

3 Ergebnisteil

3.1 Übersicht

Zu Beginn der Arbeit musste ein Nachweissystem für das UCE entwickelt werden. Der Nachweis Ull-generierender Aktivität gelang mit dem MES-System. Der nächste Schritt befasste sich mit der Suche einer geeigneten Quelle für die Aufreinigung des UCE. Das UCE wurde schließlich aus einer humanen Plasma Fraktion (Cohn-IV-Fraktion) mittels 4 aufeinander folgender chromatographischer Reinigungsschritte bis zur nahen Homogenität gereinigt. Die aktive nahezu homogene Fraktion wurde mit der LC-ESI-MS/MS analysiert, um das aktive Protein zu identifizieren. Zur weiteren Charakterisierung des identifizierten UCE wurden Inhibitionsversuche, Experimente zur Größenbestimmung und Untersuchungen auf glykosidisch gebundene Zuckerreste durchgeführt.

3.1.1 Herstellung und Reinigung eines UCE-S für den Nachweis der Ull-generierenden Aktivität mittels MES-UCE-Assay

Als Grundlage für die Etablierung eines Systems zum Nachweis einer Ull-generierenden Aktivität (UCE-Aktivität) musste zuerst ein geeignetes Substrat hergestellt werden, welches zum einen eine Schnittstelle für das UCE besitzt und zum anderen zwei Cysteine, welche über eine Disulfidbrücke verbunden waren und ein zyklisches Peptid bildeten. Ausgehend vom natürlich vorkommenden Präpro-Ull wurde eine Teilsequenz mit 21 Aminosäuren synthetisiert. Durch Oxidation wurde eine Disulfidbrücke der beiden Cysteine an Position 118 und 123 gebildet. Abbildung 5 zeigt das Chromatogramm der Reinigung des synthetisierten UCE-S.

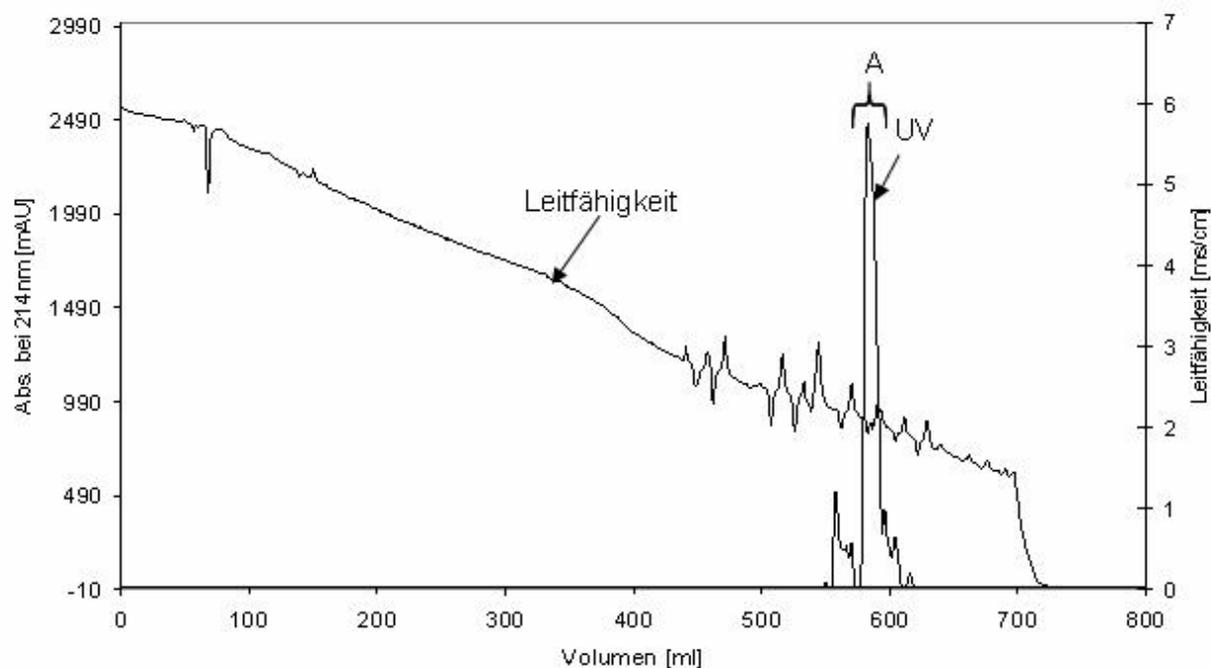


Abb.5: Chromatogramm der Reinigung des UCE-S.

Probenvolumen: 1ml (ca. 10mg). Säule: 75ml ZORBAX SB-C18 Prep. Flussrate: 15ml/min. Puffer A: 0,1% TFA. Puffer B: 80% ACN. Gradient 0-60%B in 45min. X-Achse: Elutionsvolumen [ml]. Linke Y-Achse: UV-Absorption bei 214nm [mAU]. Rechte Y-Achse: Leitfähigkeit [mS/cm]. Fraktionsgröße: 10ml Fraktion A bezeichnet UCE-Substrat.

Ein Aliquot der Fraktion, die in dem Elutionsvolumen-Intervall von 580-588ml eluierte, wurde massenspektrometrisch analysiert (Abb.6). In dem dargestellten Massenspektrum erscheint das UCE-S Signal auf der m/z Skala an der Stelle, die dem Molekulargewicht 2645.3Da entspricht.

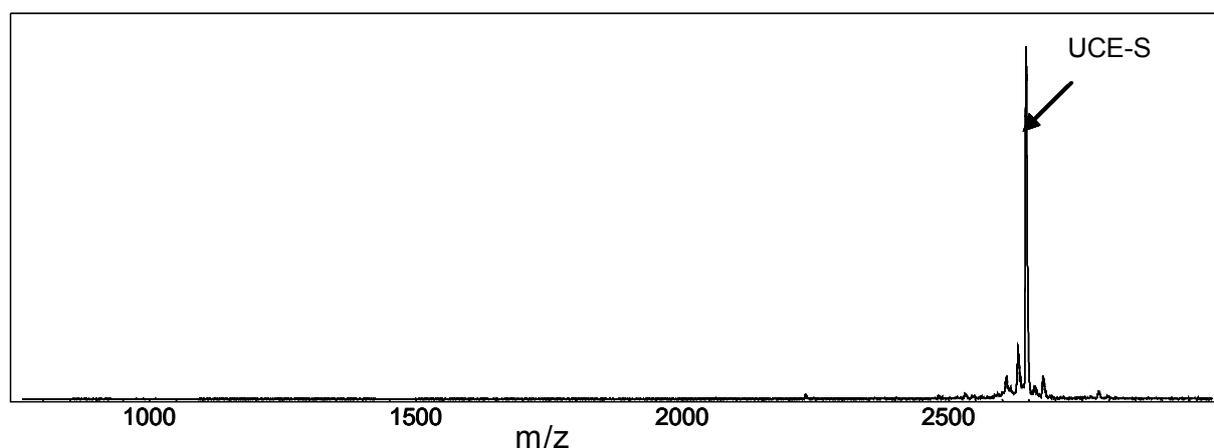


Abb.6: MALDI-Spektrum des UCE-S. Probe: 2 μ l UCE-S (10^{-4} M). Matrix: 1 μ l DHB. X-Achse: Massenbereich in Da. UCE-S: 2645.3Da.

3.1.2 Etablierung eines Systems zum Nachweis einer UCE-Aktivität

Zu Beginn musste ein Nachweissystem etabliert werden, mit dem eine UCE-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Zu diesem Zweck wurde das MES-System eingesetzt. Der MES-UCE-Assay umfasst die kovalente Immobilisierung der zu testenden Protein-Fractionen an Affinitätschromatographie-Material. Anschließend wurden die immobilisierten Proteine mit dem UCE-Substrat (Aminosäure-Sequenz zeigt Tab.8) inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden Aliquots aus dem Reaktionsgefäß abgenommen und massenspektrometrisch analysiert. UCE-Aktivitäten waren vorhanden, wenn sich das UII-Signal im Massenspektrum an der Stelle von 1389.5Da auf der Massenskala befand und die Signalintensität des Reaktionsprodukts zunahm. Abbildung 7 zeigt ein typisches MALDI-Massenspektrum der Reaktionsprodukte aus der Inkubation der Proteine einer immobilisierten Plasma-Cohn-IV-Fraktion mit UCE-S. Wie bei enzymatischen Reaktionen zu erwarten, nahm die relative Intensität des UCE-S Signals mit der Zeit ab und die des UII Signals zu. Da nach einer Inkubationszeit von 5h kein UCE-S Signal mehr detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass das Substrat vollständig umgesetzt wurde. Die Massenspektren der Abbildung 7 zeigen neben dem UCE-S Signal und dem UII Signal weitere Signale. Das mit KR-UII bezeichnete Signal konnte einem Peptid zugeordnet werden, dass ausgehend vom N-Terminus des UCE-S, um 7 Aminosäuren verkürzt ist. Bei einem weiteren Signal bezeichnet mit R-UII handelt es sich um ein Peptid, das ausgehend vom N-Terminus des UCE-S um 6 Aminosäuren verkürzt ist. Die Verunreinigung V kann nicht eindeutig einer bekannten Peptidsequenz zugeordnet werden. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um ein Peptid-Molekül, das während der Peptidsynthese entstanden ist.

Peptidbezeichnung	Aminosäuresequenz	MW [Da]
des-Glu-UII	TPDCFWKYCV	1260.5
UII	ETPDCFWKYCV	1389.5
R-UII	RETPDCFWKYCV	1545.6
KR-UII	KRETPDCFWKYCV	1673.7
KKR-UII	KKRETPDCFWKYCV	1801.8
PYKKR-UII	PYKKRETPDCFWKYCV	2061.9
UCE-S	RIWKPYKKRETPDCFWKYCV	2645.3

Tab. 8: Aminosäuresequenzen des UCE-S und deren abgeleitete Peptide.

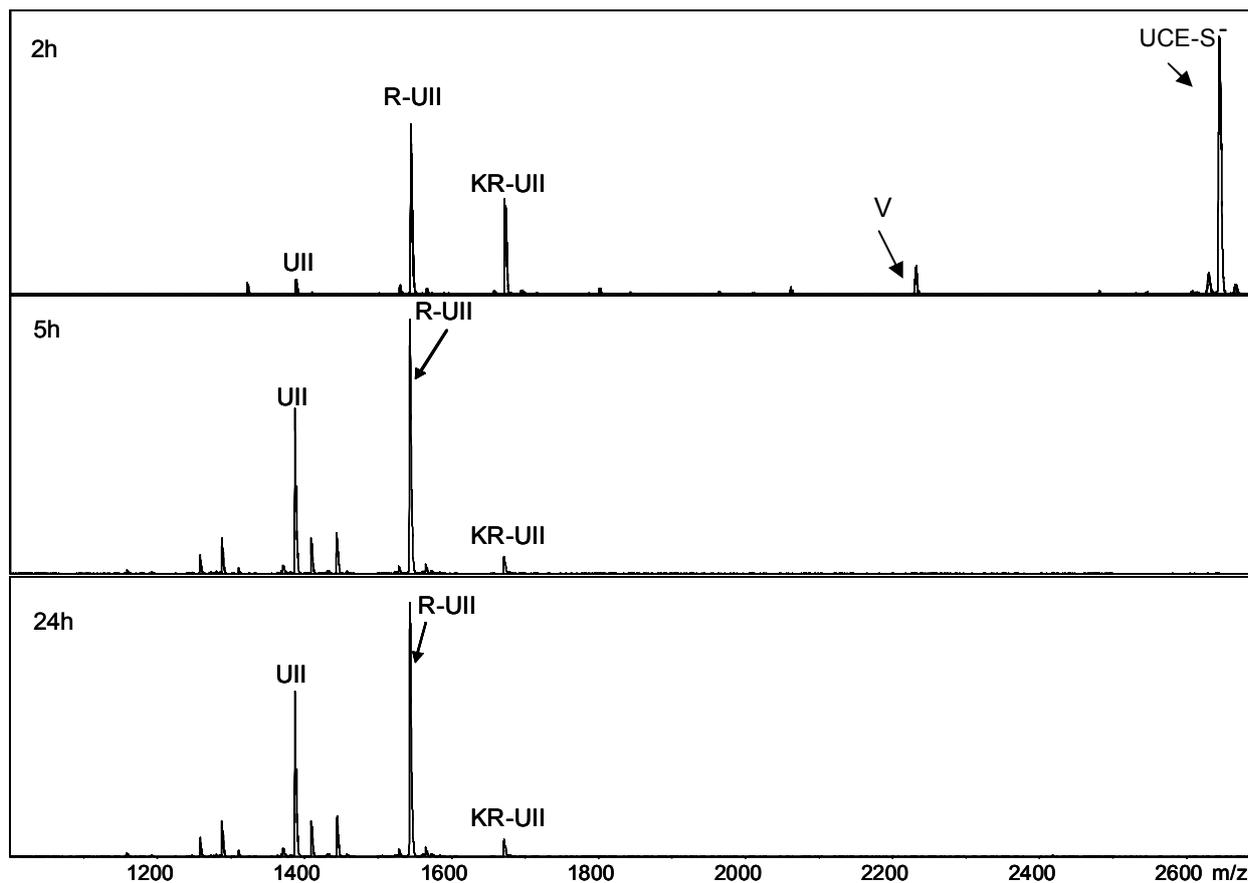


Abb.7: Typisches Ergebnis eines MES-Assays zum Nachweis UII-generierender Aktivität: MALDI-Spektren der Reaktionslösungen der Inkubation der immobilisierten Proteine einer humanen Plasmafraktion (Cohn-IV-Fraktion) mit UCE-Substrat (UCE-S) nach 2h, 5h und 24h Inkubation. UII: 1389.5Da, R-UII: Arg-UII: 1545.6Da, KR-UII: Lys-Arg-UII: 1673.7Da, UCE-S: 2645.3Da, V: Verunreinigung: 2230.9Da

3.1.3 Suche nach UCE-Aktivität in humanem Plasma

Um der Frage nachzugehen, ob eine UCE-Aktivität in humanem Plasma vorkommt, wurden humane Plasma-Proteine immobilisiert und mittels MES-UCE-Assay auf UCE-Aktivität geprüft.

