

2 Material und Methode

2.1 Material und Geräte

2.1.1 Folgende Chemikalien und Biomaterialien wurden verwendet:

ACN (Acetonitril) von Merck, AEBSF (AppliChem), Ameisensäure (Fluka), AMPSO (N-(1,1-Dimethyl-2-hydroxyethyl)-3-amino-2-hydroxypropanesulfonsäure) von Sigma, Aprotinin (AppliChem), Bestatin (AppliChem), Bicine (Sigma), bis-Tris (Fluka), Bis-Tris-Propan (Sigma), Boc-Asp(Obzl)-Pro-Arg-AMC (Bachem), CAPS (3-Cyclohexylamino-1-propan-S) von Sigma, CHES (2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure) von Sigma, Chymostatin von AppliChem, Cohn-Fraktionen von Sigma, Coomassie Plus Protein Assay Reagent von Pierce, DHB (Dihydroxybenzoesäure) von Fluka, DMSO (Dimethylsulfoxid) von Fluka, DTT (Dithiothreitol) von Sigma, E64 von AppliChem, EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide) von Pierce, EDTA (Ethylenediaminetetraessigsäure) von Biorad, Essigsäure von Fluka, Glycin (Riedel), Harnstoff (Sigma), Heparin (Roche), HEPES (4-(2-Hydroxy-ethyl) piperazin-1-ethansulfonsäure) von Sigma, HCl (Salzsäure) von Merck, Iodacetamid (Sigma), K_2HPO_4 (Dikaliumhydrogenphosphat) von Merck, Komplement-Faktor-I (Sigma), Malonsäure (Sigma), MES (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure) von Sigma, MOPS (3-(N-Morpholino)propan-sulfonsäure) von Sigma, $NaHCO_3$ (Natriumhydrogencarbonat) von AppliChem, NaH_2PO_4 (Natriumdihydrogenphosphat) von Merck, NaCl (Natriumchlorid) von Roth, N-Methyldiethanolamin (AppliChem), NaOH (Natriumhydroxid) von Sigma, Pefabloc SC (Serva), Pepstatin A (Serva), Piperazin (Fluka), Plasma (human) von Sigma, TFA (Trifluoressigsäure) von Fluka, Trypsin Sequencing grade (Promega), Wasser (HPLC grade) von J.T. Baker.

2.1.2 Verwendete Chromatographiematerialien:

Butyl-650-Gel (Tosoh), Buthyl-Sepharose (GE Healthcare), DEAE-650M-Gel (Tosoh), EAH-Sepharose (GE Healthcare), Ether-650-Gel, Fractogel COO^- (Merck), Fractogel DEAE (Merck), Fractogel SO_3^- (Merck), Fractogel TMAE (Merck), Methyl MacroPrep-Gel (Biorad), Phenyl-650-Gel (Tosoh), Phenyl-Sepharose (GE Healthcare), QAE-550C-Gel (Tosoh), Q-Sepharose FF (GE Healthcare), Sepharose 6MB (GE Healthcare), SP-Sepharose FF (GE Healthcare), Streamline DEAE-Gel (GE Healthcare), Super-Butyl 550-Gel (Tosoh), SuperQ-650M-Gel (Tosoh), t-Butyl

MacroPrep-Gel (Biorad), Toyopearl CM-650M-Gel (Tosoh), Unosphere S-Gel (Biorad), Unosphere Q-Gel (Biorad).

2.1.3 Verwendete Säulengehäuse für die Säulenchromatographien

Die Reinigung des UCE-Substrats wurde mit der ZORBAX SB-C18 Prep HAT 21.2x210 Säule mit Stahlgehäuse durchgeführt. Das XK-Säulengehäuse der Firma GE Healthcare wurde für die Hydrophobe Interaktionschromatographie eingesetzt. Für die Kationenaustauschchromatographie wurde mit der vorgepackten S6-Säule mit Unosphere S-Gel der Firma Biorad gearbeitet. Die Affinitätschromatographie wurde in dem HR 10/30 Säulengehäuse der Firma GE Healthcare durchgeführt. Die Größenausschlusschromatographie erfolgte mit der Superdex 200HR 10/30 von GE Healthcare.

2.1.4 Geräte

Für den MES-UCE-Assay wurde das Massenspektrometer Reflex III MALDI-TOF der Firma Bruker verwendet. Aliquots der Inkubationsansätze aus dem MES-Assay wurden auf den Bruker MTP AnchorChip 384/400 pipettiert. Die Immobilisierung der Proben erfolgte auf dem Überschlagsrotor Rotator Drive STR4 von Stuart Scientific. Für die Substratinkubation wurde der Schüttler von Fisher Bioblock Scientific verwendet. Die Chromatographien wurden an den HPLC Anlagen (Explorer und Purifier) von der Firma GE Healthcare durchgeführt. Die PPS-Experimente erfolgten mit dem Genesis Freedom 200 mit einem Temo 96-Kanalpipettenkopf der Firma Tecan. Die Befüllung der Pufferplatten in 1,2ml Storage DeepWell Platten der Firma ABGene für die PPS-Experimente erfolgte mit dem Dispenser Multidrop DW der Firma Thermo Electron. Für den MES-UCE-Assay wurden 500µl Eppendorfgefäße und Mikrottestplatten 96Well K der Firma Sarstedt benutzt. Die pH-Werte wurden mit der InLab[®]422 Combination Semi-micro pH-Electrode von METTLER TOLEDO gemessen. Für die Proteinbestimmung der Eluate und Überstände aus den PPS-Experimenten wurde der UV-Reader Genios der Firma Tecan eingesetzt. Alle weiteren Proteinkonzentrationen wurden mit dem Photometer iEMS Reader MF von Thermo Labsystems bestimmt. Die Einengung der Proteinfractionen wurde in Amicon Ultra Zentrifugenfiltern mit der Ausschlussgrenze von 10kDa der Firma Millipore durchgeführt und mit der Multifuge 3 S-R von Heraeus zentrifugiert. Die Vorbereitung der Proben ab der 2. Chromatographie erfolgte unter der Sterilbank

LaminAir von Holten. Die Identifizierung der tryptischen Peptide wurde mit der LC-ESI MSD Trap XCT Ultra mit dem HPLC Chip 40nl trap 75µm x 153mm 5µm C18 SB-ZX der Firma Agilent Technologies durchgeführt.

