

2 Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Instrumente

Die HPLC Anlagen Purifier und Explorer stammen von der Firma GE Healthcare. Für den MES Assay wurde das Reflex III MALDI-TOF der Firma Bruker Daltonics benutzt. Die Inkubation von Reaktionsgemischen fand in Microtestplatten 96Well K der Firma Sarstedt statt. Für die Abnahme von Aliquots aus Reaktionsgemischen und das Auftragen der Aliquots auf den MTP AnchorChip 384/400 von Bruker Daltonics wurde der Multidrop Ilex der Firma Perkin Elmer eingesetzt. Alle Pipettierschritte der PPS-Experimente wurden mit dem Pipettierroboter Multiprobe Ilex durchgeführt. Die dazu benötigten Puffer und Chromatographiegele wurden in 1,2 ml Storage DeepWell Platten oder 2,2 ml Storage DeepWell Platten der Firma ABGene dem Robotersystem bereitgestellt.

Die Identifizierung von UIIP1 mittels MALDI Fingerprint erfolgte mit dem Reflex III MALDI-TOF von Bruker Daltonics. Als Target wurde der AnchorChip 384/400 von Bruker Daltonics verwendet. Für die Identifizierung von UIIP2 über die LC-ESI MS/MS wurde das ESI (Ion Trap) Gerät EsquireHCT der Firma Bruker Daltonics verwendet. Das nano HPLC System stammte von der Firma Ultimate.

Die Zentrifugation von Extrakten wurde mit der Sorvall Zentrifuge RC50 durchgeführt. Wenn nichts anderes vermerkt, wurde für alle übrigen Zentrifugationen die 3K1 Zentrifuge der Firma Sigma eingesetzt. Die isoelektrische Fokussierung wurde mit dem Rotofor System von Bio-Rad durchgeführt. Die pH-Werte wurden mit der InLab[®]422 Combination Semi-micro pH Electrode von METTLER TOLEDO gemessen. Proteinkonzentrationen wurden in Microtestplatten 96Well F von Sarstedt mit Hilfe des Photometers iEMS Reader MF von Thermo Labsystems bestimmt. Für Homogenisierungen wurde das Dispergierwerkzeug S 25 N-18G der Firma IKA-Werke bei 12000 U/min benutzt. Die 96-ZipPlate stammte von Millipore.

2.1.2 Chemikalien

Acetonitril (ACN), Ameisensäure, Eisen(III)-chlorid Hexahydrat, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumchlorid (NaCl), Natronlauge (NaOH), N-Methylpiperazin, Salzsäure (HCl) und Tris wurden von Merck (Darmstadt) bezogen.

Cobalt-(II)-chlorid, Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3), N-methyl-diethanolamin, und Nickel-(II)-sulfat Hexahydrat wurden von AppliChem (Darmstadt) gekauft. CNBr-aktivierte Sepharose Beads (6MB) stammten von GE Healthcare (Freiburg). Glycin, MES, Natriumacetat und Zitronensäure wurde von Serva (Heidelberg) bezogen. Die Bradford-Lösung Commassie Plus Protein Assay Reagent wurde von PIERCE (Bonn) angeschafft. Die Polyampholytlösung Bio-Lyte 3/10 Ampholyte, 40% wurde von Bio-Rad (München) bezogen. 1,3 Diaminopropan, Bis-Tris, Malonsäure Dinatriumsalz Monohydrat, Triethanolamin und Trifluoressigsäure (TFA) stammten von Fluka (Taufkirchen). 2,5-Dihydroxy-benzoessäure (DHB), Ammoniumacetat, Bis-Tris-Propan, Butandionsäure, CAPSO, CHES, Diethanolamin, Ethanolamin, HEPES, Kupfersulfat, Pepsin A und Zink-(II)-chlorid wurden von Sigma (Taufkirchen) bezogen. Sämtliche Chemikalien, die für die Identifizierungen der UIIPs und den Gelelektrophoresen benötigt wurden, wurden von der Firma WITA GmbH gestellt.

2.1.3 Chromatographiematerial und Chromatographiesäulen

Die Chromatographiegele Fractogel EMD SO_3^- (M), Fractogel EMD TMAE (M), Fractogel EMD Propyl 650 S, Fractogel EMD Chelat (M) wurden von Merck (Darmstadt) bezogen. Die Chromatographiegele Toyopearl DEAE 650M, Toyopearl Super Q 650M, Toyopearl Ether 650M, Toyopearl Hexyl 650C, Toyopearl Butyl 650M, Toyopearl Phenyl 650M und die Säule TSK Gel DEAE- 5PW Glas (8,0 mm ID x 7,5 cm L) waren von der Firma Tosoh (Stuttgart). Die Chromatographiegele Phenyl Sepharose 6FF, Octyl Sepharose 4FF, Butyl Sepharose 4FF, die Säulengehäuse HR 16/10 mit 2 Adaptoren und XK 26/40 sowie die Gelfiltrationssäule Superdex 200 HR 10/30 und die Reversed Phase Säule 5RPC 4.1x150 wurden von der Firma GE Healthcare (Freiburg) gekauft. Hydroxyapatit Bio-Gel HT Gel, t-Butyl MacroPrep Gel, Methyl MacroPrep Gel und Unosphere Q Gel wurden von der Firma BioRad (München) bezogen. Für die LC-ESI MS/MS Analyse wurde die PepMap C18 5 μl 100A als Trapping Säule und die PepMap C18 3 μm (75 μm x115 cm) 100A als Trennsäule der Firma PerSeptive Biosystems benutzt.

2.2 Methode

2.2.1 Reinigungs-Strategie

Abbildung 2 zeigt schematisch die Reihenfolge der Methoden, die angewendet wurden, um möglichst homogene Fraktionen mit Urotensin-II-generierenden

