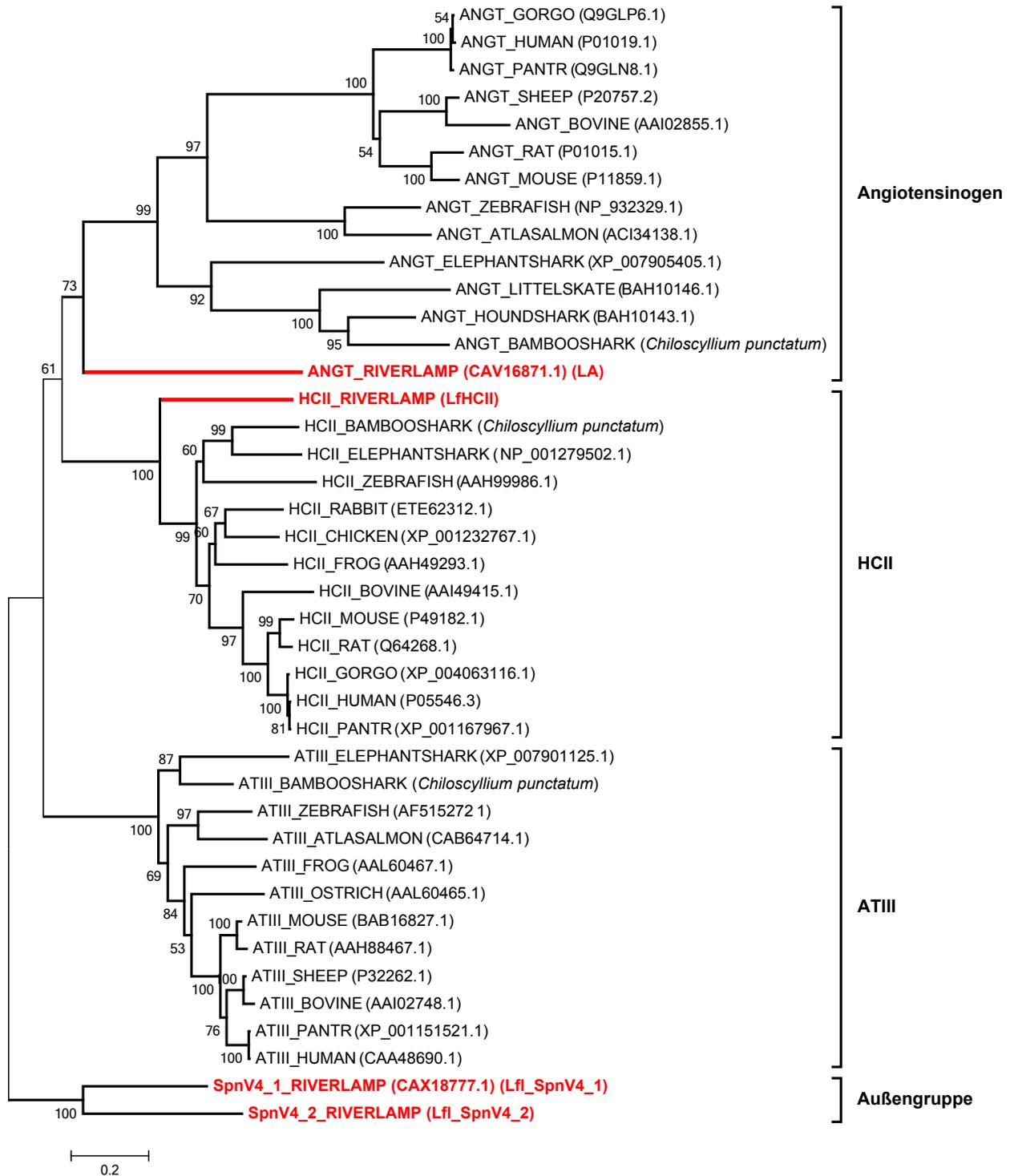


Abbildung 4.8: Phylogenetischer Stammbaum von Angiotensinogen, HCII und ATIII. Das Phylogramm wurde mit *MEGA6* (Alignment mittels *ClustalW*, statistische Methode: *Neighbor-Joining*, Substitutionsmodell: *Poisson-Model*) erstellt. Der Prozentsatz des Konfidenzintervalls (> 50 %) von 1000 *Bootstrap*-Replikaten ist jeweils links vom zugehörigen Knoten angegeben. Die Serpene *Lfl_SpnV4_1* und *Lfl_SpnV4_2* wurden als Außengruppe verwendet und der Baum damit gewurzelt. Die Datenbank-Zugangsnummern sind in Klammern angegeben. Die Serpene aus *L. fluviatilis* sind rot hervorgehoben.

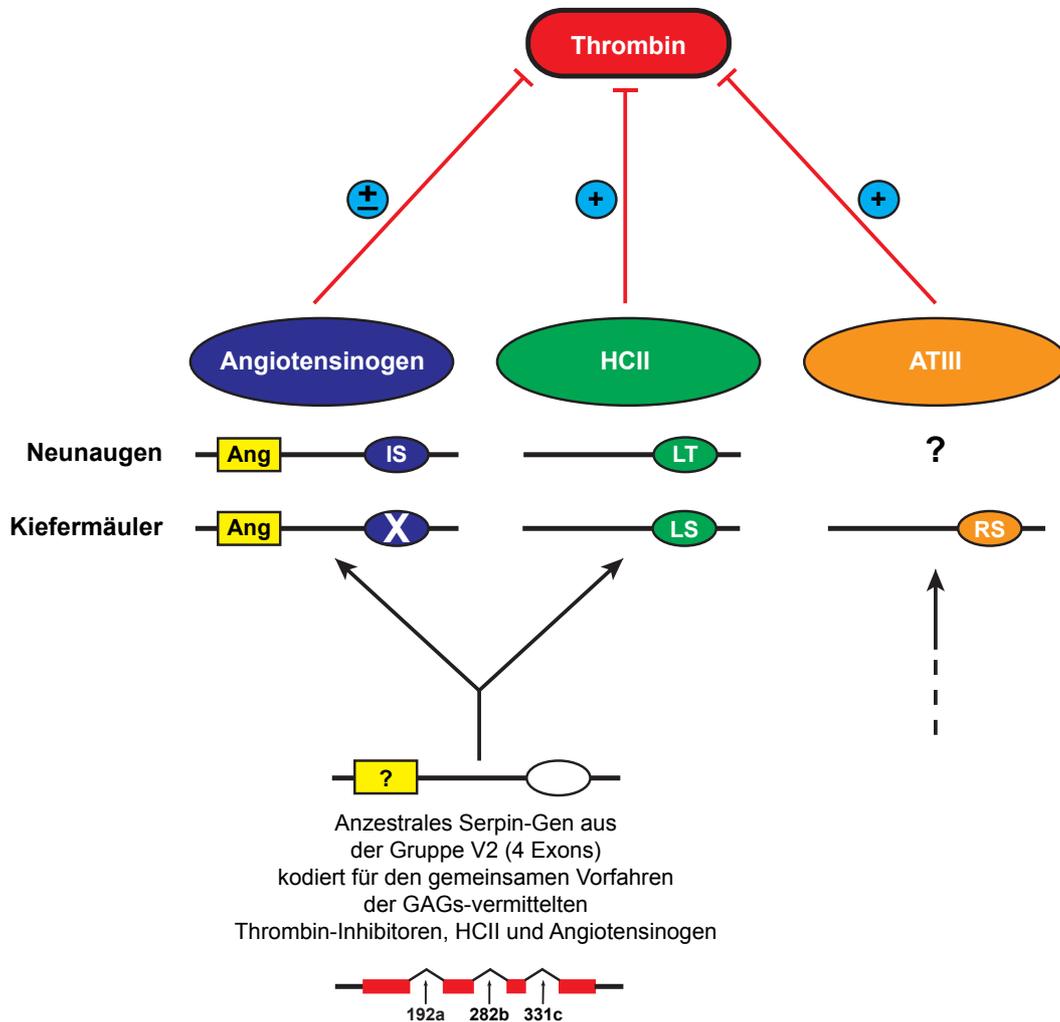


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung der Evolution der Serpin-vermittelten Thrombin-Inhibition. Die Duplikation eines Serpin-Genes mit Thrombin hemmender Aktivität führt zur Entstehung von Angiotensinogen und HCII. Die Thrombin hemmende Aktivität des Angiotensinogens ist in Kiefermäulern (*Gnathostomata*) verloren gegangen, während sie in Neunaugen erhalten blieb. ATIII, welches anscheinend in Neunaugen fehlt, spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Thrombins in Kiefermäulern und ersetzt eventuell damit funktionell das Angiotensinogen. Ob das Angiotensin (Rechteck) bereits Bestandteil des ancestralen Thrombininhibitors war, ist noch unklar. Die Aminosäurereste an der P1-P1'-Position der inhibitorischen RCLs werden in Ovalen mit einem Ein-Buchstaben-Code wiedergegeben. Für die Genstruktur des Vorfahren sind nur die Standard-Introns, die bei allen Serpinen der Gruppe V2 vorhanden sind, dargestellt.

In Neunaugen ist die inhibitorische Aktivität von Angiotensinogen konserviert und Angiotensinogen fungiert hier mit HCII zusammen als Hauptinhibitor des Thrombins. Da Thrombin unter hypernatriämischen Bedingungen aktiviert wird (Di Cera, 2007), könnte Angiotensinogen eventuell Neunaugen vor unangemessener Blutgerinnung im Meerwasser schützen. Zur räuberischen und parasitären Lebensweise besitzen Flussneunaugen ein bezahntes Saugmaul, mit dem sie sich von Blut und Gewebe ihrer Beutefische ernähren (Hardisty, 1983). Es ist jedoch unklar, ob Angiotensinogen bei der Antikoagulation und

der Steigerung des Blutdrucks der Fische zur andauernden Blutversorgung der parasitären Neunaugen eine Rolle spielt.

Im Gegensatz zu den Neunaugen hat das Angiotensinogen der Kiefermäuler die inhibitorische Aktivität verloren, was möglicherweise mit der Änderung des physiologischen Netzwerks zusammenhängt, in dem Thrombin wirkt. Phylogenetische Analysen weisen darauf hin, dass ATIII möglicherweise in den 50 Millionen Jahren nach der Divergenz der Neunaugen in Strahlenflossern (*Actinopterygii, ray-finned fishes*) entstanden ist (Kumar *et al.*, 2013). Außer Thrombin kann ATIII als ein Breitbandinhibitor die Aktivität weiterer Gerinnungsfaktoren wie z. B. die Faktoren FIXa, FXa und FXIa hemmen (Olson *et al.*, 2004). Im Vergleich zum Neunaugen-Angiotensinogen, das Thrombin hoch-selektiv hemmt, fungiert ATIII als Regulator eines komplexeren multifaktoriellen Gerinnungssystems (Abbildung 1.12) viel effizienter. Das Auftreten des Breitbandinhibitors ATIII hat möglicherweise den Verlust der antiproteolytischen Aktivität des Angiotensinogens begünstigt.

4.4 Die Serpine Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2 aus *L. fluviatilis*

Zwei weitere Serpine aus *L. fluviatilis*, Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2, die zur Gruppe V4 gehören, wurden in dieser Arbeit ebenfalls untersucht und charakterisiert. Da Lfl_SpnV4_2 keine inhibitorische Aktivität gegen den getesteten Gerinnungsfaktoren aufweist, wird das Serpin im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter diskutiert. Das Serpin Lfl_SpnV4_1 besteht aus 439 Aminosäuren (Abschnitt 5.2.3), einschließlich eines N-terminalen mutmaßlichen Signalpeptids für die Sekretion. Der Komplextierungstest (Abbildung 3.24(a)) zeigt, dass hFXa eine bevorzugte Zielprotease von Lfl_SpnV4_1 ist. In seinem RCL besitzt dieses Serpin an der mutmaßlichen P1-Stelle ein Arginin, ähnlich wie der FXa-Inhibitor ATIII von Säugetieren (Abbildung 3.22). Bei der Inkubation mit anderen Proteasen (humanes α -Thrombin, Plasmin und Cathepsin G sowie Trypsin und α -Chymotrypsin aus Rinderpankreas) wurde Lfl_SpnV4_1 lediglich mit Trypsin eine geringe Menge an Komplexen nach kurzer Inkubationszeit gebildet. Der Komplex wird jedoch wie das Serpin selbst nach längerer Inkubationszeit degradiert. Um festzustellen, ob Lfl_SpnV4_1 noch andere Serin- bzw. Cysteinproteasen hemmen kann, wäre ein breiter angelegtes *protease-screening* erforderlich. Lfl_SpnV4_1 ist als FXa hemmendes Serpin für das Verständnis der Entwicklung des Blutgerinnungssystems von großer Bedeutung, vor allem da kein ATIII-Gen in Neunaugen vorhanden zu sein scheint.

4.4.1 Herstellung und Reinigung von biologisch aktivem Lfl_SpnV4_1

Um die hFXa hemmende Aktivität des Lfl_SpnV4_1 quantitativ zu charakterisieren, wurde das Serpin als His₍₆₎-Fusionsprotein rekombinant in *E. coli* hergestellt und aufgereinigt. Trotz der Optimierung der Kultivierungsbedingungen lag das rekombinante Protein in IBs vor. Die unlöslichen IBs wurden in 8 M Harnstoff solubilisiert und durch schrittweise Verdünnung rückgefaltet. Dabei ging eine große Menge des Proteins verloren. Das rückgefaltete Protein, das bereits relativ rein vorliegt, war jedoch stark verdünnt. Die nachfolgende Affinitätschromatographische Aufreinigung mittels Ni²⁺-beladener IMAC-Sepharose ermöglichte eine zuverlässige und reproduzierbare Aufkonzentrierung des rückgefalteten Zielproteins. Die Ausbeute von 20 mg/L rekombinantem His₍₆₎-Lfl_SpnV4_1-Fusionsprotein (Abschnitt 3.4.3) liegt im Rahmen dessen, was in einem vergleichbaren Fall erzielt werden konnte (Bird *et al.*, 2004). Wegen fehlender posttranslationaler Modifikationen ist die Molekülmasse des in *E. coli* produzierten Lfl_SpnV4_1 (Abbildung 3.27) ca. 15 kDa kleiner als die des in COS-7-Zellen hergestellten Moleküls (Abbildung 3.23). Die Komplexierung von hFXa mit dem aufgereinigten Lfl_SpnV4_1 (Abbildung 3.28) zeigt ein ähnliches Bandenmuster wie das mit dem in COS-7-Zellen hergestellten Serpin (Abbildung 3.24(a)). Dies bedeutet, dass das bakteriell hergestellte, rückgefaltete und gereinigte Lfl_SpnV4_1 in seiner biologisch aktiven Form vorliegt und die posttranslationalen Modifikationen dieses Serpins keine Rolle für die Hemmung von hFXa spielen. Jedoch ist unbekannt, welcher Anteil des gereinigten Proteins tatsächlich biologisch aktiv ist. Bei der kinetischen Charakterisierung wurden der maximale SI-Grenzwert und die minimale Geschwindigkeitskonstante unter der Annahme bestimmt bzw. berechnet, dass die gesamte Menge des aufgereinigten Serpins aktiv ist.

4.4.2 Lfl_SpnV4_1 ist ein wirksamer Inhibitor von hFXa

Für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Hemmung von Proteasen durch Serpine wurde häufig die *progress-curve*-Methode angewandt (Al-Khunaizi *et al.*, 2002; Oley *et al.*, 2004; Bentele *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008). Mit diesem Verfahren wurde für die Hemmung von hFXa durch Lfl_SpnV4_1 eine hohe apparente Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung ($k_{inh} = 7,68 \pm 1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) ermittelt. Der k_{inh} -Wert könnte tatsächlich höher sein, wenn ein Teil des gereinigten Lfl_SpnV4_1 nicht biologisch aktiv ist.

Die k_{inh} -Werte der Inhibition von hFXa durch die drei verschiedenen Serpine, Lfl_SpnV4_1, humanes ATIII und ZPI, in Ab- und Anwesenheit von Kofaktoren und ohne Zugabe von Phospholipiden, sind in Abbildung 4.10 graphisch dargestellt und in Tabelle 4.1 aufgelistet. In Abwesenheit von Kofaktoren ist der k_{inh} -Wert der Hemmung von hFXa durch Lfl_SpnV4_1 größer als der von humanem ATIII bzw. ZPI. Im Gegensatz zur Inhibition durch humanes ATIII und ZPI haben Heparin und Ca^{2+} nur einen geringen bzw. keinen Effekt auf die Hemmung von hFXa durch Lfl_SpnV4_1. Es scheint daher, dass Lfl_SpnV4_1, ATIII und ZPI den Gerinnungsfaktor FXa auf unterschiedliche Weise hemmen.

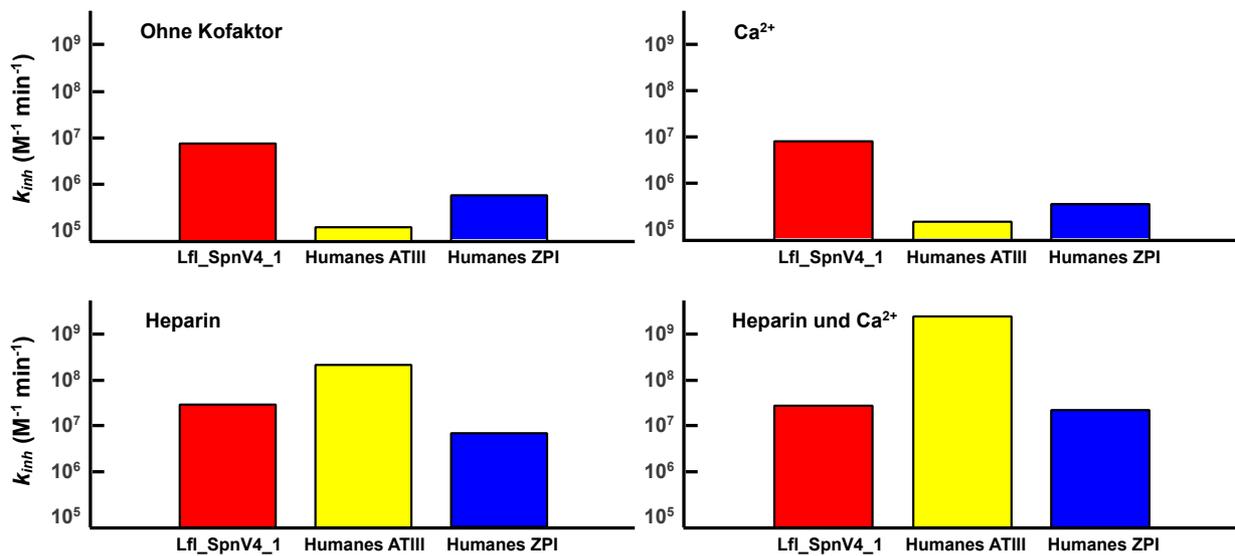


Abbildung 4.10: Graphische Darstellung der k_{inh} -Werte für die Hemmung von hFXa durch Lfl_SpnV4_1, humanes ATIII und ZPI. Die k_{inh} -Werte der Hemmung von hFXa durch Lfl_SpnV4_1, humanes ATIII und ZPI sind in rot, gelb und blau dargestellt. Die Y-Achse ist logarithmisch skaliert.