2.2 Methode

2.2.1 Reinigungs-Strategie

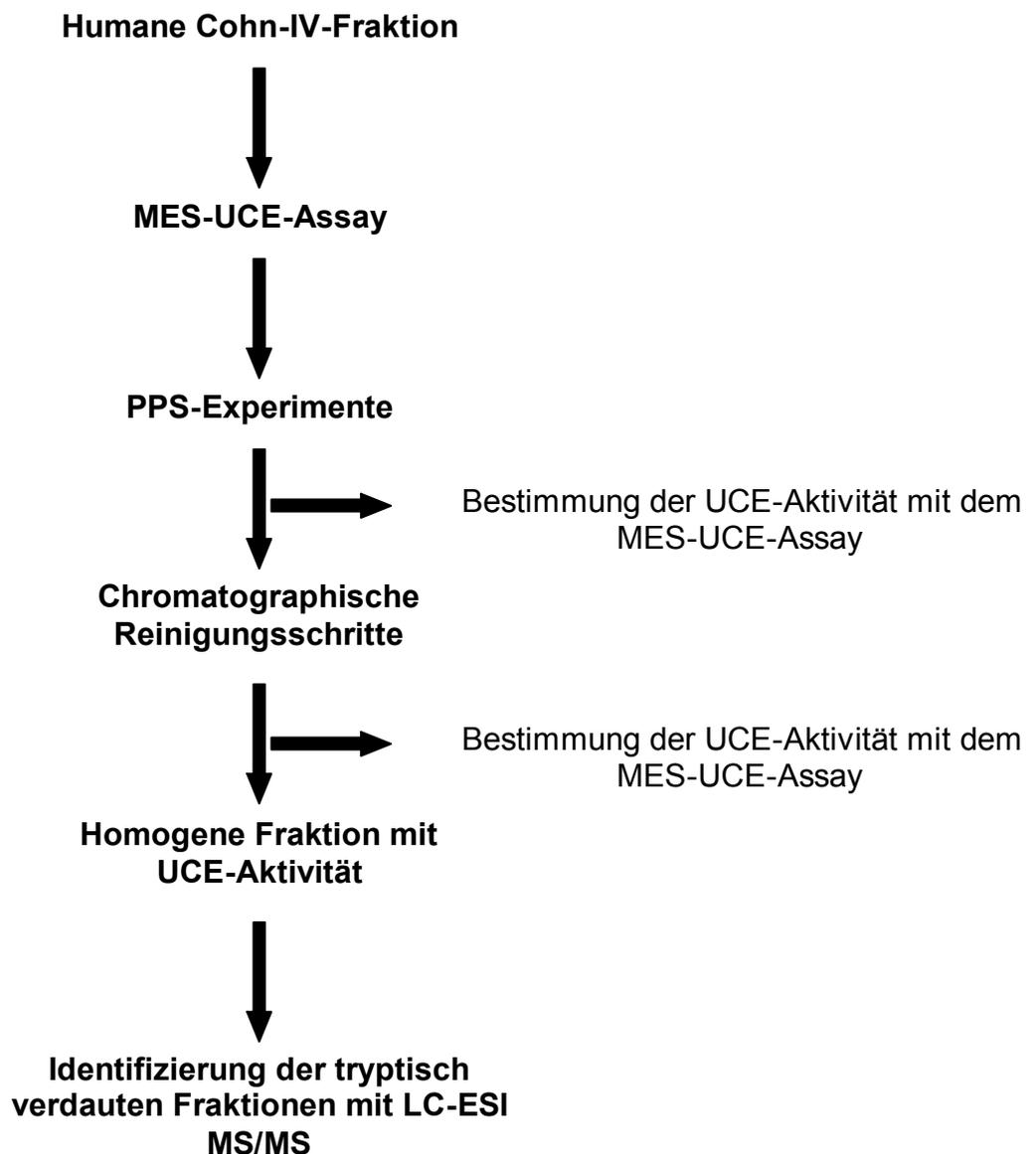


Abb.3: Reinigungs-schemata eines Urotensin-II-generierenden Enzyms (UCE).

Die Abbildung 3 zeigt das methodische Vorgehen für die Reinigung des UCE. Als Ausgangsmaterial wurde eine kommerzielle Cohn-IV-Präparation eingesetzt. Nach Entwicklung eines Assays zum Nachweis der UCE-Aktivität (UCE-MES-Assay) wurden Chromatographien im Batch-Verfahren durchgeführt (PPS-Experimente). Der

aus den PPS-Experimenten ermittelte Parametersatz wurde auf die anschließende chromatographische Reinigung übertragen. Zur Bestimmung der aktiven Fraktionen mit einer UCE-Aktivität nach allen PPS-Experimenten und chromatographischen Reinigungen wurde der UCE-MES-Assay verwendet.

Nahezu homogene Fraktionen mit UCE-Aktivität, die nach 4 Reinigungsschritten generiert worden sind, wurden tryptisch verdaut und mittels LC-ESI MS/MS analysiert.

2.2.2 Entwicklung eines Massenspektrometrie-basierten Enzym-Screening Systems (MES-System) zur Detektion einer UCE-Aktivität

2.2.2.1 Herstellung eines spezifischen UCE-Substrats (UCE-S)

Ausgehend vom humanen Präpro-Ull wurde eine Teilsequenz RIWKPYKKRETPDCFWKYCV mit der Ull-Schnittstelle von der WITA GmbH synthetisiert. Das UCE-S Peptid wurde in 100mM Ammoniumacetat; pH7 aufgenommen, auf eine Konzentration von 0,1mg/ml eingestellt und 48h inkubiert. Die Lösung wurde anschließend auf 0,1% TFA eingestellt und auf eine 75ml Reversed Phase ZORBAX SB-C18 Prep HAT 21.2x210 Säule aufgetragen. Als mobile Phase wurde eine 0,1%ige TFA Lösung (Puffer A) und 80% ACN (Puffer B) verwendet. Die Reversed-Phase-Chromatographie (RPC) wurde bei einem Fluss von 15ml/min durchgeführt. Der Gradient verlief von 0% auf 60% B in 45min und dann für 5min auf 100% B. Es wurden Fraktionen von 10ml gesammelt. Gewonnene Peptid-Fraktionen der RPC wurden bei -80°C eingefroren und anschließend in der Vakuumzentrifuge Savant SPD111V getrocknet. Auf einen MTP AnchorChip wurde 1µl DHB-Matrix-Lösung (30mg/ml DHB in 50% ACN) aufgetragen und eingetrocknet. Die getrockneten Peptide wurden in 1ml destilliertem Wasser gelöst und 1µl dieser Lösungen auf die eingetrocknete Matrix pipettiert. Nach dem Trocknen der Proben, wurden diese massenspektrometrisch vermessen. Peptid-Fraktionen die bei 2645,3 Da ein Signal mit normaler Isotopenverteilung zeigten und keine Peaks, die auf Verunreinigungen schließen lassen, wurden für die weiteren Experimente verwendet.