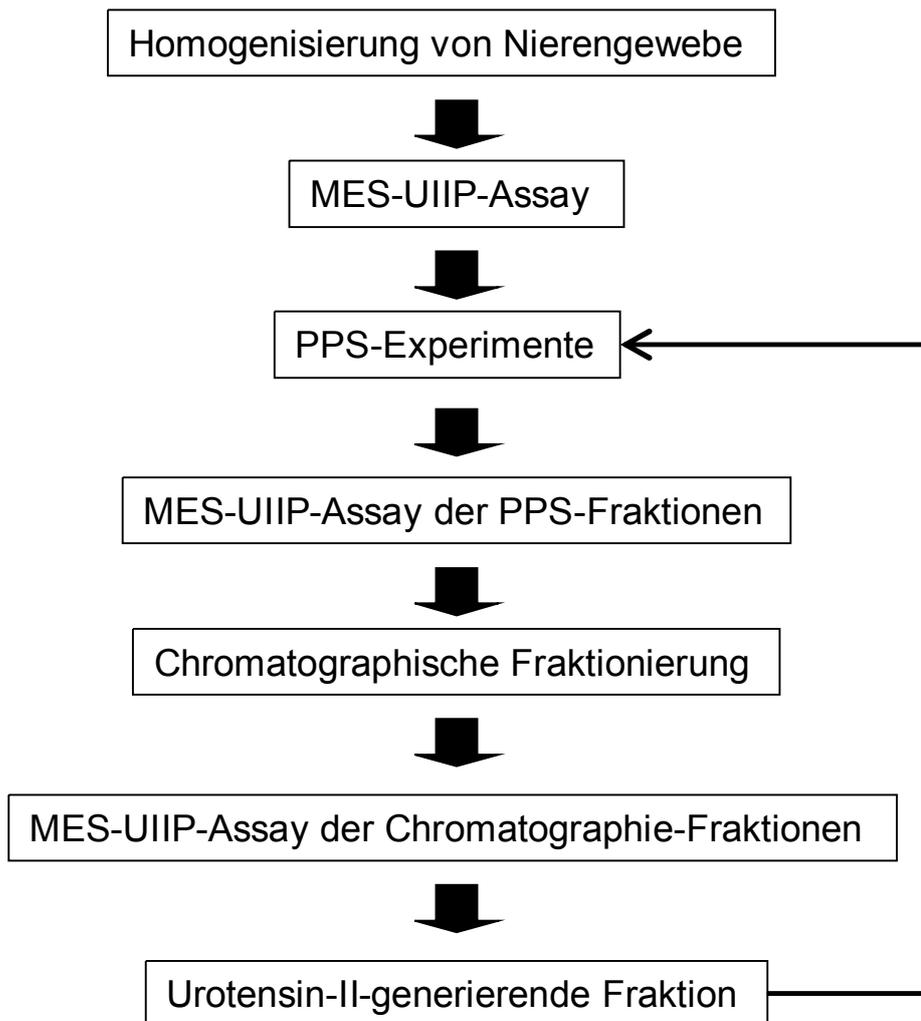


Abb. 2: Schema zur Reinigung von UIIPs zur nahen Homogenität.

Proteinen (UIIP) zu erhalten. Das MES (Massenspektrometrie-basierten Enzym-Screening-System) wurde dabei als System zum Nachweis von UIIP genutzt. Das PPS (Protein-Purification-Parameter-Scouting-System) ist ein System, mit dem in kurzer Zeit viele chromatographische Parameter auf ihre Eignung zur optimierten Reinigung eines Zielproteins getestet werden können. Das System lässt eine Übertragung der gewonnenen Daten auf eine Säulenchromatographie zu (Thiemann et al. 2004).

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 Substrats für UIIP (UII-S).

Zwei Präpro-Varianten des UIIs des Schweins wurden in der SwissProt Datenbank gefunden. Als Substrat für UIIPs wurde das Peptid mit der Aminosäuresequenz RIKKPYKKRGPPSECFWKYCV gewählt, dass von der WITA GmbH Berlin synthetisiert wurde. Das Peptid wurde in einer Konzentration von 0,1 mg/ml für 48h in 100 mM Ammoniumacetat; pH 7 inkubiert. Die Lösung wurde anschließend auf 0,1% TFA eingestellt und auf eine Reversed Phase Säule 5RPC 4.1x150 aufgetragen. Als mobile Phase wurde eine 0,1%ige TFA Lösung (LM A) und 80% ACN (LM B) verwendet. Die Reversed-Phase-Chromatographie (RPC) wurde bei einem Fluss von 1 ml/min und mit einem linearen Gradienten von 0% B zu 50% B in 40 Minuten durchgeführt. Die Fraktionsgröße wurde anhand des Chromatogramms von Hand variabel eingestellt. Die peptidhaltigen Fraktionen der RPC wurden bei -80°C eingefroren und anschließend in der Vakuumzentrifuge Savant SPD111V getrocknet. Die getrockneten Peptide wurden in 100 µl destilliertem Wasser gelöst und je 1 µl dieser Lösungen auf einen MTP AnchorChip aufgetragen. Zu 1 µl Probe wurde 1 µl einer Lösung aus 5 mg/ml DHB in 50% ACN und 0,1% TFA gegeben und vermischt. Nachdem die Proben eingetrocknet waren, wurden Massenspektren gemessen und diejenigen Fraktionen für weitere Versuche verwendet, deren Massenspektren ein Signal bei 2610,4 Da mit normaler Isotopenverteilung zeigten.

2.2.2.2 Immobilisierung von Proteinfractionen

Die Immobilisierung von Proteinfractionen erfolgte auf Grundlage des von GE Healthcare gelieferten Protokolls zur Immobilisierung an BrCN aktivierte Sepharose Beads 6 MB. Abweichend zu diesem Protokoll sind die zu immobilisierenden Proteinfractionen mit dem gleichen Volumen an Kopplungspuffer vermischt und zu den Beads gegeben worden. Nach der Blockierung wurden die Beads mit dem immobilisierten Proteinfractionen 3-4mal mit Wasser gewaschen.

2.2.2.3 Inkubation der immobilisierten Proteinfractionen mit Ull-S

Die Beads mit den immobilisierten Proteinfractionen wurden mit 30 µl destilliertem Wasser überschichtet. Zum Reaktionsansatz sind 2 µl einer 1/20 Verdünnung der Substratlösung (siehe 2.2.2.1) gegeben worden. Die Reaktionsmischungen wurden inkubiert. Auf ein MTP AnchorChip wurden 2 µl einer Matrix-Lösung (5 mg/ml DHB in 50% ACN; 0,1% TFA) pipettiert. Nachdem die Matrix-Lösung eingetrocknet war, wurden nach 1, 2, 3 und 4 Stunden (wenn nichts anderes angemerkt) je 3mal 2 µl Aliquots der Reaktionsmischungen auf die Matrix pipettiert. Nachdem die Proben eingetrocknet waren, wurden Massenspektren der präparierten Proben aufgenommen.

2.2.2.4 Semiquantitativer Nachweis der Reaktionsprodukte mittels MALDI-Massenspektrometrie

Zum semiquantitativen Nachweis der Reaktionsprodukte ist für jedes Massenspektrum das Verhältnis der Signalintensität des Signals bei 1412,6 Da zu dem Signal bei 2610,4 Da gebildet worden. Da zu jedem Zeitpunkt 3 Proben präpariert worden sind, wurde der Durchschnitt der Intensitätsverhältnisse dieser 3 Proben berechnet. Weiterhin sind die Werte, die sich aus der obigen Rechenoperation ergaben, für alle 4 Zeitpunkte addiert worden. Dieser Wert wurde mit der Anzahl aller Spektren eines Reaktionsansatzes multipliziert, die ein Signal bei 1412,6 Da aufwiesen. Der sich daraus ergebende Wert wurde als Ull-generierende Aktivität angegeben. Alle Schritte wurden mit Hilfe eines Visual Basic Skripts automatisch ausgeführt.

2.2.3 Durchführung von Batch-Chromatographien

Bei der Batch-Chromatographie wurde das Chromatographiegel durch Vermischen mit einem Equilibrierungs- und Waschpuffer equilibriert oder gewaschen. Dazu wurde mit dem Puffer und dem Gel eine homogene Suspension im Verhältnis 1:1 (wenn keine konkreten Volumina angegeben sind) erzeugt. Nachdem das Gel sedimentiert war, wurde der Überstand verworfen. Das Herstellen einer homogenen Suspension und das Verwerfen des Überstandes wurde 3 bis 4mal wiederholt. Beim Auftragen einer Probe wurde eine Suspension von Gel, Probe und einem Probenauftragspuffer hergestellt. Nachdem das Gel sedimentiert war, wurde der

Überstand verworfen. Anschließend wurde das Gel gewaschen (siehe oben). Die Elution der Probe erfolgte durch Vermischen des Gels mit einem Elutionspuffer. Nach der Sedimentation des Gels wurde der Überstand in ein Gefäß überführt. Die Vermischung von Elutionspuffer mit dem Gel und das Überführen des Überstandes in ein Gefäß wurde 2-3mal wiederholt, wobei die Überstände der Elution vereinigt wurden.