Abbildung 8 zeigt die MALDI-Spektren der Reaktionslösungen der Inkubation der immobilisierten Proteine aus humanem Plasma mit UCE-S.

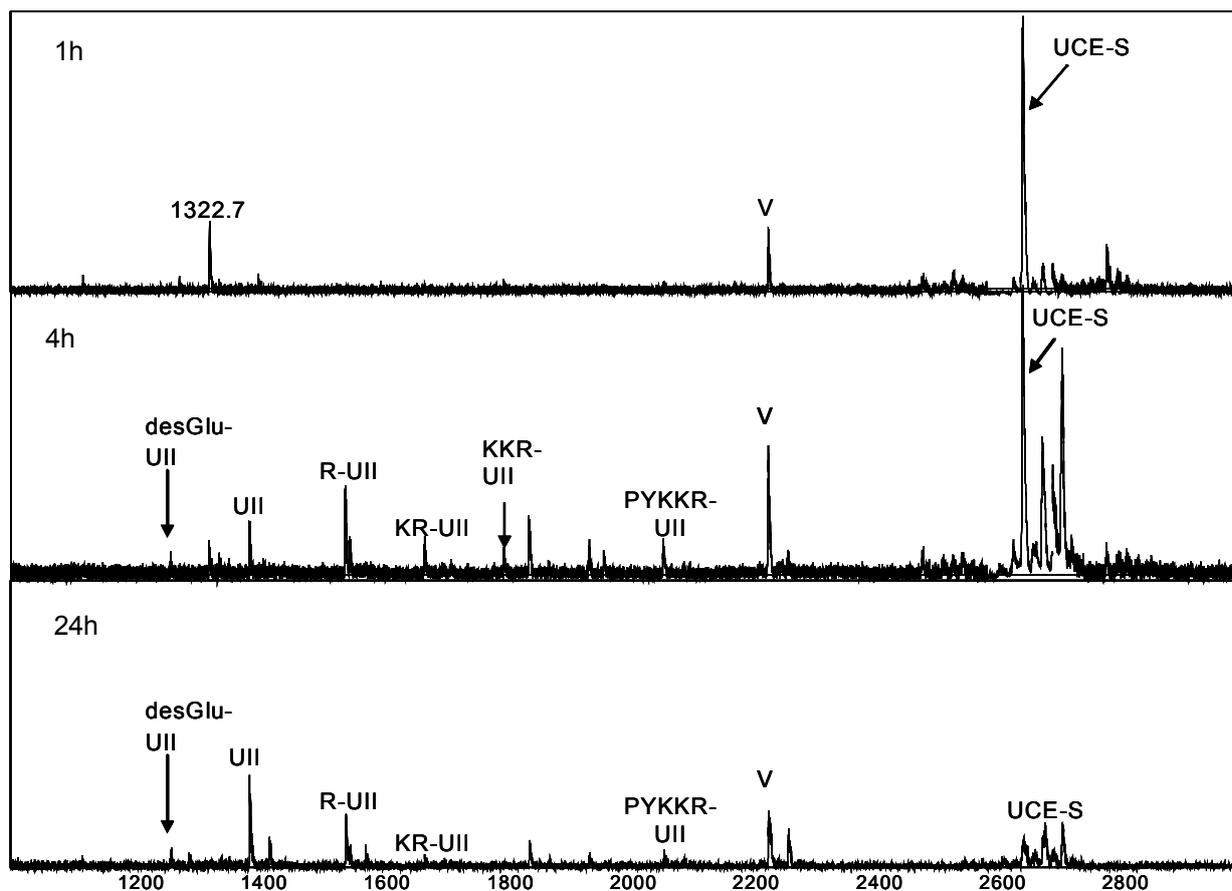


Abb.8: MES-Assay zum Nachweis einer UCE-Aktivität in humanem Plasma: MALDI-Spektren der Reaktionslösungen der Inkubation der immobilisierten humanen Plasma-Proteine mit UCE-S nach 1h, 4h und 24h Inkubation.
 UII: 1389.5Da, R-UII: 1545.6Da, KR-UII: 1673.7Da, KKR-UII: 1801.8Da, PYKKR-UII: 2061.9Da, UCE-S: 2645.3Da, desGlu-UII: 1260.5Da, V:Verunreinigung: 2230.9Da

Die Spektren zeigen die Abnahme des UCE-S Signals und die Zunahme des UII Signals mit zunehmender Inkubationszeit. Nach 24h Inkubationszeit ist ein fast vollständiger Abbau des UCE-S zu sehen. Neben den Signalen des UCE-S und des UII wurden weitere Signale mit folgenden Massen 2061.9Da, 1801.8Da, 1673.7Da, 1545.6Da und 1260.5Da gefunden. Diesen Massen konnten Peptidsequenzen zugeordnet werden, die sich vom UCE-S ableiten lassen (siehe Tabelle 8). Die Intensitäten der Signale der Peptide PYKKR-UII, KR-UII und R-UII, die nach 4h im Spektrum zu sehen sind, haben nach einer Inkubationszeit von 24h wieder abgenommen.

3.1.4 Bestimmung des Molekulargewichts von UCE aus humanem Plasma

Um das ungefähre Molekulargewicht vom UCE zu bestimmen, wurden Ultrazentrifugationsversuche mit Filtern unterschiedlicher Ausschlussgrenzen (10kDa, 30kDa, 50kDa und 100kDa) durchgeführt. Die Filtrate und Retentate wurden mit dem MES-UCE-Assay auf die UCE-Aktivität überprüft. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der Experimente zur Bestimmung des relativen Molekulargewichts des UCE aus humanem Plasma. Im Retentat des 50kDa-Filters ist die höchste UCE-Aktivität wieder zu finden, was darauf hindeutet, dass das UCE ein Molekulargewicht größer 50kDa besitzt.

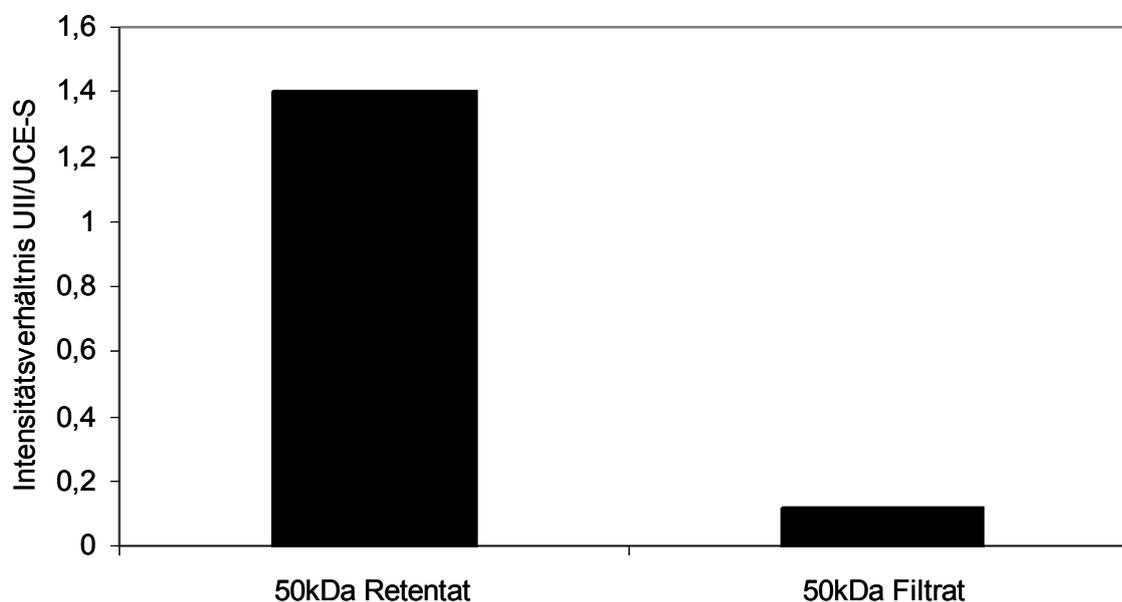


Abb. 9: Ergebnisse der relativen Molekulargewichtsbestimmung des UCE mittels 50kDa Zentrifugenfilter. X-Achse: Filtrat und Retentat des 50kDa Filters. Y-Achse: UII-generierende Aktivität.

3.1.5 Suche einer UCE-Aktivität in einer humanen Plasma Cohn-Fraktion

Nachdem gezeigt werden konnte, dass UCE im Plasma vorkommt (Abb.8), wurden unterschiedliche Cohn-Fractionen auf UCE-Aktivität überprüft. Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der Suche in unterschiedlichen humanen Plasma-Cohn-Fractionen.

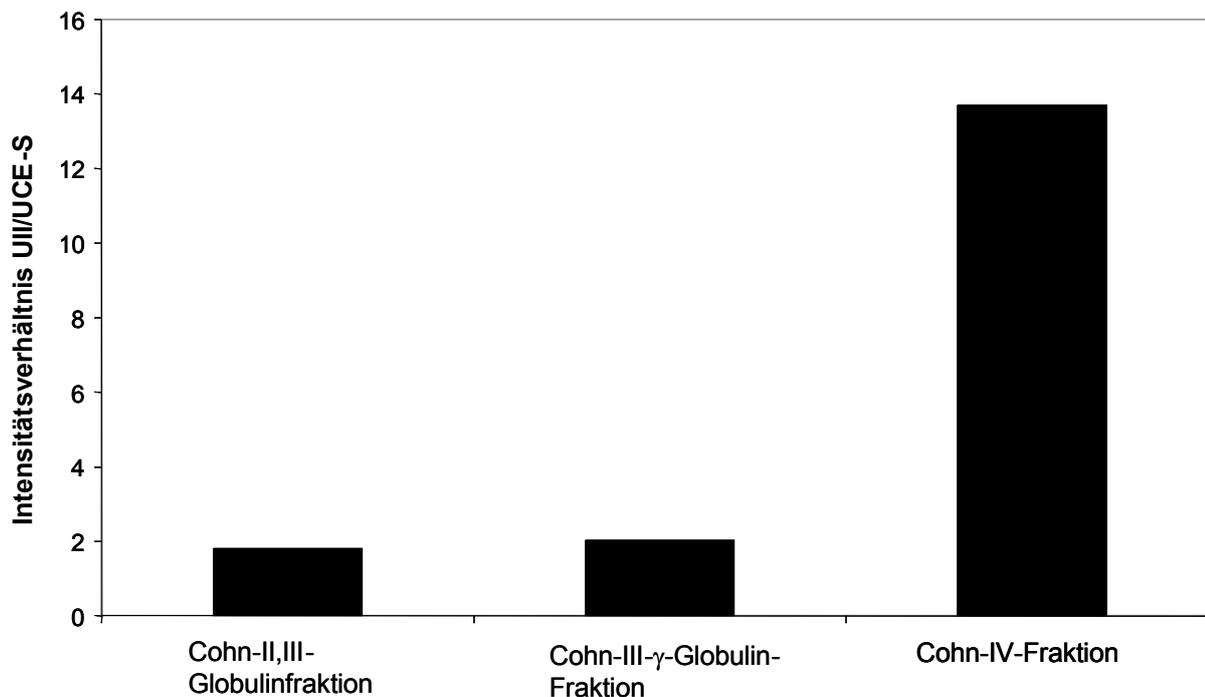


Abb.10: Ergebnisse der Suche nach UCE-Aktivität in unterschiedlichen humanen Plasma-Cohn-Fractionen. Unterschiedliche Cohn-Fractionen aus humanem Plasma wurden an Affinitätschromatographie-Materialien immobilisiert und mittels MES-Assay die UII-generierende Aktivität bestimmt. Y-Achse: UII-generierende Aktivität.

