

3 Ergebnisse

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

Zum Nachweis UII-generierender Aktivität in Proteinfractionen aus Nierengewebe des Schweins mit Hilfe des MES-UIIP-Assays wurden die Proteine der zu

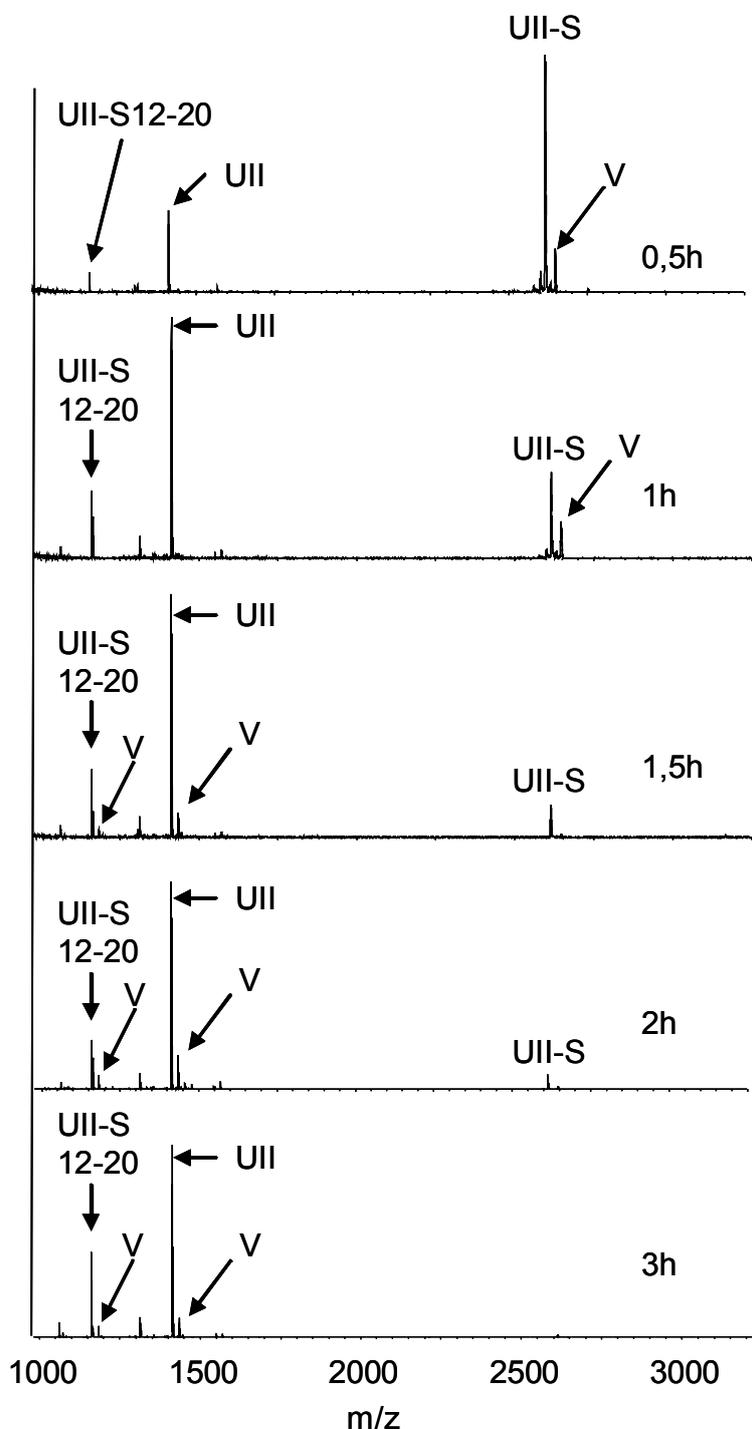


Abb.4: **MES-UIIP-Assay**: MALDI Spektren der Reaktionsprodukte nach Inkubation von UII-S mit immobilisierten Proteinen eines Rohextrakts aus Nierengewebe des Schweins nach verschiedenen Inkubationszeiten. UII: 1412,60 Da, UII-S12-20: 1159,53 Da, UII-S: 2610,39 Da, V: Verunreinigung. Peptidsequenzen: siehe Anhang.

untersuchenden Fraktion an Beads kovalent immobilisiert. Anschließend wurden die immobilisierten Proteine mit einem Peptid-Substrat (UII-S) inkubiert. Nach 0,5; 1; 1,5; 2 und 3 Stunden wurden Aliquots aus der Reaktionsmischung entnommen und Massenspektren dieser Aliquots aufgenommen. Abbildung 4 zeigt die MALDI Spektren der Reaktionsprodukte der Inkubation von UII-S mit immobilisierten Proteinen eines Extrakts aus Nierengewebe. Es ist deutlich die Abnahme des Signals von UII-S und die Zunahme des Signals von UII mit zunehmender Inkubationszeit zu sehen. Das Signal von UII-S12-20 nimmt ebenfalls mit zunehmender Inkubationszeit zu (Peptidsequenzen: siehe Anhang).