2.2.4 Suche nach geeigneten chromatografischen Parametern zur Proteinreinigung (PPS)

Die PPS-Experimente wurden mit Hilfe eines Pipettierroboters nach dem Prinzip der Batch-Chromatographie (siehe 2.2.3) durchgeführt. Der Pipettierautomat wurde so programmiert, dass immer nur Kopien von einer 96-Well Platte zu einer Anderen oder zu einem Abfallgefäß erstellt wurden. Für die automatisierte Durchführung von PPS-Experimenten benötigte man eine 96-Well Platte mit Equilibrierungs- und Waschpuffern, eine 96-Well Platte mit Probenauftragspuffern, eine 96-Well Platte mit Elutionspuffern und eine 96-Well Platte mit Chromatographiematerial. Die Zusammensetzung der Puffer und die Art der Chromatographiematerialien sind in den jeweiligen Kapiteln beschrieben. Grundsätzlich sind alle Puffer durch Vermischen von Stammlösungen direkt in den 96-Well Platten hergestellt worden. Die Chromatographiegele wurden vor der Verteilung in die 96-Well Platten konditioniert und gewaschen. Um ein bestimmtes Gel mit konstantem Volumen aliquotieren zu können, wurde vorher ausprobiert, welches Volumen mit einer vollständig in ein Gelsediment getauchten Pipettenspitze aufgesaugt werden muss, um das gewünschte Volumen an Gelsediment transferieren zu können. Mit diesen experimentell ermittelten, und für alle Gele unterschiedlichen Werten, wurden die Gele aliquotiert. Wurde für die PPS Versuche nur ein bestimmtes Gel verwendet, so ist die Aliquotierung mit einem Roboter durchgeführt worden.

Die Equilibrierung erfolgte durch schnelles Abgeben der Equilibrierungs-Waschpuffern zu den Gelsedimenten. Durch 3maliges Ansaugen und Abgeben der Suspension vermischten sich Sedimente mit den Puffern bis zur Homogenität. Nach der Sedimentation der Gele wurden die Überstände entfernt. Die Zugabe an Puffern, 3maliges Vermischen der Puffer mit Gelen und die Entfernung der Überstände wurde 3mal wiederholt. Die Probe wurde zusammen mit individuellen Probenauftragspuffern zu den Gelen gegeben und mit den Gelen vermischt. Für die

Vermischung wurde die gleiche Programmierung wie bei den Equilibrierungsschritten verwendet. Nach der Sedimentation der Gele wurden die Überstände verworfen. Die Gele wurden mit derselben Prozedur gewaschen, die für die Equilibrierung der Gele verwendet wurde. Die Elution der Proben erfolgt durch die Equilibrierungsprozedur, mit dem Unterschied, dass die Überstände in eine neue 96-Well Platte kopiert und vereinigt wurden.

2.2.5 Gewinnung eines homogenen Pools aus Nierengewebe des Schweins

80 Schweinenieren wurden aus einem lokalen Schlachthaus bezogen. Kurz nach der Entnahme wurden die Nieren in Stücke von ca. 1 cm³ geschnitten und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Stücke wurden im Vakuum getrocknet und anschließend pulverisiert.

2.2.6 Nachweis von UIIP mit Hilfe des MES-UIIP Assays

1 g Nierenpulver (siehe 2.2.5) wurde in 15 ml 100 mM Na-Phosphat pH 7 homogenisiert. Das Homogenat wurde für 30 Minuten bei 30000 g zentrifugiert (Sorvall SS-34 Rotor). 100 µl des Überstandes (Extrakt) wurden an 20 µl Sepharose Beads immobilisiert und nach dem Waschen die UII-generierende Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2; Aliquots wurden nach 0,5, 1, 1,5, 2 und 3 Stunden abgenommen).

2.2.7 Charakterisierung von UIIP1

Für jeden Charakterisierungsversuch wurde 1 g Nierenpulver (siehe 2.2.5) in 15 ml 100 mM Na-Phosphat pH 7 homogenisiert und das Homogenat für 30 Minuten bei 30000 g zentrifugiert. Der Überstand (Extrakt) wurde für die Charakterisierungsversuche verwendet.

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

10 ml Extrakt (siehe 2.2.7) wurden mit NaCl auf 500 mM eingestellt. 10 ml Fractogel EMD SO₄⁻ (M) wurde mit Wasser gewaschen und anschließend mit Equilibrierungspuffer (100 mM Na-Phosphat; 500 mM NaCl; pH 7) equilibriert. Es wurde eine Batch-Chromatographie (siehe 2.2.3) mit dem Extrakt durchgeführt. Die Probe wurde 3mal mit 10 ml 2 M NaCl Lösung eluiert. Je 5 ml der Eluate wurden mit

den Ultrazentrifugationsfilter Amicon Ultra mit Ausschlussgrößen von 10 kDa, 30 kDa, 50 kDa und 100 kDa für 1h bei 4000 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Retentate 2mal mit 1 ml Kopplungspuffer (100 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl; pH 8,3) verdünnt und für 45 Minuten zentrifugiert. Die Retentate wurden an 50 µl Sepharose Beads immobilisiert und die Ull-generierende Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2).

2.2.7.2 Durchführung einer nativen gelfreien isoelektrischen Fokussierung

In Anlehnung an Kapitel 2.2.7.1 ist das Eluat der Batch-Chromatographie mit einem 10 kDa Filter zentrifugiert worden. Das Retentat der Filtration wurde mit Wasser auf 50 ml Gesamtvolumen verdünnt und mit 625 µl Polyampholytlösung versetzt. Die Fokussierung wurde nach dem Protokoll für die isoelektrische Fokussierung von BioRad durchgeführt. Nach 4h, bei einer konstanten Leistung von 15 W, war die Fokussierung beendet. 700 µl der Fraktionen aus der isoelektrischen Fokussierung wurden an 200 µl Sepharose Beads immobilisiert und die Ull-generierende Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2).

2.2.8 Reinigungswege

In Abbildung 3 sind schematisch die 2 Reinigungswege dargestellt, die zur Reinigung und Identifizierung von UIIP1 (Weg-1) und UIIP2 (Weg-2) benutzt worden sind.