Die Cohn-IV-Fraktion zeigt die höchste UCE-Aktivität und wurde für die weitere Reinigung des UCE verwendet.

3.2 Reinigungsschema des UCE aus einer humanen Cohn-IV-Fraktion aus humanem Plasma

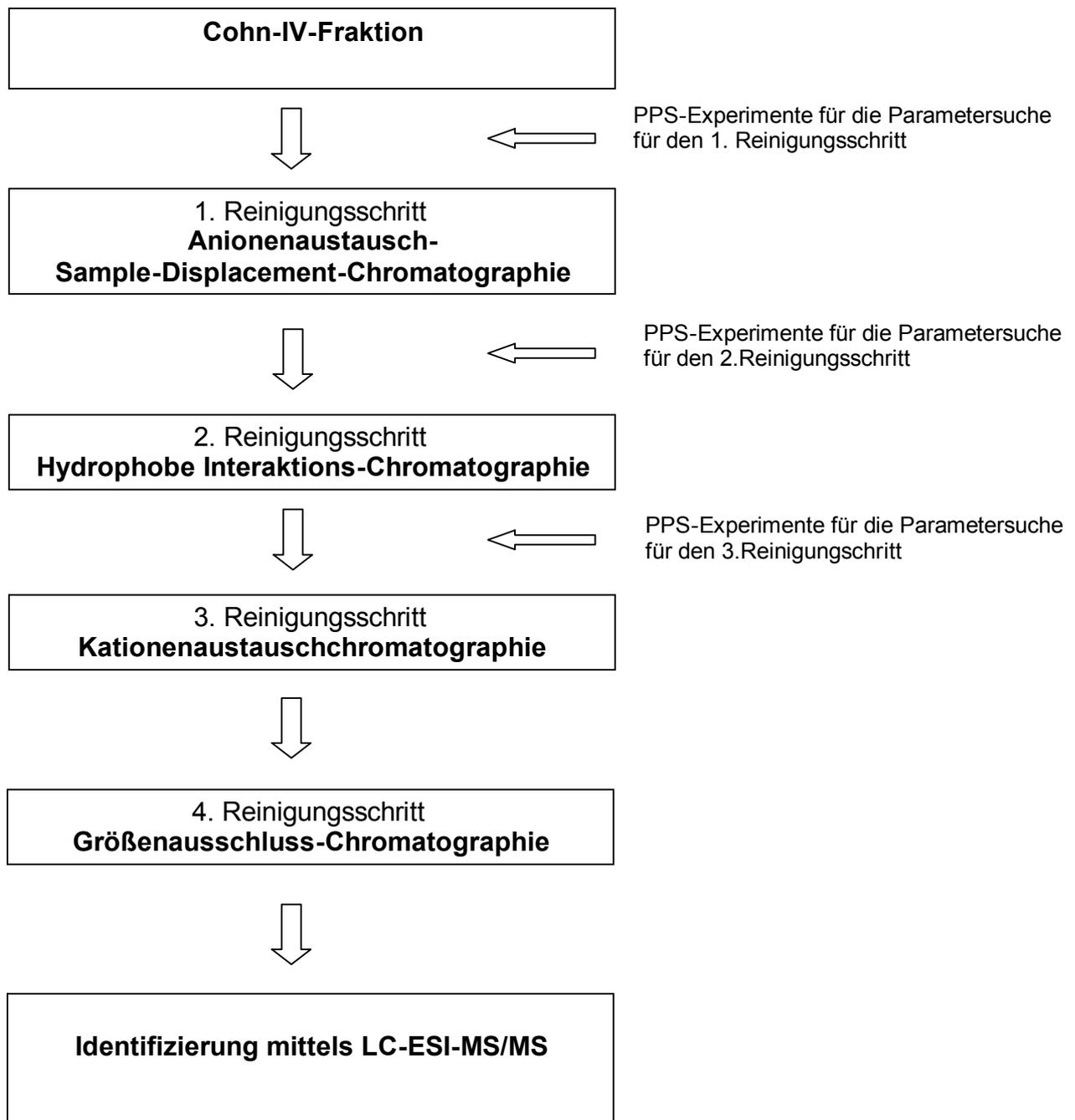


Abb.11: Reinigungsschema des UCE aus einer humanen Cohn-IV-Fraktion aus Plasma

Abbildung 11 zeigt die Vorgehensweise der Reinigung des UCE. Für die Reinigung des UCE wurde als Quelle eine kommerzielle Cohn-IV-Präparation eingesetzt. Zur Bestimmung von Parametern zur optimalen chromatographischen Reinigung der UCE-Aktivität wurden vor jedem Chromatographieschritt PPS-Experimente durchgeführt. Die aus den PPS-Experimenten erhaltenen Parametersätze wurden anschließend auf die Säulenchromatographie übertragen. Nach dem vierten

Reinigungsschritt war von einer nahezu homogenen UCE-Fraktion auszugehen, welche tryptisch verdaut und mittels LC-ESI-MS/MS identifiziert wurde.

3.2.1 Suche nach chromatographischen Parametern für die Anreicherung des UCE

In den Abbildungen 12A-C sind die Ergebnisse der PPS-Experimente mit einer Cohn-IV-Fraktion aus humanem Plasma und 8 unterschiedlichen Anionenaustauschchromatographie-Materialien dargestellt. Abbildung 12A zeigt die UII-generierenden Aktivitäten der Eluate aus den 40 Batchchromatographien. Dunkle Bereiche geben eine hohe und weiße Bereiche eine niedrige bis gar keine UCE-Aktivität an. Abbildung 12B zeigt die gemessenen Proteinmengen der Eluate aus den PPS-Experimenten. Abbildung 12C zeigt die spezifischen Ausbeuten der UII-generierenden Aktivitäten.

12A

Anionen- austauschergele	pH	6	7	8	9	10
Fractogel TMAE		1	0	0	0	1
Fractogel DEAE		2	0	0	0	0
SuperQ-650M		1	0	0	0	0
DEAE-650M		0	1	0	0	1
QAE-550C		0	2	1	0	0
Streamline DEAE		0	1	2	0	0
Q-Sepharose FF		0	0	1	1	0
UnosphereQ		0	0	1	4	0

12B

Anionen- austauschergele	pH	6	7	8	9	10
Fractogel TMAE		9	9	10	11	10
Fractogel DEAE		10	9	10	10	6
SuperQ-650M		9	9	10	10	10
DEAE-650M		12	31	12	14	15
QAE-550C		12	11	12	14	12
Streamline DEAE		11	10	11	11	12
Q-Sepharose FF		12	11	12	12	13
UnosphereQ		8	10	11	9	10

12C

Anionen- austauschergele	pH	6	7	8	9	10
Fractogel TMAE		0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
Fractogel DEAE		0,2	0,0	0,0	0,0	0,1
SuperQ-650M		0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
DEAE-650M		0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
QAE-550C		0,0	0,2	0,1	0,0	0,0
Streamline DEAE		0,0	0,1	0,2	0,0	0,0
Q-Sepharose FF		0,0	0,0	0,1	0,1	0,0
UnosphereQ		0,0	0,0	0,0	0,4	0,0

Abb.12: Ergebnismatrices der Anionen-PPS-Experimente zur Bestimmung von Parametern zur optimalen chromatographischen Reinigung der UCE-Aktivität aus der humanen CohnIV-Fraktion. Probenauftrag 10µl pro well. Parameter für PPS-Experimente: 100µl Gel pro well; X-Achse: pH-Wert-Variation. Y-Achse: Gel-Variation.

12A: Ull-generierende Aktivitäten angegeben als Intensitätsverhältnis von Ull/UCE-S

12B: Proteinmenge [µg] der Eluate aus den PPS-Experimenten

12C: Spezifische Ull-generierende Aktivitäten

Für den ersten Reinigungsschritt, die Anreicherung des UCE wurde mit dem Parametersatz QAE-550C-Gel; pH7 eine Sample Displacement Chromatographie (SDC) durchgeführt.

3.2.2 Anreicherung des UCE mittels Anionenaustausch-SDC

Die PPS-Experimente zeigten eine hohe spezifische UCE-Aktivität bei dem QAE 550C-Gel und einem Probenauftragspuffer mit einem pH-Wert von 7, welche für die Anionenaustausch-SDC genutzt wurden.

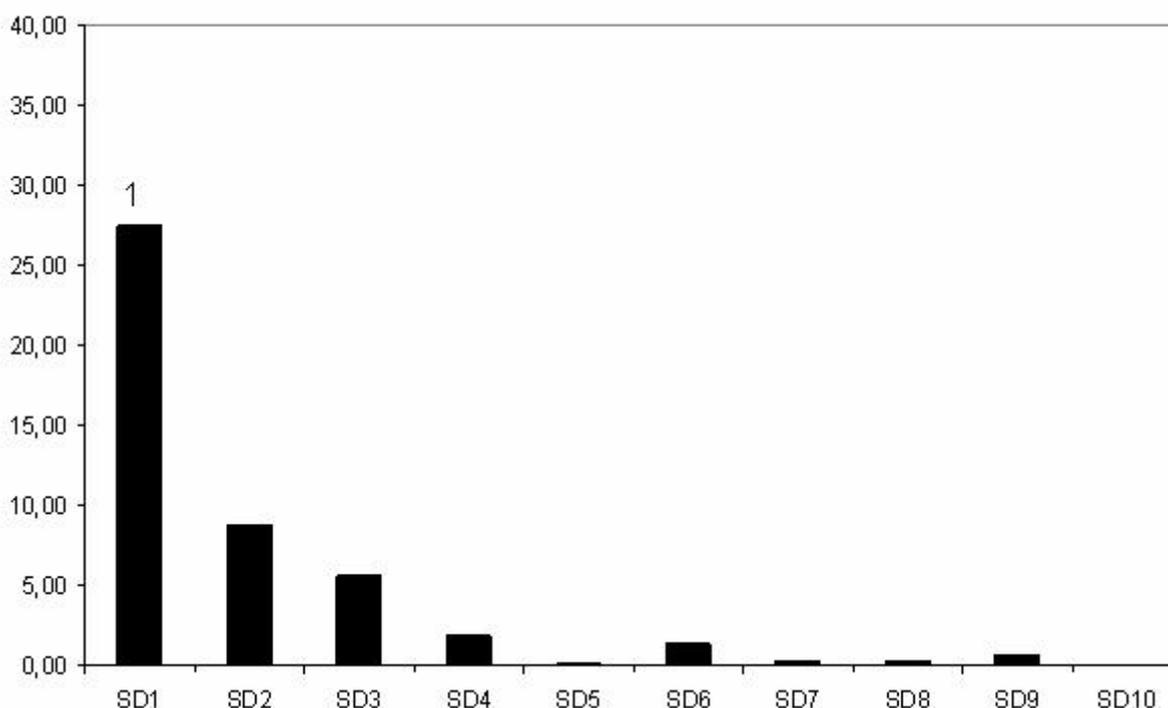


Abb.13: Ergebnis der Anionenaustausch-SDC einer humanen Cohn-IV-Fraktion aus Plasma. Probenvolumen: 100ml (2g) einer humanen CohnIV-Fraktion. Gel: 10 Gefäße a 50ml QAE 550C-Gel. Puffer A: 50mM bis-tris-Propan; pH7. Puffer B: 1M NaCl. X-Achse: 10 Sample Displacement Fraktionen. Y-Achse: UCE-generierende Aktivität.

Abbildung 13 zeigt das Ergebnis der Anionenaustausch-SDC. Die höchste UCE-Aktivität ist in der SD1-Fraktion wieder zu finden. Diese Fraktion, wurde für die weitere Aufreinigung des UCE verwendet und wird im weiteren Verlauf mit Fraktion 1 bezeichnet.

3.2.3 Suche nach geeigneten Parametern für den zweiten chromatographischen Reinigungsschritt des UCE

Für die Suche geeigneter Parameter zur weiteren Reinigung des UCE wurden mit der Fraktion 1 aus der Anionenaustausch-SDC (Abb.13) PPS-Experimente durchgeführt. Abbildung 14A zeigt die Versuchsmatrix für die PPS-Experimente mit einem Metall-Chelatgel (IMAC-Gel) mit jeweils 6 unterschiedlichen zweiwertigen Metallionen beladen und 8 unterschiedlichen HIC-Chromatographiematerialien bei unterschiedlichen pH-Bedingungen (pH 5-9). Abbildungen 14B-D zeigen die Ergebnismatrices der PPS-Experimente. Abbildung 14B zeigt die Ull-generierenden Aktivitäten. In Abbildung 14C sind die Proteinmengen [μg] der Eluate der PPS-Experimente dargestellt. Abbildung 14D zeigt die spezifischen Ull-generierenden Aktivitäten.