Die mit V bezeichneten Signale sind immer auf der m/z Skala gegenüber einem Signal, dem eine Aminosäuresequenz zugeordnet werden konnte, um 32 Da nach rechts verschoben. Es handelt sich hier also nicht um Na⁺ oder K⁺-Addukte des UII-S, sondern um ein Peptid das während der UII-S Synthese entstanden ist und in ähnlicher Weise von den Enzymen umgesetzt wird wie UII-S. Daher sind sie auch neben den Signalen von UII-S-Metaboliten zu finden, die nur durch die Einwirkung von Enzymaktivitäten zu erklären sind.

3.2 Charakterisierung des UII-generierenden Proteins (UIIP1)

Für die Charakterisierung des UIIP1s wurde nach einer Fraktion mit möglichst hoher spezifischer UII-generierender Aktivität gesucht. Die PPS-Experimente mit einem Kationenaustauscher zeigen (Kapitel: 3.3.1; Abbildung 9C), dass ein Eluat mit einer hohen spezifischen UII-generierenden Aktivität durch eine Batch-Kationenaustausch-Chromatographie bei einem pH-Wert von 7 in Anwesenheit von 500 mM NaCl gewonnen werden konnte. Diese Fraktion wird im Folgenden Proteinfraction A genannt.

3.2.1 Bestimmung des Molekulargewichts von UIIP1

Um herauszufinden, in welchem Molekulargewichtsbereich das gesuchte Protein einzuordnen ist, wurden mit der UII-generierenden Proteinfraction A (siehe 3.2) Ultrazentrifugationsversuche mit Filtern unterschiedlicher Ausschlussgrenzen durchgeführt. Die UII-generierenden Aktivitäten der Retentate wurden mit dem MES-UIIP-Assay gemessen. Abbildung 5 zeigt MALDI Spektren von UII-S nach 2h und 4h

Inkubation mit einer immobilisierten Proteinfraction A > 10 kDa. Das obere Spektrum zeigt eine Reihe von Signalen, die von Peptiden stammen, die aus UII-S entstanden sind. Nach einer Inkubationsdauer von 4 Stunden sind fast nur noch die Signale von UII-S10-20 und UII-S13-20 zu sehen. Das Substrat wurde fast vollständig zu Peptiden abgebaut, die kleiner als UII sind.

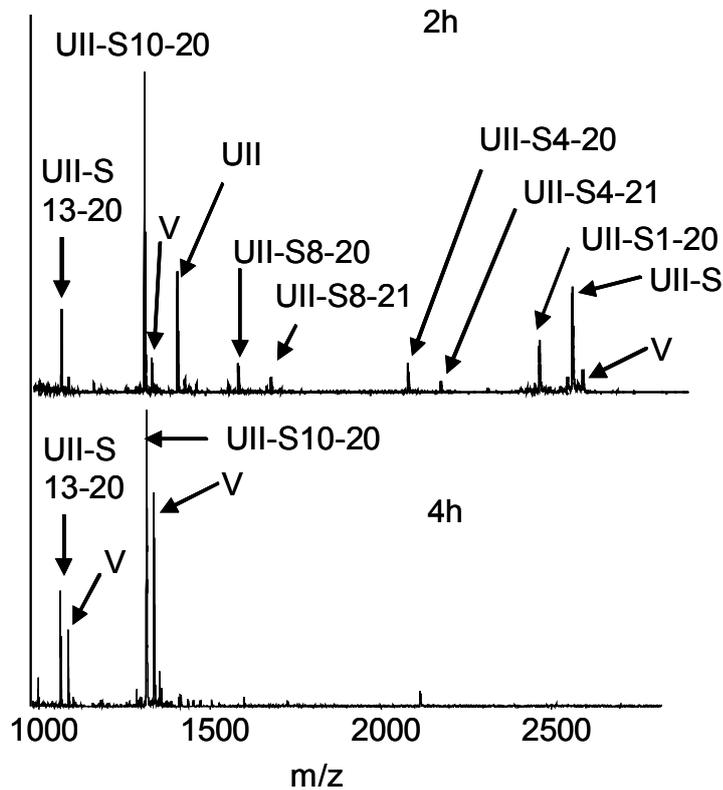


Abb.5: Typische MALDI Spektren von UII-S nach 2h und 4h Inkubation mit den immobilisierten Proteinen der Fraction A > 10 kDa aus Nierengewebe.