2.2.2.2 Immobilisierung der Proteinfractionen

Die Immobilisierung der Proteinfractionen erfolgte an die Affinitätsbeads BrCN-aktivierte Sepharose 6MB. Für die Immobilisierung wurde eine entsprechende Menge an trockenen Beads aus dem Vorratsgefäß abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zum Quellen der Beads wurde das ca. 100-fache Volumen einer 1mM HCl-Lösung zugegeben und die Mischung auf einem Überschlagsrotor ca. 1h Stunde inkubiert. Von den Beads wurde die überschüssige HCl-Lösung entfernt und 3mal mit Wasser gewaschen. Für die Immobilisierung von Proteinfractionen wurden jeweils 30µl Beads portioniert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Wasser entfernt und die Beads 1mal mit Kopplungspuffer (100mM NaHCO₃, 500mM NaCl, pH8,3) gewaschen. Dieser wurde anschließend von den Beads entfernt. Es wurden 30µl Proteinlösung mit 30µl Kopplungspuffer gemischt und zu den Beads pipettiert. Die Kopplung erfolgte 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf einem Überschlagsrotor. Nach der Kopplung wurde die Lösung von den Beads entfernt, 100µl Blockierungspuffer (100mM NaHCO₃, 500mM NaCl, 100mM Glycin, pH 8,3) zugegeben und 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf einem Überschlagsrotor inkubiert. Nach der Blockierung wurden die immobilisierten Proteine 3mal mit Wasser gewaschen.

2.2.2.3 Inkubation der immobilisierten Proteinfractionen mit dem UCE-Substrat

Von den Beads mit den immobilisierten Proteinfractionen wurde das Wasser vom vorigen Waschschrift entfernt und 30 µl einer 10⁻⁵M UCE-Substratlösung zugegeben. Die Inkubation erfolgte auf einem Schüttler. Auf ein MTP AnchorChip wurde 1µl einer DHB-Matrix-Lösung pipettiert. Nach dem Eintrocknen der Matrix wurden nach definierten Zeitpunkten 3x2µl Aliquots der Reaktionsmischung abgenommen und auf den MTP AnchorChip pipettiert. Beim Aufbringen der Proben auf die Matrix kommt es zur Kokristallisation der Probenmoleküle der Reaktionslösung in die Matrix. Dies erfolgt inhomogen, woraus Bereiche niedriger und hoher (Hot Spots) Probenmolekülkonzentrationen resultieren. Trifft der Laser auf Hot Spot Areale kommt es zu hohen Signalintensitäten, was nicht die exakte Verteilung der Probenmoleküle in dem Kristall widerspiegelt. Um eine Relativierung dieses Effekts zu erreichen, wurden pro Position 20 Massenspektren aufgenommen, anschließend eine neue Position des Kristalls für den Laserbeschuss gewählt und insgesamt 100 Spektren pro Probe summiert.

2.2.2.4 Semiquantitativer Nachweis der Reaktionsprodukte mittels MALDI-Massenspektrometrie

Für den semiquantitativen Nachweis einer UCE-Aktivität wurden für jedes Massenspektrum Verhältnisse der Signalintensitäten von UII (Massensignal bei 1389.5 Da) und des Substrats UCE-S (Massensignal bei 2645.3 Da) gebildet. Von den n=3-Messungen wurden Mittelwerte der Intensitätsverhältnisse gebildet. Die gemittelten Intensitätsverhältnisse wurden von allen Zeitpunkten addiert und der erhaltene Wert als UCE-Aktivität angegeben. Alle Schritte wurden mit einem Visual Basic Skript automatisch ausgeführt.

2.2.3 Suche nach geeigneten chromatographischen Parametern zur Proteinreinigung (PPS)

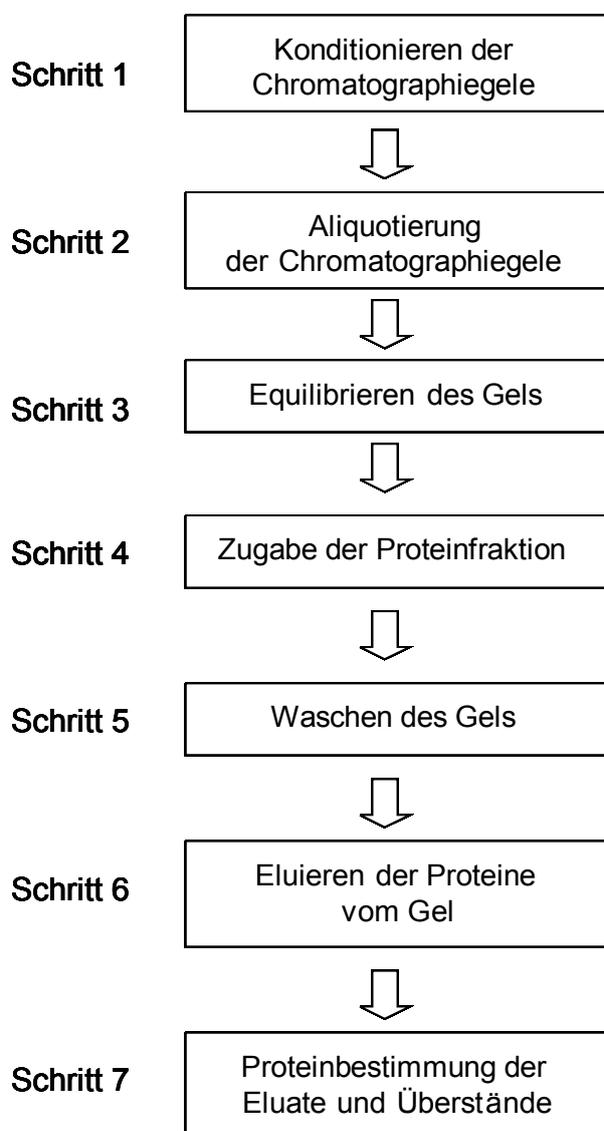


Abb.4: Schema zur Durchführung von PPS-Experimenten

Das PPS ist ein Batchverfahren, bei dem verschiedene chromatographische Parameter auf ihre Eignung für eine chromatographische Reinigung getestet wurden. In Abbildung 4 ist der schematische Ablauf dargestellt. Die Batchchromatographien wurden in 96-DeepWell-Platten automatisch mit einem Pipettierroboter-system durchgeführt. Der erste Schritt bestand im Waschen und Konditionieren der zu testenden Chromatographiegelmaterialien. Dazu wurden definierte Volumina einer Suspension mit den gewünschten Chromatographiegelmaterialien abgenommen, in ein Gefäß überführt und nach Sedimentation der Überstand abgenommen. Anschließend wurde das Chromatographiegelmaterial einmal mit Wasser gewaschen und anschließend konditioniert. Im Anschluss wurde das Gel mehrfach gewaschen und in einen Messzylinder