Tabelle 4.1:
Geschwindigkeitskonstante der Hemmung von hFXa durch Lfl_SpnV4_1, ATIII und ZPI

k_{inh} ($M^{-1} \cdot min^{-1}$)	Kofaktor	Kofaktor			
		–	Ca^{2+}	Heparin	Heparin und Ca^{2+}
Lfl_SpnV4_1		$7,7 \times 10^6$	$8,1 \times 10^6$	$2,8 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$
Humanes ATIII*		$1,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$2,1 \times 10^8$	$2,4 \times 10^9$
Humanes ZPI*		$5,7 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	$6,6 \times 10^6$	$2,2 \times 10^7$

* Die Werte für ATIII und ZPI wurden den Arbeiten von Rezaie (1998) und Huang *et al.* (2011) entnommen.

Ein Sequenzvergleich mit humanem ATIII und ZPI zeigt, dass das Neunaugen-Serpin in den Helices A und D nur wenige basische Aminosäuren enthält (Abbildung 4.11). Dies könnte ein Grund für den geringen Einfluss des Heparins auf die Reaktion zwischen hFXa und Lfl_SpnV4_1 sein.

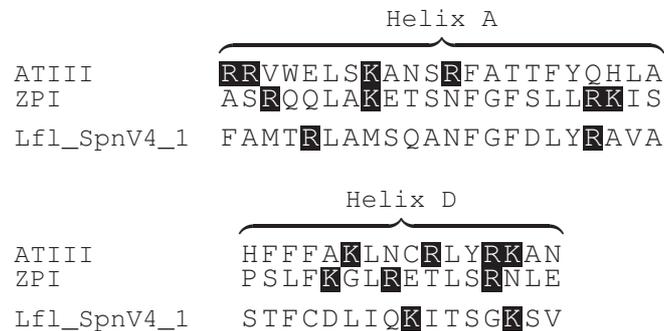


Abbildung 4.11: Vergleich der Helices A und D von Lfl_SpnV4_1, humanem ATIII und ZPI. ATIII: humanes ATIII (NP_000479); ZPI: humaner ZPI (Q9UK55.1). Die basischen Aminosäuren (Arginin und Lysin) sind schwarz hinterlegt. Die Helices A und D beziehen sich auf die Strukturelemente des humanen ATIII.

In Gegenwart von Protein Z, Phospholipiden und Ca^{2+} wird die Reaktionsgeschwindigkeit der Hemmung von hFXa durch ZPI bis zu ca. 2000-fach erhöht (Huang *et al.*, 2010). Um den Hemmungsmechanismus von Lfl_SpnV4_1 abschließend erklären zu können, sind weitere Untersuchungen erforderlich, in denen beispielsweise verschiedene Phospholipide als Kofaktoren für die Interaktion mit hFXa eingesetzt werden.

Ein SI-Wert von 1,9 (Abschnitt 3.4.4) bedeutet, dass ca. zwei Moleküle Lfl_SpnV4_1 benötigt werden, um ein hFXa-Molekül zu inhibieren. Dies stimmt mit dem Ergebnis des Komplexierungstests (Abbildung 3.28) überein, bei dem das Verhältnis der Intensitäten von Komplexbande und gespaltenem Serpin ca. 1 : 1 ist. Dieser Wert ist vergleichbar mit den SI-Werten für die Hemmung von hFXa durch humanes ATIII (Olson *et al.*, 1992) und ZPI (Huang *et al.*, 2010, Huang *et al.*, 2011), die in Abwesenheit von Kofaktoren 1 bzw. 3,6 betragen. Die Reaktion zwischen hFXa und Lfl_SpnV4_1 zeigt somit die Charakteristika physiologisch relevanter Serpin/Protease-Interaktionen, bei denen die k_{inh} -Werte $>10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ sind und die SI-Werte etwa 1 betragen (Al-Khunaizi *et al.*, 2002; Gettins, 2002). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass das Serpin Lfl_SpnV4_1 ein wirksamer und spezifischer Inhibitor von hFXa ist. Der Mechanismus der Inhibition unterscheidet sich wahrscheinlich von der Hemmung durch ATIII und ZPI. Die weitere Analyse des Mechanismus ist daher von großem Interesse.

4.4.3 Lokalisierung des Gens für Lfl_SpnV4_1

Sowohl in Meerneunaugen (Abbildung 3.31) als auch in Flussneunaugen (nicht gezeigt) ist das Gen für SpnV4_1 unmittelbar neben dem HCII-Gen innerhalb eines Introns des 72 kb großen PI4KA-Gens lokalisiert. Die Syntenie der Gene für HCII und PI4KA ist in Menschen und anderen Vertebraten konserviert (Kumar, 2010), während kein SpnV4_1-Ortholog in den untersuchten Kiefernäulern identifiziert wurde. Das Überleben dieses Serpins in Neunaugen bietet einen Einblick in die Entwicklungsgeschichte der Vertebraten-Serpine. Die Nachbarschaft der Neunaugen-Gene für HCII und SpnV4_1 unterstützt die auf den Genstrukturen basierende Klassifikation und das Evolutionsmodell der Vertebraten-Serpine (Ragg *et al.*, 2001). Diese Klassifikation (Tabelle 1.1) und das Evolutionsmodell (Abbildung 1.8) deuten darauf hin, dass die Gruppe V2, zu deren Mitgliedern HCII und Angiotensinogen zählen, und die Gruppe V4, zu der das Serpin Lfl_SpnV4_1 gehört, miteinander verwandt sind. Vermutlich entstanden die Gruppen V2 und V4 aus einem gemeinsamen Vorfahren, welcher ein Intron an der Position 192a enthielt (Ragg *et al.*, 2001). Kolo-kalisation von Paralogen ist häufig das Ergebnis lokaler Genverdopplungen beispielsweise infolge eines ungleichen *crossing-overs* bzw. eines ungleichen Schwesterchromatidaustauschs (Zhang, 2003; Brown, 2007). Die ursprünglichen V2- und V4-Serpine können eventuell durch Genverdopplung des gemeinsamen Vorfahren und Introninsertionen sowie Ansammlung von Mutationen entstanden sein.

4.5 Die Regulation der Blutgerinnung ursprünglicher Vertebraten

Ein hypothetisches Blutgerinnungssystem in Neunaugen wurde bereits mithilfe der bioinformatischen Analyse vorgeschlagen (Doolittle *et al.*, 2008; Doolittle, 2009; Ponczek *et al.*, 2012) und in Abbildung 1.13 schematisch dargestellt. Wie die Blutgerinnungsenzyme, insbesondere die beiden Schlüsselfaktoren Thrombin und FXa, in den ursprünglichen Vertebraten reguliert werden, war jedoch nicht bekannt. Die Untersuchungen dieser Arbeit liefern Informationen zur Rolle von Serpinen als Regulatoren der Blutgerinnungsenzyme und als Vorläufer von Effektor-Peptiden für die Blutdruck-Modulation bei dem ursprünglichen Vertebraten *L. fluviatilis*. Mit den hier beschriebenen experimentellen Analysen der gerinnungshemmenden Serpine kann ein Proteinnetzwerk rekonstruiert werden, das vermutlich das hämostatische System der ursprünglichen Vertebraten konstituiert hat (Abbildung 4.12).

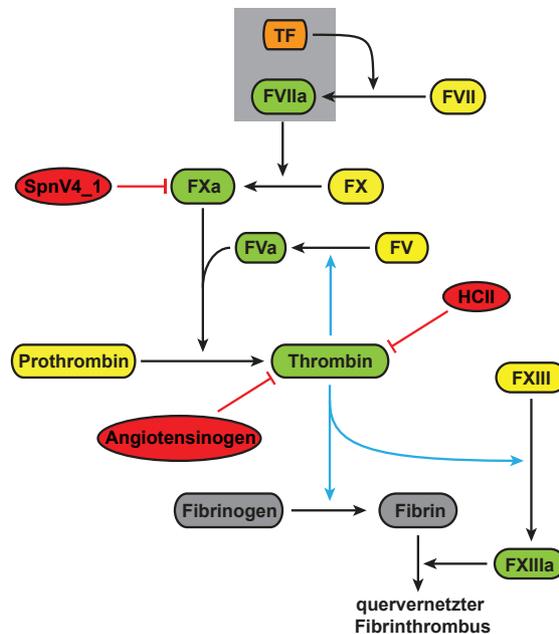


Abbildung 4.12: Serpine und ihre Rolle bei der Blutgerinnung ursprünglicher Vertebraten. Angiotensinogen, HCII und ein SpnV4_1-ähnliches Serpin werden als Hauptregulatoren des ursprünglichen Blutgerinnungssystems vorgeschlagen. Die ancestrale Blutgerinnungskaskade (Abbildung 1.13), die in dem letzten gemeinsamen Vorfahren der kieferlosen Fische und der Kiefermäuler vorhanden war, basiert auf den von Doolittle und Ponczek vorgeschlagenen Schemen (Doolittle *et al.*, 2008; Doolittle, 2009; Ponczek *et al.*, 2012). Das Blutgerinnungssystem der Säugetiere und die entsprechenden Inhibitoren von Thrombin und FXa sind zum Vergleich in Abbildung 1.12 dargestellt.

Das Vorkommen von HCII und Angiotensinogen sowohl in Neunaugen als auch in Kiefermäulern deutet darauf hin, dass diese Serpine bereits seit über 500 Millionen Jahren existieren. Die Kolo-kalisation von HCII und SpnV4_1 im Genom von Neunaugen spricht ebenfalls für die lange Existenz des SpnV4_1-Gens. Wie ihre biochemische Aktivität nahelegt, waren diese drei Serpine an der Regulation der ursprünglichen Blutgerinnungskaskade beteiligt. In Kiefermäulern bleibt jedoch nur eines dieser Serpine, HCII, funktionell unverändert. Lfl_SpnV4_1 wurde anhand seiner biochemischen Parameter als wirksamer und selektiver Inhibitor von FXa. Anscheinend ging das SpnV4_1-Gen mit der FXa hemmenden Aktivität entlang der Radiation der Kiefermäuler verloren. Erstaunlicherweise besitzt das Neunaugen-Angiotensinogen im Gegensatz zu seinen Orthologen aus Kiefermäulern eine gerinnungshemmende Aktivität. Heparin und Heparansulfat können die Reaktion der Hemmung von Thrombin mit einer glockenförmigen Dosisabhängigkeit erheblich aktivieren und stimulieren. Die Präferenz für unterschiedliche GAGs weist darauf hin, dass Angiotensinogen und HCII als ancestrale Inhibitoren des Thrombins möglicherweise unterschiedliche Rollen bei der Physiologie dieser Protease in Neunaugen spielen. Die drei Serpine zusammen könnten ursprünglich die Aufgaben erfüllen, die

bei Kiefermäulern vor allem der Breitbandinhibitor ATIII übernimmt (Abbildung 1.12). Das ATIII-Gen ist vermutlich nach der Divergenz der Neunaugen entstanden. Sein Auftreten hat möglicherweise das Verschwinden des SpnV4_1-Gens und wie bereits erwähnt den Verlust der Thrombin-hemmenden Aktivität des Angiotensinogens in Kiefermäulern begünstigt.

Bei Säugetieren greifen Blutgerinnungssystem und Blutdruckregulation durch mehrere Verbindungen, einschließlich Endothelin und Bradykinin, ineinander. Einige Bestandteile des Gerinnungssystems bei den Säugetieren könnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf den vaskulären Tonus wirken (Siller-Matula *et al.*, 2011). Zum Beispiel ist HCII in der Lage die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) im Menschen zu stimulieren (Huang *et al.*, 2007) und die endotheliale-Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)-Signalkaskade zu aktivieren (Ikeda *et al.*, 2012). Der Ursprung dieser Verknüpfungen ist jedoch weitgehend unbekannt. Als Vorläuferprotein der Angiotensin-Peptide (Abschnitt 4.1) und Inhibitor des Thrombins (Abschnitt 4.2) zeigt das Neunaugen-Angiotensinogen eine weitere Verbindung zwischen Blutgerinnung und Blutdruckregulation der Vertebraten auf. Es scheint, dass bereits früh in der Vertebratenevolution eine Reihe von Serpinen entwickelt wurde, die die prokoagulatorische Kaskade mit der Blutdruckregulation verknüpft haben. Diese Vernetzung der beiden Systeme durch Angiotensinogen wurde anschließend in Kiefermäulern entkoppelt. Im Vergleich zu den ursprünglichen Vertebraten sind die beiden Systeme in Kiefermäulern viel komplexer geworden und Angiotensinogen allein scheint für beide Systeme nicht spezifisch bzw. effizient genug zu sein. Dies könnte der Grund für den Verlust der Thrombin hemmenden Aktivität des Angiotensinogens sein, die in Kiefermäulern durch ATIII übernommen wurde.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit gelang es vier Serpine aus dem Flussneunauge zu charakterisieren. Drei davon scheinen eine Rolle in der Blutgerinnungskaskade zu spielen. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit einige zentrale Fragen geklärt wurden, müssen zur vollständigen Aufklärung der Entwicklung des Blutgerinnungssystems sowie zur Funktion und Prozessierung der einzelnen Serpine in Neunaugen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Im Gegensatz zu allen bisher charakterisierten Orthologen ist das Neunaugen-Angiotensinogen das einzige, das GAG-bindende und Thrombin hemmende Aktivität besitzt. Es ist daher interessant den biochemischen Mechanismus der Hemmung von Thrombin durch Neunaugen-Angiotensinogen genauer zu untersuchen. Dazu gehört die Identifizierung der GAG-Bindungsstelle des Angiotensinogens, die durch systematische Punktmutationen und Heparin-Affinitätschromatographie charakterisiert werden könnte. Darüber hinaus sollte der Effekt von Heparinmolekülen unterschiedlicher Länge auf die Reaktionsgeschwindigkeit untersucht werden. Damit kann eventuell geklärt werden, ob die Konformation von Angiotensinogen durch die Bindung an Heparin verändert wird und ob lediglich der Brücken-Mechanismus oder ob der allosterische Mechanismus ebenfalls zur Reaktionsbeschleunigung durch Heparin beiträgt. Die Interaktion von Angiotensinogen aus *L. fluviatilis* wurde nur mit humanem α -Thrombin untersucht. Die mRNA-Sequenz von Prothrombin des japanischen Neunauges (NCBI-Datenbank-Zugangsnummer.: BAG66074) und der 3'-Bereich der cDNA-Sequenz von Prothrombin des Flussneunauges (Daten nicht gezeigt) wurden bereits identifiziert. Deshalb wäre es interessant, die Hemmung von Thrombin aus Neunaugen durch Angiotensinogen in Gegenwart Organismus-eigener Kofaktoren zu charakterisieren. Im Vergleich zum Angiotensinogen in Menschen und Mäusen weist Neunaugen-Angiotensinogen sowohl bei den biochemischen Eigenschaften als auch der vorhergesagten Tertiärstruktur erhebliche Unterschiede auf. Die Funktionen von Proteinen werden durch ihre räumliche Struktur bedingt. Zum besseren Verständnis der Funktionen des Neunaugen-Angiotensinogens ist die Bestimmung seiner Tertiärstruktur von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass das Peptid Lfl_Ang II mit dem Rezeptor LfAGTR1 aus *L. fluviatilis* interagiert. Die Untersuchungen wurden jedoch nur mit einem Peptid durchgeführt, das am N-Terminus zusätzlich fünf Aminosäurereste (EEDYD) verglichen mit dem klassischen Angiotensin II aus Kiefernäulern besitzt. Dies gibt Anlass zu einigen neuen Fragen, z. B. ob bzw. welche Funktion diese fünf Aminosäuren haben und über welchen

Mechanismus der Rezeptor durch das Lfl_Ang II-Peptid aktiviert wird. Besonders interessant ist die Frage, welche Prozesse bzw. welche Zellreaktionen nach Aktivierung des Rezeptors stattfinden. Weil bisher keine Orthologen von Renin im Genom von Meerneunaugen gefunden wurden, wäre es ebenfalls interessant zu untersuchen, wie Angiotensin-Peptide in Neunaugen entstehen bzw. über welche Proteasen Angiotensin-Peptide aus dem Vorläufer abgespalten werden. Ein ACE1-Gen scheint in Neunaugen vorhanden zu sein. Ob ACE bzw. andere Enzyme für die Entstehung des Lfl_Ang II-Peptids essentiell sind, bleibt ebenfalls unbekannt. Die Klärung dieser Fragen ist für das Verständnis der Regulierung des Blutdrucks, der Kontrolle des Wasserverlusts in Neunaugen und der Entstehung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) in Vertebraten von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde erstmalig ein FXa hemmendes Serpin, Lfl_SpnV4_1, aus Neunaugen identifiziert und charakterisiert. Heparin und Ca^{2+} -Ionen spielen keine wesentliche Rolle für die Reaktion, während sie für die Inhibition durch ATIII und ZPI in Kiefernäulern als wichtige Kofaktoren dienen. Es sollte vor allem geklärt werden, ob bzw. welche Kofaktoren, die Lfl_SpnV4_1 vermittelte FXa Inhibierungsreaktion beschleunigen und wie diese Kofaktoren mit dem Inhibitor und der Protease interagieren können.

Kapitel 5

Anhang

5.1 Materiallisten

5.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Materialien und Geräte

In den folgenden Tabellen sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Materialien, Chemikalien, Kits, Größenstandards, Enzyme, Primer, Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper sowie die verwendeten Software aufgelistet.