14A

Fe-IMAC	Zn-IMAC	Cu-IMAC	Mg-IMAC	Ni-IMAC	Mn-IMAC		
Super-Butyl 550 pH5	Butyl-650 pH5	Butyl-Sepharose pH5	t-Butyl MacroPrep pH5	Methyl-MacroPrep pH5	Phenyl-650 pH5	Phenyl-Sepharose pH5	Ether-650 pH5
Super-Butyl 550 pH6	Butyl-650 pH6	Butyl-Sepharose pH6	t-Butyl MacroPrep pH6	Methyl-MacroPrep pH6	Phenyl-650 pH6	Phenyl-Sepharose pH6	Ether-650 pH6
Super-Butyl 550 pH7	Butyl-650 pH7	Butyl-Sepharose pH7	t-Butyl MacroPrep pH7	Methyl-MacroPrep pH7	Phenyl-650 pH7	Phenyl-Sepharose pH7	Ether-650 pH7
Super-Butyl 550 pH8	Butyl-650 pH8	Butyl-Sepharose pH8	t-Butyl MacroPrep pH8	Methyl-MacroPrep pH8	Phenyl-650 pH8	Phenyl-Sepharose pH8	Ether-650 pH8
Super-Butyl 550 pH9	Butyl-650 pH9	Butyl-Sepharose pH9	t-Butyl MacroPrep pH9	Methyl-MacroPrep pH9	Phenyl-650 pH9	Phenyl-Sepharose pH9	Ether-650 pH9

Abb. 14A: Versuchsmatrix für PPS-Experimente für die chromatographische Reinigung des UCE.

Angegeben sind die eingesetzten unterschiedlichen Chromatographiegele und die verschiedenen pH-Werten. Gelvolumen pro Well: 10 μl . Probenauftragsvolumen: 10 μl der Fraktion 1 (ca. 60 μg pro well) aus der SDC (Abb.13).

14B

3	0	3	2	2	5		
4	3	4	8	10	9	2	2
1	3	2	2	5	4	2	3
3	3	7	4	3	3	1	1
3	1	1	0	3	2	0	8
7	3	5	4	4	1	0	5

14C

6,0	5,9	6,4	5,0	6,3	5,3		
6,2	8,1	6,6	6,8	6,1	6,3	5,7	5,2
6,0	6,1	5,9	6,5	5,1	5,5	6,1	5,1
5,7	5,9	5,8	5,8	5,2	5,7	6,4	5,0
5,9	6,3	6,1	5,3	5,1	5,7	5,6	5,1
5,8	6,5	6,0	5,4	5,4	5,9	6,0	5,0

14D

0,5	0,1	0,5	0,3	0,3	0,9		
0,7	0,4	0,6	1,1	1,6	1,5	0,3	0,3
0,1	0,4	0,4	0,3	1,0	0,6	0,2	0,6
0,6	0,5	1,2	0,8	0,5	0,5	0,1	0,2
0,5	0,2	0,2	0,1	0,6	0,4	0,0	1,5
1,3	0,4	0,8	0,7	0,7	0,1	0,1	1,1

Abb.14B-D: Ergebnismatrizes der IMAC- und HIC-PPS-Experimente.

14B: UII-generierende Aktivität angegeben als Intensitätsverhältnis UII/UCE-S (dunkle Felder zeigen eine hohe UII-generierende Aktivität).

14C: Absolute Proteinmenge der Eluate in μg (dunkle Felder zeigen eine hohe Proteinausbeute).

14D: spezifische UII-generierende Aktivität (dunkle Felder zeigen eine hohe spezifische UII-generierende Aktivität, helle Felder eine geringe bis gar keine Aktivität).

Aufgrund einer hohen spezifischen Ull-generierenden Aktivität wurde für die weitere chromatographische Reinigung des UCE der Parametersatz t-Butyl-MacroPrep-Gel (Abb.14D) mit einem Probenauftragspuffer bei einem pH von 5 auf die Säulenchromatographie übertragen.

3.2.4 Chromatographische Reinigung des UCE mittels Hydrophober Interaktions-Chromatographie

Für die weitere chromatographische Reinigung des UCE wurde aufgrund der Ergebnisse der PPS-Experimente (Abb.14B-D) eine Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC) mit dem t-Butyl-MacroPrep-Gel bei einem pH-Wert von 5 durchgeführt.

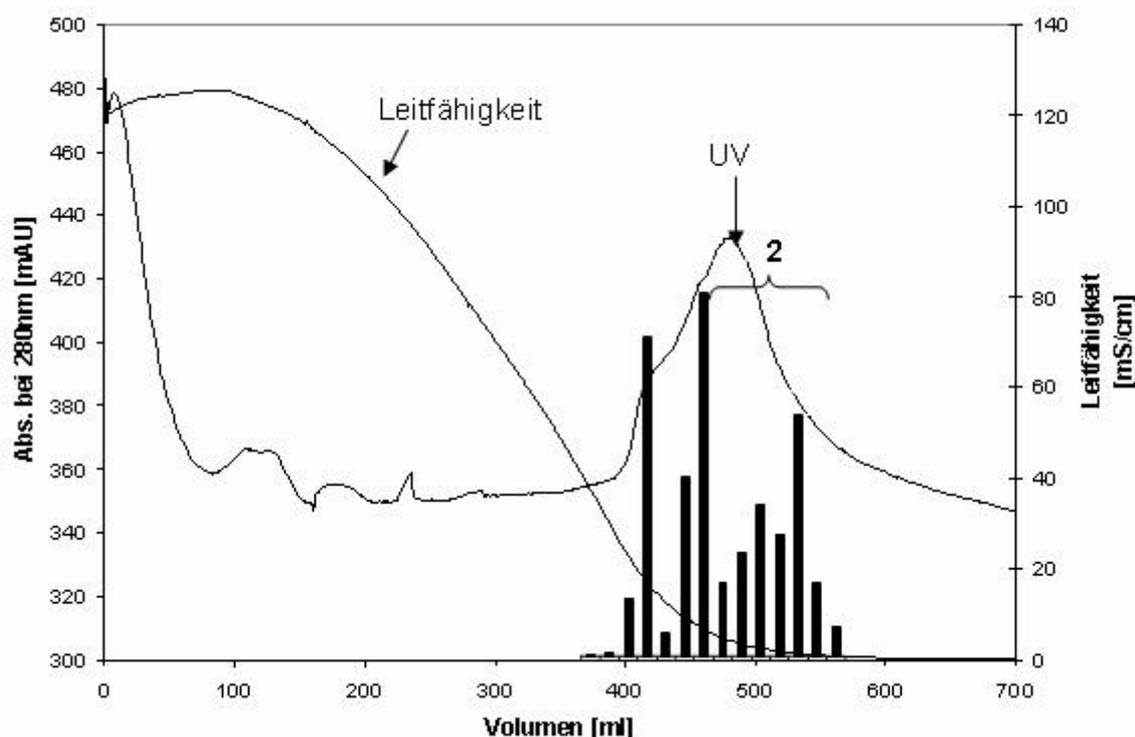


Abb.15: Chromatogramm einer Hydrophoben Interaktions-Chromatographie der Ull-generierenden Fraktion 1 aus der SDC (Abb.13). Probenvolumen: 150ml (ca. 900mg Protein). Säule: 150ml t-Butyl MacroPrep-Gel gepackt in XK50-Säulengehäuse. Puffer A: 50mM Malonsäure in 2M NaCl; pH5. Puffer B: Wasser. Flußrate: 5ml/min. Gradient: 0-100% B in 60min. X-Achse: Elutionsvolumen. Y-Primärachse: UV-Absorption bei 280nm. Y-Sekundärachse: Leitfähigkeit [mS/cm]. Balkendiagramm: Ull-generierende Aktivitäten. Zusammengefasste Fraktionen sind mit 2 bezeichnet.

Abbildung 15 zeigt das Chromatogramm der HIC der Fraktion 1 aus der SDC (Abb. 13). Eine UV-Absorption ist erst bei einer niedrigen Leitfähigkeit zu sehen, bei der sich auch UCE-Aktivitäten wiederfinden, dargestellt als Balkendiagramm. Aufgrund des Aktivitätsprofils könnte man vermuten, dass mehrere unterschiedliche Proteine

mit UII-generierender Aktivität getrennt wurden. Für die weitere Reinigung des UCE wurden Fraktionen mit einem Elutionsvolumen in einem Intervall von 470-540ml vereinigt, im weiteren Verlauf mit Fraktion 2 bezeichnet. Für den nächsten Reinigungsschritt wurde die Fraktion 2 über einen 10kDa Filter aufkonzentriert.

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

Für die weitere chromatographische Reinigung des UCE wurden PPS-Experimente mit unterschiedlichen Kationenaustauschern bei verschiedenen pH-Bedingungen mit der Fraktion 2 aus der HIC (Abb. 15) durchgeführt.

Gel \ pH	CM-650M	Fractogel SO ₃ ⁻	SP-Sepharose FF	Fractogel COO ⁻	UnosphereS
4	0,1	0,2	0,2	0,0	0,1
5	0,1	0,2	0,1	0,0	0,2
6	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1
7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1

Abb.16: Ergebnismatrix der Kationenaustausch-PPS-Experimente

Probenvolumen: 10µl der Fraktion 2 pro well (ca. 55µg Protein). Gelvolumen: 10µl pro well. Zahlenfelder: UII-generierende Aktivitäten angegeben als Intensitätsverhältnis UII/UCE-S (je dunkler das Feld desto höher die Aktivität). X-Achse: Gelvariation. Y-Achse: pH-Wert-Variation.

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der PPS-Experimente, angegeben als UII-generierende Aktivitäten der Eluate. Eine hohe UCE-Aktivität ist bei einem pH-Wert von 5 und dem UnosphereS-Gel zu sehen.

3.2.6 Chromatographische Reinigung des UCE mittels Kationenaustausch-Chromatographie

Für die weitere chromatographische Reinigung des UCE wurde der aus den PPS-Experimenten ermittelte Parametersatz UnosphereS-Gel bei einem pH-Wert von 5 auf die Säulenchromatographie übertragen.

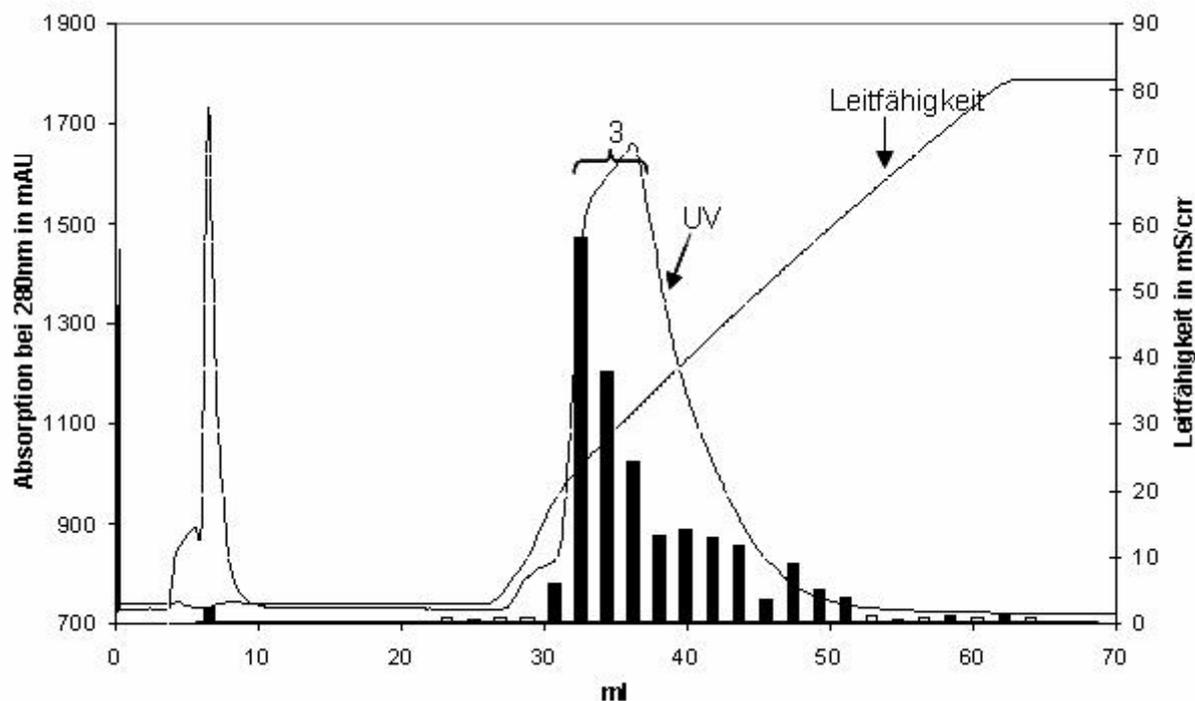


Abb.17 Chromatogramm der Kationenaustausch-Chromatographie der Fraktion 2 aus der Hydrophoben Interaktionschromatographie (Abb.15).