überführt. Nach Sedimentation wurde die überstehende Lösung abgenommen und soweit mit Wasser aufgefüllt bis eine 1:1 Gel-Wasser-Mischung entstand. Der 2. Schritt beinhaltete die Aliquotierung der Gele in 96-DeepWell-Platten. Dafür wurde die Gel-Wasser-Suspension in ein Gefäß überführt und das ganze soweit gemischt, das eine homogene Suspension entstand, aus der 20µl entnommen und in das entsprechende Well der 96-DeepWell-Platte pipettiert wurde. Das Gelsediment betrug in jedem Well 10µl. Ab Schritt 3 wurden alle Schritte automatisch mit dem Pipettierroboter durchgeführt. Der dritte Schritt beinhaltete die Abnahme des Überstands von den Gelen. Für die Gel-Equilibrierung wurden 100µl des individuellen Puffers zum Gelsediment gegeben und mehrfach bis zur Homogenität gemischt. Nach Sedimentation der Gele wurde der Überstand entfernt und erneut mit 100µl Equilibrierungspuffer gewaschen. Dieser Vorgang wurde 3mal wiederholt. Schritt 4 beinhaltete den Probenauftrag, bei dem 10µl der Proteinlösung zusammen mit 170µl der individuellen Probenauftragspuffer zu den Gelen gegeben und vermischt wurden. Nach dem Sedimentieren der Gele wurde der Überstand mit den nicht gebundenen Proteinen abgenommen und in eine UV-durchlässige 96-DeepWellplatte überführt und für die Proteinbestimmung aufbewahrt. Das Waschen der Gele (Schritt 5) mit den individuellen Waschpuffern ist identisch mit dem Equilibrierungsschritt (Schritt 3). Nach dem Sedimentieren der Gele wurden die Überstände verworfen. Die Elution (Schritt 6) mit dem Elutionspuffer erfolgte stufenweise. Die Eluate (100µl pro Well) wurden in eine UV-durchlässige 96-DeepWell-Platte überführt. Von den Eluaten und Überständen wurden Proteinbestimmungen durchgeführt (Schritt 7). Für die automatische Durchführung der PPS-Experimente mußten folgende Komponenten bereitgestellt werden: eine befüllte Gelplatte (für Schritt 2), eine Equilibrierungs/Waschpufferplatte (für Schritt 3 und 5), eine Probenauftragspufferplatte (Schritt 4), eine Probenplatte mit den Proteinfractionen (für Schritt 4), eine Elutionsplatte (für Schritt 6) und zwei UV-durchlässige 96-DeepWell-Platten (für Schritt 4 und 6).

2.2.4 Gewinnung von Plasma aus humanem Blut

In einer 50ml Spritze wurde 1ml Heparinlösung vorgelegt. Anschließend wurden 50ml humanes Vollblut in die Heparin-befüllte Spritze aufgezogen. Das Blut wurde in vier 15ml Greihner-Röhrchen a 12ml aufgeteilt und bei RT 20min bei 5000 rpm

zentrifugiert. Im Überstand befand sich das Plasma, das von den festen Blutbestandteilen getrennt worden war.

2.2.5 Suche einer UCE-Aktivität in humanem Plasma mit dem MES-UCE Assay

Die Immobilisierung der Plasma-Proteine erfolgte nach Vorschrift 2.2.2.2. Für die Immobilisierung wurden 50µl humanes Plasma in 50µl Kopplungspuffer aufgenommen. Nach der Immobilisierung erfolgte die Inkubation mit dem UCE-S (siehe Punkt 2.2.2.3). Der Nachweis der UCE-Aktivität über die Bildung des Reaktionsprodukts UII wurde mit dem MALDI-MS erbracht (siehe Punkt 2.2.2.4). Aliquots wurden in der Regel nach 2h, 5h und 24h abgenommen.

2.2.6 Abschätzung des Molekulargewichts des UCE aus humanem Plasma

Es wurden jeweils 500µl humanes Plasma in Amicon Ultra Zentrifugenfilter der Firma Millipore mit den Ausschlussgrößen 10kDa, 30kDa, 50kDa und 100kDa pipettiert und 30min bei 4°C bei 4000 x g zentrifugiert. Die erhaltenen Retentate und Filtrate wurden abgenommen und jeweils 100µl immobilisiert (Vorschrift 2.2.2.2; 2.2.2.3; 2.2.2.4).

2.2.7 Suche einer UCE-Aktivität in unterschiedlichen humanen Cohn-Fraktionen mit dem MES-UCE Assay

Es wurden jeweils 1mg der gekauften Cohn-III-Globulinfraktion, Cohn-III-γ-Globulinfraktion und Cohn-IV-Fraktion in 100µl Kopplungspuffer aufgenommen und an 30 µl Beads immobilisiert. Nach der Immobilisierung (Punkt 2.2.2.2) und Inkubation mit dem Substrat (Punkt 2.2.2.3) wurde die UCE-Aktivität bestimmt (2.2.2.4). Die Abnahme der Aliquots erfolgte nach 1h, 2h, 4h, 6h und 28h.

2.3 Reinigung des UCE

2.3.1 Suche nach geeigneten Parametern zur chromatographischen Reinigung des UCE mit dem PPS-System

Für die Durchführung der PPS-Experimente mussten insgesamt fünf 96-DeepWell-Platten vorbereitet werden. Insgesamt wurden 8 unterschiedliche Anionenaustauschergele und 5 verschiedene pH-Werte getestet. Daraus ergab sich eine Anzahl von 40 unterschiedlichen Parametersätzen. Die Pufferlösungen und Gele wurden jeweils beginnend von Position A1 bis H5 der 96-DeepWell-Platte

befüllt. Für die Vorbereitung der Gelplatte wurden 10ml Fractogel TMAE, Fractogel DEAE, SuperQ-650M-Gel, DEAE-650M-Gel, QAE-550C-Gel, Streamline DEAE-Gel, Q-Sepharose FF und Unosphere Q-Gel abgenommen und in ein 50ml Greihner-Röhrchen überführt, mit Wasser gewaschen und anschließend mit einer 1M NaCl-Lösung konditioniert. Die Gele wurden dann 3mal mit Wasser gewaschen, in einen Messzylinder überführt und eine 1:1 Gel-Wasser-Mischung hergestellt und in ein Greihner-Röhrchen überführt. Nachdem durch mehrmaligen Schwenken eine homogene Suspension entstand, wurden 20µl der Suspension in das entsprechende Well pipettiert.