Tabelle 5.1: Chemikalien/Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller/Lieferant (ggf. Kat.-Nr.)
Acrylamid-/Bis-Lösung 29 : 1, 40 %	Sigma-Aldrich (A7802)
Agar	Sigma-Aldrich (A7002-500G)
Agarose Basic	Appllichem GmbH (A8963,1000)
Agarose peqGOLD Universal-Agarose	PeQlab Biotechnologie GmbH (35-1020)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (A9164)
Ammoniumthiocyanat	Roth (4477.1)
Ampicillin	Roth (K029.2)
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA (K51-001)
BSA Standard (2 mg/mL)	Pierce Biotechnology (23209)
Bromphenolblau	Serva (15375.01)
Chloroform	Merck (1024452500)
Coomassie PhastGel Blue R-350 Tabletten	GE Healthcare (17-0518-01)
Coomassie Protein Assay Reagent	Pierce Biotechnology (23200)
Dermatansulfat	Sigma-Aldrich (C3788)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth (K028.2)
4-6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Serva (18860.01)
Dimethylsulfoxid (DMSO), p.a.	Fisher Scientific (D/4121/PB15)
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	VWR (444425M)
DMEM-Medium	PAA (E15-843)
Entwickler (Kodak) für Röntgenfilme	Hartenstein (GBXE)
Essigsäure, p.a.	VWR (20104.298)
Essigsäure (technisch)	Chemikalienlager, Universität Bielefeld
Ethanol, p.a.	VWR (20821.296)
Ethanol (technisch)	Chemikalienlager, Universität Bielefeld
Ethidiumbromid	Roth (7870.2)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth (8043.2)
Fixierer (Kodak) für Röntgenfilme	Hartenstein (GBXF)
Formaldehyd	Roth (4979.1)
Formamid	Sigma-Aldrich (F-9037)
Glucose	Novartis NBx BPD (1AQ 114693)

Tabelle 5.1: (Fortsetzung)

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller/Lieferant (ggf. Kat.-Nr.)
Glutathion (reduziert)	Sigma-Aldrich (G4705)
Glutathion Sepharose™ 4B	GE Healthcare (17-0756-01)
Glycerin (≥ 86 %)	Roth (4043.1)
Glycerin (wasserfrei)	Roth (7530.1)
Glycin	Roth (3908.2)
Glykogen	Thermo Scientific (R0561)
Guanidiniumthiocyanat	Roth (0017.1)
Harnstoff	Roth (3941.1)
Heparansulfat	Sigma-Aldrich (H7640)
Heparin	Sigma-Aldrich (H3393)
Hepes	Roth (9105.4)
Hydrochloric acid (HCl) 37 %	VWR (20252.290)
Hygromycin B Solution (50 mg/ml)	PAA (P02-015)
IGEPAL® CA-630 (Nonidet® P-40)	Fluka (56741-50ML-F)
Imidazol	Merck (1047160250)
Isopropanol, p.a.	VWR (20842.312)
Isopropanol (technisch)	Chemikalienlager, Universität Bielefeld
Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Sigma-Aldrich (I5502)
Kaliumacetat, p.a.	Roth (T874.2)
Kaliumchlorid (KCl)	VWR (26764.298)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Fluka (60220-2.5KG)
LB Medium (Lennox L Broth Base)	Roth (X964.3)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (M7154)
Methanol, p.a.	VWR (20847.295)
Methanol (technisch)	Chemikalienlager, Universität Bielefeld
MOPS	A.Hartenstein (CM30)
Natriumacetat (NaAc)	VWR (27653.292)
Natriumchlorid (NaCl)	VWR (27810.295)
Natriumhydroxid	VWR (28244.295)
Natriumdeoxycholat	Fluka (30970-100G)
Nickel(II)-acetat	Chemikalienlager, Universität Bielefeld
PageBlue™ Protein Staining Solution	Thermo Scientific (24620)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth (6367.2)
Phosphorsäure 85 % (H ₃ PO ₄)	VWR (20626.292)
Polyethylenglycol (PEG 8000)	Sigma-Aldrich (P4463)
Polyethylenimin (PEI), Linear (MW 25,000)	Polysciences Inc. (23966)
Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-frei)	Roche (11873580001)
Proteinase K	Thermo Scientific (E00491)
Roti®-Aqua-Phenol	Roth (A980.1)
Roti®-Chloroform/Isoamylalkohol(24/1)	Roth (X984.2)
Roti®-Phenol (TE-gesättigt)	Roth (0038.2)
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	Roth (4360.2)
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka (87687)
TMR-Lfl_Ang II (TMR-EEDYDERPYMQPF)	GenScript USA Inc.
Trypsin-EDTA Lösung	PAA (L11-004)

Tabelle 5.1: (Fortsetzung)

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller/Lieferant (ggf. Kat.-Nr.)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth (AE15.2)
Tris-Base	Sigma-Aldrich (T1503-1KG)
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich (T8787-100ML)
Tween® 20	Roth (9127.2)
WEST-ZOL® Western Blot Detection System	iNtRON Biotechnology (16021)
Zitronensäure (Monohydrat)	Merck (1002441000)

Tabelle 5.2: Materialien

Material	Hersteller/Lieferant (ggf. Kat.-Nr.)
Amicon® Ultra 4mL Filter für Proteinpurifikation	Merck Millipore (UFC801024)
Blotting-Filterpapier	Hartenstein (F595)
CellStar® Tissue Culture Flasks (25 cm ²)	Greiner Bio-one (690160)
Cell Culture Flasks (75 cm ² ; 175 cm ²)	PAA (PAA70075; PAA71175)
Einmal-Reaktionsgefäß (0,2 mL; 0,5 mL)	StarLab (I1402-8100; S1605-0000)
Einmal-Reaktionsgefäß (1,5 mL; 2 mL)	StarLab (S1620-2700; S1615-5500)
Einmal-Spritzen BD Discardit™ II (10 mL; 20 mL)	Hartenstein (SE14; SE15)
Faltenfilter	Chemikalienlager, Universität Bielefeld
Folie zum Einschweißen von SDS-Gelen	Leonhard Fuss Ltd & Co. KG
GE XK 16/40 Column	GE Healthcare (28-9889-38)
Gelloader Pipettenspitzen (1-200 µL)	Hartenstein (GS21)
HiTrap™ Heparin HP Column (1 mL; 5 mL)	GE Healthcare (17-0406-01; 17-0407-01)
IMAC Sepharose™ 6 Fast Flow	GE Healthcare (17-0921-07)
Kryoröhrchen, steril, Typ CryoGen™	Hartenstein (KT18)
Küvetten ratiolab®	Hartenstein (KEHM)
Lab-Tek® II Chambered #1.5 German Coverglass System	Thermo Scientific (155409)
Laborglasflaschen Duran® (25-2000 mL)	Schott Duran
Nitrilhandschuhe	StarLab
Parafilm "M"® Laboratory Film	Chemikalienlager, Universität Bielefeld
Petrischalen	PAA (PAA10090X)
Pipettenspitzen (20 µL; 200 µL)	StarLab (S1110-3000; S1111-1006)
Pipettenspitzen (1000 µL; 5000 µL)	StarLab (S1111-2021; I1053-0000)
Präzisionswischtücher Kimtech Science	Kimberly-Clark Professional®
PVDF-Membran Roti®	Roth (T830.1)
Q Sepharose™ Fast Flow	GE Healthcare (17-0510-10)
Röntgenfilm Fuji Super RX	Hartenstein (RF12)
Skalpellschaber Typ Bayha, unsteril	Hartenstein (SI23)
Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassettes	Pierce (MWCO 3,5 kDa)
Sterilfilter Minisart® (0,2 µm)	Hartenstein (FI02)
Sterilfilter PTFE (0,45 µm)	IBS Integra Biosciences (153015)
Tissue culture Dish (9 cm ²)	SARSTEDT (83.1800)
Zellschaber	PAA (PAA90030)
Zentrifugenröhrchen (15; 50 mL)	Hartenstein (ZR97; ZR82)

Tabelle 5.3: Geräte

Gerät	Hersteller/Lieferant (ggf. Kat.-Nr.)
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Arbeitsgruppe Ragg, Technische Fakultät der Universität Bielefeld
Autoklav Typ GE66	Getinge (6200101)
Autoklav Typ FVS 2	IBS Integra Biosciences (4303E)
Brutschrank Typ B 6120	Heraeus Instruments
CO ₂ -Inkubator Model 311	Forma Scientific Inc. (78561-599)
Durchlauf Trockner RCD 3200 Durst	Phototechnik GmbH
Eismaschine	Ziegra (883862)
Elektrophorese-System Mini-PROTEAN®	Bio-Rad (165-3301)
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss AG (76931)
FPLC-Anlage ÄKTA Purifier	GE Healthcare
Freezer (für -80 °C)	SANYO (MDF-393)
Gel Documentation Systems	Viber Lourmat (DP-CF-011.C)
Geltrockner Gel Dryer Model 583	Bio-Rad (165-1746)
Inversmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG (660449)
Konfokal Mikroskop Zeiss LSM780	Carl Zeiss AG
Kryotank Chronas Biosafe 350	Messer Group GmbH
Kühlzentrifuge Biofuge 28RS	Heraeus Sepatech (3650)
Kühlzentrifuge Biofuge fresco 17	Thermo Scientific (75002421)
Kühlzentrifuge RC5C, Rotor SS-34	Sorvall Instruments, DuPont
Zeiss LSM780 Inverted Confocal Microscope	Carl Zeiss
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph
Mikrowelle 800 W	Siemens
Mikrowelle NN-E201 WM	Hartenstein (LMW1)
Milli-Q®-Anlage	Merck Millipore
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad (170-3930)
NanoPhotometer™ P 300	Implen GmbH
pH-Meter InoLab pH Level 1	WTW GmbH
Pipettierhilfe Pipetboy comfort	IBS Integra Biosciences
Pipette Research	Eppendorf
Pipette Reference	Eppendorf
Pipette Ergo One, steril	StarLab
Roller-Dreheinrichtung	Incudrive Schuett-biotec GmbH
Röntgenkassette (24 × 30 cm)	Hartenstein
Schüttler Certomat R®	Braun Biotech International
Schüttler Certomat U®	Braun Biotech International
Schüttler Duomax 1030	Heidolph instruments
Schüttler Minirocker MR1	PeQlab Biotechnologie GmbH (90-MR-1)
Schüttler Polymax 1040	Heidolph instruments
SNAP i.d.® Protein Detection System	Merck Millipore
Spannungsgeber EV231 Electrophoresis Power Supply	Consort (101054)
Spannungsgeber Power Pac™ Basic	Bio-Rad (164-5050)
Sterilbank LaminaAir HB 2448	Heraeus Instruments
Thermoblock Cooling-Heating Thermostat CH-100	PeQlab Biotechnologie GmbH (90-CH-100)
Thermoblock TB1	Biometra® (051-200)

Tabelle 5.3: (Fortsetzung)

Gerät	Hersteller/Lieferant (ggf. Kat.-Nr.)
Thermocell Cooling & Heating Block CHB-202	BIOER Technology
Thermostat 5320	Eppendorf
Thermocycler peqSTAR 96 Universalgradient	PeQlab Biotechnologie GmbH (95-96002)
Thermocycler Primus 96 Thermocycler	MWG-Biotech
Thermocycler Progene Thermal Cycler	TECHNE AG
Thermocycler Thermoblock T-Gradient	Biometra (1611382)
Ultraschalldesintegrator Sonifier® 450	Branson
Ultraviolet sterilizing PCR Workstation	PeQlab Biotechnologie GmbH
UV-Tisch ECX-F20.M	Hartenstein (10103260)
Vakuumpumpe	Merck Millipore
Vakuumpumpe mit Kältefalle KF-2-60	Bachofer
Vortex-Mixer Genie® 2	Scientific industries, Inc.
Waage, analytisch, CP224S	Sartorius
Waage, universal, PCB 4000	KERN & Sohn GmbH
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus (75003490)
Zentrifuge Pico 17	Thermo Scientific (75002411)

5.1.2 Primer

Alle Primer wurden von der Firma Life Technologies™ (Invitrogen™) bezogen.

Tabelle 5.4: Genspezifische Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')
AngioBamHI_neu	TGCGGGGATCCATGTGAAGTGTGTCATCACTGCT
Ang_LampZuHum_f	CTACGACGATCGGGTCTACATCCACCCCTTCC
Ang_LampZuHum_r	GGAAGGGGTGGATGTAGACCCGATCGTCGTAG
LampAngio_HindIII_ATG	GGTACCAAGCTTATGAAGCTCTTCATCGTCCTCCTG
LampAng_KpnI_oSP	GCCTCAGGTACCGAACGGCCCTACATGCAGCCCTTC
Lang_c-Myc_BamHI_1	GATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCCTGCTTGGGATCTGCCAC
Lang_c-Myc_BamHI_2	GTGCGGGGATCCTCAAAGATCCTCTTCTGAGATG
LfAng-Y24F-f	GAAGAGGACTTCGACGAACGGCCC
LfAng-Y24F-r	GGGCCGTTCGTGCGAAGTCCCTCTTC
LampHCII_oSP_BamHI	AGCCCTGGATCCCAAGACCAAACCAAGACAGCTG
HCII_r1	ACCTCCGAATTCTCAGTTCTTAGCTGGGTTGG
Ndel-His-Haem+	TCTCGCCATATGCACCATCACCATCACCATTACCCCTATGATGTTCC
SpnV4_1_osp_KpnI+	AAGGCGGGTACCTCAAGAAATAAACACAAGG
SpnV4_1_BamHI-	AATCGGGGATCCAATCAGTGCCCTGTGG
SpnV4_2_osp_KpnI+	AAGGCGGGTACCGACCATCACGGGCGCACAAG
SpnV4_2_BamHI-	AACGCAGGATCCCTAATGATGATGCTTCTTTCCCTCC
SpnV4_2_ATG_HindIII+	ATCACGAAGCTTATGGCTCGCCTTTCCCTCTC

Tabelle 5.5: Primer für Sequenzierreaktionen

Primer	Sequenz (5' → 3')	Kommentar
M13for	GTAAAACGACGGCCAG	Flankieren die MCS von pCR [®] 4_Topo [®]
M13rev	CAGGAAACAGCTATGAC	
pcDNA+	TCTGGCTAACTAGAGAACC	Flankieren die MCS von pcDNA3.1(+)
pcDNA-	GCTGGCAACTAGAAGGCA	
pJet1.2+	CRACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Flankieren die MCS von pJet1.2/blunt
pJet1.2-	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	
pKM263+	TAATACGACTCACTATAGG	Flankieren die MCS von pKM263
pKM263-	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	

5.1.3 Kits und DNA- bzw. Protein-Marker

Tabelle 5.6: Kits

Kit	Hersteller/Lieferant (ggf. Kat.-Nr.)
CloneJET [™] PCR Cloning Kit	Thermo Scientific (K1231)
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific (K1611)
GeneJET [™] Gel Extraction Kit	Thermo Scientific (K0692)
GeneJET [™] PCR Purification Kit	Thermo Scientific (K0701)
GeneJET [™] Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific (K0503)
TOPO TA Cloning [®] Kit for Sequencing	Life Technologies [™] (K4575-02)

Tabelle 5.7: DNA- und Protein-Marker

DNA-Längenstandards	Hersteller/Lieferant (ggf. Kat.-Nr.)
GeneRuler [™] 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific (SM0311)
GeneRuler [™] 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific (SM0241)
HMW-SDS Marker Kit	GE Healthcare (17-0615-01)
LMW-SDS Marker Kit	GE Healthcare (17-0446-01)
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific (26612)

5.1.4 Antikörper

Tabelle 5.8: Antikörper

Antikörper	Hersteller/Lieferant (ggf. Kat.-Nr.)
Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Antibody	GE Healthcare (NA934)
Angiotensin (N-10)	Santa Cruz Biotechnology (sc-7419)
Anti-c-myc Antibody	Sigma-Aldrich (C3956)
Anti-HA antibody produced in rabbit	Sigma-Aldrich (H6908-.5ML)
Anti-Mouse IgG, HRP-linked Antibody	New England Biolabs. Inc. (7076S)
Anti-Sulfotyrosine, clone Sulfo-1C-A2	Millipore (05-1100X)
Monoclonal Anti-Goat/Sheep IgG-Peroxidase antibody	Sigma-Aldrich (A9452-1VL)

5.1.5 Enzyme, Proteasen, Substrate und Inhibitoren

Tabelle 5.9: Enzyme

Enzyme	Hersteller/Lieferant (ggf. Kat.-Nr.)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (recombinant)	Thermo Scientific (EP0501)
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs. Inc. (M0530S)
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs. Inc. (M0491S)
q-Taq DNA Polymerase	qARTA Bio, Inc. (QT-S)
Taq DNA Polymerase with ThermoPol® Buffer	New England Biolabs. Inc. (M0267S)
Taq DNA Polymerase	PeQlab Biotechnologie GmbH (01-1010)
Restriktionsendonuklease <i>Bam</i> HI	Thermo Scientific (ER0051)
Restriktionsendonuklease <i>Dpn</i> I	Thermo Scientific (ER1701)
Restriktionsendonuklease <i>Eco</i> RI	Thermo Scientific (ER0271)
Restriktionsendonuklease <i>Hind</i> III	Thermo Scientific (ER0501)
Restriktionsendonuklease <i>Kpn</i> I	Thermo Scientific (ER0521)
Restriktionsendonuklease <i>Nde</i> I	Thermo Scientific (ER0581)
Restriktionsendonuklease <i>Xba</i> I	Thermo Scientific (ER0681)
T4-DNA Ligase	New England Biolabs. Inc. (M0202S)

Tabelle 5.10: Serin- und Cysteinproteasen

Proteasen	Hersteller/Lieferant (ggf. Kat.-Nr.)
Cathepsin G (from human leukocytes)	Sigma-Aldrich (C4428)
α -Chymotrypsin (from bovine pancreas)	Sigma-Aldrich (C3142)
Human Faktor Xa	Enzyme Research Laboratories (HFXa)
Plasmin (from human plasma)	Sigma-Aldrich (P1867)
α -Thrombin (from human plasma)	Sigma-Aldrich (T1063)
Trypsin (from bovine pancreas)	Sigma-Aldrich (T8003)

Tabelle 5.11: Substrate und Inhibitoren

Substrate und Inhibitoren	Hersteller (ggf. Kat.-Nr.)
Chromozym TH (Tosyl-Gly-Pro-Arg-4-nitranilide acetate)	Roche (10 206 849 001)
Human Antithrombin III (ATIII)	Sigma-Aldrich (A2221)
PPACK (H-D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketon)	Bachem (N-1065)
S-2222™ (Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA)	Chromogenix

5.1.6 Bakterienstämme, Zelllinien und Kulturmedien

Alle Medien wurden in dH₂O angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert. Nach Abkühlen der autoklavierten Lösungen wurden Antibiotika zugesetzt.