Signale nach 2h:

UII-S:	2610,39 Da
UII-S1-20:	2511,32 Da,
UII-S4-21:	2213,11 Da,
UII-S4-20:	2114,04 Da,
UII-S8-21:	1696,80 Da,
UII-S8-20:	1597,73 Da,
UII:	1412,60 Da,
UII-S10-20:	1313,54 Da,
UII-S13-20:	1062,41 Da.

Signale nach 4h:

UII-S10-20:	1313,54 Da,
UII-S13-20:	1062,41 Da.

V: Verunreinigung

Peptidsequenzen: siehe Anhang

Abbildung 6 zeigt die UII-generierenden Aktivitäten der Retentate nach

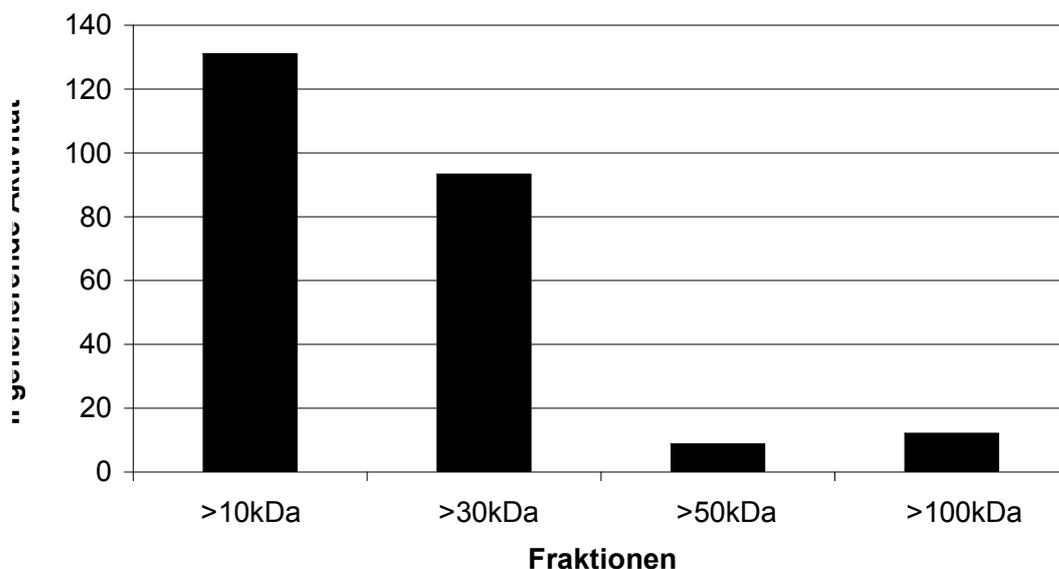


Abb.6: Aktivitätsprofil der UII-generierenden Aktivitäten der Retentate nach Zentrifugation mit Ultrazentrifugationsfiltern verschiedener Ausschlussgrenzen. Probe: UII-generierende Proteinfraction A (siehe: 3.2). X-Achse: Ausschlussgrenze der Ultrazentrifugationsfilter. Y-Achse: UII-generierende Aktivität

Zentrifugation mit Filtern der Ausschlussgrenzen 10, 30, 50, 100 kDa. Die UII-generierenden Aktivitäten sind in den Fraktionen größer 10 kDa und 30 kDa noch sehr gut nachweisbar. In den Fraktionen > 50 kDa und > 100 kDa sind die UII-generierenden Aktivitäten dagegen nur schwach ausgeprägt.

3.2.2 Bestimmung des isoelektrischen Punktes von UIIP1

Um den isoelektrischen Punkt des UIIP1s zu finden, wurde eine native, gelfreie isoelektrische Fokussierung (IF) mit der UII-generierenden Proteinfraktion A > 10 kDa (siehe 3.2) durchgeführt. Abbildung 7 zeigt MALDI Spektren von UII-S nach 2h und 4h Inkubation mit einer immobilisierten IF-Proteinfraktion. Bereits nach 2h ist das UII-S fast vollständig zu UII konvertiert worden. Nach 4h ist fast nur noch das Signal von UII zu detektieren.