Probenvolumen: 1ml (ca. 22mg). Säule: 7ml UnosphereS-Gel gepackt in ein 10/50 Säulengehäuse. Puffer A: 50mM Phosphatpuffer; pH5. Puffer B: 1M NaCl. Flußrate: 0,9ml/min. Gradient: 0% auf 100%B in 40 Minuten. X-Achse: Elutionsvolumen [ml] Y-Primärachse: UV-Absorption bei 280nm Y-Sekundärachse: Leitfähigkeit [mS/cm]. Zusammengefasste Fraktionen sind mit 3 bezeichnet.

Abbildung 17 zeigt das Chromatogramm der Kationenaustausch-Chromatographie des UCE. Eine hohe UV-Absorption ist bei einem Elutionsvolumen im Intervall von 30-50ml zu sehen, in denen auch die UCE-Aktivität wieder zu finden ist. Das Balkendiagramm zeigt die UCE-Aktivitäten. Die zusammengefassten Fraktionen (bezeichnet als Fraktion 3) wurden für den nächsten Reinigungsschritt über einen 10kDa Filter eingengt.

3.2.7 Charakterisierungsversuche der Protease UCE mittels Proteaseinhibitoren

Für die Einteilung des UCE in eine Proteaseklasse wurden Experimente mit unterschiedlichen Proteaseinhibitoren zur Inhibition des UCE durchgeführt. Abbildung 18 zeigt, dass eine starke Inhibition der UCE-Aktivität mit dem Aspartatprotease-Inhibitor Pepstatin A, dem Serin/Cystein-Protease-Inhibitor Chymostatin und dem Metallo-Protease-Inhibitor EDTA erreicht werden konnte. Eine Inhibition konnte auch bei der Inkubation mit dem Serinprotease-Inhibitor AEBSF

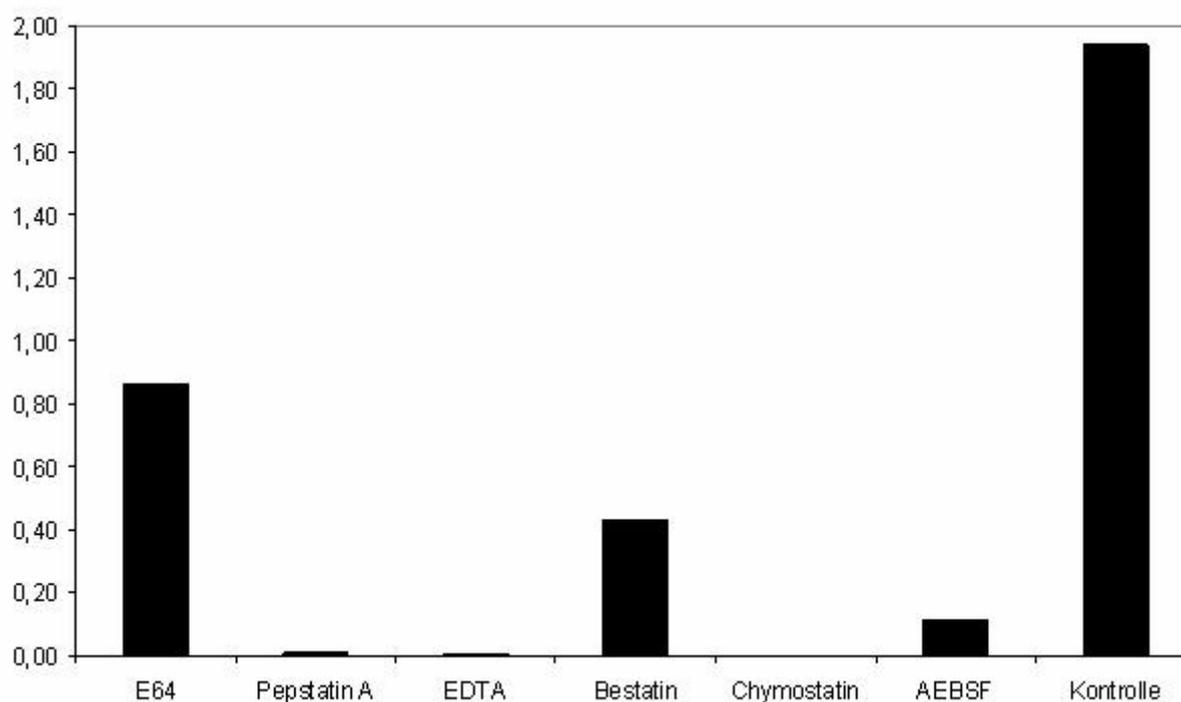


Abb.18: Inhibitionsprofil der UII-generierenden Fraktion 3 aus der Kationenaustausch-Chromatographie (Abb.17). Probenvolumen: 50 μ l. Inhibitorenkonzentrationen: 10 μ M E64, 10 μ M Pepstatin A, 1mM EDTA, 100 μ M Bestatin, 10 μ M Chymostatin und 1mM AEBSF. X-Achse: Proteaseinhibitoren. Y-Achse: UII-generierende Aktivitäten.

Aufgrund der Inhibitionsergebnisse handelt es sich bei der UCE-Aktivität vermutlich um eine Serinprotease, eine Metalloprotease oder eventuell eine Aspartatprotease.

3.2.8 Reinigung des UCE mit einer Größenausschluss-Chromatographie

Als finaler Reinigungsschritt des UCE wurde eine Größenausschluss-Chromatographie der Fraktion 3 durchgeführt. Abbildung 19 zeigt das Ergebnis der Größenausschluss-Chromatographie.

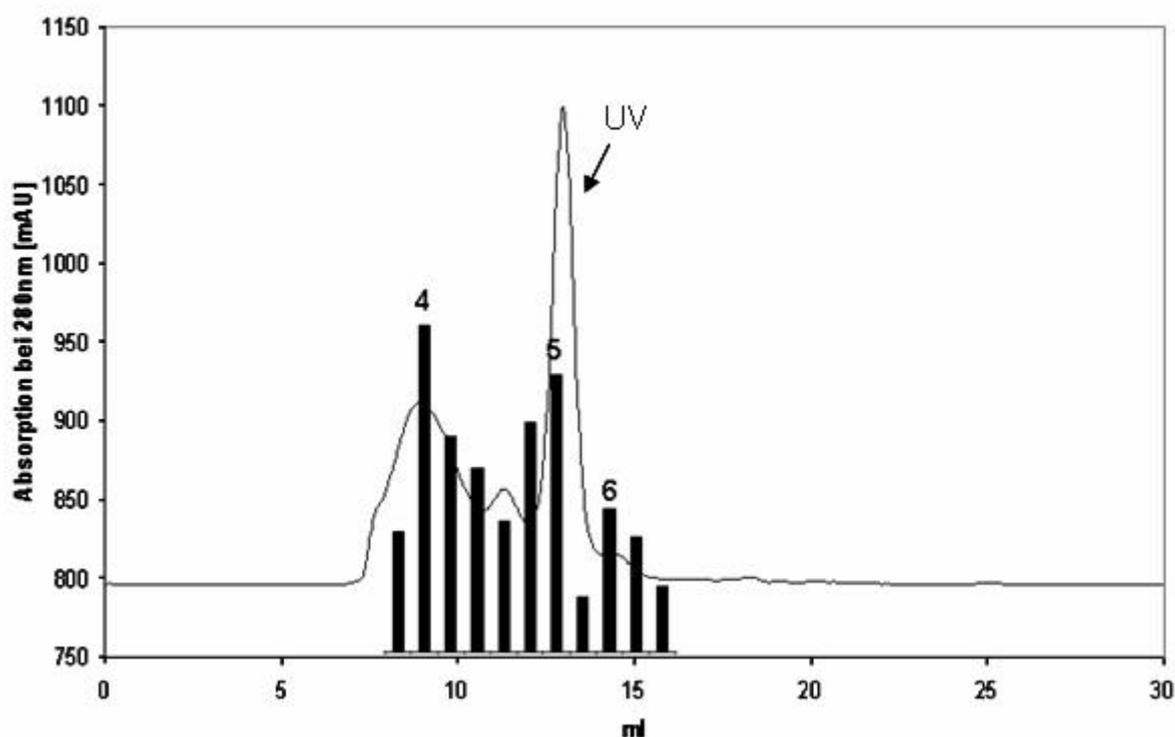


Abb.19: Chromatogramm der Größenausschluss-Chromatographie der Ull-generierenden Aktivität der Fraktion 3 (Abb.17). Probenvolumen: 200 μ l. Säule: Superdex 200HR 10/30. Puffer A: 50mM Phosphatpuffer in 150mM NaCl; pH7. Flußrate: 250 μ l/min. X-Achse: Elutionsvolumen [ml]. Y-Primärachse: Absorption bei 280nm.

Das Chromatogramm zeigt signifikante UV-Absorptionen, denen UCE-Aktivitäten zugeordnet werden konnten. Das Aktivitätsprofil zeigt 3 mögliche UCE-Aktivitäten, die mit Fraktion 4, 5 und 6 bezeichnet (Abb.19) und für die Identifizierung mittels LC-ESI MS/MS tryptisch verdaut wurden.

Die Größenausschluss-Chromatographie kann neben der Trennung von Proteinen auch für die Abschätzung des Molekulargewichts herangezogen werden. Tabelle 9 zeigt die Elutionsvolumina und die Partitionskoeffizienten der Standardproteine und der Fraktionen 4, 5 und 6 aus der Größenausschluss-Chromatographie (Abb. 19). Das Säulenvolumen betrug 24ml. Die Elutionsvolumina der Fraktionen 4, 5 und 6 aus der Größenausschluss-Chromatographie betragen 9ml, 13ml und 14ml und einen K_{av} von 0,12, 0,35 und 0,41. Die ungefähren Molekulargewichte wurden mit Hilfe einer Kalibrierungskurve (Abb. 20) bestimmt.

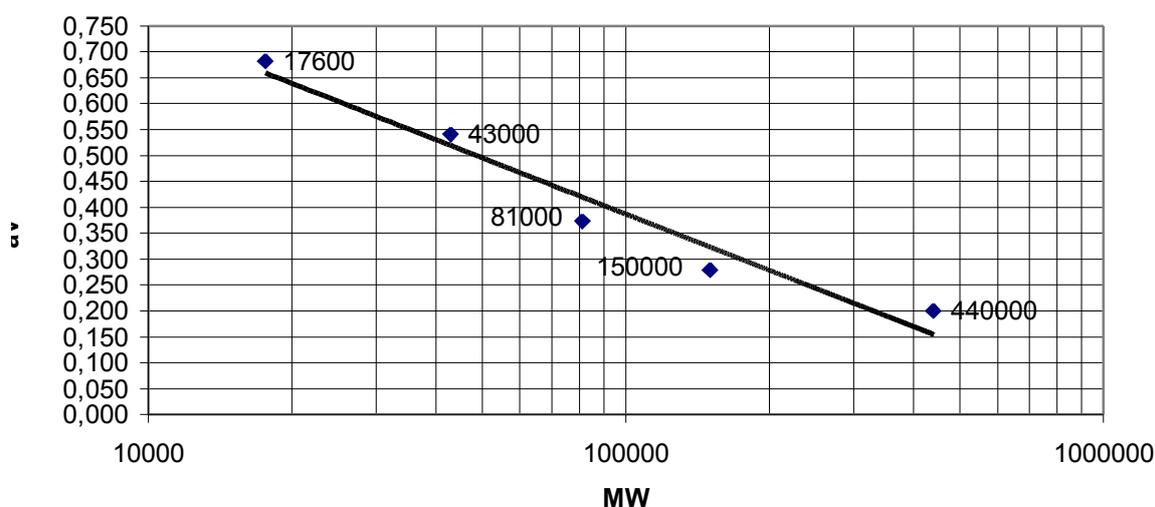


Abb.20: Kalibrierungskurve der Größenausschluss-Chromatographie. Der Partitionskoeffizient K_{av} der Standardproteine ist aufgetragen gegen das Molekulargewicht (MW). Der ermittelte K_{av} der Fraktion 5 beträgt 0,352 (Tab.2), was einem geschätzten Molekulargewicht von ca. 90kDa entspricht.

	MW [Da]	Elutionsvolumen [ml]	K_{av}
Ferritin	440000	10	0,2
IgG	150000	12	0,28
Transferrin	81000	13	0,37
Lysozym	43000	16	0,54
Myoglobin	17600	19	0,68
Fraktion 4	ca. 540000	9	0,12
Fraktion 5	ca. 90000	13	0,35
Fraktion 6	ca. 74000	14	0,41

Tab.9: Ermittelte ungefähre Molekulargewichte der Fraktionen 4, 5 und 6 der Größenausschluss-Chromatographie (Abb. 17).

Die ungefähren ermittelten Molekulargewichte der Fraktion 4, 5 und 6 aus der Größenausschluss Chromatographie betragen ca. 540kDa, 90kDa und 74kDa.