Tabelle 5.12: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)</i> 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> λ-	Life Technologies
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Novagen

Tabelle 5.13: Medien für die bakterielle Kultivierung

Medium	Zusammensetzung
LB-Flüssigmedium	20 g LB Medium (Lennox L Broth Base) auf 1 L
LB-Amp-Flüssigmedium	LB-Flüssigmedium mit 100 µg/mL Ampicillin
LB-Kan-Flüssigmedium	LB-Flüssigmedium mit 30 µg/mL Kanamycin
LB-Agar-Amp	LB-Medium mit 15 g/L Agar und 100 µg/mL Ampicillin
LB-Agar-kan	LB-Medium mit 15 g/L Agar und 30 µg/mL Kanamycin
SOC-Medium	20 g/L Trypton; 5 g/L Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 10 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ und 20 mM Glukose

Tabelle 5.14: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
COS-7	<i>Cercopithecus aethiops</i> , <u>origin-defective SV-40</u> , Fibroblasten-Zelllinie aus Nierengewebe von Grünen Meerkatzen (<i>Cercopithecus aethiops</i>), die stabil mit einer Mutante des SV40-Virus transformiert wurden (Gluzman, 1981).	ATCC #CRL1651
HEK-293-wt	Wildtyp von <u>Human Embryonic Kidney</u> Zellen, menschliche embryonale Nierenzellen, die durch das menschliche Adenovirus 5 transformiert wurden (Graham <i>et al.</i> , 1977).	AG Dierks, Universität Bielefeld
HEK-293-EBNA	Variante der HEK-293-Zellen, die das EBNA-1 Gen des Epstein-Barr-Virus exprimiert.	AG Frey, Universität Bielefeld

Tabelle 5.15: Medien zur Kultivierung von Zelllinien

Zelllinie	Medium (Hersteller bzw. Lieferant, Bestell-Nr.)
COS-7 und HEK-293-wt (nicht transfiziert)	DMEM-Medium (PAA, E15-843) 10 % FCS, v/v (PAA, A15-105)
HEK-293-wt (mit pcDNA3.1 Plasmiden transfiziert)	DMEM-Medium, 10 % FCS, v/v 400-700 µg/mL G418 (PAA, P11-012)
HEK-293-EBNA (nicht transfiziert)	DMEM-Medium, 10 % FCS, v/v 250 µg/mL G418
HEK-293-EBNA (mit pCEP4 Plasmiden transfiziert)	DMEM-Medium, 10 % FCS, v/v 250 µg/mL G418 400 µg/mL Hygromycin B (PAA, P02-015)

5.1.7 Programme und Datenbanken

Tabelle 5.16: Computer-Programme

Programm	Verwendungszweck	Webadresse
blast	Suche homologer Proteine	blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Clone Manager 8	Entwicklung der Klonierungsstrategie	www.scied.com/
Clustal Omega	Protein-/DNA-Alignments	www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
ClustalW2	Protein-/DNA-Alignments	www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
Compute pl/Mw	Ermittlung der Molekülmasse und des pI-Werts eines Proteins	web.expasy.org/compute_pi/
Fiji (ImageJ)	Bildbearbeitung und Bildverarbeitung	fiji.sc/Fiji
GeneDoc	Darstellung von Sequenzalignments	www.nrbsc.org/gfx/genedoc/
HMMTOP	Vorhersage von Transmembrandomänen	www.enzim.hu/hmmtop/html/adv_submit.html
I-TASSER	Protein-Modellierung	zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/
NEBcutter V2.0	Ermittlung von Restriktionsschnittstellen	tools.neb.com/NEBcutter2/index.php
NetNGlyc 1.0	Vorhersage von N-Glykosylierungsstellen	www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/
NGlycPred	Vorhersage von N-Glykosylierungsstellen	exon.niaid.nih.gov/nglycpred/
MEGA	Stammbaumerstellung	www.megasoftware.net/
Molecular Toolkit	Manipulation und Translation von Nukleotidsequenzen	arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/index.html
Oligo Analysis Tool	Primer-Design	www.operon.com/tools/oligo-analysis-tool.aspx
Origin	Datenanalyse und grafische Darstellung	www.originlab.de/
Phyre 2	Protein-Modellierung	www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/
SciDAVis	Datenanalyse und grafische Darstellung	scidavis.sourceforge.net/
SignalP 4.1	Vorhersage von Signalpeptid-Schnittstellen	www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
Sulfinator	Vorhersage von Sulfatierungsstellen	web.expasy.org/sulfinator/
Swiss-Model	Protein-Modellierung	swissmodel.expasy.org/
Swiss-PdbViewer	Darstellung von Protein-3D-Strukturen	spdbv.vital-it.ch/
TEXshade	Darstellung von Sequenzalignments	www.uni-kiel.de/Pharmazie/chem/Prof_Beitz/pdf/texshade.pdf
TEXtopo	Darstellung der Topologie von Membranproteinen	www.uni-kiel.de/pharmazie/chem/Prof_Beitz/textopo.htm
T _m Calculator	Primer-Design	www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/tm-calculator

Tabelle 5.17: Datenbanken

Datenbank	Verwendungszweck	Webadresse
Ensembl	Genom-Datenbank	www.ensembl.org/index.html
MEROPS	Peptidase-Datenbank	merops.sanger.ac.uk/
NCBI	molekularbiologische Daten	www.ncbi.nlm.nih.gov/
PDBj	3D-Strukturdaten von Makromolekülen	legacy.pdbj.org/index.html
RCSB	Protein-Datenbank	www.rcsb.org/pdb/home/home.do
UniProt	bioinformatische Datenbank für Proteine	www.uniprot.org/

5.2 Proteinsequenzen aus *L. fluviatilis*

5.2.1 Sequenz von Angiotensinogen aus *L. fluviatilis* (LA)

M K L F I V L L A F C A A L C S P C V G E E D Y D 75
ATGAAGCTCTTCATCGTCCCTCTGGCGTTCTGCGCTGCTCTCTGCTCCCCCTGCGTGGGCGAAGAGGACTACGAC
E R P Y M Q P F H L I P P S L S V Q A T E Q P L A 150
GAACGGCCCTACATGCAGCCCTTCCATCTAATCCCACCTTCCCTGAGCGTCCAGGCCACGGAGCAACCGCTCGCT
S N E T W D Y P E P L A P G Q S P A A S S E E G S 225
TCCAACGAGACGTGGGACTACCCCGAGCCGCTGGCGCCCGGCCAAAAGTCCCGCGGCCTCATCGGAAGAGGGCAGT
S E E K G D E R E P H G D E G K R G R K D K K K S 300
TCCGAGGAGAAGGGGGACGAGAGGGAGCCCCACGGAGACGAAGGCAAAAGGGGTAGAAAGGACAAGAAAAAGTCC
K T Q R I A S A V N G L G F R L Y K Q V L G G A G 375
AAGACTCAGCGCATCGCCTCTGCCGTCAACGGTCTGGGCTTCAGGCTCTACAAGCAGGTGCTGGGAGGCGCGGGA
P A D N I F F S P L S I A S A L G V V T A G A N G 450
CCGGCCGACAACATCTTCTCTCGCCCCTGAGCATCGCCTCGGCTCTGGGTGTCGTGACCGGGCGCGAACGGA
S T R A E L D T A L G F K E F L H G K K K A K S M 525
AGCACGCGGGCCGAGCTGGACACGGCGCTCGGTTTCAAGGAGTTCTCCACGGAAAGAAGAAGGCCAAGTCCATG
K Y F A R L N G A L Y K R S A G F E L M G K N V V 600
AAGTACTTCGCGAGGCTCAACGGCGCCCTTTACAAGAGAAGCGCGGGCTTCGAGCTGATGGGCAAGAACGTGGTC
F S K K G L W L Y R Q F T R T V A H L F K S N V R 675
TTCAGCAAGAAGGGCCTCTGGCTGTACCGGCAGTTCACGCGCACGGTCGCCCACTTGTCAAGAGCAACGTGAGG
S V D F G D S K N A V E L M N A Y I E K V T S K K 750
TCGGTGGACTTTGGCGACTCGAAGAATGCGGTGGAGCTCATGAACGCTTACATTGAGAAGGTCACCTCGAAGAAA
F P D V I S D V D T D T S L V I V N V I Y F K G S 825
TTCCCGGATGTCATCTCCGACGTGGACACGGATACCTCCCTCGTGATCGTCAATGTCATTTATTTCAAAGGATCG
W G N K F E P D L T K N V R F W V N S S Y S M M V 900
TGGGGAACAAGTTTGAACCCGACCTCACGAAGAACGTCCGCTTCTGGGTCAACAGCAGCTACTCGATGATGGTG
P T M H Q R A K L S Y T Q D R K L R S T V V K L P 975
CCCACAATGCACCAAAGGGCCAAGCTCAGCTACACACAGGACC GCAAGTTGCGTTCCACAGTCGTCAAGCTGCCG
Y E G G A S M L V I V P H R T E D L P K V E E S V 1050
TATGAGGGCGGGCGGAGCATGCTGGTCATCGTTCCGCACAGGACAGAGGACCTGCCCAAGGTGGAGGAGAGCGTC
S Q E Q L E E W L S L L G P S N H Y V Q L S L P K 1125
TCCCAGGAGCAGCTGGAGGAGTGGCTCTCTTTGCTGGGTCCCAGCAACCACTATGTCCAGCTATCTCTTCCAAAAG
F K I S V S Y D L K A Y L S A M G M S S M F S Y G 1200
TTCAAGATCAGCGTGTCTATGACCTGAAAGCCTACCTGAGTGAATGGGGATGTCCAGCATGTTTCAGCTACGGA
A D L S R I T G M Q K L H V D K I T H K S V L H V 1275
GCAGACTTGTCTCGGATCACCGGCATGCAGAAGCTACACGTGGACAAGATCACTCATAAGTCAGTGTTCATGTG
N E E G T E A K A E T V V G I M P I S M P P T V T 1350
AACGAGGAAGGGACAGAGGCCAAGGCCGAGACCGTCTGTTGGCATCATGCCATATCCATGCCACCAACGGTGACC
V D R P F V V L I Y D E K T R A V I F M G R V A D 1425
GTGGACAGGCCCTTTGTGGTGCTCATATACGATGAGAAAACGAGAGCTGTGATCTTCATGGGCCGAGTGGCAGAT
P K Q .
CCCAAGCAGTGA 1437

5.2.2 Sequenz von HCII aus *L. fluviatilis* (LfHCII)

M F L Y G L I F A L S F L Q W V E G Q D Q T K T A 75
 ATGTTTCTGTATGGGCTCATATTTGCTTTGAGCTTCTTACAATGGGTTGAGGGACAAGACCAACCAAGACAGCT

V D V N K D A Q L S F S R Y P N N P S D S Y M D D 150
 GTTGATGTCAACAAAGATGCACAGCTATCTTTTCAAGGTACCCAAACAATCCCTCAGATTCTATATGGATGAC

T L A L D L N G F T D E D S I E D Y I D F D K L L 225
 AACTAGCTTTGGACCTCAATGGTTTTCACAGATGAGGATTCTATTGAAGACTACATCGATTTTGACAAGCTGCTG

N E D E D Y P D E I D D I N E D G S T G V T V N A 300
 AATGAAGATGAGGACTACCCAGACGAAATCGATGACATAAATGAAGATGGCTCCACCGCGTGACAGTTAATGCA

E K L V D A S F N K K L F L R R F Q G K T R I Q R 375
 GAAAACTAGTGGATGCATCATTCAATAAAAAGTTATTCTGAGAAGATTCCAGGGGAAAACGCGAATCCAGCGA

L S I V N S D F A F N L Y R S V S E S T P P G E N 450
 CTCTCCATTGTCAACAGCGACTTCGCATTCAATCTGTACCGATCCGTAAGCGAGTCCACTCCACCTGGGGAGAAC

L L L A P L G I S S T L G M I S L G A N G G T H E 525
 CTCCTTCTGGCTCCTCTGGGCATCTCTTCTACCTTGGGCATGATATCACTCGGAGCAAATGGAGGCACACATGAA

E I Y R A L G F E S L V N S S S K Y N I S T V H K 600
 GAAATCTACAGAGCCTTAGGGTTGAGAGCCTGGTAAATTCTAGCTCCAAGTACAACATTTGACCGTGCACAAG

L F H R L N H R L F R H N F G Y T L K S A S A L Y 675
 CTCTTTCACCGACTGAATCACCGCCTTTTCCGCCACAACCTTTGGCTACAGCTCAAGTCGGCAAGTGCCTATAT

L Q R R W P L L P S Y Q Q C L R K T Y F A E A H T 750
 TTACAACGCAGGTGGCCTCTGCTGCCATCTACCAACAATGCCTCCGGAAGACATACTTTGAGAGGCTCACACT

V D F K D P A T V Q R I S H W V S S S T K G T I S 825
 GTTGACTTTAAAGACCCTGCGACGGTGCAGCGTATCAGTCACTGGGTGTCAAGTTCCACCAAGGGGACAATATCC

D A V T N I D P S T V F L V I N S V Y F K G P W E 900
 GATGCGGTGACCAACATTGATCCGAGCACCGTATTCTGGTCATCAACAGCGTGTATTTTAAAGGGCCATGGGAG

I K F S K H Q T S M R S F R L N D K E S V K V Q M 975
 ATTAAGTTCTCAAACATCAGACCTCCATGCGGTCAATTTTCGGTTGAACGACAAAGAGTCCGTCAAGGTTCAAATG

M Q T K A S F L V T T D H E L G C D I L Q L A Y Q 1050
 ATGCAAACCAAGGCGAGCTTTTGGTTACCACGGACCATGAGCTGGGCTGTGATATCTCCAGCTTGCCTACCAG

G N V S M I L A V P H K L K G G L K T L E R A L S 1125
 GGCAATGTGAGCATGATTTTGGCAGTACCACACAAGCTGAAGGGTGGCCTCAAACACTGGAACGTGCCCTTTCC

F D L L E K W L Q A M T N R T R D V I I P K F N L 1200
 TTTGATCTCCTAGAGAAGTGGCTCCAAGCAATGACTAACAGAACACGGGATGTCATCATTTCCCAAATTCACCTG

Q Q K Y D L K N N L K E M G V T E L F Q A N A D L 1275
 CAGCAGAAGTACGATCTCAAAAATAACTTGAAAGAGATGGGAGTGACTGAGTTGTTCCAAGCCAATGCAGACCTG

S G M T G A K D V Q V S S F Q H Q G F I K I D E E 1350
 TCTGGGATGACTGGTGCCAAGGATGTGCAAGTTAGCTCGTTCCAGCACCAGGGCTTCATAAAGATTGACGAGGAG

G S E A A A V T T V G F T P L T S H N R F V A D R 1425
 GGGAGTGAAGCAGCGCCGCTACTACAGTTGGCTTCACGCCACTCACATCCCACAACCGCTTCGTTGCTGACCGC

P F V F I V Y E H H T M S V L F L G Q V S N P A K 1500
 CCCTTTGTTTTTCAATTGTCTACGAGCATCACACTATGAGTGTGCTTTTCTTGGGCCAGGTGTCCAACCCAGCTAAG

N .
 AACTGA 1506

5.2.3 Sequenz von Lfl_SpnV4_1

M L P I L T L L L L V T S A T S S R N K H K E H D 75
 ATGCTACCGATTTTGACTTTACTTCTCTTGGTGACGTCTGCAACGTCTCAAGAAATAACACAAGGAACATGAC

F P Q Q M V E P T T S F A M T R L A M S Q A N F G 150
 TTTCCACAGCAAATGGTAGAACCCACGACTTCATTCGCCATGACCCGACTTGCAATGTCTCAAGCCAACCTTCGGT

F D L Y R A V A Q E S P G E N I F M S P L T T S L 225
 TTCGATTGTACCGTGCCGTTGCGCAAGAAAGCCCTGGAGAAAACATCTTCATGTCTCCCCTGACCACCTTCGTTG

V L A M L T A G A H G T T E Q A L S R A L Y F S H 300
 GTACTTGCCATGCTTACTGTGGGGCTCATGGAACACAGAACAAGCCCTTTCCAGAGCTCTTTACTTTTCTCAT

L R N P N V H S T F C D L I Q K I T S G K S V S K 375
 CTTGCAACCCCAACGTGCACAGCACATTCTGTGACCTCATCCAGAAAATAACGTCCGGGAAAAGTGTGTCCAAA

M A A R I F A A R N I K I K K E F L D V V E Q N Y 450
 ATGGCAGCTCGCATCTTTGCGGCAAGAAACATTAATAAATAAAAAGGAATTTTTGGATGTAGTTGAACAAAACCTAC

H A K P E N L H G P E E K D L K R I N S W V E E K 525
 CATGCAAAACCAGAAAACCTCCATGGTCCTGAAGAAAAGACCTAAAAAGAATAAATAGTTGGGTGGAAGAAAAG

T D G K I K D F L Q E L P S N L R M L L L S A I Y 600
 ACGGATGGGAAAATCAAAGATTTTCTTCAGGAGCTACCGAGCAATTTAAGAATGCTACTCTCTGAGTGCTATCTAC

F K G K W E Q Q F Y K D N T S P V W F H V N E E N 675
 TTCAAGGGGAAGTGGGAACAGCAATTCTATAAAGATAATACATCACCAGTCTGGTTCATGTCAATGAAGAAAAC

K T M V D M M Y D S I Y P V K A G R H P Y L P Y K 750
 AAAACCATGGTGGACATGATGTATGACTCTATATACCCAGTAAAGGCAGGACGTCATCCATACCTGCCATACAAA

V A Q L E F Q G D K N M L I F L P D E V T T N L T 825
 GTTGCAAACTTGAGTTCAGGGTGACAAAAACATGCTGATATTTCTGCTGACGAAGTGACGACCAACCTGACC

A L E Q S L S S D L L L N L T E S Q L K S G N R I 900
 GCCCTGGAGCAGAGTCTGTCCTCCGATCTGCTGCTCAACCTCACCGAGTCACAGCTGAAATCAGGAAATCGCATA