	1	2	3	4	5
A	Fractogel TMAE				
B	Fractogel DEAE				
C	SuperQ-650M	SuperQ-650M	SuperQ-650M	SuperQ-650M	SuperQ-650M
D	DEAE-650M	DEAE-650M	DEAE-650M	DEAE-650M	DEAE-650M
E	QAE-550C	QAE-550C	QAE-550C	QAE-550C	QAE-550C
F	Streamline DEAE				
G	Q-Sepharose FF				
H	UnoshereQ	UnoshereQ	UnoshereQ	UnoshereQ	UnoshereQ

Tab. 1: Gelplatte mit jeweils 10µl Gelsediment pro Well. XY-Achsen zeigen die Positionen der 96-DeepWell-Platte an

Für die Herstellung der Pufferplatten wurden von jedem Puffer jeweils 50ml einer 50mM Lösung hergestellt und auf die gewünschten pH-Werte mit NaOH bzw. HCl eingestellt. Die Befüllung der Probenauftragspufferplatte und der Equilibrierungs-/Waschplatte mit individuellen Puffern erfolgte mit einem Dispensers.

	1	2	3	4	5
A	Piperazin pH6	Bis-Tris-Propan pH7	N-Methyl- diethanolamin pH8	CHES pH9	CAPS pH10
B	Piperazin pH6	Bis-Tris-Propan pH7	N-Methyl- diethanolamin pH8	CHES pH9	CAPS pH10
C	Piperazin pH6	Bis-Tris-Propan pH7	N-Methyl- diethanolamin pH8	CHES pH9	CAPS pH10
D	Piperazin pH6	Bis-Tris-Propan pH7	N-Methyl- diethanolamin pH8	CHES pH9	CAPS pH10
E	Piperazin pH6	Bis-Tris-Propan pH7	N-Methyl- diethanolamin pH8	CHES pH9	CAPS pH10
F	Piperazin pH6	Bis-Tris-Propan pH7	N-Methyl- diethanolamin pH8	CHES pH9	CAPS pH10
G	Piperazin pH6	Bis-Tris-Propan pH7	N-Methyl- diethanolamin pH8	CHES pH9	CAPS pH10
H	Piperazin pH6	Bis-Tris-Propan pH7	N-Methyl- diethanolamin pH8	CHES pH9	CAPS pH10

Tab. 2: Probenauftragspufferplatte und Equilibrierungs- und Waschpufferplatte befüllt mit jeweils 500µl 50mM individueller Puffer pro Well.

Die Elutionsplatte wurde mit einer 1M NaCl-Lösung befüllt. In der Probenplatte befand sich in den Wells A1-D1 jeweils 500µl einer 1mg/ml Cohn-IV-Proteinlösung. Nach Herstellung aller Platten für die PPS-Experimente wurden diese auf der Pipettierroboterplattform positioniert und die PPS-Experimente automatisch durchgeführt (siehe 2.2.3). Die Elution erfolgte 4mal mit 30µl Elutionspuffer. Es wurden 100µl der Eluate abgenommen und mittels MES-UCE-Assay auf eine UCE-Aktivität untersucht (siehe unter 2.2.2.2, 2.2.2.3 und 2.2.2.4).

2.3.2 Erste chromatographische Reinigung mittels Anionenaustausch-Sample Displacement-Chromatographie zur Anreicherung des UCE

Es wurden 600ml QAE-550C-Gel abgenommen, 1mal mit Wasser gewaschen und anschließend mit einer 1M NaCl-Lösung konditioniert. Es erfolgte ein 3maliges Waschen mit Wasser des konditionierten Gels. Das gewaschene Gel wurde mit dem 50mM bis-Tris-Propan-Puffer bei einem pH von 8 (Puffer A) equilibriert und anschließend gleichmäßig auf 10 Glasflaschen verteilt. 2g der Cohn-IV-Präparation wurden in 100ml Puffer A aufgenommen und mit dem Gel in der ersten Flasche vermischt. Nach Sedimentation des Gels wurde der Überstand abgenommen, in die zweite Flasche überführt und dort mit dem Gel vermischt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis alle 10 Gelaliquots mit den Überständen der vorigen Chromatographie vermischt worden waren. Die 10 Gelaliquots wurden mit jeweils

50ml Puffer A 3mal gewaschen. Gelaliquots von 1ml wurden abgenommen und dreifach mit jeweils 1ml einer 1M NaCl-Lösung (Puffer B) eluiert. 100µl des Eluats wurden an 50µl Seharosebeads immobilisiert und die UCE-Aktivität bestimmt (siehe unter 2.2.2.2, 2.2.2.3 und 2.2.2.4). Die höchste UCE-Aktivität der 10 Gelaliquots wurde in der Fraktion 1 gefunden, daraufhin erfolgte die Gesamtelution der Gelfraktion 1 mit jeweils 3mal 50ml Puffer B.