3.3 Identifizierung

3.3.1 Identifizierung der tryptisch verdauten Peptide der Ull-generierenden Fraktionen der Größenausschluss-Chromatographie mittels LC-ESI MS/MS

Für die Identifizierung der aktiven Fraktionen 4, 5 und 6 aus der Größenausschluss-Chromatographie (Abb. 19) wurden diese zuvor tryptisch verdaut und anschließend mittels LC-ESI-MS/MS analysiert. Abbildung 21 zeigt das Chromatogramm der Reversed Phase Chromatographie der tryptischen Peptide aus der Fraktion 5. Während einer Retentionszeit von 8-40min konnten Peptide detektiert werden und MS/MS-Daten aufgenommen.

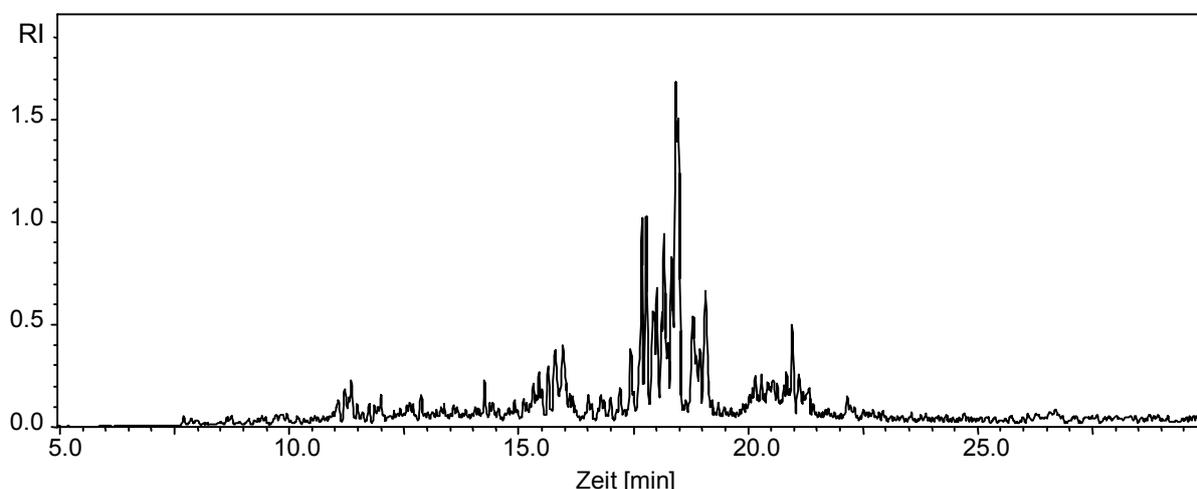


Abb. 21: Chromatogramm einer Reversed Phase-Chromatographie der tryptischen Peptide der Fraktion 5 aus der Größenausschluss-Chromatographie (Abb. 19). Puffer A: 0,1% TFA. Puffer B: 0,1% TFA in 100% ACN. Chip Trapping Säule: 40nl ZORBAX 300SB C18. Chip Analytische Säule: 150mm x 75µm ZORBAX 300SB C18. Probenvolumen: 8µl. X-Achse: Retentionszeit [min]. Y-Achse: Relative Intensität der Peptidsignale.

Mit dem Data Analysis Programm von Agilent wurden aus den MS-Spektren Massentabellen erstellt. Die Massentabellen wurden in einen Mascot generic file (mgf) umgewandelt und Mascot-Datenbankabfragen durchgeführt. Mit Hilfe der Datenbankabfragen konnte eine Protease, der humane Komplement-Faktor-I (EC-Nummer: 3.4.21.45) identifiziert werden. Insgesamt konnten 9 Peptide des Komplement-Faktors-I mit folgenden AS-Sequenzen: VFSLQWGEVK, AQLGDLPWQVAIK, GLETSLAECTFTK, ADSPMDDFFQCVNGK, TMGYQDFADVVCYTQK, YQIWTTVVDWIHPDLK, EANVACLDLGFQQGADTQR, VANYFDWISYHVGRPFISQYNV, DASGITCGGIYIGGCWILTAAHCLR identifiziert werden, mit einem Score von 392. Die Sequenzabdeckung für den Komplement-

Faktor-I betrug 25%. Die Datenbankabfragen der analysierten tryptisch verdauten Fraktionen 4 und 6 der Größenausschluss-Chromatographie (Abb. 19) ergaben keine weitere identifizierte Protease. Im Anhang befinden sich die Liste der identifizierten Proteine der Fraktionen 4 und 6.

3.3.2 LC-ESI MS/MS Analyse der tryptisch verdauten Peptide der kommerziellen Präparation des humanen Komplement-Faktors-I

Nach Identifizierung des Komplement-Faktors-I in der Fraktion 5 wurde nach einer kommerziellen Präparation des Komplement-Faktor-I gesucht. Eine aus humanem Plasma aufgereinigte Präparation wurde von Sigma angeboten. Da für weitere Charakterisierungsversuche diese Präparation als Positivkontrolle eingesetzt werden sollte, musste sichergestellt sein, dass keine weiteren Proteasen in der Präparation vorhanden sind. Dafür wurde ein Teil der Präparation tryptisch verdaut und mit der LC-ESI-MS/MS identifiziert.

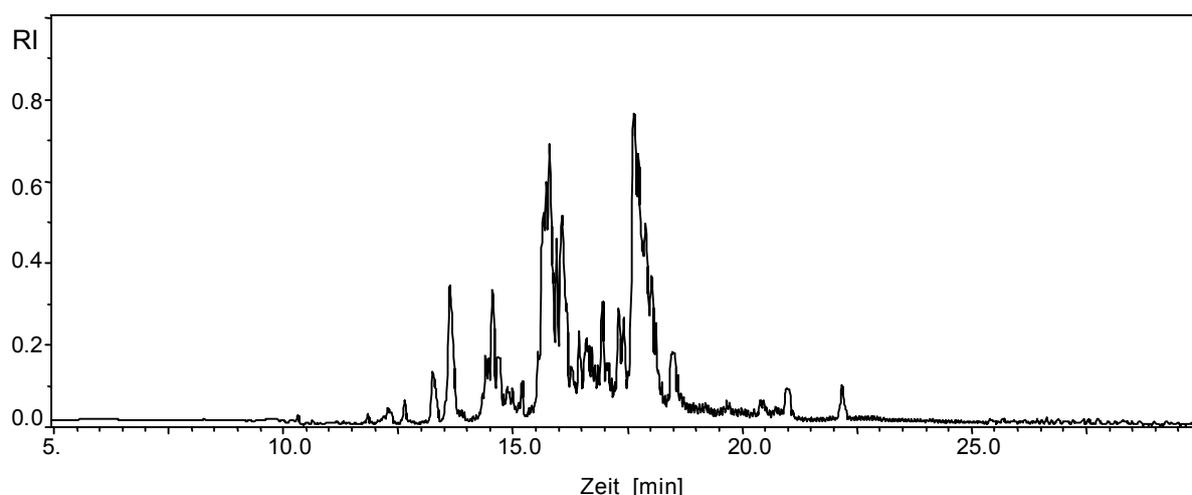


Abb. 22: Chromatogramm einer Reversed Phase-Chromatographie der tryptischen Peptide einer kommerziellen Komplement-Faktor-I-Präparation. Puffer A: 0,1% TFA. Puffer B: 0,1% TFA in 100% ACN. Chip Trapping Säule: 40nl ZORBAX 300SB C18. Chip Analytische Säule: 150mm x 75µm ZORBAX 300SB C18. Probenvolumen: 8µl. X-Achse: Retentionszeit [min]. Y-Achse: Relative Intensität der Peptidsignale.

Die Datenbankabfrage ergab die Identifizierung des humanen Komplement-Faktors-I mit einem Score von 998. Folgende Peptide des Komplement-Faktors-I wurden identifiziert: FSVSLK, TMFICK, IVIEYVDR, VFCQPWQR, SFPTYCQQK, RIVIEYVDR, VFSLQWGEVK, GLETSLAECTFTK, RAQLGDLPWQVAIK, ADSPMDDFFQCVNGK, TMGYQDFADVVCYTQK, YQIWTTVVDWIHPDLK, RTMGYQDFADVVCYTQK, EANVACLDLGFQQGADTQR, ACDGINDCGDQSDELCK, IIFHENYNAGTYQNDIALIEMK. Die Sequenzabdeckung

des Komplement-Faktors-I betrug 34%. Außer dem Komplement-Faktor-I konnte in der Präparation noch Albumin identifiziert werden. Da es keinen Hinweis auf eine weitere Protease in der kommerziellen Präparation gab, konnten mit dieser Präparation Charakterisierungsversuche durchgeführt werden.

3.3.3 Vergleich der AS-Sequenzen der tryptischen Peptide der kommerziellen Präparation des humanen Komplement-Faktors-I und der Fraktion 5

In der tryptisch verdauten Probe der kommerziellen Präparation des Komplement-Faktors-I konnten 16 Peptide, in der Fraktion 5 10 Peptide dem Komplement-Faktor-I zugeordnet werden. Insgesamt wurden in beiden Fraktionen 7 Peptide mit identischen AS-Sequenzen gefunden (Tab. 10).

Identifizierte tryptische Peptide der gekauften Komplement-Faktor-I-Präparation	Identifizierte tryptische Peptide der Fraktion 5
VFSLQWGEVK	VFSLQWGEVK
GLETSLAECTFTK	GLETSLAECTFTK
ADSPMDDFFQCVNGK	ADSPMDDFFQCVNGK
TMGYQDFADVVCYTQK	TMGYQDFADVVCYTQK
YQIWTTVVDWIHPDLK	YQIWTTVVDWIHPDLK
EANVACLDLGFQQGADTQR	EANVACLDLGFQQGADTQR
RAQLGDLPWQVAIK	RAQLGDLPWQVAIK
TMFICK	AQLGDLPWQVAIK
IVIEYVDR	VANYFDWISYHVGRPFISQYNV
VFCQPWQR	DASGITCGGIYIGGCWILTAHCLR
SFPTYCQK	
RIVIEYVDR	
FSVSLK	
RTMGYQDFADVVCYTQK	
ACDGINDCGDQSDELCK	
IIFHENYNAGTYQNDIALIEMK	

Tab.10: Vergleich der AS-Sequenzen der identifizierten Peptide der kommerziellen Präparation des Komplement-Faktor-I und der Fraktion 5, die dem Komplement-Faktor-I zugeordnet werden konnten. Identische AS-Sequenzen der beiden Fraktionen sind fett gedruckt.

3.4 Nachweis einer UCE-Aktivität der Fraktion 5 und des Komplement Faktors-I mittels MES-UCE-Assay

Um sicherzustellen, dass der Komplement-Faktor-I eine UCE-Aktivität besitzt, wurden die Fraktion 5 und die kommerzielle Komplement-Faktor-I-Präparation mit Hilfe des MES-UCE-Assay auf UCE-Aktivität untersucht.

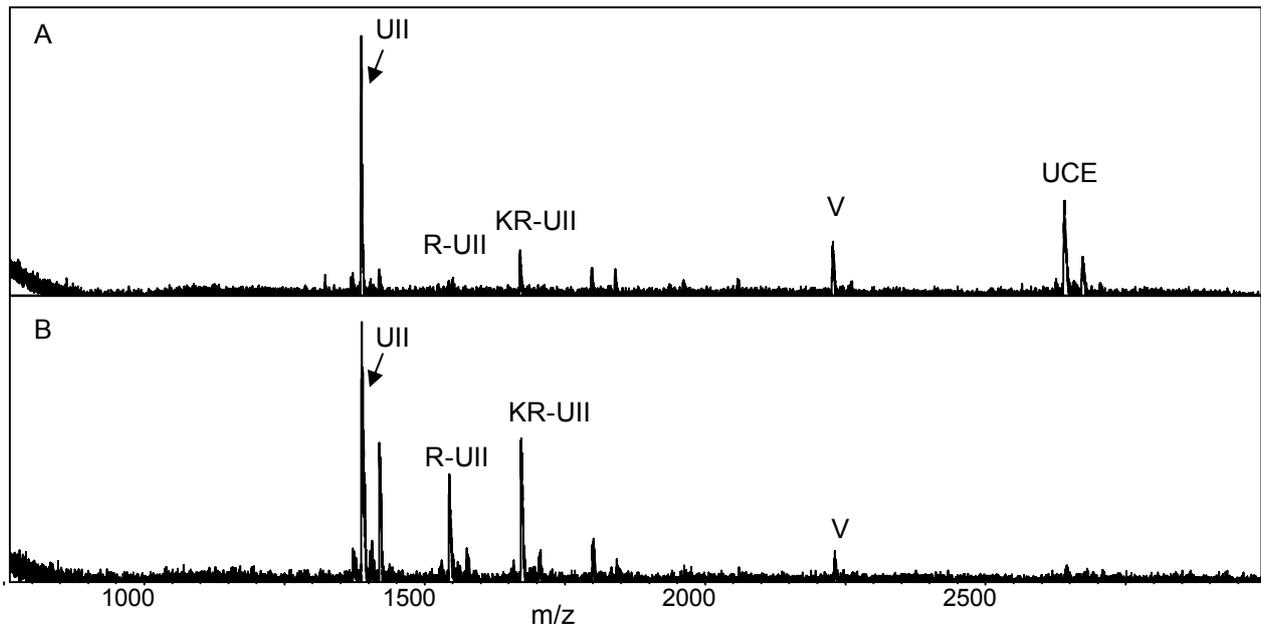


Abb. 23: MES-Assay für den Nachweis einer UCE-Aktivität des Komplement-Faktors-I (A) und der gereinigten Fraktion 5 (B) aus einer humanen Cohn IV-Fraktion: MALDI-Spektren der Reaktionslösungen der Inkubation der immobilisierten Proteine der kommerziellen Komplement-Faktor-I-Präparation (A) und der gereinigten Fraktion 5 (B) einer Cohn-IV-Fraktion mit UCE-S nach 7h Inkubation.

