

Suche, Reinigung und Identifizierung von Urotensin-II generierenden Enzymen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Joachim Thiemann
aus Heidenheim an der Brenz

September 2005

Freie Universität Berlin

Gutachter zur Dissertation von Joachim Thiemann

1. Gutachter:

Hartmut Schlüter
(Name)

Nephrologie CBF
Abteilung: Proteinanalytik
Postadresse:
Institut für Physiologie CCM
(Institut)

Tucholskystr. 2
(Straße)

10117 Berlin
(PLZ, Ort)

Hartmut.Schlueter@charite.de
(E-Mail)

030 / 450 514 891
(Telefon)

2. Gutachter:

Petra Knaus
(Name)

Institut für Biochemie
(Institut)

Thielallee 63
(Straße)

14195 Berlin
(PLZ, Ort)

knaus@chemie.fu-berlin.de
(E-Mail)

8385 2935
(Telefon)

Disputation am 16.01.2006

Danksagung

Ich danke:

Prof. Dr. Hartmut Schlüter für die interessante Themenstellung der Arbeit, die es mir ermöglichte, mich im Bereich der Massenspektrometrie, der Proteinreinigung und der Automatisierung weiterzubilden, und der mich an das selbständige wissenschaftliche Arbeiten herangeführt hat. Prof. Schlüter hat mich in meinem akademischen Werdegang stets unterstützt!

Sandra Kurzawski danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Ich danke der WITA GmbH für die Analysen der Proben.

0 Titel und Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung S.8

2 Material und Methode S.14

2.1 Material

2.1.1 Instrumente

2.1.2 Chemikalien

2.1.3 Chromatographiematerial und Chromatographiesäulen

2.2 Methode

2.2.1 Reinigungs-Strategie

2.2.2 Entwicklung eines Massenspektrometrie-basierten Enzym-Screening-Systems (MES) zur Detektion von UIIPs (MES-UIIP-Assay)

2.2.2.1 Herstellung eines spezifischen Substrates für UIIP (UII-S).

2.2.2.2 Immobilisierung von Proteinfractionen

2.2.2.3 Inkubation der immobilisierten Proteinfractionen mit UII-S

2.2.2.4 Semiquantitativer Nachweis der Reaktionsprodukte mittels MALDI Massenspektrometrie

2.2.3 Durchführung von Batch-Chromatographien

2.2.4 Suche nach geeigneten chromatografischen Parametern zur Proteinreinigung (PPS)

2.2.5 Gewinnung eines homogenen Pools aus Nierengewebe des Schweins

2.2.6 Nachweis von UIIP mit Hilfe des MES-UIIP Assays

2.2.7 Charakterisierung von UIIP1

2.2.7.1 Durchführung einer Ultrazentrifugation mit 10, 30, 50, 100 kDa Filter

2.2.7.2 Durchführung einer nativen gelfreien isoelektrischen Fokussierung

2.2.8 Reinigungswege

2.2.9 Reinigungsweg-1

- 2.2.9.1 Suche nach Parametern zur chromatographischen Konzentrierung von UIIPs mit einem Kationenaustauscher
- 2.2.9.2 Suche nach Parametern zur chromatographischen Konzentrierung von UIIPs mit einem Anionenaustauscher
- 2.2.9.3 Konzentrierung von UIIP1 mit einer Batch-Kationenaustausch-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 1)
- 2.2.9.4 Suche nach Parametern zur chromatographischen Reinigung von UIIP1 aus einer Batch-Kationenaustausch-Chromatographie-Fraktion
- 2.2.9.5 Reinigung von UIIP1 mit einer Cobalt-Affinitäts-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 2)
- 2.2.9.6 Suche nach Parametern zur chromatographischen Reinigung von UIIP1 aus einer Cobalt-Affinitäts-Chromatographie-Fraktion
- 2.2.9.7 Reinigung von UIIP1 mit einer Anionenaustausch-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 3)
- 2.2.9.8 2-dimensionale Gelelektrophorese der UII-generierenden Fraktion aus der Anionenaustausch-Chromatographie
- 2.2.9.9 Identifizierung von UIIP1 mittels MALDI Fingerprint
- 2.2.9.10 Versuche zur Substratspezifität von Pepsin
- 2.2.9.11 Versuche zur Reinigung von Pepsin