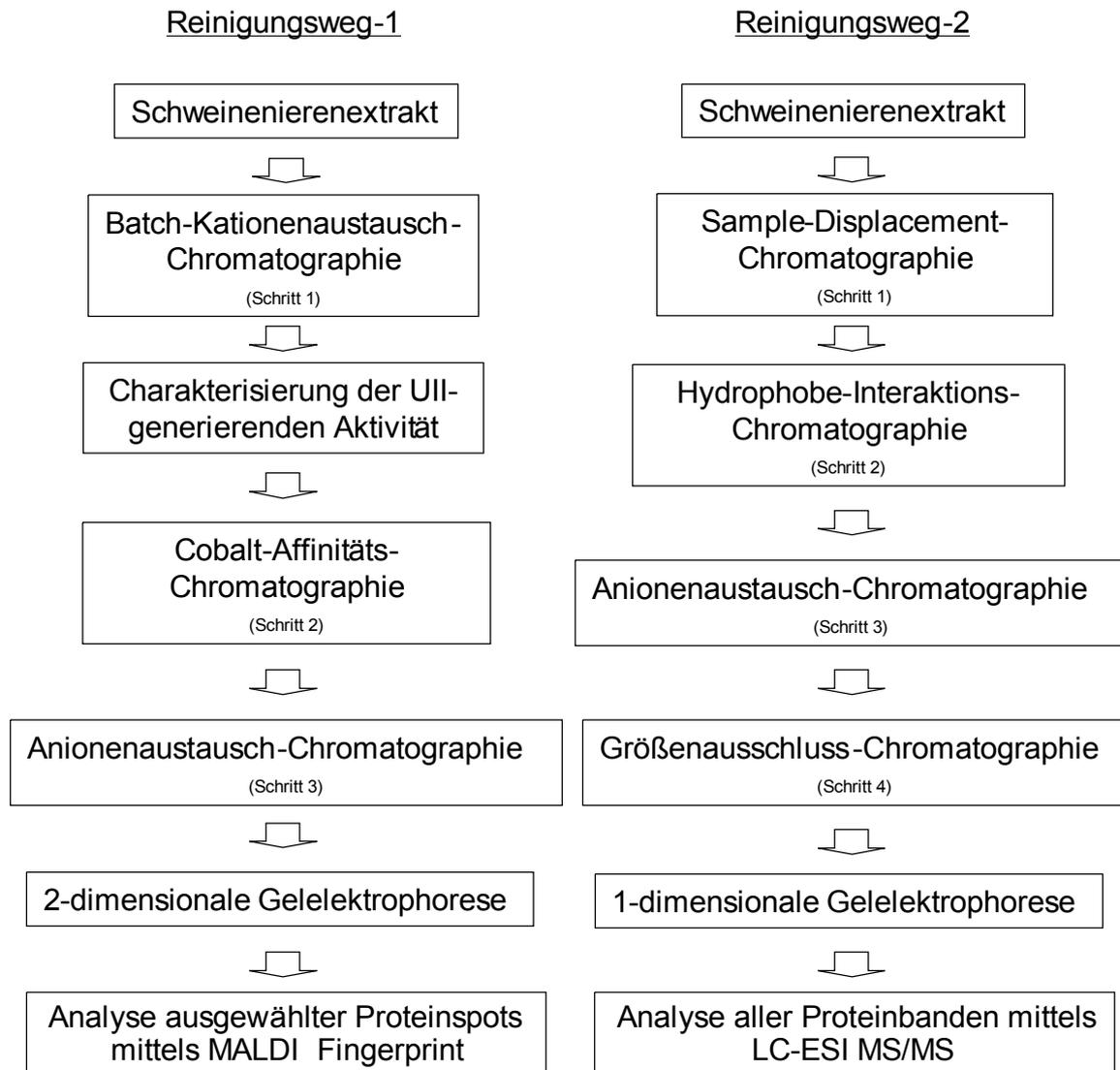


Abb. 3: Schema zur Reinigung und Identifizierung von UIIP1 und UIIP2 durch zwei unterschiedliche Wege.

2.2.9 Reinigungsweg-1

2.2.9.1 Suche nach Parametern zur chromatographischen Konzentrierung von UIIPs mit einem Kationenaustauscher

1 g Nierenpulver (siehe 2.2.5) wurde mit 10 ml 20 mM Na-Phosphat pH 7 homogenisiert und anschließend für 30 Minuten bei 30000 g zentrifugiert (SS-34 Rotor). Der Überstand wurde für die PPS-Experimente (siehe 2.2.4) verwendet. Für diesen Versuch wurde Fractogel EMD SO3- (M) in 32 Kavitäten aliquotiert. Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Equilibrierungs- und Waschpuffer, der Probenauftragspuffer (Variation der Zusammensetzung gegenüber den Equilibrierungs- und Waschpuffer nur durch die Natriumchloridkonzentration angegeben in eckigen Klammern), und deren Anordnung in einer 96-DeepWell Platte. Als Elutionslösung wurde 2 M NaCl eingesetzt.

Natriumchloridkonzentration (mM)	0 [0]	100 [113]	200 [226]	500 [565]
40 mM Zitronensäure; pH 3	A1	A2	A3	A4
40 mM Ammeisensäure; pH 4	B1	B2	B3	B4
40 mM Malonsäure; pH 5	C1	C2	C3	C4
40 mM Malonsäure; pH 6	D1	D2	D3	D4
40 mM Butandionsäure; pH 6,5	E1	E2	E3	E4
40 mM Na-Phosphat; pH 7	F1	F2	F3	F4
40 mM Na-Phosphat; pH 7,5	G1	G2	G3	G4
40 mM HEPES; pH 8	H1	H2	H3	H4

Fett: Bezeichnung der Kavität

Das Gel wurde 3mal mit 445 µl Equilibrierungs- und Waschpuffer equilibriert und gewaschen. Zu 300 µl Gelsediment wurden 1,5 ml Probenauftragspuffer und 200 µl Probe gegeben. Die Proben wurden 3mal mit 300 µl Elutionslösung eluiert. 800 µl der Eluate wurden an 70 µl Sepharose Beads immobilisiert und die UII-generierende Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2; hier wurden nach 0,5, 1, 2 und 4 Stunden Aliquots abgenommen). 10 µl der Eluate wurden mit 290 µl Coomassie Färbelösung vermischt und die Extinktion bei 595 nm gemessen und die BSA- Äquivalente der Eluate anhand einer Eichgeraden bestimmt und als Proteinkonzentrationen dargestellt.

2.2.9.2 Suche nach Parametern zur chromatographischen Konzentrierung von UIIPs mit einem Anionenaustauscher

1 g Nierenpulver (siehe 2.2.5) wurde mit 10 ml 20 mM Bis-Tris pH 7 homogenisiert und anschließend für 30 Minuten bei 30000 g zentrifugiert (SS-34 Rotor). Der Überstand wurde für PPS-Experimente (siehe 2.2.4) verwendet. Für diesen Versuch wurde Fractogel EMD TMAE (M) in 32 Kavitäten aliquotiert. Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Equilibrierungs- und Waschpuffer, der Probenauftragspuffer (Variation der Zusammensetzung gegenüber den Equilibrierungs- und Waschpuffer nur durch die Natriumchloridkonzentration angegeben in eckigen Klammern), und deren Anordnung in einer 96-DeepWell Platte. Als Elutionslösung wurde 2 M NaCl eingesetzt.

Natriumchloridkonzentration (mM)	0 [0]	100 [113]	200 [226]	500 [565]
40 mM N-Methylpiperazin; pH 5	A1	A2	A3	A4
40 mM bis-Tris; pH 6	B1	B2	B3	B4
40 mM bis-Tris-Propan; pH 7	C1	C2	C3	C4
40 mM Triethanolamin; pH 7,5	D1	D2	D3	D4
40 mM Tris; pH 8	E1	E2	E3	E4
40 mM CHES; pH 8,5	F1	F2	F3	F4
40 mM CHAPS; pH 9	G1	G2	G3	G4
40 mM 1,3 Diaminopropan; pH 10	H1	H2	H3	H4

Fett: Bezeichnung der Kavität

Das Experiment wurde mit den Volumina wie unter 2.2.9.1 beschrieben durchgeführt.

2.2.9.3 Konzentrierung von UIIP1 mit einer Batch-Kationenaustausch-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 1)

50 g Nierenpulver (siehe 2.2.5) wurde in 300 ml 40 mM Na-Phosphat pH 7 homogenisiert. Anschließend wurde bei 20000 g 60 Minuten zentrifugiert (GSA Rotor). Der Überstand (Extrakt) wurde mit NaCl auf 500 mM eingestellt. Es wurde eine Batch-Chromatographie (siehe 2.2.3) mit 300 ml Fractogel EMD SO₃⁻ (M) und dem Extrakt durchgeführt. Der Equilibrierungs- und Waschpuffer setzte sich aus 40 mM Na-Phosphat, 500 mM NaCl, pH 7 zusammen. Es wurde 2mal mit 250 ml Elutionspuffer (40 mM Na-Phosphat; 2 M NaCl; pH 7) eluiert.