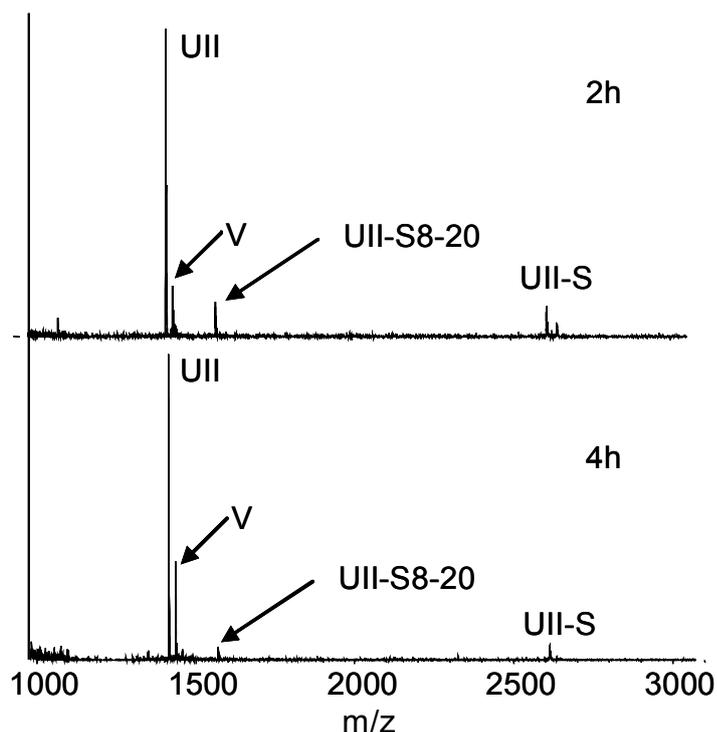


Abb.7: MALDI Spektren von UII-S nach 2h und 4h Inkubation mit einer immobilisierten IF-Proteinfraktion mit einem pH Wert von 5,9.

Signale nach 2h:

UII-S:	2610,39 Da
UII-S8-20:	1597,73 Da,
UII:	1412,60 Da.

Signal nach 4h:

UII-S:	2610,39 Da
UII-S8-20:	1597,73 Da,
UII:	1412,60 Da.

V: Verunreinigung

Peptidsequenzen: siehe Anhang

Abbildung 8 zeigt die UII-generierenden Aktivitäten der Fraktionen der isoelektrischen Fokussierung. Die höchste UII-generierende Aktivität ist in der Fraktion mit pH 5,9 zu finden.