2.2.10 Reinigungsweg-2

- 2.2.10.1 Konzentrierung und Reinigung von UIIP2 mit einer Sample-Displacement-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 1)
- 2.2.10.2 Suche nach Parametern zur chromatographischen Reinigung von UIIP2 aus einer Sample-Displacement-Chromatographie-Fraktion
- 2.2.10.3 Reinigung von UIIP2 mit einer Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 2)
- 2.2.10.4 Suche nach Parametern zur chromatographischen Reinigung von UIIP2 aus einer Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie-Fraktion
- 2.2.10.5 Reinigung von UIIP2 mit einer Anionenaustausch-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 3)
- 2.2.10.6 Reinigung von UIIP2 mit einer Größenausschluss-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 4)
- 2.2.10.7 Versuche zur Klassifizierung der Protease UIIP2

- 2.2.10.8 SDS-Page der Ull-generierenden Fraktion aus der Größenausschluss-Chromatographie
- 2.2.10.9 Identifizierung von UIIP2 mittels LC-ESI MS/MS

3 Ergebnisse

S.38

3.1 Nachweis der Ull-generierenden Aktivität mit Hilfe des MES-UIIP-Assays

3.2 Charakterisierung des Ull-generierenden Proteins (UIIP1)

- 3.2.1 Bestimmung des Molekulargewichts von UIIP1
- 3.2.2 Bestimmung des isoelektrischen Punkts von UIIP1

3.3 Reinigungsweg-1

- 3.3.1 Suche nach Parametern zur chromatographischen Konzentrierung von UIIPs mit einem Kationenaustauscher
- 3.3.2 Suche nach Parametern zur chromatographischen Konzentrierung von UIIPs mit einem Anionenaustauscher
- 3.3.3 Suche nach Parametern zur chromatographischen Reinigung einer Kationenaustauscher-Fraktion mit Ull-generierender Aktivität
- 3.3.4 Reinigung von UIIP1 mit einer Cobalt-Affinitäts-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 2)
- 3.3.5 Suche nach Parametern zur chromatographischen Reinigung von UIIP1 aus einer Cobalt-Affinitäts-Chromatographie-Fraktion.
- 3.3.6 Reinigung von UIIP1 mit einer Anionenaustausch-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 3)
- 3.3.7 2-dimensionale Gelelektrophorese einer Ull-generierenden Fraktion aus der Anionenaustausch-Chromatographie
- 3.3.8 Identifizierung der Proteine aus Spot 5-17 mittels MALDI Fingerprint
- 3.3.9 Substratspezifität von Pepsin A
- 3.3.10 Reinigung von Pepsin A

3.4 Reinigungsweg-2

- 3.4.1 Konzentrierung und Reinigung von UIIP2 mit der Sample-Displacement-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 1)
- 3.4.2 Suche nach Parametern zur chromatographischen Reinigung von UIIP2 aus einer Sample-Displacement-Chromatographie-Fraktion
- 3.4.3 Reinigung von UIIP2 mit einer Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 2)
- 3.4.4 Suche nach Parametern zur chromatographischen Reinigung von UIIP2 aus einer Hydrophoben-Interaktions-Chromatographie-Fraktion
- 3.4.5 Reinigung von UIIP2 mit einer Anionenaustausch-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 3)
- 3.4.6 Reinigung von UIIP2 mit einer Größenausschluss-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 4)
- 3.4.7 Klassifizierung der Protease UIIP2
- 3.4.8 SDS-Page der UII-generierenden Fraktion aus der Größenausschluss-Chromatographie
- 3.4.9 Identifizierung von UIIP2 mittels LC-ESI MS/MS

4	Diskussion	S.63
5	Zusammenfassung	S.81
6	Summary	S.82
7	Literaturverzeichnis	S.83
8	Erfolgte Publikationen	S.88
	8.1 Artikel	
	8.2 Poster	
9	Anhang	S.89
	9.1 Bezeichnung von Peptiden, deren Masse und Aminosäuresequenzen	
	9.2 Abkürzungen	