Ull: 1389.5Da, R-Ull: 1545.6Da, KR-Ull: 1673.7Da, UCE-S: 2645.3Da, V:Verunreinigung: 2230.9Da.

Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse des Nachweises einer UCE-Aktivität der kommerziellen Komplement-Faktor-I-Präparation im Vergleich mit der gereinigten Fraktion 5. Die MALDI-Spektren beider Fraktionen zeigen sowohl einen Abbau des UCE-S zum Ull, als auch die Generierung der zwei Zwischenstufen (KR-Ull und R-Ull) des Ull. Mit Hilfe des MES-UCE-Assays konnte gezeigt werden, dass die Komplement-Faktor-I-Präparation eine UCE-Aktivität besitzt.

3.5 Nachweis der Komplement-Faktor-I-typischen Aktivität der Fraktion 5 mittels eines Fluoreszenz-basierten Enzymassays

Tsiftoglou et al. konnte zeigen, dass der Komplement-Faktor-I das synthetische Fluoreszenzsubstrat Boc-Asp(Obzl)-Pro-Arg-AMC proteolytisch umsetzt (Tsiftoglou et al. 2004). Für den Nachweis, dass auch die Fraktion 5 im Vergleich mit der Komplement-Faktor-I-Präparation das synthetische Fluoreszenz-Substrat umsetzt, wurde ein Fluoreszenz-basierter Enzymassay durchgeführt. Die kommerzielle Komplement-Faktor-I-Präparation diente als Positiv-Kontrolle.

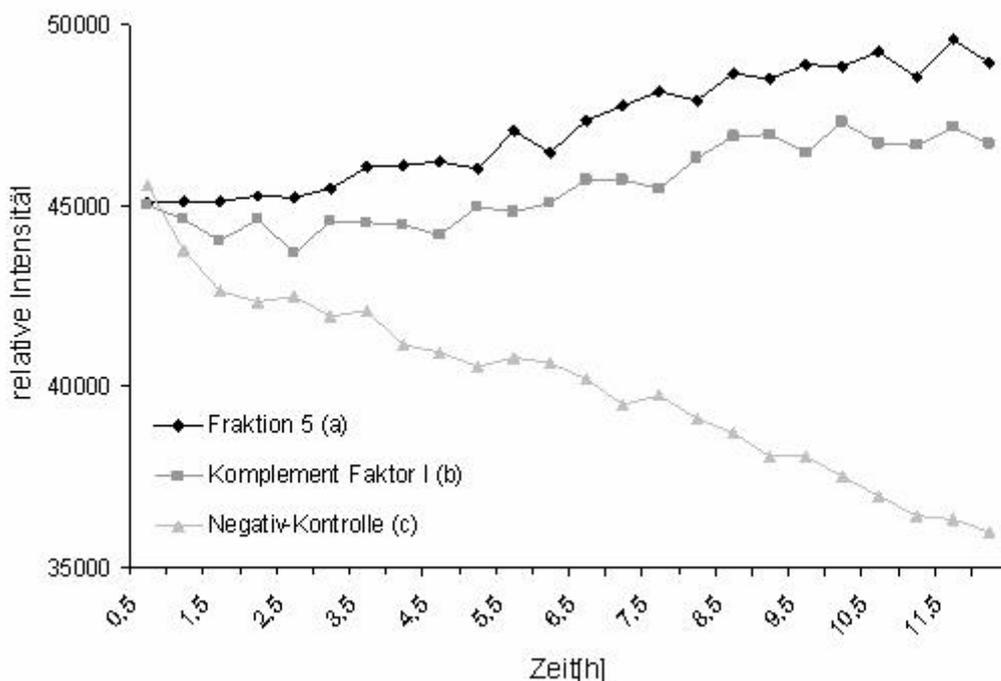


Abb. 24: Fluoreszenz-basierter Enzymassay zum Nachweis der proteolytischen Spaltung eines synthetischen Komplement-Faktor-I-Substrats durch die gereinigte Fraktion 5 aus der Größenausschluss-Chromatographie (a) und der Komplement-Faktor-I-Präparation (b). Inkubation in 96-Deepwell Platte von a) 50µl einer 25mM Boc-Asp(Obzl)-Pro-Arg-AMC-Substrat-Lösung in 150µl eines 25mM Bicine-Puffer; 150mM NaCl; 0,5mM EDTA; pH 8.25. b) 50µl einer 25µM Boc-Asp(Obzl)-Pro-Arg-AMC-Substrat-Lösung; 10µl der Fraktion 5 aus der Gelfiltration in 140µl eines 25mM Bicine-Puffer; 150mM NaCl; 0,5mM EDTA; pH 8.25. c) 50µl einer 25µM Boc-Asp(Obzl)-Pro-Arg-AMC-Substrat-Lösung; 5µg einer kommerziellen Präparation des humanen Komplement-Faktor-I in 145µl eines 25mM Bicine-Puffer; 150mM NaCl; 0,5mM EDTA; pH 8.25. Messung: Anregung bei 350nm, Emission bei 465nm. Inkubationstemperatur: 37°C. Messungen nach jeweils 30min. X-Achse: Zeit [h]. Y-Achse: Relative Intensität.

Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse des Enzymassays. Fraktion 5 (a) und der Komplement-Faktor-I der kommerziellen Präparation (b) zeigen eine Umsetzung des Fluoreszenzsubstrates Boc-Asp(Obzl)-Pro-Arg-AMC ab einer Inkubationszeit von 4,5h, während die Negativkontrolle keine Substratumsetzung zeigt.

Mit Hilfe eines Fluoreszenz-basierten Enzymassays konnte gezeigt werden, dass in der Fraktion 5 als auch in der kommerziellen Komplement-Faktor-I-Präparation eine

proteolytische Aktivität vorhanden ist, die das Fluoreszenz-Substrat Boc-Asp(Obzl)-Pro-Arg-AMC umsetzt.

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

Der Komplement-Faktor-I ist ein Glykoprotein mit N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydraten (Tsiftoglou et al., 2005). Für die Charakterisierung der gereinigten Fraktion 5 wurden Experimente auf glykosidische Reste durchgeführt. Es gibt zwei Arten glykosidischer Bindungen: O- und N-glykosidisch. Für den Nachweis O-glykosidisch gebundener Zuckerreste wurde untersucht, ob sich die gereinigte Fraktion 5 und die Komplement-Faktor-I-Präparation an eine PNA (Peanut agglutinin)-Lektin-Säule binden lassen. Für den Nachweis N-glykosidisch gebundener Zuckerreste wurde untersucht, ob sich die gereinigte Fraktion 5 und die Komplement-Faktor-I-Präparation an eine GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin)-Lektin-Säule binden lassen.

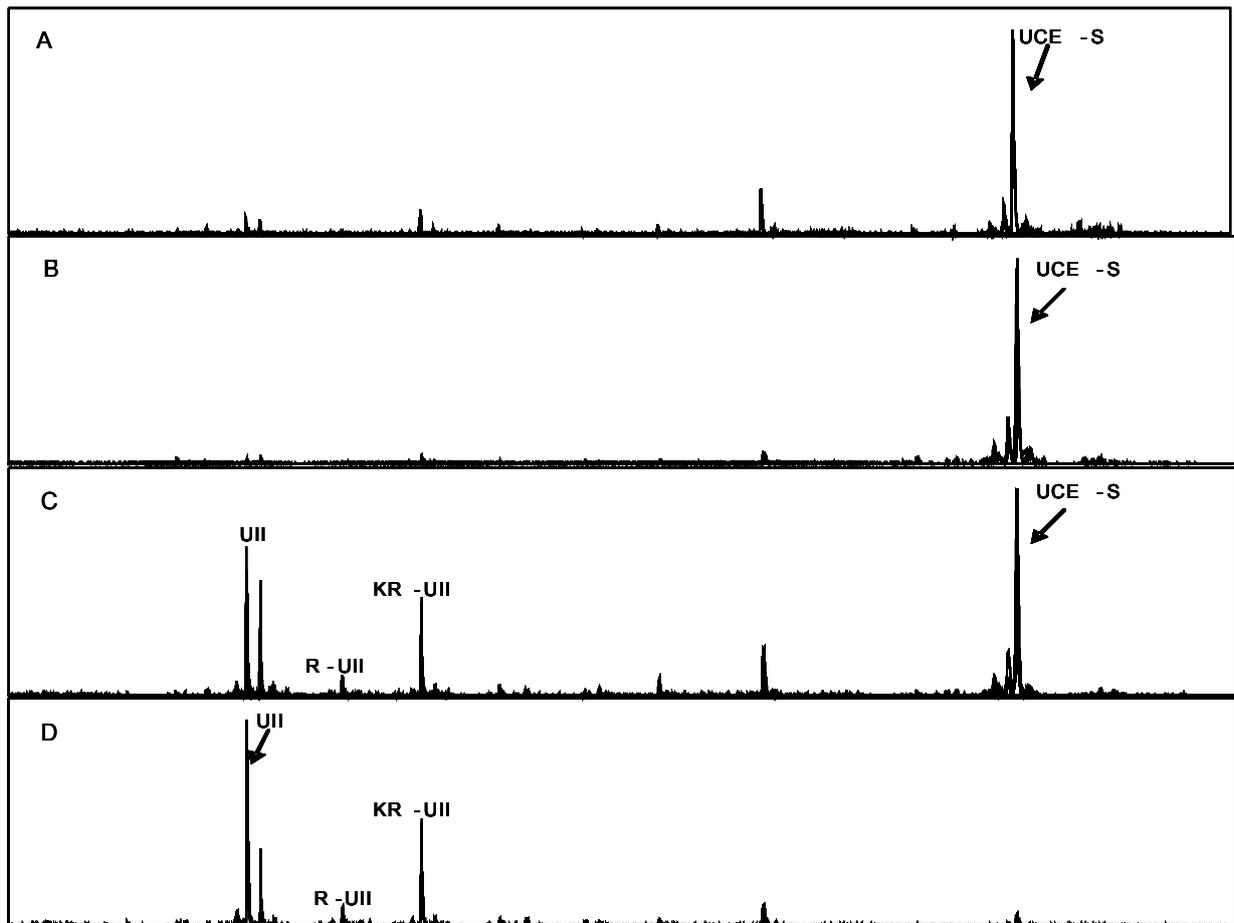


Abb. 25A-D: Charakterisierung der gereinigten Fraktion 5 und der Komplement-Faktor-I-Präparation auf O-glykosidisch gebundene Zuckerreste mittels PNA-Lektin-Säule. MALDI-Spektren der Reaktionslösungen der Inkubation des immobilisierten A: Eluats der PNA-Lektin-Säule der gereinigten Fraktion 5 B: Eluats der PNA-Lektin-Säule der Komplement-Faktor-I-Präparation C: Durchflussfraktion der PNA-Lektin-Säule der gereinigten Fraktion 5 und D: der Durchflussfraktion der PNA-Lektin-Säule der Komplement-Faktor-I-Präparation nach 24h Inkubation.

Die MALDI-Spektren der Abbildungen 25A und B zeigen keine U11-Signale in den Eluaten der gereinigten Fraktion 5 und der Komplement-Faktor-I-Präparation, so dass davon auszugehen ist, dass weder die gereingte Fraktion 5 noch die kommerzielle Komplement-Faktor-I-Präparation an das PNA-Lektin gebunden hat. In den Durchflussfraktionen der gereinigten Fraktion 5 und der Komplement-Faktor-I-Präparation konnten U11-generierende Aktivitäten nachgewiesen werden (Abb. 25C und D).