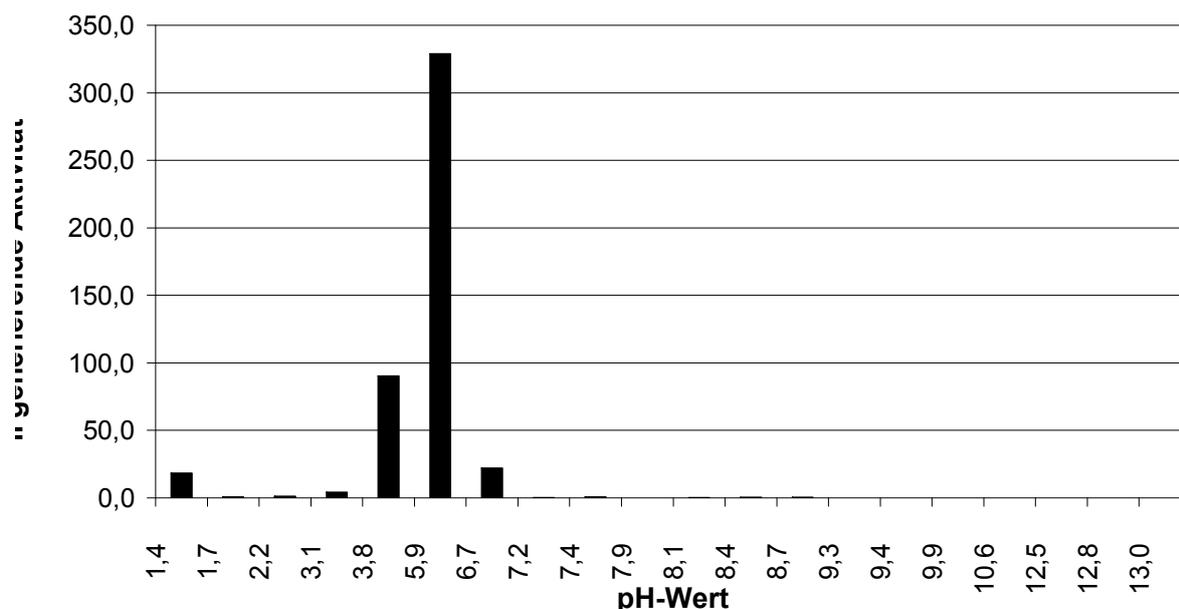


Abb.8: Aktivitätsprofil der Ull-generierenden Aktivitäten der Fraktionen aus der präparativen, gelfreien isoelektrischen Fokussierung. Probe: Ull-generierende Proteinfraction A > 10 kDa (siehe 3.2). X-Achse: pH-Wert der Fraktionen. Y-Achse: Ull-generierende Aktivität

3.3 Reinigungsweg-1

Einen schematischen Überblick über den Reinigungsweg-1 ist in Abbildung 3, Kapitel 2.2.8 zu sehen.

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

Abbildung 9 zeigt Ergebnisse von PPS-Experimenten mit einem Kationenaustauscher und einem Proteinextrakt aus Nierengewebe. In Abbildung 9A sind die Ull-generierenden Aktivitäten der Eluate für jede der 32 Chromatographien dargestellt. Hohe Ull-generierende Aktivitäten sind bei einem pH von 7 in Anwesenheit von 100 und 500 mM NaCl und in Abwesenheit von NaCl zu finden. Bei einem pH von 6,5 ist eine hohe Ull-generierende Aktivität nur in Anwesenheit von 500 mM NaCl zu sehen. Abbildung 9B zeigt die Proteinkonzentrationen der Eluate. Abbildung 9C zeigt die spezifischen Ausbeuten an Ull-generierenden Aktivitäten. Sehr hohe spezifische Ausbeuten sind bei einem pH-Wert von 6,5 und 7 in Anwesenheit von 500 mM NaCl zu sehen (Verweis: Kapitel: 3.2 Charakterisierung der Ull-generierenden Aktivität).

Ergebnisse

A	pH-Wert NaCl [mM]	3	4	5	6	6,5	7	7,5	8
	0	0	1	10	0	0	44	0	0
100	0	0	0	0	0	54	0	0	
200	0	15	0	0	2	0	0	1	
500	0	13	11	0	36	34	0	0	
B	0	0	0,5	1,1	1,3	1,3	1,2	0,8	0,8
	100	0	0,4	0,9	0,8	1	0,8	0,6	0,5
	200	0	0,3	0,7	0,6	0,4	0,4	0,3	0,2
	500	0	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0	0
C	0	0	2	10	0	0	38	0	0
	100	0	0	0	0	0	65	0	0
	200	0	48	0	0	6	0	0	3
	500	0	157	238	0	654	673	0	0

Abb.9: Ergebnismatrix von Kationenaustausch-PPS-Experimenten mit einem Ull-generierenden Extrakt aus Nierengewebe. Probevolumen: 200 µl (ca. 3 mg Protein) pro Kavität. A: Ull-generierende Aktivitäten. B: Proteinkonzentrationen [µg/µl]. C: spezifische Ull-generierende Aktivitäten. Gelmaterial: 300 µl Fractogel EMD SO₃⁻ (M) pro Kavität. X-Achse: Variation des pH-Wertes. Y-Achse: Variation der NaCl-Konzentration.

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

Zur Bestimmung des Verhaltens von UIIPs gegenüber einem Anionenaustauscher sind PPS-Experimente mit Extrakt aus Nierengewebe durchgeführt worden. Abbildung 10A gibt die UII-generierenden Aktivitäten der Eluate an. Sehr hohe Aktivitäten wurden bei pH-Werten von 7,5 und 8 in Abwesenheit von NaCl detektiert. Hohe UII-generierende Aktivitäten wurden in Eluaten detektiert, die durch eine Chromatographie unter folgenden Bedingungen gewonnen wurden: pH 6, 0 mM NaCl und 100 mM NaCl; pH 7, 0 mM NaCl; pH 7,5, 100 mM NaCl und pH 8, 100 mM NaCl. Abbildung 10B gibt die Proteinkonzentrationen der Eluate der PPS-Experimente an. Die Abbildung 10C zeigt die spezifischen Ausbeuten an UII-generierenden Aktivitäten. Eine sehr hohe spezifische Ausbeute an UII-generierender Aktivität ist bei einem pH von 8 in Abwesenheit von NaCl zu erkennen. Hohe UII-generierende Aktivitäten wurden in Eluaten detektiert, die durch eine Chromatographie unter folgenden Bedingungen gewonnen wurden: pH 6, 0 mM NaCl und 100 mM NaCl; pH 7, 0 mM NaCl; pH 7,5, 0 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM NaCl und pH 8, 100 mM NaCl.