2.3.3 Suche nach geeigneten Parametern für die zweite chromatographische Reinigung des UCE

Für die Durchführung der PPS-Experimente mussten insgesamt fünf 96-DeepWell-Platten vorbereitet werden. Folgende Gele wurden verwendet: ein Metallchelatgel (IMAC-Gel) mit jeweils 6 unterschiedlichen Metallionen beladen, 8 verschiedene Hydrophobe Interaktionsgele (Super-Butyl 550, Butyl-650, Buthyl-Sepharose, t-Butyl MacroPrep-Gel, Methyl MacroPrep-Gel, Phenyl-650-Gel, Phenyl-Sepharose, Ether-650-Gel). Neben 5 unterschiedlichen Gelen für die Hydrophobe Interaktions-Chromatographie wurden 5 unterschiedliche pH-Werte getestet. Die Pufferlösungen und Gele wurden jeweils beginnend von Position A1 bis Position F8 der 96-DeepWell-Platte befüllt. Für die Vorbereitung der Gelplatte wurden 1ml der oben aufgeführten Gele abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt, mit Wasser gewaschen und anschließend mit einer 1M NaCl-Lösung konditioniert. Die Gele wurden dann 3mal mit Wasser gewaschen und eine 1:1 Gel-Wasser-Mischung hergestellt. Nachdem eine homogene Suspension entstanden war, wurden 20µl der Suspension in das entsprechende Well pipettiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Fe-IMAC	Zn-IMAC	Cu-IMAC	Mg-IMAC	Ni-IMAC	Mn-IMAC		
B	Super-Butyl 550	Butyl-650	Butyl-Sepharose	t-Butyl MacroPrep	Methyl-MacroPrep	Phenyl-650	Phenyl-Sepharose	Ether-650
C	Super-Butyl 550	Butyl-650	Butyl-Sepharose	t-Butyl MacroPrep	Methyl-MacroPrep	Phenyl-650	Phenyl-Sepharose	Ether-650
D	Super-Butyl 550	Butyl-650	Butyl-Sepharose	t-Butyl MacroPrep	Methyl-MacroPrep	Phenyl-650	Phenyl-Sepharose	Ether-650
E	Super-Butyl 550	Butyl-650	Butyl-Sepharose	t-Butyl MacroPrep	Methyl-MacroPrep	Phenyl-650	Phenyl-Sepharose	Ether-650
F	Super-Butyl 550	Butyl-650	Butyl-Sepharose	t-Butyl MacroPrep	Methyl-MacroPrep	Phenyl-650	Phenyl-Sepharose	Ether-650

Tab. 3: Gelplattenbelegung. 10µl Gelsediment pro Well. Position A1-6 IMAC-Gel beladen mit entsprechenden Metallion. Position B1-F8 unterschiedliche HIC-Gele.

Die Pufferplatten wurden durch Mischen der einzelnen Lösungen (Pufferlösungen, NaCl-Lösung und Wasser) auf die entsprechende Konzentration eingestellt. Die Befüllung erfolgte mit Hilfe eines Dispensers. In die Probenplatte wurden jeweils 500µl der Fraktion 1 aus der Anionenaustausch-Sample Displacement Chromatographie in die Positionen A1-D1 pipettiert. Danach erfolgte die automatische Durchführung der PPS-Experimente mit dem Pipettierroboter-System. Durchführung wie unter 2.2.3 beschrieben. Es wurde 6mal mit 30µl des Elutionspuffers eluiert.

2 Material und Methode

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	50mM Na-Phosphat; 1M NaCl; pH7							
B	50mM Malonsäure 2M NaCl; pH 5							
C	50mM bis-Tris; 2M NaCl; pH 6							
D	50mM Na-Phosphat; 2M NaCl; pH 7							
E	50mM HEPES; 2M NaCl; pH8							
F	50mM AMPSO; 2M NaCl; pH9							

Tab.4: Zusammensetzung der Equilibrierungs- und Waschpufferplatte und der Probenauftragspufferplatte. Jedes Well wurde mit 1ml des individuellen Puffers befüllt.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	25mM Na-Phosphat; 1M NaCl; pH4							
B	50mM Na-Phosphat; pH7	50mM Na-Phosphat; pH7	50mM Na-Phosphat; pH7					
C	50mM Na-Phosphat; pH7	50mM Na-Phosphat; pH7	50mM Na-Phosphat; pH7					
D	50mM Na-Phosphat; pH7	50mM Na-Phosphat; pH7	50mM Na-Phosphat; pH7					
E	50mM Na-Phosphat; pH7	50mM Na-Phosphat; pH7	50mM Na-Phosphat; pH7					
F	50mM Na-Phosphat; pH7	50mM Na-Phosphat; pH7	50mM Na-Phosphat; pH7					

Tab. 5: Zusammensetzung der Elutionspufferplatte. Jedes Well wurde mit 1ml des individuellen Puffers befüllt.

2.3.4 Zweite Chromatographische Reinigung von UCE mittels Hydrophober Interaktions-Chromatographie

Ein XK50-Säulengehäuse wurde mit 150ml t-Butyl MacroPrep-Gel gepackt und an das HPLC Explorer System angeschlossen. Mit einem Fluss von 10ml/min wurde die Säule solange mit Puffer A (50mM Malonsäure; 2M NaCl; pH5) equilibriert, bis die Leitfähigkeit konstant blieb. Die aktive Fraktion 1 (150ml) aus der Anionenaustausch-Sample Displacement Chromatographie wurde mit 150ml 100mM Malonsäure vermischt und mit einer NaCl-Lösung auf 2M eingestellt. Der pH-Wert wurde mit einer HCl-Lösung auf einen Wert von 5 gebracht. Die Probe wurde mit einem Fluss von 10ml/min mit der Sample Pump des Explorers auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit 200ml Puffer A gewaschen. Der Gradient für die Elution der Probe verlief von 0% auf 100% B (Wasser) in 60min. Während der Chromatographie wurden 10ml Fraktionen gesammelt. Nach 60min wurde 15min mit Wasser gespült. Von den Fraktionen mit einer deutlichen UV-Absorption bei 280nm wurden 100µl abgenommen und auf UCE-Aktivität untersucht (siehe unter 2.2.2.2, 2.2.2.3 und 2.2.2.4).

2.3.5 Suche nach chromatographischen Parametern für die dritte chromatographische Reinigung des UCE

Für den nächsten Reinigungsschritt wurden 5 Kationenaustauschergele (Toyopearl CM-650M-Gel, Fractogel SO₃⁻, SP-Sepharose FF, Fractogel COO⁻ und UnosphereS-Gel) bei 5 verschiedenen pH-Werten getestet. Die Pufferlösungen und Gele wurden jeweils beginnend von Position A1 bis Position E5 der 96-DeepWell-Platte befüllt. Für die Vorbereitung der Gelplatte wurden 1ml der oben aufgeführten Gele abgenommen und in Eppendorfgefäße überführt, mit Wasser gewaschen und anschließend mit einer 1M NaCl-Lösung konditioniert. Danach wurden die Gele 3mal mit Wasser gewaschen und eine 1:1 Gel-Wasser-Mischung hergestellt. Nachdem eine homogene Suspension entstanden war, wurden 20µl der Suspension in das entsprechende Well pipettiert. Die Elutionspufferplatte enthielt 500µl einer 1M NaCl-Lösung pro Well. Die Befüllung der Pufferplatten erfolgte mit dem Dispenser. Die Probenplatte enthielt in Position A1-D1 jeweils 500µl der Fraktion 2 aus der Hydrophoben Interaktions-Chromatographie.