V Y L P R L R L K M K K D L S T A L N H L G L D D 975
 GTTTATCTTCTCTCGCCTGCGCCTCAAATGAAAAGGACCTTTCAACTGCACTCAACCACCTTGGTTTGGATGAC

L F M A P D F H K I S E E P L I V S A V T H V A T 1050
 CTGTTTCATGGCACCAGGACTTCCATAAGATATCCGAGGAACCCCTGATAGTTTCTGCCGTTACCCACGTAGCCACC

M D L T E E G A E A A A V T G V F L S R T N P I Y 1125
 ATGGACTTAACGGAGGAGGGGGCGGAGGCAGCGCGGTGACCGGCTTTTCTCTCCCGTACCAATCCCATCTAC

P V F K V D R P F L F L I R D T S T G T V L F L G 1200
 CCCGTGTTCAAAGTGGACCGGCCCTTCTCTTCTCCTCATTTCGTGACACGTCTACAGGCACCGTGCTCTTCTCCTCGGA

R V M D P T D A A V E E E E G A E G N H G K R R R 1275
 CGGGTCAATGACCCGACCGACGACGCGGAGGAGGAGGGTGGGAGGGCAATCACGGGAAGCGTCCGCCG

G H G K R L H K T P T T G H . 1320
 GGGCAGGCAAACGCCTGCACAAAACCCACACAGGGCACTGA

5.2.4 Sequenz von Lfl_SpnV4_2

M A R L S P L F V S L L I A I L S L G V A D H H G 75
ATGGCTGCCTTTCCCTCTCTTCGTCTCACTCCTCATCGCCATTCTCTCCCTGGGAGTCGCGGACCATCACGGA
R T K P A A P P I S V K P G A P P V S A K S D I S 150
CGCACAAAGCCGGCCGCCCTCCCATCTCGGTGAAGCCGGGTGCCCTCCCGTCTCGGCGAAGTCGGACATCTCT
P F T V S R L A G S Q G D L G F Q L F H K L G E A 225
CCGTTACGGTGTCTCGCCTCGCGGGTCCAGGGGACCTGGGCTTCCAACCTTCCACAAACTGGGCGAGGCC
S P G Q N V F F S P L T T S A A L M M L L A G T A 300
TCACCGGCCAGAATGTCTTCTTCTCGCCTCTCACCACCTCTGCAGCGCTGATGATGCTCTTAGCCGGCAGGCC
H Q T E T Q L T N A L R L Q F L R D P N P Q A S F 375
CATCAGACAGAGACTCAGCTACCAACGCCCTGCGTCTCCAATTCCTCCGTGACCCGAATCCCCAGGCCTCTTC
Q A L I S K L Q H G H H S T N I A A R I F T A K D 450
CAAGCCCTGATTTCCAACTGCAACATGGCCACCACAGCACCAACATCGCTGCCCGCATCTTACCGCCAAAGAT
A K I K Q Q F L D A V E K Y H K A K P Q N L I G N 525
GCCAAATCAAGCAGCAATTTCTCGACGCGGTGGAGAAATACCACAAAGCCAAACCGCAGAACTTGATCGGGAAC
M K E D V A L I N K W V A E K T E G H I P D F I K 600
ATGAAGGAAGACGTGGCACTGATAAATAAGTGGGTGGCCGAAAAGACGGAAGGACACATCCAGACTTCATCAA
E L P A D L Q L F I V S A I F F K G K W L K P F Q 675
GAGTTCGCCGATCTGCAGCTCTTTATTGTGAGCGCCATTTTCTCAAGGGTAAGTGGCTGAAACCCTTCCAG
V E S T S P R P F H L S P T N E T Q V P T M F A R 750
GTTGAGTCTACGAGTCCGAGGCCGTTCCACCTGAGTCCAACCAACGAGACGCAGGTCCCCACGATGTTTGCCAGG
G Y P V K K G R H P S L P V T V A Q I Q F Q G N T 825
GGTTACCCCGTGAAGAAGGGGAGACACCCAGCCTGCCAGTCACGGTCGCCCAAATCCAGTTCAGGGCAACAGC
S L L L F V P D A V S T N L S T L E S S L S S Q L 900
AGTCTGCTGCTGTTCTCCTGACGCGGTGAGCACGAACCTGTCCACGCTGGAGTCGTCGCTGTCTCCAGCTC
V T T L V E E T L V Q K K I N L Q L P L I S L D V 975
GTGACCACGCTGGTGGAGGAGACGCTGGTGCAGAAGAAGATCAACTTGAGCTGCCGCTCATCTCCTTGGACGTC
E S D L K Q T L T D I G L G D L F T A P D L S K I 1050
GAGAGCGACCTCAAGCAGACGCTGACGGACATCGGTCTTGGAGATCTTTCACGGCTCCGGACCTCAGCAAGATC
S D S P L R V S K V I H R A T M T L N E E G V K A 1125
TCGGACTCTCCTCTCCGTGTCTCCAAGGTCATCCACCGTGCCACCATGACCCTCAACGAGGAGGGAGTCAAGGCA
A A A T G I M I N L M S V R F P E E L K V D R P F 1200
GCGGCCGCCACGGGATTATGATCAATCTCATGTCCGTCCGGTTTCCCAGGAGCTGAAGGTGGACAGACCGTTC
V F L I R D D E T G A L L F A G R V T N P P P V S 1275
GTCTTCCTCATCAGAGACGACGAGACGGGCGCTCTGCTCTTCGAGGAAGGGTCACGAACCCCCCTCCCGTGTCC
E K K K K H E D T S S S E E H G K E G K H G K K E 1350
GAGAAGAAGAAGAAACACGAGGATACCTCCTCATCCGAGGAGCATGCCAAGGAGGGAAAGCACGGGAAGAAGGAG
G K K H H H . 1371
GGAAAGAAGCATCATCATTAG

E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P 1650
 GAGGACGGCAGCGTGCAGCTGGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCTGTGCTGCTGCC

D N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V L L 1725
 GACAACCACTACCTGAGCACCCAGAGCGCCCTGAGCAAGGACCCCAACGAGAAGCGGGACCACATGGTGCTGCTG

E F V T A A G I T L G M D E L Y K . 1779
 GAATTCGTGACCGCCGCTGGCATCACCCCTGGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Die eGFP-Sequenz ist grau unterlegt.

5.3 Zur phylogenetischen Analyse verwendete Proteinsequenzen

Tabelle 5.18: Zur phylogenetischen Analyse von LfAGTR1 verwendete Proteinsequenzen

Sequenz	Zugangsnummer für den Datenbankeintrag in NCBI
H. sapiens_AGTR1	NP_033611.1
R. norvegicus_AGTR1a	P25095.1
R. norvegicus_AGTR1b	P29089.1
M. musculus_AGTR1a	P29754.1
M. musculus_AGTR1b	P29755.1
O. cuniculus_AGTR1	P34976.1
B. taurus_AGTR1	P25104.1
S. scrofa_AGTR1	P30555.1
D. rerio_AGTR1	CAQ15007.1
A. anguilla_AGTR1	CAB40835.1
S. canicula_AGTR1	CAF02299.1
B. marinus_AGTR1	BAF48111.1
G. gallus_AGTR1	P79785.1
O. aries_AGTR1	O77590.2
D. sabina_AGTR1	ADO64259.1
O. cuniculus_AGTR2	NP_001076107.1
C. familiaris_AGTR2	ABA40750.1
H. sapiens_AGTR2	NP_000677.2
B. taurus_AGTR2	DAA13460.1
M. unguiculatus_AGTR2	Q9Z0Z6.1
M. musculus_AGTR2	AAB29336.1
R. norvegicus_AGTR2	AAB34021.1
X. laevis_AGTR2	NP_001072452.1
D. melanogaster opsin	AAA28733.1

Literaturverzeichnis

- Aaij, C. und Borst, P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, **269**(2): 192–200.
- Agilent Technologies (2013). *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Instruction Manual)*. Agilent Technologies, Inc., e.01 Auflage.
- Aiyar, A., Tyree, C. und Sugden, B. (1998). The plasmid replicon of EBV consists of multiple *cis*-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *The EMBO Journal*, **17**(21): 6394–6403.
- Akinc, A., Thomas, M., Klibanov, A. M. und Langer, R. (2005). Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *The Journal of Gene Medicine*, **7**(5): 657–663.
- Al-Khunaizi, M., Luke, C. J., Askew, Y. S., Pak, S. C., Askew, D. J., Cataltepe, S., Miller, D., Mills, D. R., Tsu, C., Brömme, D., Irving, J. A., Whisstock, J. C. und Silverman, G. A. (2002). The serpin SQN-5 is a dual mechanistic-class inhibitor of serine and cysteine proteinases. *Biochemistry*, **41**(9): 3189–3199.
- Albiston, A. L., McDowall, S. G., Matsacos, D., Sim, P., Clune, E., Mustafa, T., Lee, J., Mendelsohn, F. A. O., Simpson, R. J., Connolly, L. M. und Chai, S. Y. (2001). Evidence that the angiotensin IV (AT₄) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**(52): 48623–48626.
- Anderson, W. G., Takei, Y. und Hazon, N. (2001). The dipsogenic effect of the renin-angiotensin system in elasmobranch fish. *General and Comparative Endocrinology*, **124**(3): 300–307.
- Aplin, M., Bonde, M. M. und Hansen, J. L. (2009). Molecular determinants of angiotensin II type 1 receptor functional selectivity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **46**(1): 15–24.
- Atchley, W. R., Lokot, T., Wollenberg, K., Dress, A. und Ragg, H. (2001). Phylogenetic analyses of amino acid variation in the serpin proteins. *Molecular Biology and Evolution*, **18**(8): 1502–1511.
- Baglin, T. P., Carrell, R. W., Church, F. C., Esmon, C. T. und Huntington, J. A. (2002). Crystal structures of native and thrombin-complexed heparin cofactor II reveal a multistep allosteric mechanism. *PNAS*, **99**(17): 11079–11084.
- Baneyx, F. und Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, **22**(11): 1399–1408.
- Banfield, D. K., Irwin, D. M., Walz, D. A. und MacGillivray, R. T. (1994). Evolution of prothrombin: isolation and characterization of the cDNAs encoding chicken and hagfish prothrombin. *Journal of Molecular Evolution*, **38**(2): 177–187.

- Barbas III, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K. und Silverman, G. J. (2007). Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2007**(11): pdb.ip47.
- Bauman, S. J. und Church, F. C. (1999). Enhancement of heparin cofactor II anticoagulant activity. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**(49): 34556–34565.
- Beitz, E. (2000a). *T_EXshade*: shading and labeling of multiple sequence alignments using *L^AT_EX2 ϵ* . *Bioinformatics*, **16**(2): 135–139.
- Beitz, E. (2000b). *T_EXtopo*: shaded membrane protein topology plots in *L^AT_EX2 ϵ* . *Bioinformatics*, **16**(11): 1050–1051.
- Benigni, A., Cassis, P. und Remuzzi, G. (2010). Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Molecular Medicine*, **2**(7): 247–257.
- Bentele, C., Krüger, O., Tödtmann, U., Oley, M. und Ragg, H. (2006). A proprotein convertase-inhibiting serpin with an endoplasmic reticulum targeting signal from *Branchiostoma lanceolatum*, a close relative of vertebrates. *The Biochemical Journal*, **395**(3): 449–456.
- Bentley, P. J. (1982). *Comparative vertebrate endocrinology*. Cambridge Univ. Pr., Cambridge, 2. Auflage.
- Bernfield, M., Götte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. und Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annual Review of Biochemistry*, **68**: 729–777.
- Bio-Rad (2012). *Instruction Manual Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell*. Bio-Rad Laboratories, Inc., M1703930 Auflage.
- Bird, P. I., Pak, S. C., Worrall, D. M. und Bottomley, S. P. (2004). Production of recombinant serpins in *Escherichia coli*. *Methods*, **32**: 169–176.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, **7**(6): 1513–1523.
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J. und Schäfer, F. (2009). Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods in Enzymology*, **463**(9): 439–473.
- Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S. und Brunak, S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, **4**(6): 1633–1649.
- Bode, W., Turk, D. und Karshikov, A. (1992). The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Science*, **1**(4): 426–471.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. und Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *PNAS*, **92**(16): 7297–7301.

- Bouton, M.-C., Boulaftali, Y., Richard, B., Arocas, V., Michel, J.-B. und Jandrot-Perrus, M. (2012). Emerging role of serpinE2/protease nexin-1 in hemostasis and vascular biology. *Blood*, **119**(11): 2452–2457.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248–254.
- Braun, P. J., Dennis, S., Hofsteenge, J. und Stone, S. R. (1988). Use of site-directed mutagenesis to investigate the basis for the specificity of hirudin. *Biochemistry*, **27**(17): 6517–6522.
- Bray, B., Lane, D. A., Freyssinet, J.-M., Pejler, G. und Lindahl, U. (1989). Anti-thrombin activities of heparin. Effect of saccharide chain length on thrombin inhibition by heparin cofactor II and by antithrombin. *The Biochemical Journal*, **262**(1): 225–232.
- Brinkmeyer, S., Eckert, R. und Ragg, H. (2004). Reformable intramolecular cross-linking of the N-terminal domain of heparin cofactor II: effects on enzyme inhibition. *European Journal of Biochemistry*, **271**(21): 4275–4283.
- Brown, J. A., Cobb, C. S., Frankling, S. C. und Rankin, J. C. (2005). Activation of the newly discovered cyclostome renin-angiotensin system in the river lamprey *Lampetra fluviatilis*. *The Journal of Experimental Biology*, **208**(2): 223–232.
- Brown, T. A. (2007). *Genome und Gene : Lehrbuch der molekularen Genetik*. Spektrum, Akad. Verl., Berlin, 3. Auflage.
- Bruch, M., Weiss, V. und Engel, J. (1988). Plasma serine proteinase inhibitors (serpins) exhibit major conformational changes and a large increase in conformational stability upon cleavage at their reactive sites. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**(32): 16626–16630.
- Burnette, W. N. (1981). “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, **112**(2): 195–203.
- Calugaru, S. V., Swanson, R. und Olson, S. T. (2001). The pH dependence of serpin-proteinase complex dissociation reveals a mechanism of complex stabilization involving inactive and active conformational states of the proteinase which are perturbable by calcium. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**(35): 32446–32455.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. und Righetti, P. G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, **25**(9): 1327–1333.
- Cardin, A. D. und Weintraub, H. (1989). Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **9**(1): 21–32.
- Carrell, R. und Travis, J. (1985). α_1 -Antitrypsin and the serpins: variation and countervariation. *Trends in Biochemical Sciences*, **10**(1): 20–24.
- Carrell, R. W., Stein, P. E., Fermi, G. und Wardell, M. R. (1994). Biological implications of a 3 Å structure of dimeric antithrombin. *Structure*, **2**(4): 257–270.

- Chai, S. Y., Fernando, R., Peck, G., Ye, S.-Y., Mendelsohn, F. A. O., Jenkins, T. A. und Albiston, A. L. (2004). The angiotensin IV/AT₄ receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**(21): 2728–2737.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, **162**(1): 156–159.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, **1**(2): 581–585.
- Chuang, G.-Y., Boyington, J. C., Joyce, M. G., Zhu, J., Nabel, G. J., Kwong, P. D. und Georgiev, I. (2012). Computational prediction of N-linked glycosylation incorporating structural properties and patterns. *Bioinformatics*, **28**(17): 2249–2255.
- Cobb, C. S., Frankling, S. C., Rankin, J. C. und Brown, J. A. (2002). Angiotensin converting enzyme-like activity in tissues from the river lamprey or lampern, *Lampetra fluviatilis*, acclimated to freshwater and seawater. *General and Comparative Endocrinology*, **127**(1): 8–15.
- Colman, R. W. (1984). Surface-mediated defense reactions. The plasma contact activation system. *The Journal of Clinical Investigation*, **73**(5): 1249–1253.
- Compton, S. J. und Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, **151**(2): 369–374.
- Cornell, M. J., Williams, T. A., Lamango, N. S., Coates, D., Corvol, P., Soubrier, F., Hoheisel, J., Lehrach, H. und Isaac, R. E. (1995). Cloning and expression of an evolutionary conserved single-domain angiotensin converting enzyme from *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**(23): 13613–13619.
- Crowley, S. D. und Coffman, T. M. (2012). Recent advances involving the renin-angiotensin system. *Experimental Cell Research*, **318**(9): 1049–1056.
- Davidson, C. J., Tuddenham, E. G. und McVey, J. H. (2003). 450 Million Years of hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **1**(7): 1487–1494.
- Davie, E. W., Fujikawa, K. und Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*, **30**(43): 10363–10370.
- Davie, E. W. und Kulman, J. D. (2006). An overview of the structure and function of thrombin. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **32**(suppl. 1): 3–15.
- Di Cera, E. (2007). Thrombin as procoagulant and anticoagulant. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **5**(suppl. 1): 196–202.
- Di Scipio, R. G., Hermodson, M. A. und Davie, E. W. (1977). Activation of human factor X (Stuart factor) by a protease from Russell's viper venom. *Biochemistry*, **16**(24): 5253–5260.
- Doolittle, R. F. (1983). Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antithrombin-ovalbumin family. *Science*, **222**(4622): 417–419.