2.2.9.4 Suche nach Parametern zur chromatographischen Reinigung von UIIP1 aus einer Batch-Kationenaustausch-Chromatographie-Fraktion

In Anlehnung an 2.2.9.3 wurde ein Extrakt hergestellt und eine Batch-Chromatographie (siehe 2.2.3) mit 75 ml Fractogel EMD SO₃⁻ (M) durchgeführt. 450 µl Gel wurde entnommen, die Probe mit 700 µl 2 M NaCl Lösung eluiert und für PPS-Experimente (siehe 2.2.4) verwendet. Die Tabelle zeigt die Anordnung der Gele in einer 96-DeepWell Platte:

Toyopearl Hexyl 650C (A1)	Fractogel EMD Fe-Chelat (A2)
Toyopearl Ether 650 M (B1)	Fractogel EMD Zn-Chelat (B2)
Hydroxyapatit Bio-Gel HT Gel (C1)	Fractogel EMD Cu-Chelat (C2)
Butyl Sepharose 4FF (D1)	Fractogel EMD Co-Chelat (D2)
Octyl Sepharose 4FF (E1)	Fractogel EMD Ni-Chelat (E2)
Fractogel EMD Propyl (M) (F1)	Fractogel EMD Mg-Chelat (F2)
Phenyl Sepharose 6FF (G1)	Fractogel EMD Ca-Chelat (G2)

Fett: Bezeichnung der Kavität

Die nächste Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Equilibrierungs- und Waschpuffer und der Probenauftragspuffer und deren Anordnung in einer 96-DeepWell Platte:

2 M NaCl; 0.1 M NaHCO ₃ ; pH 8,3 (A1)	100 mM Na-Acetat; 1 M NaCl; pH 7,7 (A2)
2 M NaCl; 0.1 M NaHCO ₃ ; pH 8,3 (B1)	20 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7,2 (B2)
40 mM K-Phosphat; pH 7,2 (C1)	20 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7,2 (C2)
2 M NaCl; 0.1 M NaHCO ₃ ; pH 8,3 (D1)	20 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7,2 (D2)
2 M NaCl; 0.1 M NaHCO ₃ ; pH 8,3 (E1)	20 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7,2 (E2)
2 M NaCl; 0.1 M NaHCO ₃ ; pH 8,3 (F1)	20 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7,2 (F2)
2 M NaCl; 0.1 M NaHCO ₃ ; pH 8,3 (G1)	20 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7,2 (G2)

Fett: Bezeichnung der Kavität

Die nächste Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Elutionspuffer und deren Anordnung in einer 96-DeepWell Platte:

0,1M NaHCO ₃ ; pH 8,3 (A1)	100 mM Ameisensäure; 1 M NaCl; pH 4 (A2)
0,1M NaHCO ₃ ; pH 8,3 (B1)	100 mM Ameisensäure; 1 M NaCl; pH 4 (B2)
40mM K-Phosphat; 0,5M NaCl; pH 7,2 (C1)	100 mM Ameisensäure; 1 M NaCl; pH 4 (C2)
0,1M NaHCO ₃ ; pH 8,3 (D1)	100 mM Ameisensäure; 1 M NaCl; pH 4 (D2)
0,1M NaHCO ₃ ; pH 8,3 (E1)	100 mM Ameisensäure; 1 M NaCl; pH 4 (E2)
0,1M NaHCO ₃ ; pH 8,3 (F1)	100 mM Ameisensäure; 1 M NaCl; pH 4 (F2)
0,1M NaHCO ₃ ; pH 8,3 (G1)	100 mM Ameisensäure; 1 M NaCl; pH 4 (G2)

Fett: Bezeichnung der Kavität

Die Gele wurden 3mal mit 333 µl Equilibrierungs- und Waschpuffern equilibriert und gewaschen. Zu 50 µl Gelsediment wurden 0,9 ml Probenauftragspuffer und 60 µl Probe gegeben. Die Proben wurden 3mal mit 50 µl Elutionspuffern eluiert. 100 µl der Eluate wurden an 30 µl Sepharose Beads immobilisiert und die Ull- generierende Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2).

2.2.9.5 Reinigung von UIIP1 mit einer Cobalt-Affinitäts-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 2)

Das Eluat der Batch-Kationenaustausch-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 1) (siehe 2.2.9.3) wurde 1:1 mit dest. Wasser verdünnt und der pH Wert auf 7,2 eingestellt. 20 ml Fractogel EMD Chelat (M) wurde mit Wasser gewaschen, anschließend wurde eine Lösung aus 100 mM CoCl₂ mit dem Gel vermischt. Das Gel wurde erneut mit Wasser gewaschen. Mit Puffer A (20 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7,2) wurde das Gel equilibriert und anschließend mit der Probe vermischt. Diese Suspension ist in ein Säulengehäuse HR 16/10 gefüllt worden. Die präparierte

Säule wurde an die HPLC Anlage Purifier angeschlossen. Für 5 Minuten ist bei einem Fluss von 2 ml/min die Säule mit 100% Puffer A durchspült worden. Anschließend wurde für 15 Minuten mit 15% Puffer B (20 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 3) und weitere 60 Minuten mit 100% Puffer B die Probe eluiert. Während des Elutionsvorgangs wurden Fraktionen von 4 ml gesammelt. Ein 50 µl Aliquot je Fraktion wurde an 50 µl Sepharose Beads immobilisiert. Die Ull-generierende Aktivität wurde bestimmt (siehe: 2.2.2; hier wurden nach 0,5, 1, 2 und 4 Stunden Aliquots abgenommen).

2.2.9.6 Suche nach Parametern zur chromatographischen Reinigung von UIIP1 aus einer Cobalt-Affinitäts-Chromatographie-Fraktion

Die Fraktionen aus der Cobalt-Affinitäts-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 2) (siehe 2.2.9.5), die zwischen der 16. und der 22. Minute eluierten, wurden zusammengefasst und Aliquots für PPS-Experimente (siehe 2.2.4) verwendet. Die Tabelle zeigt die verwendeten Gele, die Probenauftrags-, Equilibrierungs- und Waschpuffer, und die Elutionslösungen für 4 verschiedene Bedingungen. Dieser Versuch wurde per Hand durchgeführt.

Gele	Proben-, Equilibrierungs- und Waschpuffer	Elutionslösung
Super Q 650 M	25 mM CHAPS; pH 9	2 M NaCl
DEAE 650 M	25 mM CHAPS; pH 9	2 M NaCl
Super Q 650 M	25 mM Triethanolamin; pH 7,5	2 M NaCl
DEAE 650 M	25 mM Triethanolamin; pH 7,5	2 M NaCl

Die Gele wurden 3mal mit 333 µl Equilibrierungs- und Waschpuffern equilibriert und gewaschen. Zu 100 µl Gelsediment wurden 1 ml Probenauftragspuffer und 20 µl Probe gegeben. Die Proben wurden 3mal mit 100 µl Elutionslösung eluiert. Die Eluate wurden an 50 µl Sepharose Beads immobilisiert und die Ull-generierende Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2).

2.2.9.7 Reinigung von UIIP1 mit einer Anionenaustausch-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 3)

Die zusammengefassten Fraktionen mit den Retentionszeiten der 16. bis 22. Minute aus der Cobalt-Affinitäts-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 2; siehe 2.2.9.5) wurden mit einem Amicon Ultra Filter mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa für 1h bei 4000 g zentrifugiert. Anschließend wurde 2mal das Retentat mit 1 ml Puffer A (25 mM Triethanolamin; pH 7,5) verdünnt und für 45 weitere Minuten zentrifugiert. Das resultierende Retentat wurde auf 1 ml mit Puffer A ergänzt und auf eine DEAE 5PW Anionenaustauschersäule aufgetragen. Die HPLC Anlage Purifier wurde mit einem Fluss von 1 ml/min betrieben. Die Säule ist mit 100% Puffer A für 5 Minuten durchspült worden. Anschließend wurde die Probe mit einem Gradient von 37 Minuten von 0% Puffer B (25 mM Triethanolamin; 1 M NaCl; pH 7,5) zu 50% Puffer B eluiert. Während des Elutionsvorgangs wurden Fraktionen von 2 ml gesammelt. 100 µl Aliquots der Fraktionen wurden an 30 µl Sepharose Beads immobilisiert. Die Ull-generierende Aktivität wurde bestimmt (siehe 2.2.2).