	1	2	3	4	5
A	Toyopearl CM-650M	Fractogel SO ₃ ⁻	SP-Sepharose FF	Fractogel COO ⁻	UnosphereS
B	Toyopearl CM-650M	Fractogel SO ₃ ⁻	SP-Sepharose FF	Fractogel COO ⁻	UnosphereS
C	Toyopearl CM-650M	Fractogel SO ₃ ⁻	SP-Sepharose FF	Fractogel COO ⁻	UnosphereS
D	Toyopearl CM-650M	Fractogel SO ₃ ⁻	SP-Sepharose FF	Fractogel COO ⁻	UnosphereS
E	Toyopearl CM-650M	Fractogel SO ₃ ⁻	SP-Sepharose FF	Fractogel COO ⁻	UnosphereS

Tab. 6: Gelplattenbelegung. Pro Well 10µl Gelsediment. Position A1-E5 wurden mit Kationenaustauschergelen befüllt.

	1	2	3	4	5
A	50mM K ₂ HPO ₄ ; pH4				
B	50mM K ₂ HPO ₄ ; pH5				
C	50mM MES; pH6				
D	50mM MOPS; pH7				
E	50mM HEPES; pH8				

Tab. 7: Zusammensetzung der Equilibrierungs- und Waschpufferplatte und der Proben- auftragspufferplatte. Jedes Well wurde mit 1ml des individuellen Puffers befüllt.

2.3.6 Dritte chromatographische Reinigung des UCE mittels Kationenaustausch-Chromatographie

Eine kommerzielle Uno S6-Säule vorgepackt mit dem Unosphere S-Gelmaterial wurde an die HPLC Anlage Purifier angeschlossen und bei einem Fluss von 1ml/min mit Puffer A (50mM Phosphatpuffer, pH5) equilibriert. Das Volumen von 70ml der Fraktion 2 aus der Hydrophoben Interaktions-Chromatographie wurde über einen 10kDa-Filter auf ein Volumen von 500µl eingengt und mit 500µl Puffer A gemischt. Die Probe wurde über eine 1ml Probenschleife mit einem Fluss von 0,9ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Probenelution erfolgte bei einem Gradienten von 0% auf 100% B (1M NaCl) in 40min. Es wurden 1ml Fraktionen gesammelt. 100µl der Fraktionen mit einer signifikanten UV-Absorption bei 280nm wurden auf UCE-Aktivitäten getestet (siehe unter 2.2.2.2, 2.2.2.3 und 2.2.2.4). Die Fraktionen mit UCE-Aktivität wurden mit Fraktion 3 bezeichnet, vereinigt und über einen 10kDa-Filter konzentriert.

2.3.7 Charakterisierungsversuche des UCE mittels Protease-Inhibitoren

Folgende Protease-Inhibitoren wurden verwendet: 10µM E64, 10µM Pepstatin A, 1mM EDTA, 100µM Bestatin, 10µM Chymostatin, 1mM AEBSF (angegeben ist die Endkonzentration). Für die Charakterisierungsversuche wurden 7x30µl Sepharosebeads (6 Inhibitoren + 1 Kontrolle) portioniert und jeweils 50µl der Proteinfraction 3 aus dem dritten chromatographischen Reinigungsschritt zugegeben. E64 und AEBSF als irreversible Inhibitoren wurden zu den immobilisierten Proteinfractionen pipettiert und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30minütiger Inkubation wurden 27µl des UCE-S (10^{-5} M) dazu gegeben und bei Raumtemperatur geschüttelt. Von allen anderen Inhibitoren wurden 3µl jeweils zu 27µl des UCE-S gegeben, vermischt und zu den immobilisierten Proteinfractionen pipettiert und bei Raumtemperatur geschüttelt. Aliquots wurden nach 4h und 22h abgenommen und mittels MALDI-MS vermessen (siehe 2.2.2.4).

2.3.8 Vierte chromatographische Reinigung des UCE mittels Größenausschluss-Chromatographie

Fraktion 3 aus der Kationenaustausch-Chromatographie wurde über einen 10kDa-Filter auf ein Volumen von 100µl eingengt. Die Probe wurde in 100µl Puffer A (50mM Phosphatpuffer, 150mM NaCl, pH7) aufgenommen. Die Gelfiltrationssäule Superdex 200 HR 10/30 wurde an die HPLC-Anlage Purifier angeschlossen. Die Probe wurde mit einem Fluss von 250µl/min auf die Säule aufgetragen. Die Chromatographie wurde mit Puffer A durchgeführt. Es wurden 1ml Fraktionen gesammelt. Fraktionen mit einer deutlichen UV-Absorption bei 280nm wurden immobilisiert und auf eine UCE- Aktivität getestet (siehe unter 2.2.2.2, 2.2.2.3 und 2.2.2.4).

2.4 Identifizierung der Fraktionen mit UCE-Aktivitäten

2.4.1 Tryptischer Verdau der Fraktionen mit UCE-Aktivitäten aus der Größenausschluss-Chromatographie

Eine hohe UCE-Aktivität wurde in den Fraktionen 4, 5 und 6 (siehe Chromatogramm der Größenausschluss-Chromatographie) gefunden. Jeweils 800µl der Fraktionen 4-6 wurden in Eppendorfgefäße überführt und eingefroren. Die gefrorenen Fraktionen wurden anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Pellets wurden in 50µl

6M Harnstoff aufgenommen und 5µl einer 200mM DTT-Lösung in 100mM NaHCO₃ (pH8,3) zugegeben und 1h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert.

Zu dem Inkubationsansatz wurden 10µl einer 200mM Iodacetamid-Lösung in 100mM NaHCO₃ (pH8,3) pipettiert und 1h auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10µl einer 200mM DTT-Lösung in 100mM NaHCO₃ (pH8,3) zu dem Ansatz pipettiert und wieder 1h auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 425µl einer 100mM NaHCO₃-Lösung (pH8,3) zugegeben und der Reaktionsansatz in ein Glasvial überführt. In das Glasvial wurden 5µl einer 0,25µg/µl Trypsin-Lösung pipettiert und 24h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Lösung auf 0,1% Endkonzentration Ameisensäure angesäuert.

2.4.2 Tryptischer Verdau einer kommerziellen Komplement-Faktor-I-Präparation

Die Durchführung des tryptischen Verdau erfolgte wie unter Punkt 2.4.1 beschrieben. Es wurden 50µl einer 1mg/ml Komplement-Faktor-I-Lösung tryptisch verdaut.