- Doolittle, R. F. (2009). Step-by-step evolution of vertebrate blood coagulation. *Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology*, **74**: 35–40.
- Doolittle, R. F. (2011). Coagulation in vertebrates with a focus on evolution and inflammation. *Journal of Innate Immunity*, **3**(1): 9–16.
- Doolittle, R. F., Jiang, Y. und Nand, J. (2008). Genomic evidence for a simpler clotting scheme in jawless vertebrates. *Journal of Molecular Evolution*, **66**(2): 185–196.
- Eckert, K. A. und Kunkel, T. A. (1991). DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *Genome Research*, **1**(1): 17–24.
- Eckert, R. (2005). *Die N-terminale Domäne von Heparinkofaktor II: Konformation und Bedeutung für die Hemmung von Thrombin*. PhD thesis, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Eckert, R. und Ragg, H. (2003). Zinc ions promote the interaction between heparin and heparin cofactor II. *FEBS Letters*, **541**(1–3): 121–125.
- Ehrlich, H. J., Keijer, J., Preissner, K. T., Gebbink, R. K. und Pannekoek, H. (1991). Functional interaction of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and heparin. *Biochemistry*, **30**(4): 1021–1028.
- Eliyahu, H., Barenholz, Y. und Domb, A. J. (2005). Polymers for DNA delivery. *Molecules*, **10**(1): 34–64.
- Elliott, P. R., Pei, X. Y., Dafforn, T. R. und Lomas, D. A. (2000). Topography of a 2.0 Å structure of α_1 -antitrypsin reveals targets for rational drug design to prevent conformational disease. *Protein Science*, **9**(7): 1274–1281.
- Engh, R., Lobermann, H., Schneider, M., Wiegand, G., Huber, R. und Laurell, C.-B. (1989). The S variant of human α_1 -antitrypsin, structure and implications for function and metabolism. *Protein Engineering*, **2**(6): 407–415.
- Esmon, C. T. (2003). The protein C pathway. *Chest*, **124**(suppl. 3): 26S–32S.
- Evans, A. N., Henning, T., Gelsleichter, J. und Nunez, B. S. (2010). Molecular classification of an elasmobranch angiotensin receptor: Quantification of angiotensin receptor and natriuretic peptide receptor mRNAs in saltwater and freshwater populations of the Atlantic stingray. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*, **157**(4): 423–431.
- Evans, D. L., McGrogan, M., Scott, R. W. und Camell, R. W. (1991). Protease specificity and heparin binding and activation of recombinant protease nexin I. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**(33): 22307–22312.
- Ferrario, C. M. (2006). Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1–7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension*, **47**(3): 515–521.
- Freyhof, J. (2013). *Lampetra fluviatilis*. Technical report, The IUCN Red List of Threatened Species, Version 2014.1.
- Friedenauer, S. und Berlet, H. H. (1989). Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. *Analytical Biochemistry*, **178**(2): 263–268.

- Fyhrquist, F. und Saijonmaa, O. (2008). Renin-angiotensin system revisited. *Journal of Internal Medicine*, **264**(3): 224–236.
- Gallagher, J. T. und Walker, A. (1985). Molecular distinctions between heparan sulphate and heparin. *The Biochemical Journal*, **230**(3): 665–674.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. und Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. In *The proteomics protocols handbook*, chapter 52, pages 571–607. Humana Press, Totowa, NJ.
- GE Healthcare (2005). *IMAC Sepharose™ 6 Fast Flow*. GE Healthcare, 28-4046-22 Auflage.
- GE Healthcare (2007). *HiTrap™ Heparin HP*. GE Healthcare, 18-1134-77 Auflage.
- GE Healthcare (2010). *Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing (Principles and Methods)*. GE Healthcare, 11-0004-21 Auflage.
- Gerstmeier, R. und Romig, T. (2003). *Die Süßwasserfische Europas: für Naturfreunde und Angler*. Kosmos, Stuttgart, 2. Auflage.
- Gess, R. W., Coates, M. I. und Rubidge, B. S. (2006). A lamprey from the Devonian period of South Africa. *Nature*, **443**(7114): 981–984.
- Gettins, P. G. W. (2002). Serpin structure, mechanism, and function. *Chemical Reviews*, **102**(12): 4751–4804.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, **23**(1): 175–182.
- Gomes, A. M., Stelling, M. P. und Pavão, M. S. G. (2013). Heparan sulfate and heparanase as modulators of breast cancer progression. *BioMed Research International*, **2013**: Article ID 852093.
- Gooptu, B., Hazes, B., Chang, W.-S. W., Dafforn, T. R., Carrell, R. W., Read, R. J. und Lomas, D. A. (2000). Inactive conformation of the serpin α_1 -antichymotrypsin indicates two-stage insertion of the reactive loop: implications for inhibitory function and conformational disease. *PNAS*, **97**(1): 67–72.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. und Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*, **36**(1): 59–72.
- Grütter, M. G., Priestle, J. P., Rahuel, J., Grossenbacher, H., Bode, W., Hofsteenge, J. und Stone, S. R. (1990). Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel mode of serine protease inhibition. *The EMBO Journal*, **9**(8): 2361–2365.
- Guex, N. und Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **18**(15): 2714–2723.
- Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, **30**(5): 1229–1235.

- Hammond, G. L., Smith, C. L., Goping, I. S., Underhill, D. A., Harley, M. J., Reventos, J., Musto, N. A., Gunsalus, G. L. und Bardin, C. W. (1987). Primary structure of hormon corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serin protease inhibitors. *PNAS*, **84**: 5153–5157.
- Han, X., Fiehler, R. und Broze, G. J. Jr. (2000). Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor. *Blood*, **96**(9): 3049–3055.
- Hardisty, M. W. (1983). The significance of lampreys for biological research. *Endeavour*, **7**(3): 110–115.
- Hardisty, M. W. und Potter, I. C. (1981). *The biology of lampreys*, volume 3. Academic Press.
- Harrison-Bernard, L. M. (2009). The renal renin-angiotensin system. *Advances in Physiology Education*, **33**(4): 270–274.
- Hattori, T., Kimura, K., Seyrek, E. und Dubin, P. L. (2001). Binding of bovine serum albumin to heparin determined by turbidimetric titration and frontal analysis continuous capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, **295**(2): 158–167.
- Heeb, M. J. und Griffin, J. H. (1988). Physiologic inhibition of human activated protein C by α_1 -antitrypsin. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**(24): 11613–11616.
- Heimberg, A. M., Cowper-Sal-lari, R., Sémon, M., Donoghue, P. C. J. und Peterson, K. J. (2010). MicroRNAs reveal the interrelationships of hagfish, lampreys, and gnathostomes and the nature of the ancestral vertebrate. *PNAS*, **107**(45): 19379–19383.
- Hermans, J. M. und Stone, S. R. (1993). Interaction of activated protein C with serpins. *The Biochemical Journal*, **295**(1): 239–245.
- Hirayoshi, K., Kudo, H., Takechi, H., Nakai, A., Iwamatsu, A., Yamada, K. M. und Nagata, K. (1991). HSP47: a tissue-specific, transformation-sensitive, collagen-binding heat shock protein of chicken embryo fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, **11**(8): 4036–4044.
- Hänsel, R. und Sticher, O. (2010). *Pharmakognosie Phytopharmazie*. Springer-Lehrbuch. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 9. Auflage.
- Howitt, F. O. und Prideaux, E. B. R. (1932). The isoelectric point of serum-globulin as determined by kataphoresis. *Proceedings of the Royal Society B*, **112**(774): 24–27.
- Huang, P.-H., Leu, H.-B., Chen, J.-W., Wu, T.-C., Lu, T.-M., Yu-An Ding, P. und Lin, S.-J. (2007). Decreased heparin cofactor II activity is associated with impaired endothelial function determined by brachial ultrasonography and predicts cardiovascular events. *International Journal of Cardiology*, **114**(2): 152–158.
- Huang, X., Dementiev, A., Olson, S. T. und Gettins, P. G. W. (2010). Basis for the specificity and activation of the serpin protein Z-dependent proteinase inhibitor (ZPI) as an inhibitor of membrane-associated factor Xa. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**(26): 20399–20409.
- Huang, X., Rezaie, A. R., Broze Jr, G. J. und Olson, S. T. (2011). Heparin is a major activator of the anticoagulant serpin, protein Z-dependent protease inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*, **286**(11): 8740–8751.

- Huang, X., Swanson, R., Broze Jr, G. J. und Olson, S. T. (2008). Kinetic characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor reaction with blood coagulation factor Xa. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**(44): 29770–29783.
- Huntington, J. A. (2003). Mechanisms of glycosaminoglycan activation of the serpins in hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **1**(7): 1535–1549.
- Huntington, J. A. (2011). Serpin structure, function and dysfunction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **9**(suppl. 1): 26–34.
- Huntington, J. A. (2013). Thrombin inhibition by the serpins. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **11**(suppl. 1): 254–264.
- Huntington, J. A., Olson, S. T., Fan, B. und Gettins, P. G. W. (1996). Mechanism of heparin activation of antithrombin. Evidence for reactive center loop preinsertion with expulsion upon heparin binding. *Biochemistry*, **35**(26): 8495–8503.
- Hunyady, L., Baukal, A. J., Gáborik, Z., Olivares-Reyes, J. A., Bor, M., Szaszák, M., Lodge, R., Catt, K. J. und Balla, T. (2002). Differential PI 3-kinase dependence of early and late phases of recycling of the internalized AT1 angiotensin receptor. *The Journal of Cell Biology*, **157**(7): 1211–1222.
- Huttner, W. B. (1987). Protein tyrosine sulfation. *Trends in Biochemical Sciences*, **4**(9): 361–363.
- Ikeda, Y., Aihara, K.-i., Yoshida, S., Iwase, T., Tajima, S., Izawa-Ishizawa, Y., Kihira, Y., Ishizawa, K., Tomita, S., Tsuchiya, K., Sata, M., Akaike, M., Kato, S., Matsumoto, T. und Tamaki, T. (2012). Heparin cofactor II, a serine protease inhibitor, promotes angiogenesis via activation of the AMP-activated protein kinase-endothelial nitric-oxide synthase signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, **287**(41): 34256–34263.
- Implen (2011). *NanoPhotometer® P-Class User Manual P 300 / P 330 / P 360*. Implen GmbH, 2.1 Auflage.
- Invitrogen™ (2012). *TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing*. Invitrogen™ by Life Technologies™, man0000109 Auflage.
- Irving, J. A., Pike, R. N., Lesk, A. M. und Whisstock, J. C. (2000). Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Research*, **10**(12): 1845–1864.
- Irving, J. A., Steenbakkers, P. J. M., Lesk, A. M., Op den Camp, H. J. M., Pike, R. N. und Whisstock, J. C. (2002). Serpins in prokaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, **19**(11): 1881–1890.
- Janvier, P. (2006). Palaeontology: modern look for ancient lamprey. *Nature*, **443**(7114): 921–924.
- Johnson, D. J. D., Li, W., Adams, T. E. und Huntington, J. A. (2006). Antithrombin-S195A factor Xa-heparin structure reveals the allosteric mechanism of antithrombin activation. *The EMBO Journal*, **25**(9): 2029–2037.

- Kanal, K. M., Fullerton, G. D. und Cameron, I. L. (1994). A study of the molecular sources of nonideal osmotic pressure of bovine serum albumin solutions as a function of pH. *Biophysical Journal*, **66**(1): 153–160.
- Kehoe, J. W. und Bertozzi, C. R. (2000). Tyrosine sulfation: a modulator of extracellular protein-protein interactions. *Chemistry & Biology*, **7**(3): R57–R61.
- Kimura, A., Ikeo, K. und Nonaka, M. (2009). Evolutionary origin of the vertebrate blood complement and coagulation systems inferred from liver EST analysis of lamprey. *Developmental and Comparative Immunology*, **33**(1): 77–87.
- Kindness, G., Long, W. F. und Williamson, F. B. (1981). The anticoagulant activity of dermatan sulphates: evidence against the involvement of antithrombin III. *British Journal of Pharmacology*, **72**(1): 81–88.
- Knauer, D. J., Majumdar, D., Fong, P.-C. und Knauer, M. F. (2000). SERPIN regulation of factor XIa. The novel observation that protease nexin 1 in the presence of heparin is a more potent inhibitor of factor XIa than C1 inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**(48): 37340–37346.
- Knelson, E. H., Nee, J. C. und Blobel, G. C. (2014). Heparan sulfate signaling in cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, **39**(6): 277–288.
- Knight, C. G. (1995). Active-site titration of peptidases. *Methods in Enzymology*, **248**: 85–101.
- Knoop, V. und Müller, K. (2009). *Gene und Stammbäume: Ein Handbuch zur molekularen Phylogenetik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2. Auflage.
- Kobayashi, H. und Takei, Y. (1996). *The renin angiotensin system: comparative aspects*, volume 35 of *Zoophysiology*. Springer, Berlin.
- Kobori, H., Nangaku, M., Navar, L. G. und Nishiyama, A. (2007). The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacological Reviews*, **59**(3): 251–287.
- Komiyama, T., Ray, C. A., Pickup, D. J., Howard, A. D., Thornberry, N. A., Peterson, E. P. und Salvesen, G. (1994). Inhibition of interleukin-1 β converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**(30): 19331–19337.
- Kopatz, I., Remy, J.-S. und Behr, J.-P. (2004). A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *The Journal of Gene Medicine*, **6**(7): 769–776.
- Kubota, Y. und Ueki, H. (1968). Determination of the isoelectric point of bovine plasma albumin by cellulose acetate paper electrophoresis. *The Journal of Biochemistry*, **64**(3): 405–406.
- Kuhn, L. A., Griffin, J. H., Fisher, C. L., Greengard, J. S., Bouma, B. N., España, F. und Tainer, J. A. (1990). Elucidating the structural chemistry of glycosaminoglycan recognition by protein C inhibitor. *PNAS*, **87**(21): 8506–8510.
- Kumar, A. (2010). *Phylogenomics of vertebrate serpins*. PhD thesis, Bielefeld University.

- Kumar, A., Bhandari, A., Sarde, S. J. und Goswami, C. (2013). Sequence, phylogenetic and variant analyses of antithrombin III. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **440**(4): 714–724.
- Kumar, R., Thomas, C. M., Yong, Q. C., Chen, W. und Baker, K. M. (2012). The intracrine renin-angiotensin system. *Clinical Science*, **123**(5): 273–284.
- Kutzner, T. J. (2013). *Isolierung, Charakterisierung und phylogenetischer Vergleich von Serpinen basaler Vertebraten*. PhD thesis, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Kvassman, J.-O., Verhamme, I. und Shore, J. D. (1998). Inhibitory mechanism of serpins: loop insertion forces acylation of plasminogen activator by plasminogen activator inhibitor-1. *Biochemistry*, **37**(44): 15491–15502.
- Lamango, N. S. und Isaac, R. E. (1994). Identification and properties of a peptidyl dipeptidase in the housefly, *Musca domestica*, that resembles mammalian angiotensin-converting enzyme. *The Biochemical Journal*, **299**: 651–657.
- Lane, D. A., Denton, J., Flynn, A. M., Thunberg, L. und Lindahl, U. (1984). Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4. *The Biochemical Journal*, **218**(3): 725–732.
- Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. und Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**(21): 2947–2948.
- Laurent, V., Bulet, P. und Salzet, M. (1995). A comparison of the leech *Theromyzon tessulatum* angiotensin I-like molecule with forms of vertebrate angiotensinogens: a hormonal system conserved in the course of evolution. *Neuroscience Letters*, **190**(3): 175–178.
- Law, R. H. P., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. A., Wong, W., Rosado, C. J., Langendorf, C. G., Pike, R. N., Bird, P. I. und Whisstock, J. C. (2006). An overview of the serpin superfamily. *Genome Biology*, **7**(5): Article ID: 216.
- Lebaron, R. G., Esko, J. D., Woods, A., Johansson, S. und Höök, M. (1988). Adhesion of glycosaminoglycan-deficient chinese hamster ovary cell mutants to fibronectin substrata. *The Journal of Cell Biology*, **106**(3): 945–952.
- Lefkowitz, J. B. (2008). Coagulation pathway and physiology. In *An Algorithmic Approach to Hemostasis Testing*. College of American Pathologists, Washington.
- Li, W., Adams, T. E., Kjellberg, M., Stenflo, J. und Huntington, J. A. (2007). Structure of native protein C inhibitor provides insight into its multiple functions. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**(18): 13759–13768.
- Li, W., Adams, T. E., Nangalia, J., Esmo, C. T. und Huntington, J. A. (2008). Molecular basis of thrombin recognition by protein C inhibitor revealed by the 1.6-Å structure of the heparin-bridged complex. *PNAS*, **105**(12): 4661–4666.
- Li, W. und Huntington, J. A. (2008). The heparin binding site of protein C inhibitor is protease-dependent. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**(51): 36039–36045.

- Li, W. und Huntington, J. A. (2012). Crystal structures of protease nexin-1 in complex with heparin and thrombin suggest a 2-step recognition mechanism. *Blood*, **120**(2): 459–467.
- Li, W., Johnson, D. J. D., Esmon, C. T. und Huntington, J. A. (2004). Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nature Structural & Molecular Biology*, **11**(9): 857–862.
- Lin, X. (2004). Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development*, **131**(24): 6009–6021.
- Lottspeich, F. und Engels, J. W. (2012). *Bioanalytik*. Springer Spektrum, Berlin, 3. Auflage.
- Lu, D., Kalafatis, M., Mann, K. G. und Long, G. L. (1996). Comparison of activated protein C/protein S-mediated inactivation of human factor VIII and factor V. *Blood*, **87**(11): 4708–4717.
- Marcum, J. A., Mckenney, J. B., Galli, S. J., Jackman, R. W. und Rosenberg, R. D. (1986). Anticoagulant active heparin-like from mast cell-deficient mice molecules. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, **250**(5): H879–H888.
- Michaelis, L. und Menten, M. L. (1913). The kinetics of invertin action. 1913. Translated by T.R.C. Boyde. 2013. *FEBS Letters*, **587**(17): 2712–2720.
- Miserey-Lenkei, S., Lenkei, Z., Parnot, C., Corvol, P. und Clauser, E. (2001). A functional enhanced green fluorescent protein (EGFP)-tagged angiotensin II AT_{1A} receptor recruits the endogenous G α q/11 protein to the membrane and induces its specific internalization independently of receptor-G protein coupling in HEK-293 cells. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, **15**(2): 294–307.
- Miura, S.-i., Saku, K. und Karnik, S. S. (2003). Molecular analysis of the structure and function of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension Research*, **26**(12): 937–943.
- Mülhardt, C. (2013). *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*. Der Experimentator. Springer Spektrum, Berlin, 7. Auflage.
- Monahan-Earley, R., Dvorak, A. M. und Aird, W. C. (2013). Evolutionary origins of the blood vascular system and endothelium. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **11**(suppl. 1): 46–66.
- Monigatti, F., Gasteiger, E., Bairoch, A. und Jung, E. (2002). The Sulfinator: predicting tyrosine sulfation sites in protein sequences. *Bioinformatics*, **18**(5): 769–770.
- Montecucco, F., Pende, A. und Mach, F. (2009). The renin-angiotensin system modulates inflammatory processes in atherosclerosis: evidence from basic research and clinical studies. *Mediators of Inflammation*, **2009**: Article ID: 752406.
- Mottonen, J., Strand, A., Symersky, J., Sweet, R. M., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., Gerard, R. D. und Goldsmith, E. J. (1992). Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature*, **355**(6357): 270–273.
- Müller, F., Mutch, N. J., Schenk, W. A., Smith, S. A., Esterl, L., Spronk, H. M., Schmidbauer, S., Gahl, W. A., Morrissey, J. H. und Renné, T. (2009). Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators *in vivo*. *Cell*, **139**(6): 1143–1156.