2.2.9.8 2-dimensionale Gelelektrophorese der Ull-generierenden Fraktion aus der Anionenaustausch-Chromatographie¹

Die Ull-generierende Fraktion aus der Anionenaustausch-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 3; siehe 2.2.9.7) mit der Retentionszeit von der 20. bis 21. Minute wurde mit 200 µl 1% Desoxycholsäure versetzt und bei 5°C für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 400 µl 50% Trichlorsäure hinzugegeben. Dann wurde für 5 Minuten bei 18000 g zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 30 µl einer Lösung aus 9 M Harnstoff, 70 mM DTT, 2% Ampholytes 2-4(WITA), 2% CHAPS, 1% Tween 20 aufgenommen und mit 0,6 µl an 5 µM Pepstatin und 50 mM PMSF versetzt. Die Probe wurde für 30 Minuten bei 167800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Die 2D-Gelelektrophorese wurde nach Klose und Kobaltz (Klose und Kobaltz 1995) durchgeführt. Das Gel wurde nach Blum mit Silber gefärbt (Blum et al. 1987).

¹ Wurde von der WITA GmbH durchgeführt

2.2.9.9 Identifizierung von UIIP1 mittels MALDI Fingerprint²

Proteinspots, die in einem Bereich zu finden waren, das einem Molekulargewicht zwischen 30 und 50 kDa und einem pI Bereich von 3,8 bis 6,7 entsprachen, wurden ausgestochen und in Stücke von 1 mm² geschnitten. Die Gelstücke wurden mit 200 µl einer 200 mM Ammoniumbicarbonat, 10 mM DTT Lösung für 30 Minuten inkubiert und die Lösung anschließend abgenommen. Anschließend wurden die Gelstücke mit einer Lösung aus 25 mM Ammoniumbicarbonat, 50% Acetonitril, pH 8,1 für 20 Minuten inkubiert und die Lösung anschließend verworfen. Für 15 Minuten ist die Lösung aus 25 mM Ammoniumbicarbonat, 80% ACN mit den Gelstücken inkubiert und anschließend die Lösung verworfen worden. 25 µg Trypsin wurde in einer Lösung aus 250 µl 1 mM HCl und 500 µl 25 mM Ammoniumbicarbonat gelöst. 5 µl dieser Trypsin Lösung wurde zu den Gelstücken gegeben und für 3h bei 37°C inkubiert. 12 µl einer 0,1% TFA Lösung wurde hinzu pipettiert. Durch eine ZipPlate wurde 2mal 10 µl einer Lösung aus 85% ACN, 0,1% TFA gesaugt. Anschließend wurde 2mal 10 µl einer Lösung aus 70% ACN, 0,1% TFA hindurchgesaugt. Daraufhin wurde 5mal 10 µl einer Lösung aus 0,1% TFA durch die Platte gesaugt. Die Probe wurde in Aliquots auf die ZipPlate auftragen und abgesaugt. Die Probe wurde 5mal mit 10 µl 0,1% TFA Lösung gewaschen. Die Elution der Probe erfolgte durch 10maliges Auftragen 10 µl einer 50% ACN, 0,1% TFA Lösung und durch Absaugen der Lösung. 0,3 µl des Eluates wurden zu 1,5 µl einer bereits auf dem AnchorChip befindlichen HCCA Lösung (20 mg/ml HCCA; 50% ACN; 0,1% TFA) pipettiert. Nachdem die Probe eingetrocknet war, wurde 5 µl eiskaltes Ammoniumcitrat auf die Probe pipettiert und sofort wieder entfernt. Anschließend wurden 0,5 µl einer Lösung aus Ethanol, Aceton und 0,2% TFA zu der Probe gegeben und die Probe getrocknet.

Die Proben wurden mit einem MALDI Massenspektrometer analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlexControl, XMass, flexAnalysis, Biotools und Mascot.

² Wurde von der WITA GmbH durchgeführt

2.2.9.10 Versuche zur Substratspezifität von Pepsin

Eine kleine Spartelspitze an Pepsin wurde an Sepharose Beads immobilisiert. Die Aktivität wurde mit dem MES System detektiert (siehe 2.2.2; hier wurden nach 0,5; 1; 1,5; 2 und 16 Stunden Aliquots abgenommen).

2.2.9.11 Versuche zur Reinigung von Pepsin

200 µl Fractogel Chelat wurde mit 100 mM CoCl₂ gewaschen. Anschließend wurde das Gel mit Puffer A (100 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7,5) gewaschen und mit 1 ml an Puffer A überschichtet. Eine kleine Spartelspitze an Pepsin wurde mit dem Co-Chelat vermischt. Anschließend wurde der Chelat 4mal mit 1 ml Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte durch 5maliges Vermischen des Chelates mit 200 µl Puffer B (100 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 4) und anschließender Abnahme des Überstandes. Der vereinigte Überstand ist immobilisiert worden. Die Aktivität wurde mit dem MES-System detektiert (siehe: 2.2.2; hier wurden nach 2, 4, 6 und 16 Stunden Aliquots abgenommen).

2.2.10 Reinigungsweg-2

2.2.10.1 Konzentrierung und Reinigung von UIIP2 mit einer Sample-Displacement-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 1)

100 g Nierenpulver wurde in 750 ml 40 mM Na-Phosphat pH 7 homogenisiert. Anschließend wurde bei 20000 g 60 Minuten zentrifugiert (GSA Rotor). Der Überstand wurde mit NaCl auf 100 mM eingestellt. 600 ml Fractogel EMD SO3- (M) wurde mit Equilibrierungspuffer (40 mM Na-Phosphat; 100 mM NaCl; pH 7) equilibriert. Das Gel wurde auf 10 Glasflaschen in gleichen Aliquots verteilt. Der Extrakt wurde mit dem Gel in Flasche 1 vermischt und der Überstand nach Sedimentation des Gels zu dem Gel in Flasche 2 gegeben. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis alle 10 Gelaliquots mit dem Überstand der vorherigen Chromatographie vermischt worden waren. In Anlehnung an die Batch-Chromatographie (siehe: 2.2.3) wurden die Gelaliquots 3mal mit 60 ml Equilibrierungspuffer gewaschen. 500 µl an Gelsediment wurde jeder Flasche entnommen und die Probe mit 500 µl Elutionspuffer (40 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7) eluiert. 300 µl des Eluates wurden immobilisiert und die Ull-generierende Aktivität gemessen (siehe: 2.2.2).