2.4.3 Identifizierung der tryptisch verdauten Peptide der Fraktionen 4, 5 und 6 aus der Größenausschluss-Chromatographie mittels LC-ESI MS/MS

Es wurden jeweils 20µl der verdauten Fraktionen 4, 5 und 6 in eine 96-Well-PCR-Platte überführt und in den Autosampler des LC-ESI MS/MS gestellt. Der Autosampler injizierte jeweils 8µl Probe auf ein Chip-System der Firma Agilent. Die Probe wurde auf eine Trapping C18-Säule (40nl ZORBAX 300SB C18), die sich auf den Chip befand, mit einem Fluss von 4µl/min 10min mit 100% Puffer A (3% ACN, 0,1% Ameisensäure) aufgetragen. Als Trennsäule (Analytische Säule), die sich ebenfalls auf dem Chip befand, wurde eine C18-Säule (C18-Säule 150mm x 75µm ZORBAX 300SB) verwendet. Es wurde 45min ein Gradient von 0% auf 40% B (80% ACN, 0,1% Ameisensäure) gefahren und für 3min auf 97% B. Anschließend wurde 2min bei 97% B und dann auf 3% B gespült. Zur Auswertung der generierten ESI-Daten wurde die Software DataAnalysis und Mascot verwendet.

2.5 Nachweis einer UCE-Aktivität der Fraktion 5 und des Komplement-Faktors-I mittels MES-System

Es wurden 5µl einer käuflich erworbenen 1mg/ml Komplement-Faktor-I-Lösung (5µg Protein) und 50µl der Fraktion 5 aus der Größenausschluss-Chromatographie an 30µl Sepharose immobilisiert (siehe 2.2.2.2 und 2.2.2.3) und auf eine UCE-Aktivität getestet (siehe 2.2.2.4). Aliquots der Inkubationsansätze wurden nach 2h, 4h, 7h und 24h abgenommen.

2.6 Nachweis der Hydrolyse eines Komplement-Faktor-I-Substrats durch die Fraktion 5 mittels eines Fluoreszenz-basierenden Enzymassays¹

In eine schwarze 96-Well-Mikrotiter-Platte wurde in Position A1 die Negativ-Kontrolle mit 50µl 25mM Boc-Asp(Obzl)-Pro-Arg-AMC-Fluoreszenzsubstrat in 150µl Puffer 1 (25mM Bicine-Puffer, 150mM NaCl, 0,5mM EDTA, pH8.25) pipettiert. In das Well A2 wurden 50µl einer 25µM Boc-Asp(Obzl)-Pro-Arg-AMC-Substrat-Lösung und 10µl der Fraktion 5 in 140µl Puffer 1 pipettiert. In das Well A3 wurden 50µl einer 25µM Boc-Asp(Obzl)-Pro-Arg-AMC-Substrat-Lösung und 5µl (entspricht 5µg) einer kommerziellen Präparation des humanen Komplement-Faktor-I in 145µl Puffer 1 pipettiert. Die Platte wurde bei 37°C 12h inkubiert und bei einer Anregungswellenlänge von 350nm und einer Emissionswellenlänge von 465nm alle 30min vermessen.

¹Der Fluoreszenzassay wurde nach der Vorschrift von S. A. Tsiftoglou und R.B. Sim durchgeführt (Tsiftoglou et al., 2004).

2.7 Charakterisierungsversuche O- bzw. N-glykosidisch gebundener Oligosaccharide der gereinigten Fraktion 5 im Vergleich mit der Komplement-Faktor-I-Präparation

Für die Durchführung wurden ein Mannose-Glykoprotein-Kit mit gekoppelten GNA-Lektin und ein O-Glykan-Glykoprotein-Kit mit gekoppelten PNA-Lektin der Firma Qiagen verwendet. Die Vorgehensweise erfolgte nach Vorschrift von Qiagen. Alle Puffer und Lösungen waren in dem Kit enthalten. Zu Beginn wurden die Fraktionssäulen in 2ml Eppendorfgefäße platziert, anschließend 500µl des jeweiligen Bindungspuffers zugegeben, 2min bei 500rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden adäquate Proteinmengen der Fraktion 5 und der kommerziellen Präparation des Komplement-Faktor-I eingesetzt. Von der Fraktion 5 wurden 2x30µl (0,1mg/ml) in jeweils 500µl des

entsprechenden Bindungspuffers aufgenommen. Von der kommerziellen Präparation des Komplement-Faktors-I wurden jeweils 2x3 μ l (1mg/ml) abgenommen, mit Wasser auf 30 μ l aufgefüllt und anschließend mit 500 μ l des entsprechenden Bindungspuffers vermischt. Die in Puffer aufgenommenen Proben wurden zu den entsprechenden Fraktionssäulen pipettiert und 2min bei 500rpm zentrifugiert. 100 μ l des Durchflusses wurden an 50 μ l Sepharosebeads immobilisiert (siehe 2.2.2.2 und 2.2.2.3) und der Rest verworfen. Die Lektinsäulen wurden 3mal mit dem jeweiligen Bindungspuffer gewaschen, für 2min bei 500rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Für die Elution der Proteine von den Lektinsäulen wurden 300 μ l Elutionspuffer zu den Lektinsäulen pipettiert und 1min inkubiert. Anschließend wurde 5min bei 500rpm zentrifugiert und 100 μ l des Eluats an 50 μ l Sepharosebeads immobilisiert (siehe 2.2.2.2 und 2.2.2.3). Die Abnahmen der Aliquots der Überstände erfolgte nach 1,5h; 3,5h; 5,5h und 24h und die Abnahmen der Eluate nach 1,5h; 3,5h und 24h. Die Proben wurden dann massenspektrometrisch vermessen (siehe 2.2.2.4).

2.8 Charakterisierungsversuche der Fraktion 5 und der kommerziellen Komplement-Faktor-I-Präparation mit den Serinprotease-Inhibitoren Aprotinin und Pefabloc SC

Für die Charakterisierungsversuche wurden 4x30 μ l Sepharosebeads vorbereitet. Jeweils 2x30 μ l einer 0,1mg/ml Fraktion 5 und der kommerziellen Komplement-Faktor-I-Präparation wurden an Sephaosebeads immobilisiert (siehe 2.2.2.2). Für die Inkubation wurden jeweils 27 μ l einer 10⁻⁵M UCE-S-Lösung mit jeweils 3 μ l einer 10 μ M Aprotinin-Lösung und 2,5mM einer Pefabloc SC-Lösung vermischt und zu den jeweiligen immobilisierten Proteinen gegeben. Die Abnahmen der Aliquots erfolgte nach 1,5h; 3,5h; 5,5h und 24h. Anschließend wurden die abgenommenen Aliquots massenspektrometrisch vermessen (siehe 2.2.2.4).