- Mullis, K. B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. K., Horn, G. T. und Erlich, H. A. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **51**: 263–273.
- Naito, K. und Fujikawa, K. (1991). Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**(12): 7353–7358.
- Naski, M. C., Lorand, L. und Shafer, J. A. (1991). Characterization of the kinetic pathway for fibrin promotion of α -thrombin-catalyzed activation of plasma factor XIII. *Biochemistry*, **30**(4): 934–941.
- Nicholas, K. B., Nicholas, H. B. Jr. und Deerfield, D. W. II. (1997). GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW. NEWS*, **4**: 14.
- Nishimura, H. (1978). Physiological evolution of the renin-angiotensin system. *Japanese Heart Journal*, **19**(5): 806–822.
- Nishimura, H. und Ogawa, M. (1973). The renin-angiotensin system in fishes. *American Zoologist*, **13**(3): 823–838.
- Nishimura, H., Ogawa, M. und Sawyer, W. H. (1973). Renin-angiotensin system in primitive bony fishes and a holocephalian. *The American Journal of Physiology*, **224**(4): 950–956.
- Oley, M., Letzel, M. C. und Ragg, H. (2004). Inhibition of furin by serpin Spn4A from *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters*, **577**(1-2): 165–169.
- Olson, S. T. und Björk, I. (1991). Predominant contribution of surface approximation to the mechanism of heparin acceleration of the antithrombin-thrombin reaction: elucidation from salt concentration effects. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**(10): 6353–6364.
- Olson, S. T., Björk, I., Sheffer, R., Craig, P. A., Shore, J. D. und Choay, J. (1992). Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions: resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement. *The Journal of Biological Chemistry*, **267**(18): 12528–12538.
- Olson, S. T., Stephens, A. W., Hirs, C. H. W., Bock, P. E. und Björk, I. (1995). Kinetic characterization of the proteinase binding defect in a reactive site variant of the serpin, antithrombin: role of the P1' residue in transition-state stabilization of antithrombin-proteinase complex formation. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**(17): 9717–9724.
- Olson, S. T., Swanson, R., Raub-Segall, E., Bedsted, T., Sadri, M., Petitou, M., Héroult, J.-P., Herbert, J.-M. und Björk, I. (2004). Accelerating ability of synthetic oligosaccharides on antithrombin inhibition of proteinases of the clotting and fibrinolytic systems: comparison with heparin and low-molecular-weight heparin. *Thrombosis and Haemostasis*, **92**(5): 929–939.
- Oschatz, C., Maas, C., Lecher, B., Jansen, T., Björkqvist, J., Tradler, T., Sedlmeier, R., Burfeind, P., Cichon, S., Hammerschmidt, S., Müller-Esterl, W., Wuillemin, W. a., Nilsson, G. und Renné, T. (2011). Mast cells increase vascular permeability by heparin-initiated bradykinin formation *in vivo*. *Immunity*, **34**(2): 258–268.

- Osório, J. und Rétaux, S. (2008). The lamprey in evolutionary studies. *Development Genes and Evolution*, **218**(5): 221–235.
- Patston, P. A., Church, F. C. und Olson, S. T. (2004). Serpin-ligand interactions. *Methods*, **32**(2): 93–109.
- Patston, P. A. und Schapira, M. (1994). Low-affinity heparin stimulates the inactivation of plasminogen activator inhibitor-1 by thrombin. *Blood*, **84**(4): 1164–1172.
- Pauer, H.-U., Renné, T., Hemmerlein, B., Legler, T., Fritzlar, S., Adham, I., Müller-Esterl, W., Emons, G., Sancken, U., Engel, W. und Burfeind, P. (2004). Targeted deletion of murine coagulation factor XII gene—a model for contact phase activation *in vivo*. *Thrombosis and Haemostasis*, **92**(3): 503–508.
- Paul, M., Mehr, A. P. und Kreutz, R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological Reviews*, **86**(3): 747–803.
- Pemberton, P. A., Wong, D. T., Gibson, H. L., Kiefer, M. C., Fitzpatrick, P. A., Sager, R. und Barr, P. J. (1995). The tumor suppressor maspin does not undergo the stressed to relaxed transition or inhibit trypsin-like serine proteases: evidence that maspin is not a protease inhibitory serpin. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**(26): 15832–15837.
- Petersen, L. C. und Clemmensen, I. (1981). Kinetics of plasmin inhibition in the presence of a synthetic tripeptide substrate. *The Biochemical Journal*, **199**: 121–127.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. und Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, **8**(10): 785–786.
- Pierce Biotechnology (2002). *Instructions Coomassie® Protein Assay Reagent Kit 23200*. Pierce Biotechnology, Inc., 0129w Auflage.
- Plotnick, M. I., Schechter, N. M., Wang, Z. M., Liu, X. und Rubin, H. (1997). Role of the P6-P3' region of the serpin reactive loop in the formation and breakdown of the inhibitory complex. *Biochemistry*, **36**(47): 14601–14608.
- Ponczek, M. B., Bijak, M. Z. und Nowak, P. Z. (2012). Evolution of thrombin and other hemostatic proteases by survey of protochordate, hemichordate, and echinoderm genomes. *Journal of Molecular Evolution*, **74**(5-6): 319–331.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. und Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258**: 598–599.
- Pratt, C. W., Whinna, H. C. und Church, F. C. (1992). A comparison of three heparin-binding serine proteinase inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*, **267**(13): 8795–8801.
- Pratt, C. W., Whinna, H. C., Meade, J. B., Treanor, R. E. und Church, F. C. (1989). Physicochemical aspects of heparin cofactor II. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **556**: 104–115.
- Pulakat, L., Mandavia, C. H. und Gavini, N. (2004). Role of Phe308 in the seventh transmembrane domain of the AT2 receptor in ligand binding and signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **319**(4): 1138–1143.

- Rabenstein, D. L. (2002). Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Natural Product Reports*, **19**(3): 312–331.
- Ragg, H. (1986). A new member of the plasma protease inhibitor gene family. *Nucleic Acids Research*, **14**(2): 1073–1088.
- Ragg, H., Kumar, A., Köster, K., Bentele, C., Wang, Y., Frese, M.-A., Prib, N. und Krüger, O. (2009). Multiple gains of spliceosomal introns in a superfamily of vertebrate protease inhibitor genes. *BMC Evolutionary Biology*, **9**: 208.
- Ragg, H., Lokot, T., Kamp, P.-B., Atchley, W. R. und Dress, A. (2001). Vertebrate serpins: construction of a conflict-free phylogeny by combining exon-intron and diagnostic site analyses. *Molecular Biology and Evolution*, **18**(4): 577–584.
- Ragg, H. und Preibisch, G. (1988). Structure and expression of the gene coding for the human serpin hLS2. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**(24): 12129–12134.
- Ragg, H., Ulshöfer, T. und Gerewitz, J. (1990a). Glycosaminoglycan-mediated leuserpin-2/thrombin interaction. Structure-function relationships. *The Journal of Biological Chemistry*, **265**(36): 22386–22391.
- Ragg, H., Ulshöfer, T. und Gerewitz, J. (1990b). On the activation of human leuserpin-2, a thrombin inhibitor, by glycosaminoglycans. *The Journal of Biological Chemistry*, **265**(9): 5211–5218.
- Raman, R., Sasisekharan, V. und Sasisekharan, R. (2005). Structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions. *Chemistry & Biology*, **12**(3): 267–277.
- Rankin, J. C., Watanabe, T. X., Nakajima, K., Broadhead, C. und Takei, Y. (2004). Identification of angiotensin I in a cyclostome, *Lampetra fluviatilis*. *Zoological Science*, **21**(2): 173–179.
- Ratnoff, O. D. und Colopy, J. E. (1955). A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. *The Journal of Clinical Investigation*, **34**(4): 602–613.
- Rau, J. C., Beaulieu, L. M., Huntington, J. A. und Church, F. C. (2007). Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **5**(suppl. 1): 102–115.
- Renatus, M., Zhou, Q., Stennicke, H. R., Snipas, S. J., Turk, D., Bankston, L. A., Liddington, R. C. und Salvesen, G. S. (2000). Crystal structure of the apoptotic suppressor CrmA in its cleaved form. *Structure*, **8**(7): 789–797.
- Renné, T., Schmaier, A. H., Nickel, K. F., Blombäck, M. und Maas, C. (2012). *In vivo* roles of factor XII. *Blood*, **120**(22): 4296–4303.
- Rezaie, A. R. (1998). Calcium enhances heparin catalysis of the antithrombin-factor Xa reaction by a template mechanism: evidence that calcium alleviates Gla domain antagonism of heparin binding to factor Xa. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**(27): 16824–16827.
- Rezaie, A. R. (2001). Vitronectin functions as a cofactor for rapid inhibition of activated protein C by plasminogen activator inhibitor-1: implications for the mechanism of profibrinolytic action of activated protein C. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**(19): 15567–15570.

- Ribeiro, J. M. und Mather, T. N. (1998). *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. *Experimental Parasitology*, **89**(2): 213–221.
- Roberts, T. H., Hejgaard, J., Saunders, N. F. W., Cavicchioli, R. und Curmi, P. M. G. (2004). Serpins in unicellular *Eukarya*, *Archaea*, and *Bacteria*: sequence analysis and evolution. *Journal of Molecular Evolution*, **59**(4): 437–447.
- Roy, A., Kucukural, A. und Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, **5**(4): 725–738.
- Rychlik, W., Spencer, W. J. und Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Research*, **18**(21): 6409–6412.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**(4839): 487–491.
- Salzet, M., Bulet, P., Wattez, C., Verger-Bocquet, M. und Malecha, J. (1995). Structural characterization of a diuretic peptide from the central nervous system of the leech *Erpobdella octoculata*. Angiotensin II Amide. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**(4): 1575–1582.
- Salzet, M., Deloffre, L., Breton, C., Vieau, D. und Schoofs, L. (2001). The angiotensin system elements in invertebrates. *Brain Research Reviews*, **36**(1): 35–45.
- Salzet, M. und Verger-Bocquet, M. (2001). Elements of angiotensin system are involved in leeches and mollusks immune response modulation. *Molecular Brain Research*, **94**(1-2): 137–147.
- Salzet, M., Wattez, C., Baert, J.-L. und Malecha, J. (1993). Biochemical evidence of angiotensin II-like peptides and proteins in the brain of the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. *Brain Research*, **631**: 247–255.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual (3-Volume Set)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3. Auflage.
- Schechter, I. und Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **27**(2): 157–162.
- Schechter, N. M. und Plotnick, M. I. (2004). Measurement of the kinetic parameters mediating protease–serpin inhibition. *Methods*, **32**(2): 159–168.
- Schnell, I. B., Thomsen, P. F., Wilkinson, N., Rasmussen, M., Jensen, L. R. D., Willerslev, E., Bertelsen, M. F. und Gilbert, M. T. P. (2012). Screening mammal biodiversity using DNA from leeches. *Current Biology*, **22**(8): R262–R263.
- Schreuder, H. A., de Boer, B., Dijkema, R., Mulders, J., Theunissen, H. J. M., Grootenhuis, P. D. J. und Hol, W. G. J. (1994). The intact and cleaved human antithrombin III complex as a model for serpin-proteinase interactions. *Nature Structural Biology*, **1**(1): 48–54.
- Sheehan, J. P., Tollefsen, D. M. und Sadler, J. E. (1994). Heparin cofactor II is regulated allosterically and not primarily by template effects: studies with mutant thrombins and glycosaminoglycans. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**(52): 32747–32751.

- Shimeld, S. M. und Donoghue, P. C. J. (2012). Evolutionary crossroads in developmental biology: cyclostomes (lamprey and hagfish). *Development*, **139**(12): 2091–2099.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D. und Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, **7**(539): 1–6.
- Siller-Matula, J. M., Schwameis, M., Blann, A., Mannhalter, C. und Jilma, B. (2011). Thrombin as a multi-functional enzyme: focus on *in vitro* and *in vivo* effects. *Thrombosis and Haemostasis*, **106**(6): 1020–1033.
- Skeggs, L. T., Dorer, F. E., Kahn, J. R., Lentz, K. E. und Levine, M. (1976). The biochemistry of the renin-angiotensin system and its role in hypertension. *The American Journal of Medicine*, **60**(6): 737–748.
- Smith, J. J., Kuraku, S., Holt, C., Sauka-Spengler, T. und Jiang, N. *et al.* (2013). Sequencing of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) genome provides insights into vertebrate evolution. *Nature Genetics*, **45**(4): 415–421.
- Stearns-Kurosawa, D. J., Kurosawa, S., Mollica, J. S., Ferrell, G. L. und Esmon, C. T. (1996). The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *PNAS*, **93**(19): 10212–10216.
- Stein, P. und Chothia, C. (1991). Serpin tertiary structure transformation. *Journal of Molecular Biology*, **221**(2): 615–621.
- Stein, P. E., Tewkesbury, D. A. und Carrell, R. W. (1989). Ovalbumin and angiotensinogen lack serpin S-R conformational change. *The Biochemical Journal*, **262**: 103–107.
- Strauss, W. M. (2001). Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. *Current Protocols in Molecular Biology*, **42**: 2.2.1–2.2.3.
- Sulkowski, E. (1985). Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*, **3**(1): 1–7.
- Szedlacsek, S. E., Ostafe, V., Duggleby, R. G., Serban, M. und Vlad, M. O. (1990). Progress-curve equations for reversible enzyme-catalysed reactions inhibited by tight-binding inhibitors. *The Biochemical Journal*, **265**(3): 647–653.
- Takei, Y. und Hasegawa, Y. (1990). Vasopressor and depressor effects of native angiotensins and inhibition of these effects in the Japanese quail. *General and Comparative Endocrinology*, **79**(1): 12–22.
- Takei, Y., Hasegawa, Y., Watanabe, T. X., Nakajima, K. und Hazon, N. (1993). A novel angiotensin I isolated from an elasmobranch fish. *Journal of Endocrinology*, **139**(2): 281–285.
- Takei, Y., Joss, J. M. P., Kloas, W. und Rankin, J. C. (2004). Identification of angiotensin I in several vertebrate species: its structural and functional evolution. *General and Comparative Endocrinology*, **135**(3): 286–292.

- Takemoto, N., Suehara, T., Frisco, H. L., Sato, S.-I., Sezaki, T. und Kusamori, K. *et al.* (2013). Small-molecule-induced clustering of heparan sulfate promotes cell adhesion. *Journal of the American Chemical Society*, **135**(30): 11032–11039.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. und Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12): 2725–2729.
- Tödttmann, U. (2004). *Klonierung, rekombinante Expression und Charakterisierung von Serpin1 aus Branchiostoma lanceolatum*. PhD thesis, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Teien, A. N., Abildgaard, U. und Höök, M. (1976). The anticoagulant effect of heparan sulfate and dermatan sulfate. *Thrombosis Research*, **8**(6): 859–867.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **72**(2): 211–222.
- Thermo Scientific (2011a). *Product Information: First Strand cDNA Synthesis Kit*. Thermo Fisher Scientific Inc., 11. Auflage.
- Thermo Scientific (2011b). *Product Information: GeneJET Plasmid Miniprep Kit*. Thermo Fisher Scientific Inc., 6. Auflage.
- Thermo Scientific (2012a). *Product Information: CloneJET PCR Cloning Kit*. Thermo Fisher Scientific Inc., 10. Auflage.
- Thermo Scientific (2012b). *Product Information: GeneJET Gel Extraction Kit*. Thermo Fisher Scientific Inc., 6. Auflage.
- Thermo Scientific (2012c). *Product Information: PageBlue Protein Staining Solution*. Thermo Fisher Scientific Inc., 6. Auflage.
- Thermo Scientific (2013). *Product Information: GeneJET PCR Purification Kit*. Thermo Fisher Scientific Inc., 6. Auflage.
- Thorne, H. V. (1966). Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA. *Virology*, **29**(2): 234–239.
- Tollefsen, D. M., Pestka, C. A. und Monafó, W. J. (1983). Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate. *The Journal of Biological Chemistry*, **258**(11): 6713–6716.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS*, **76**(9): 4350–4354.
- Trowbridge, J. M. und Gallo, R. L. (2002). Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology*, **12**(9): 117R–125R.
- Tucker, H. M., Mottonen, J., Goldsmith, E. J. und Gerard, R. D. (1995). Engineering of plasminogen activator inhibitor-1 to reduce the rate of latency transition. *Nature Structural Biology*, **2**: 442–445.

- Tusnády, G. E. und Simon, I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, **17**(9): 849–850.
- Van Craenenbroeck, K., Vanhoenacker, P. und Haegeman, G. (2000). Episomal vectors for gene expression in mammalian cells. *European Journal of Biochemistry*, **267**(18): 5665–5678.
- Van Deerlin, V. M. und Tollefsen, D. M. (1991). The N-terminal acidic domain of heparin cofactor II mediates the inhibition of alpha-thrombin in the presence of glycosaminoglycans. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**(30): 20223–20231.
- Van Deerlin, V. M. D. und Tollefsen, D. M. (1992). Molecular interactions between heparin cofactor II and thrombin. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **18**(3): 341–346.
- Van Der Meijden, P. E. J., Munnix, I. C. A., Auger, J. M., Govers-Riemslog, J. W. P., Cosemans, J. M. E. M., Kuijpers, M. J. E., Spronk, H. M., Watson, S. P., Renné, T. und Heemskerk, J. W. M. (2009). Dual role of collagen in factor XII-dependent thrombus formation. *Blood*, **114**(4): 881–890.
- Van Gent, D., Sharp, P., Morgan, K. und Kalsheker, N. (2003). Serpins: structure, function and molecular evolution. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **35**(11): 1536–1547.
- Van Meijer, M., Smilde, A., Tans, G., Nesheim, M. E., Pannekoek, H. und Horrevoets, A. J.-G. (1997). The suicide substrate reaction between plasminogen activator inhibitor 1 and thrombin is regulated by the cofactors vitronectin and heparin. *Blood*, **90**(5): 1874–1882.
- Van Wijk, X. M. R. und Van Kuppevelt, T. H. (2014). Heparan sulfate in angiogenesis: a target for therapy. *Angiogenesis*, **17**(3): 443–462.
- Verhamme, I. M., Bock, P. E. und Jackson, C. M. (2004). The preferred pathway of glycosaminoglycan-accelerated inactivation of thrombin by heparin cofactor II. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**(11): 9785–9795.
- Vincent, S. G., Cunningham, P. R., Stephens, N. L., Halayko, A. J. und Fisher, J. T. (1997). Quantitative densitometry of proteins stained with Coomassie Blue using a Hewlett Packard scanjet scanner and Scanplot software. *Electrophoresis*, **18**: 67–71.
- Vincze, T., Posfai, J. und Roberts, R. J. (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, **31**(13): 3688–3691.
- Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *PNAS*, **76**(2): 615–619.
- Vovis, G. F. und Lacks, S. (1977). Complementary action of restriction enzymes Endo R-DpnI and Endo R-DpnII on bacteriophage f1 DNA. *Journal of Molecular Biology*, **115**(3): 525–538.
- Wallace, A., Rovelli, G., Hofsteenge, J. und Stone, S. R. (1989). Effect of heparin on the glia-derived-nexin-thrombin interaction. *The Biochemical Journal*, **257**(1): 191–196.
- Wang, D. Y.-C., Kumar, S. und Hedges, S. B. (1999). Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **266**(1415): 163–171.