2.2.10.2 Suche nach Parametern zur chromatographischen Reinigung von UIIP2 aus einer Sample-Displacement-Chromatographie-Fraktion

Der Versuch aus Kapitel 2.2.10.1 wurde wiederholt. In Anlehnung an die Batch-Chromatographie (siehe: 2.2.3) wurde die Ull-generierende Fraktion 3mal mit Elutionspuffer (50 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7,5) eluiert. Es wurde versucht, die Ull-generierende Fraktion an Fractogel EMD Co-Chelat zu binden, was misslang. 3,2 ml dieser Fraktion wurden für PPS-Experimente (siehe 2.2.4) verwendet. Die nachstehende Tabelle zeigt die für die PPS-Experimente verwendeten Gele und deren Anordnung in einer 96-DeepWell Platte:

Fractogel EMD Co-Chelat (A1)	Toyopearl Butyl 650M (A2)	Toyopearl Butyl 650M (A3)	Toyopearl Butyl 650M (A4)
Fractogel EMD Ni-Chelat (B1)	Toyopearl Ether 650M (B2)	Toyopearl Ether 650M (B3)	Toyopearl Ether 650M (B4)
Fractogel EMD Ca-Chelat (C1)	Toyopearl Phenyl 650M (C2)	Toyopearl Phenyl 650M (C3)	Toyopearl Phenyl 650M (C4)
Fractogel EMD Mg-Chelat (D1)	t-Butyl MacroPrep (D2)	t-Butyl MacroPrep (D3)	t-Butyl MacroPrep (D4)
Fractogel EMD Cu-Chelat (E1)	Methyl MacroPrep (E2)	Methyl MacroPrep (E3)	Methyl MacroPrep (E4)
Fractogel EMD Zn-Chelat (F1)	Butyl Sepharose 4FF (F2)	Butyl Sepharose 4FF (F3)	Butyl Sepharose 4FF (F4)
Fractogel EMD Fe-Chelat (G1)	Phenyl Sepharose 6FF (G2)	Phenyl Sepharose 6FF (G3)	Phenyl Sepharose 6FF (G4)
Hydroxyapatit Bio-Gel HT Gel (H1)	Octyl Sepharose 4FF (H2)	Octyl Sepharose 4FF (H3)	Octyl Sepharose 4FF (H4)

Fett: Bezeichnung der Kavität

Die nächste Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Equilibrierungs- und Waschpuffer, der Probenauftragspuffer, und deren Anordnung in einer 96- DeepWell Platte:

50 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7 (A1)	50 mM Na-Phosphat; 2 M NaCl; pH 4 (A2)	50 mM bis-Tris; 2 M NaCl; pH 6 (A3)	50 mM HEPES; 2 M NaCl; pH 8 (A4)
50 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7 (B1)	50 mM Na-Phosphat; 2 M NaCl; pH 4 (B2)	50 mM bis-Tris; 2 M NaCl; pH 6 (B3)	50 mM HEPES; 2 M NaCl; pH 8 (B4)
50 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7 (C1)	50 mM Na-Phosphat; 2 M NaCl; pH 4 (C2)	50 mM bis-Tris; 2 M NaCl; pH 6 (C3)	50 mM HEPES; 2 M NaCl; pH 8 (C4)
50 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7 (D1)	50 mM Na-Phosphat; 2 M NaCl; pH 4 (D2)	50 mM bis-Tris; 2 M NaCl; pH 6 (D3)	50 mM HEPES; 2 M NaCl; pH 8 (D4)
50 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7 (E1)	50 mM Na-Phosphat; 2 M NaCl; pH 4 (E2)	50 mM bis-Tris; 2 M NaCl; pH 6 (E3)	50 mM HEPES; 2 M NaCl; pH 8 (E4)
50 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7 (F1)	50 mM Na-Phosphat; 2 M NaCl; pH 4 (F2)	50 mM bis-Tris; 2 M NaCl; pH 6 (F3)	50 mM HEPES; 2 M NaCl; pH 8 (F4)
50 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7 (G1)	50 mM Na-Phosphat; 2 M NaCl; pH 4 (G2)	50 mM bis-Tris; 2 M NaCl; pH 6 (G3)	50 mM HEPES; 2 M NaCl; pH 8 (G4)
10 mM Na-Phosphat; pH 7 (H1)	50 mM Na-Phosphat; 2 M NaCl; pH 4 (H2)	50 mM bis-Tris; 2 M NaCl; pH 6 (H3)	50 mM HEPES; 2 M NaCl; pH 8 (H4)

Fett: Bezeichnung der Kavität

Diese Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Elutionspuffer und deren Anordnung in einer 96-DeepWell Platte:

50 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 4 (A1)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (A2)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (A3)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (A4)
50 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 4 (B1)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (B2)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (B3)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (B4)
50 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 4 (C1)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (C2)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (C3)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (C4)
50 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 4 (D1)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (D2)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (D3)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (D4)
50 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 4 (E1)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (E2)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (E3)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (E4)
50 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 4 (F1)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (F2)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (F3)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (F4)
50 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 4 (G1)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (G2)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (G3)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (G4)
500 mM Na-Phosphat; pH 7 (H1)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (H2)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (H3)	25 mM Na-Phosphat; pH 7 (H4)

Fett: Bezeichnung der Kavität

Die Gele wurden 3mal mit 333 μ l Equilibrierungs- und Waschpuffern equilibriert und gewaschen. Zu 100 μ l Gelsediment wurden 0,8 ml Probenauftragspuffer und 100 μ l Probe gegeben. Die Proben wurden 3mal mit 100 μ l Elutionspuffern eluiert. 200 μ l der Eluate wurden an 20 μ l Sepharose Beads immobilisiert und die Ull-generierende Aktivität bestimmt (siehe: 2.2.2; hier wurden nach 16 und 24 Stunden Aliquots abgenommen).

2.2.10.3 Reinigung von UIIP2 mit einer Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 2)

In Anlehnung an die Batch-Chromatographie (siehe: 2.2.3) wurde die SD-Fraktion 3 (Reinigungs-Schritt 1; siehe 2.2.10.1) 3mal mit 60 ml Puffer A (50 mM HEPES; 2 M NaCl; pH 8) eluieren. 180 ml Octyl Sepharose wurde in ein XK 26/40 Säulengehäuse gefüllt. Die Probe wurde mit einem Fluss von 10 ml/min mit der SamplePump des HPLC Explorer Systems auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 200 ml an Puffer A gespült. Die Elution der Probe erfolgte durch einen linearen Gradient von 0% Wasser zu 100% in 80 Minuten bei einer Flussrate von 10 ml/min. Anschließend ist für 20 Minuten mit Wasser gespült worden. Während der Elution sind Fraktionen von 10 ml gesammelt worden. 200 μ l der Fraktion mit deutlicher UV-Absorption bei 280 nm wurden immobilisiert und die Ull-generierende Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2).

2.2.10.4 Suche nach Parametern zur chromatographischen Reinigung von UIIP2 aus einer Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie-Fraktion

Die Fraktionen von der 99. bis 105. Minute aus der Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 2; siehe 2.2.10.3) wurden vereinigt. 2,4 ml der vereinigten Fraktion wurde für PPS-Experimente (siehe 2.2.4) verwendet. Die Tabelle zeigt die für die PPS-Experimente verwendeten Gele und deren Anordnung in einer 96-DeepWell Platte:

Toyopearl Super Q 650M (A1)	Toyopearl DEAE 650M (A2)	Unoshere Q Strong Anion (A3)
Toyopearl Super Q 650M (B1)	Toyopearl DEAE 650M (B2)	Unoshere Q Strong Anion (B3)
Toyopearl Super Q 650M (C1)	Toyopearl DEAE 650M (C2)	Unoshere Q Strong Anion (C3)
Toyopearl Super Q 650M (D1)	Toyopearl DEAE 650M (D2)	Unoshere Q Strong Anion (D3)
Toyopearl Super Q 650M (E1)	Toyopearl DEAE 650M (E2)	Unoshere Q Strong Anion (E3)
Toyopearl Super Q 650M (F1)	Toyopearl DEAE 650M (F2)	Unoshere Q Strong Anion (F3)
Toyopearl Super Q 650M (G1)	Toyopearl DEAE 650M (G2)	Unoshere Q Strong Anion (G3)
Toyopearl Super Q 650M (H1)	Toyopearl DEAE 650M (H2)	Unoshere Q Strong Anion (H3)