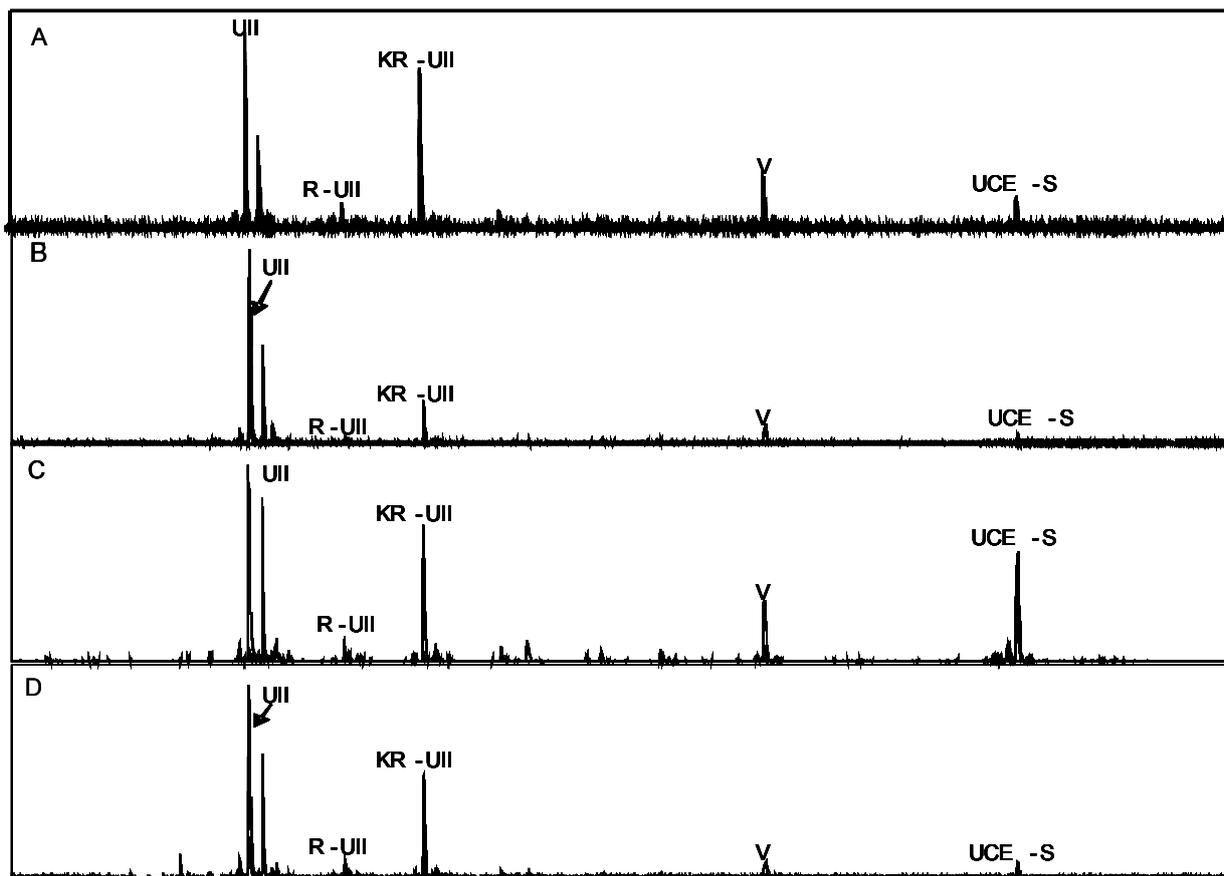


Abb. 26A-D: Charakterisierung der gereinigten Fraktion 5 und der Komplement-Faktor-I-Präparation auf N-glykosidisch gebundene Zuckerreste mittels immobilisiertem GNA-Lektin. MALDI-Spektren der Reaktionslösungen der Inkubation des immobilisierten A: Eluats der GNA-Säule der gereinigten Fraktion 5 B: Eluats der PNA-Säule der Komplement-Faktor-I-Präparation C: Durchflussfraktion der PNA-Säule der gereinigten Fraktion 5 und D: der Durchflussfraktion der GNA-Säule der Komplement-Faktor-I-Präparation nach 24h Inkubation.

Die MALDI-Spektren der Abbildungen 26A und B zeigen UII-Signale in den Eluaten der gereinigten Fraktion 5 und der Komplement-Faktor-I-Präparation, so dass beide Fraktionen an die GNA-Lektin-Säulen gebunden haben und wieder eluiert werden konnten. Abb. 26C und D zeigt UII-Signale in den Durchflussfraktionen der gereinigten Fraktion 5 und der Komplement-Faktor-I-Präparation. Dies könnte auf das Überschreiten der Bindungskapazität der Lektinsäulen zurückzuführen sein, so dass nicht alle Proteine mit UCE-Aktivität binden konnten. Die Versuche zur Charakterisierung von O- bzw. N-glykosidischen Zuckerresten der gereinigten Fraktion 5 und der Komplement-Faktor-I-Präparation haben gezeigt, dass beide Fraktionen sich an eine GNA-Lektin-Säule binden ließen und somit N-glykosidisch gebundene Zuckerreste enthalten.

3.7 Versuche zur Inhibition der gereinigten Fraktion 5 und der kommerziellen Komplement-Faktor-I-Präparation mit dem Serinproteaseinhibitor Aprotinin

Es ist bekannt, dass der Komplement-Faktor-I eine Serinprotease ist (Davis and Alper, 1984). Für die weitere Charakterisierung der Fraktion 5 im Vergleich mit der kommerziellen Komplement-Faktor-I-Präparation wurde untersucht, ob sich die UCE-Aktivität in beiden Fraktionen mit dem Serinproteaseinhibitor Aprotinin hemmen lässt.

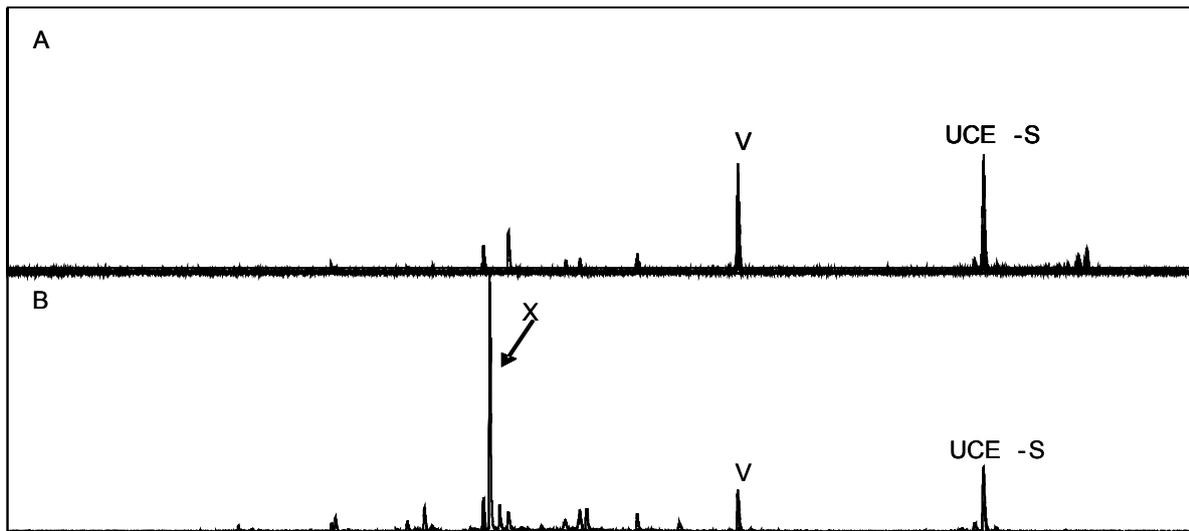


Abb. 27: MES-Analyse der Reaktionsprodukte der Inkubation der gereinigten Fraktion 5 und der kommerziellen Komplement-Faktor-I-Präparation mit UCE-S in Gegenwart des Serinproteaseinhibitors Aprotinin. MALDI-Spektren der Reaktionslösungen der Inkubation der immobilisierten gereinigten Fraktion 5 (A) und der Komplement-Faktor-I-Präparation (B) mit UCE-S und dem Inhibitor Aprotinin nach 24h Inkubation.

UCE-S: 2645.3Da. V=Verunreinigung: 2230.9Da. X=Peptid Lys-Lys-Arg-Ull: 1801.8Da.

Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse der Inhibitionsversuche mit dem Serinproteaseinhibitor Aprotinin. Es konnte eine vollständige Hemmung der UCE-Aktivität der Fraktion 5 und der kommerziellen Komplement-Faktor-I-Präparation mit dem Inhibitor Aprotinin erreicht werden. Die MALDI-Spektren (Abb. 27) zeigen weder die Generierung von Ull-Signalen noch die möglicher Zwischenprodukte (R-Ull und KR-Ull). Es konnte jedoch ein Peptid mit der Masse 1801.8Da (im Spektrum mit X bezeichnet) mit besonders hoher Signalintensität in der Komplement-Faktor-I-Präparation gefunden werden. Diese Masse entspricht dem KKR-Ull Peptid (Tab. 8). Dafür verantwortlich könnte eine weitere Protease in der kommerziellen Komplement-Faktor-I-Präparation sein.

3.8 Versuche zur Inhibition der gereinigten Fraktion 5 und der kommerziellen Komplement Faktor I-Präparation mit dem Serinproteaseinhibitor Pefabloc SC

Tsiftoglou et al. konnte zeigen, das sich der Komplement Faktor I vollständig mit Pefabloc SC (auch als AEBSF bezeichnet) inhibieren ließ. Vorangegangene Inhibitionsversuche (Punkt 3.2.7) haben gezeigt, dass die Fraktion 5 nicht vollständig von Pefabloc SC inhibiert werden konnte. Ein Grund könnte die eingesetzte Konzentration des Inhibitors sein. Daraufhin wurde die von Tsiftoglou et al. angegebene Pefabloc SC-Konzentration für den Inhibitionsversuch eingesetzt.

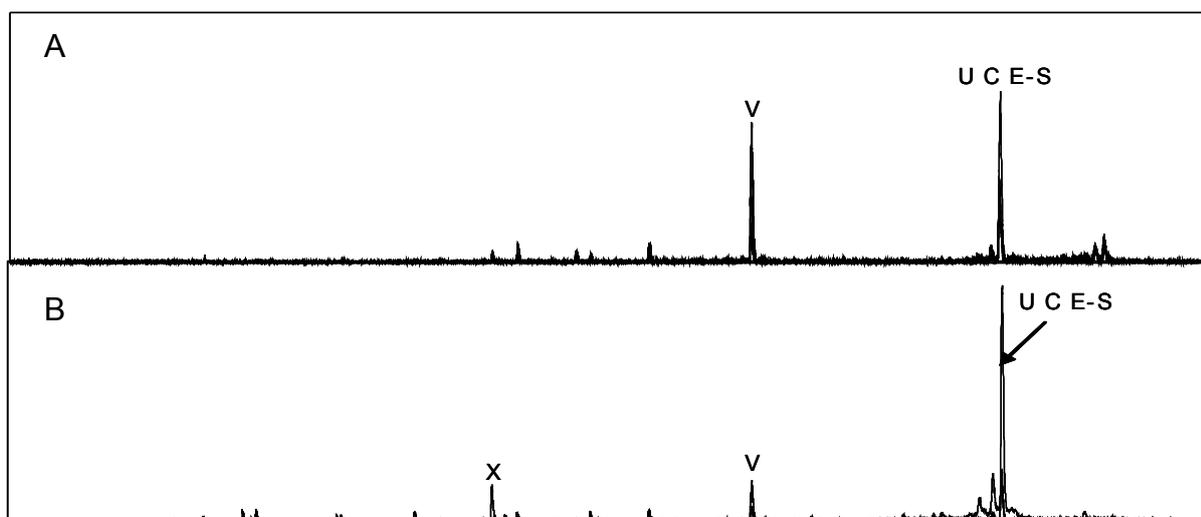


Abb. 28: MES-Analyse der Reaktionsprodukte der Inkubation der gereinigten Fraktion 5 und der kommerziellen Komplement Faktor I-Präparation mit UCE-S in Gegenwart des Serinproteaseinhibitors Pefabloc SC. MALDI-Spektren der Reaktionslösungen der Inkubation der immobilisierten gereinigten Fraktion 5 (A) und der Komplement Faktor I-Präparation (B) mit UCE-S und dem Inhibitor Pefabloc SC nach 24h Inkubation. UCE-S: 2645.3Da. V=Verunreinigung: 2230.9Da. X=Peptid Lys-Lys-Arg-Ull 1801.8Da.

Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse der Inhibitionsversuche der gereinigten Fraktion 5 und der Komplement Faktor I-Präparation mit dem Serinproteaseinhibitor Pefabloc SC. Die MALDI-Spektren zeigen keine Ull-Signale. Das Spektrum der immobilisierten Komplement Faktor I-Präparation zeigt ein Signal bezeichnet mit X, welches dem Peptid KKR-Ull (Tab. 8) entspricht. Wie bei dem vorigen Inhibitionsversuch (Abb.27) kann auch hier vermutet werden, dass in der kommerziellen Präparation eine weitere Protease vorhanden ist und sich nicht mit den Serinproteaseinhibitoren Aprotinin (Abb.27) und Pefabloc SC hemmen lässt. Die Charakterisierungsversuche haben gezeigt, dass sich die UCE-Aktivität mit den Serinproteaseinhibitoren Aprotinin und Pefabloc SC vollständig hemmen lässt.