- Watanabe, T., Inoue, K. und Takei, Y. (2009). Identification of angiotensinogen genes with unique and variable angiotensin sequences in chondrichthyans. *General and Comparative Endocrinology*, **161**(1): 115–122.
- Watanabe, T. X., Sokabe, H., Honda, I., Sakakibara, S., Nakayama, T. und Nakajima, T. (1977). Specific pressor activity and stability of synthetic angiotensins. *The Japanese Journal of Pharmacology*, **27**(1): 137–144.
- Weber, K. und Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, **244**(16): 4406–4412.
- Weiner, M. P., Costa, G. L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E. und Bauer, J. C. (1994). Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene*, **151**: 119–123.
- Wijffels, G., Fitzgerald, C., Gough, J., Riding, G., Elvin, C., Kemp, D. und Willadsen, P. (1996). Cloning and characterisation of angiotensin-converting enzyme from the dipteran species, *Haematobia irritans exigua*, and its expression in the maturing male reproductive system. *European Journal of Biochemistry*, **237**(2): 414–423.
- Wilson, J. X. (1984). The renin-angiotensin system in nonmammalian vertebrates. *Endocrine Reviews*, **5**(1): 45–61.
- Wong, M. K. S., Sower, S. A. und Takei, Y. (2012). The presence of teleost-type angiotensin components in lamprey buccal gland suggests a role in endocrine mimicry. *Biochimie*, **94**(3): 637–648.
- Wong, M. K. S. und Takei, Y. (2011). Characterization of a native angiotensin from an anciently diverged serine protease inhibitor in lamprey. *The Journal of Endocrinology*, **209**(1): 127–137.
- Yamasaki, M., Aarii, Y., Mikami, B. und Hirose, M. (2002). Loop-inserted and thermostabilized structure of P1-P1' cleaved ovalbumin mutant R339T. *Journal of Molecular Biology*, **315**(2): 113–120.
- Yates, J. L., Camiolo, S. M. und Bashaw, J. M. (2000). The minimal replicator of epstein-barr virus *oriP*. *Journal of Virology*, **74**(10): 4512–4522.
- Zhang, B., Xiao, W., Qiu, H., Zhang, F., Moniz, H. A., Jaworski, A., Condac, E., Gutierrez-Sanchez, G., Heiss, C., Clugston, R. D., Azadi, P., Greer, J. J., Bergmann, C., Moremen, K. W., Li, D., Linhardt, R. J., Esko, J. D. und Wang, L. (2014). Heparan sulfate deficiency disrupts developmental angiogenesis and causes congenital diaphragmatic hernia. *The Journal of Clinical Investigation*, **124**(1): 209–221.
- Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology & Evolution*, **18**(6): 292–298.
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, **9**: 40–47.

- Zhou, A., Carrell, R. W. und Huntington, J. A. (2001). The serpin inhibitory mechanism is critically dependent on the length of the reactive center loop. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**(29): 27541–27547.
- Zini, S., Fournie-Zaluski, M. C., Chauvel, E., Roques, B. P., Corvol, P. und Llorens-Cortes, C. (1996). Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *PNAS*, **93**(21): 11968–11973.
- Zou, Z., Anisowicz, A., Hendrix, M. J. C., Thor, A., Neveu, M., Sheng, S., Rafidi, K., Seftor, E. und Sager, R. (1994). Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science*, **263**(5146): 526–529.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Phylogenetischer Stammbaum der Vertebraten	2
1.2	Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Systems	4
1.3	Tertiärstruktur von Serpinen am Beispiel des nativen humanen α_1 -Antitrypsins	6
1.4	Drei weitere mögliche Konformationen der Serpine	8
1.5	Darstellung des <i>branched-pathway</i> -Mechanismus inhibitorischer Serpine	9
1.6	Schematische Darstellung der <i>progress-curve</i> -Methode	12
1.7	RCL-Sequenzen von inhibitorischen und nicht-inhibitorischen Human-Serpinen	14
1.8	Evolutionsmodell der Serpine von Vertebraten	17
1.9	Disaccharideinheiten von DS, Heparin und Heparansulfat	18
1.10	Kalottenmodell des ATIII-Thrombin-Heparin-Komplexes	20
1.11	Struktur der nativen und der aktivierten Konformationen von ATIII und HCII	21
1.12	Schematische Darstellung des Blutgerinnungssystems beim Menschen	24
1.13	Darstellung des hypothetischen Blutgerinnungssystems in Neunaugen	25
2.1	Aufbau der Plasmide p287, pcDNA3.1(+), p288 und p298	40
2.2	Aufbau der Plasmide pCEP4 und p308	41
2.3	Aufbau der Plasmide p397 und p398	42
2.4	Aufbau des Plasmids p408	42
2.5	Aufbau der Plasmide p290 und p335	43
2.6	Aufbau der Plasmide p355 und p349	44
2.7	Aufbau der Plasmide pKM263 und p403	44
3.1	Modellierung des Angiotensinogens aus <i>L. fluviatilis</i>	68
3.2	<i>Alignment</i> der RCL-Sequenzen von LA und menschlichen Serpinen	69
3.3	Vergleich der Sequenzen der Helices A und D von Angiotensinogen, HCII und ATIII	70
3.4	Analyse von in COS-7-Zellen hergestellten HA-LA und hLA	71
3.5	Analyse der Heparin-Affinitätschromatographie von HA-LA und hLA	72
3.6	Analyse der Komplexierung von HA-LA und hLA mit verschiedenen Proteasen	73
3.7	Analyse der Komplexbildung zwischen hLA und α -Thrombin	74
3.8	Analyse der hLA-Expression in verschiedenen HEK-293-EBNA-Klonen	75
3.9	Analyse der Aktivität von hLA in verschiedenen HEK-293-EBNA-Klonen	75
3.10	SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung von rekombinantem hLA	76
3.11	Abhängigkeit der Hemmung des humanen α -Thrombins durch hLA von der GAG-Konzentration	78
3.12	Beispiel für eine SI-Bestimmung	79
3.13	Analyse der Tyrosin-Sulfatierung der „EEDYD“-Sequenz von LA	80
3.14	Schematische Darstellung der vorhergesagten 2D-Struktur von LfAGTR1	81
3.15	Phylogenetische Einordnung von LfAGTR1	82
3.16	Sequenz- <i>Alignment</i> von LfAGTR1, humanem AGTR1 und AGTR2.	83
3.17	Internalisierung des eGFP-getaggten LfAGTR1	84
3.18	Analyse von in COS-7-Zellen hergestelltem HA-LfHCII	85

3.19	Analyse der Heparin-Affinitätschromatographie von HA-LfHCII	86
3.20	Analyse der Komplexierungstests von HA-LfHCII mit humanem α -Thrombin . . .	86
3.21	Phylogenetische Klassifikation von Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2	88
3.22	<i>Alignment</i> der RCLs von Lfl_SpnV4_1, Lfl_SpnV4_2 und humanen Serpinen . .	89
3.23	Analyse von in COS-7-Zellen hergestelltem Lfl_SpnV4_1 und Lfl_SpnV4_2 . . .	90
3.24	Komplexierungstest von HA-Lfl_SpnV4_1 und -Lfl_SpnV4_2	90
3.25	SDS-PAGE-Analyse der Expression von Lfl_SpnV4_1 in <i>E. coli</i>	91
3.26	Reinigung von Lfl_SpnV4_1 mittels IMAC-Chromatographie	92
3.27	SDS-PAGE-Analyse der Rückfaltung und Aufreinigung von Lfl_SpnV4_1	92
3.28	Überprüfung der biologischen Aktivität von Lfl_SpnV4_1	93
3.29	SI-Wert-Bestimmung für die Interaktion zwischen Lfl_SpnV4_1 und hFXa	94
3.30	Bestimmung von k_{inh} der Reaktion zwischen hFXa und Lfl_SpnV4_1	95
3.31	Konservierte Syntenie der Gene für HCII und PI4KA	96
4.1	Osmolarität und Konzentration von Na ⁺ , Cl ⁻ und Mg ²⁺ in Flussneunaugen	98
4.2	Vergleich der Sequenzen von Angiotensin II aus verschiedenen Organismen . .	100
4.3	Darstellung der möglichen Veränderungen in Angiotensin II-Sequenzen während der Evolution	101
4.4	Teil des Sequenz- <i>Alignments</i> von LA, hLA sowie HA-LA	103
4.5	Vergleich der RCL-Sequenzen von Angiotensinogen, HCII und ATIII.	105
4.6	Abhängigkeit der Inhibitions geschwindigkeit von den Konzentration der GAGs .	106
4.7	Vergleich der N-terminalen Sequenzen von LA, LfHCII und humanem HCII . . .	107
4.8	Phylogenetischer Stammbaum von Angiotensinogen, HCII und ATIII	109
4.9	Evolution der Serpin-vermittelten Thrombin-Inhibition	110
4.10	Graphische Darstellung der k_{inh} -Werte für die Hemmung von hFXa durch Lfl_SpnV4_1, humanes ATIII und ZPI	113
4.11	Vergleich der Helices A und D von Lfl_SpnV4_1, humanem ATIII und ZPI	114
4.12	Serpine und ihre Rolle bei der Blutgerinnung ursprünglicher Vertebraten	116

Tabellenverzeichnis

1.1	Klassifikation der humanen Serpine	16
2.1	Lösungen für die Isolierung von Gesamt-RNA	29
2.2	Lösungen für die Isolierung genomischer DNA	31
2.3	Standard-PCR-Ansatz	32
2.4	Standard-PCR-Programm	32
2.5	Kolonie-PCR-Ansatz	33
2.6	Kolonie-PCR-Programm	33
2.7	Ansatz für die PCR-Mutagenese	34
2.8	Programm für die PCR-Mutagenese	34
2.9	Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese	36
2.10	Puffersystem für Zellaufschluss und <i>inclusion bodies</i> -Solubilisierung	46
2.11	Lösungen für die Transfektion	48
2.12	Puffer für die Herstellung von Zellextrakten	50
2.13	Wichtige Eigenschaften der HiTrap™ Heparin HP-Sepharose-Säule	52
2.14	Wichtige Eigenschaften der IMAC Sepharose™ 6 <i>Fast Flow</i>	53
2.15	Puffersystem für die Ionenaustauschchromatographie	54
2.16	Puffersystem für die Heparin-Affinitätschromatographie	54
2.17	Puffersystem für die Reinigung von Lfl_SpnV4_1	55
2.18	Lösungen und Puffer für die SDS-PAGE	57
2.19	Lösungen und Puffer für den Western-Blot	58
2.20	Versuchsbedingungen der Komplexierungstests	60
2.21	Puffersystem für die Bestimmung der relativen Heparinbindungsfähigkeit	61
2.22	Zusammensetzung des Inkubationspuffers der Fluoreszenzmikroskopie	64
3.1	Die von <i>I-TASSER</i> geschätzte Genauigkeit des ausgewählten Modells	67
3.2	Hemmung von α -Thrombin durch hLA	77
3.3	SI-Werte für die Interaktion von hLA mit humanem α -Thrombin	79
3.4	Geschwindigkeitskonstanten für die Hemmung von hFXa durch Lfl_SpnV4_1	95
4.1	Geschwindigkeitskonstante der Hemmung von hFXa	113
5.1	Chemikalien/Reagenzien	120
5.2	Materialien	122
5.3	Geräte	123
5.4	Genspezifische Primer	124
5.5	Primer für Sequenzierreaktionen	125
5.6	Kits	125
5.7	DNA- und Protein-Marker	125
5.8	Antikörper	125
5.9	Enzyme	126
5.10	Serin- und Cysteinproteasen	126
5.11	Substrate und Inhibitoren	126

5.12 Bakterienstämme	127
5.13 Medien für die bakterielle Kultivierung	127
5.14 Zelllinien	127
5.15 Medien zur Kultivierung von Zelllinien	127
5.16 Computer-Programme	128
5.17 Datenbanken	128
5.18 Zur phylogenetischen Analyse von LfAGTR1 verwendete Proteinsequenzen . .	134

Abkürzungsverzeichnis

∞	Unendlichkeit, <i>infinity</i>
α_1 -ACT	α_1 -Antichymotrypsin
α_1 -AT	α_1 -Antitrypsin
α_2 -AP	α_2 -Antiplasmin
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
<i>blast</i>	<i>basic local alignment search tool</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (ca. 9,81 m/s ²)
<i>I-TASSER</i>	<i>iterative implementation of the threading assembly refinement</i>
TMR	Tetramethylrhodamin
TMR-Lfl_Ang	TMR-markiertes Lfl_Ang II
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ACE2	Angiotensin-Converting-Enzyme Typ 2
ACELA	Angiotensin-Converting-Enzyme-ähnliche Aktivität
ADH	antidiuretisches Hormon
AGTR1	Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor
AGTR2	Typ-2-Angiotensin-II-Rezeptor
AMPA	Aminopeptidase A
AMPM	Aminopeptidase M
Ang	Angiotensin
APC	aktiviertes Protein C
APS	Ammoniumpersulfat
ATIII	Antithrombin III
BGH	Rinderwachstumshormon, <i>bovine growth hormone</i>
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin, <i>bovine serum albumin</i>
C1-Inh	C1-Inhibitor
CAP	<i>cytoplasmic antiprotease</i>
CBG	Corticosteroid-bindendes Globulin
CBP2	Collagen-bindendes Protein 2
cDNA	komplementäre DNA, <i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
COS	<i>Cercopithecus aethiops</i> , <i>origin-defective SV-40</i>
cv	Säulenvolumen, <i>column volume</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	steriles Milli-Q [®] Wasser
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
DS	Dermatansulfat
DS-PGs	Dermatansulfat-Proteoglykane

DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	extrazelluläre Schleife, <i>extracellular loop</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
eNOS	endotheliale-Stickstoffmonoxid-Synthase
ESTs	<i>expressed sequence tags</i>
EZF	extrazelluläre Flüssigkeit
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FIXa	aktivierter Faktor IX
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FVa	aktivierter Faktor V
FVIIa	aktivierter Faktor VII
FVIIIa	aktivierter Faktor VIII
FXa	aktivierter Faktor X
FXIa	aktivierter Faktor XI
FXIIa	aktivierter Faktor XII
g	Gramm
GAGs	Glykosaminoglykane
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GlcA	D-Glukuronsäure
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HA-tag	Hämagglutinin-tag
HA-LA	Angiotensinogen aus <i>L. fluviatilis</i> mit HA-tag am N-Terminus
HCII	Heparinkofaktor II
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
hFXa	humaner Faktor Xa
His ₍₆₎ -tag	Hexa-Histidin-tag
hLA	humanisiertes Angiotensinogen aus <i>L. fluviatilis</i>
HMWK	<i>high molecular weight kininogen</i>
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
HS-PGs	Heparansulfat-Proteoglykane
HSP47	<i>heat shock protein 47</i>
IBs	<i>inclusion bodies</i>
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
ICL	intrazelluläre Schleife, <i>intracellular loop</i>
IdoA	L-Iduronsäure
IL-6	Interleukin-6
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>
IRAP	Insulin-regulierter Aminopeptidase-Rezeptor
kb	Kilo-Basenpaaren
Kf-Ang	Knochenfisch-ähnliche Angiotensin-Peptide
L	Liter
LA	Angiotensinogen aus <i>L. fluviatilis</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>

LEI	Leukozyten-Elastase-Inhibitor
LfAGTR1	Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor aus <i>L. fluviatilis</i>
LfHCII	Heparinkofaktor II aus <i>L. fluviatilis</i>
Lfl_Ang II	Angiotensin II aus <i>L. fluviatilis</i>
Lfl_SpnV4_1 ..	SpnV4_1 aus <i>L. fluviatilis</i>
Lfl_SpnV4_2 ..	SpnV4_2 aus <i>L. fluviatilis</i>
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MAS	Mas-Onkogen
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	<i>3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaAc	Natriumacetat
ncRNA	nichtkodierende RNA, <i>non-coding RNA</i>
NEP	neutrale Endopeptidase, Neprilysin
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
oSP	ohne Signalpeptid
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PAI-2	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 2
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PC	Protein C
PCI	Protein C-Inhibitor
PCIA	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 25/24/1
PCR	Polymerasekettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PEDF	<i>pigment epithelium-derived factor</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
pI	isoelektrischer Punkt
PI4KA	Phosphatidylinositol 4-kinase α
PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
PK	Präkallikrein
PL	Phospholipiden
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PN-1	Protease Nexin-1
PolyP	Polyphosphate
ProS	Protein S
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAS	Renin-Angiotensin-System
RCL	reaktive Schleife, <i>reactive centre loop</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>revolutions per minute</i>

RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE ...	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Serpin	Serinprotease-Inhibitor, <i>serine protease inhibitor</i>
SI	Stöchiometrie der Inhibierung, <i>stoichiometry of inhibition</i>
SNS	sympathisches Nervensystem
SV40	Simian Virus 40
T _m	Schmelztemperatur
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TE-Puffer	Tris-Puffer mit EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TF	<i>tissue factor</i>
TM	Thrombomodulin
TM1–7	Transmembransegment 1 bis 7
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
U	Unit
V/cm	Volt pro Zentimeter
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
ZPI	Protein-Z-abhängiger Protease-Inhibitor
°C	Grad Celsius, Celsius-Temperatur

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Yunjie Wang

Bielefeld, den 18. Oktober 2014