Fett: Bezeichnung der Kavität

Die nächste Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Equilibrierungs- und Waschpuffer, der Probenauftragspuffer, und deren Anordnung in einer 96- DeepWell Platte:

25 mM N-Methylpiperazin; pH 5 (A1)	25 mM N-Methylpiperazin; pH 5 (A2)	25 mM N-Methylpiperazin; pH 5 (A3)
25 mM bis-Tris; pH 6 (B1)	25 mM bis-Tris; pH 6 (B2)	25 mM bis-Tris; pH 6 (B3)
25 mM bis-Tris Propan; pH 7 (C1)	25 mM bis-Tris Propan; pH 7 (C2)	25 mM bis-Tris Propan; pH 7 (C3)
25 mM Triethanolamin; pH 7,5 (D1)	25 mM Triethanolamin; pH 7,5 (D2)	25 mM Triethanolamin; pH 7,5 (D3)
25 mM N-Methyl-diethanolamin; pH 8 (E1)	25 mM N-Methyl-diethanolamin; pH 8 (E2)	25 mM N-Methyl-diethanolamin; pH 8 (E3)
25 mM Diethanolamin; pH 8,5 (F1)	25 mM Diethanolamin; pH 8,5 (F2)	25 mM Diethanolamin; pH 8,5 (F3)
25 mM CHES; pH 9 (G1)	25 mM CHES; pH 9 (G2)	25 mM CHES; pH 9 (G3)
25 mM CAPS; pH 10 (H1)	25 mM CAPS; pH 10 (H2)	25 mM CAPS; pH 10 (H3)

Fett: Bezeichnung der Kavität

Die Elution erfolgte mit einer 2 M NaCl Lösung. Die Gele wurden 3mal mit 333 µl Equilibrierungs- und Waschpuffern equilibriert und gewaschen. Zu 100 µl Gelsediment wurden 0,8 ml Probenauftragspuffer und 100 µl Probe gegeben. Die Proben wurden 3mal mit 100 µl Elutionslösung eluiert. 200 µl der Eluate wurden an 20 µl Sepharose Beads immobilisiert und die UII-generierende Aktivität bestimmt (siehe: 2.2.2; hier wurden nach 1, 2 und 16 Stunden Aliquots abgenommen).

2.2.10.5 Reinigung von UIIP2 mit einer Anionenaustausch-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 3)

Die vereinigten Fraktionen mit der Retentionszeit von der 99. bis 105. Minute aus der Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 2; siehe 2.2.10.3) wurden mit Triethanolamin auf 40 mM eingestellt. Anschließend wurde der pH auf 7,5 justiert. 10 ml Toyopearl DEAE 650M wurde in ein Säulengehäuse HR 16/10 gefüllt. Die Säule wurde an die HPLC Anlage Explorer angeschlossen und das Gel mit Puffer B (40 mM Triethanolamin; 1 M NaCl; pH 7,5) konditioniert. Anschließend wurde das Gel mit Puffer A (40 mM Triethanolamin; pH 7,5) equilibriert und die Probe mit Hilfe der SamplePump bei einem Fluss von 4 ml/min auf die Säule aufgetragen. Für 5 Minuten wurde mit Puffer A gespült. Die Elution der Probe erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0% Puffer B in 38 Minuten auf 50% Puffer B und mit einer anschließenden Spülung für 2,5 Minuten mit 100% Puffer B. Während der Elution wurden Fraktionen von 4 ml gesammelt. 200 µl jeder Fraktion wurde an 20 µl Sepharose Beads immobilisiert und die Ull-generierende Aktivität bestimmt (siehe: 2.2.2).

2.2.10.6 Reinigung von UIIP2 mit einer Größenausschluss-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 4)

Die Fraktionen aus der Anionenaustausch-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 3; siehe 2.2.10.5) mit den Retentionszeiten von der 16. bis 19. Minute wurden vereinigt und mit einem Amicon Ultrazentrifugationsfilter mit der Ausschlussgrößen von 10 kDa 1h bei 4000 g zentrifugiert. Das Retentat wurde auf 200 µl mit Puffer A (20 mM Na-Phosphat; 150 mM NaCl; pH 7) aufgefüllt. Die Gelfiltrationssäule Superdex HR 10/30 wurde an die HPLC Anlage Purifier angeschlossen. Die Probe wurde mit einem Fluss von 250 µl/min aufgetragen. Die Chromatographie wurde mit Puffer A durchgeführt. Es wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt. 100 µl dieser Fraktionen wurden an 20 µl Sepharose Beads immobilisiert und die Ull-generierende Aktivität bestimmt (siehe: 2.2.2).

2.2.10.7 Versuche zur Klassifizierung der Protease UIIP2

Die Proben aus der Anionenaustausch-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 3; siehe 2.2.10.5) mit den Retentionszeiten der 16. bis 19. Minute wurden vereinigt und 6 200 µl Aliquots an 20 µl Beads immobilisiert. Zu je einem Reaktionsansatz wurde 1 µM Cathepsin, 1 mM PEFABLOC, 10 µM Pepstatin A, 10 µM Antipain und 250 µg/ml Aprotinin gegeben. Die UII-generierende Aktivität wurde bestimmt (siehe: 2.2.2) wobei nur nach 3 und 6 Stunden Aliquots für die massenspektrometrische Untersuchung abgenommen wurden (siehe 2.2.2).

2.2.10.8 SDS-Page der UII-generierenden Fraktion aus der Größenausschluss-Chromatographie³

Die Fraktion mit der höchsten UII-generierenden Aktivität aus der Größenausschluss-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 4) wurde in einer Vakuumzentrifuge bis auf 150 µl eingeeengt und anschließend mit 450 µl eiskaltem Ethanol versetzt. Anschließend wurde die Probe gevortext und für 1 Stunde bei -80°C inkubiert. Die Probe wurde erneut gevortext und anschließend für 6 Minuten bei 18000 g zentrifugiert. Der resultierende Niederschlag wurde in 35 µl 25 mM Tris, 200 mM Glycine, 0,1% SDS, 40 mM DTT und Bromphenolblau aufgenommen. Die Probe wurde in einem 12%igem Polyacrylamid Gel getrennt.

2.2.10.9 Identifizierung von UIIP2 mittels LC-ESI MS/MS³

Alle Proteinbanden wurden wie in 2.2.9.9 beschrieben tryptisch verdaut und entsalzt. Die getrocknete Probe wurde in 5 µl 0,2% TFA Lösung aufgenommen. 4 µl dieser Lösung wurde direkt auf eine PepMap C18 5 µl Säule aufgetragen. Das nLC System wurde mit einem Fluss von 0,17 nl/min betrieben. Als Lösungsmittel A wurde eine 0,1%ige TFA Lösung verwendet. Als Lösungsmittel B eine 0,1% TFA Lösung in Acetonitril. Für 5 Minuten wurde ein linearer Gradient von 0% B zu 2% B gefahren. Anschließend wurde für 55 Minuten ein linearer Gradient bis 55% B, dann ein linearer Gradient für 15 Minuten bis 90% B und anschließend ein linearer Gradient für 5 Minuten bis 95% B gefahren. Dann wurde die Anlage für 3 Minuten mit 95% Lösungsmittel B betrieben. Als Trennsäule wurde eine PepMap C18 3 µm Säule

³ Wurde von der WITA GmbH durchgeführt

Material und Methode

benutzt. Zur Auswertung der generierten ESI Daten wurde die Software EsquireControl, HyStar, DataAnalysis, Biotools und Mascot verwendet.