Ergebnisse

A	pH-Wert NaCl [mM]	5	6	7	7,5	8	8,5	9	10
	0	0	85	111	192	237	0	19	0
100	0	88	10	117	81	0	2	0	
200	0	0	0	48	6	0	0	0	
500	0	0	0	10	0	0	0	0	
B	0	0,3	1,1	0,9	1,2	1,3	1,3	1,2	0,5
	100	0,2	0,6	0,4	0,7	0,8	0,8	0,9	0,2
	200	0,1	0,3	0,1	0,4	0,5	0,4	0,4	0,2
	500	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1
C	0	0	78	121	157	186	0	15	0
	100	0	148	22	158	98	0	2	0
	200	0	0	0	107	13	0	0	0
	500	0	1	0	75	0	0	0	0

Abb.10: Ergebnismatrix von Anionenaustausch-PPS-Experimenten mit einem Ull-generierenden Extrakt aus Nierengewebe. Probenvolumen: 200 µl (ca. 3 mg Protein) pro Kavität. A: Ull-generierende Aktivitäten. B: Proteinkonzentrationen [µg/µl]. C: spezifische Ull-generierende Aktivitäten. Gelmaterial: 300 µl Fractogel EMD TMAE (M) pro Kavität. X-Achse: Variation des pH-Wertes. Y-Achse: Variation der NaCl-Konzentration.

3.3.3 Suche nach Parametern zur chromatographischen Reinigung einer Kationenaustauscher-Fraktion mit Ull-generierender Aktivität

Eine UIIP1 enthaltende Proteinfraction, gewonnen aus ca. 2 Nieren, wurde mit einer Kationenaustausch-Chromatographie bei einem pH-Wert von 7 in Anwesenheit von 500 mM NaCl konzentriert. Die Elution von UIIP1 erfolgte mit 2M NaCl (Reinigungsschritt 1).

Es wurden IMAC Chelate mit zweiwertigen Ca, Mg, Ni, Co, Cu, Zn und dreiwertigem Fe Ionen (siehe B), ein Hydroxyapatitgel und verschiedene Hydrophobe-Interaktions-Chromatographiegele (siehe A) getestet.

Die Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der PPS-Experimente.

A	Phenyl Sepharose	Fractogel Propyl	Octyl Sepharose	Butyl Sepharose	Hydroxyapatit Bio-Gel HT	Toyopearl Ether	Toyopearl Hexyl
	0	0	0	0	0	0	0
B	Fractogel Ca-Chelat	Fractogel Mg-Chelat	Fractogel Ni-Chelat	Fractogel Co-Chelat	Fractogel Cu-Chelat	Fractogel Zn-Chelat	Fractogel Fe-Chelat
	0	0	0	0,7	0	0,1	0

Abb.11: Ergebnismatrix der PPS-Experimente mit einer Ull-generierenden Fraktion aus einer Batch-Kationenaustausch-Chromatographie. Probenvolumen: 60 µl. Gelvolumen: 50 µl. Zahlen: Ull-generierende Aktivitäten (hohe Aktivitäten sind durch dunkle Felder dargestellt). A und B: X-Achse: Variation des Gelmaterials

Es konnte ein Eluat mit Ull-generierender Aktivität durch eine Cobalt-Affinitäts-Chromatographie bei einem pH-Wert von 7 gewonnen werden.

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

Für die weitere Reinigung des UIIP1s wurde aufgrund der Ergebnisse der PPS-Experimente (Abbildung 11) eine Cobalt-Affinitäts-Chromatographie gewählt. Ein mit Co-Ionen beladenes Chelat Gel wurde mit dem Eluat der Batch-Kationenaustausch-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 1; siehe: 3.3.3) vermischt und diese Suspension anschließend in eine Säule gepackt. Mit Hilfe eines pH-Gradienten wurde die Probe eluiert. Abbildung 12 zeigt das Chromatogramm und die Ull-generierenden Aktivitäten in den gewonnenen Fraktionen.

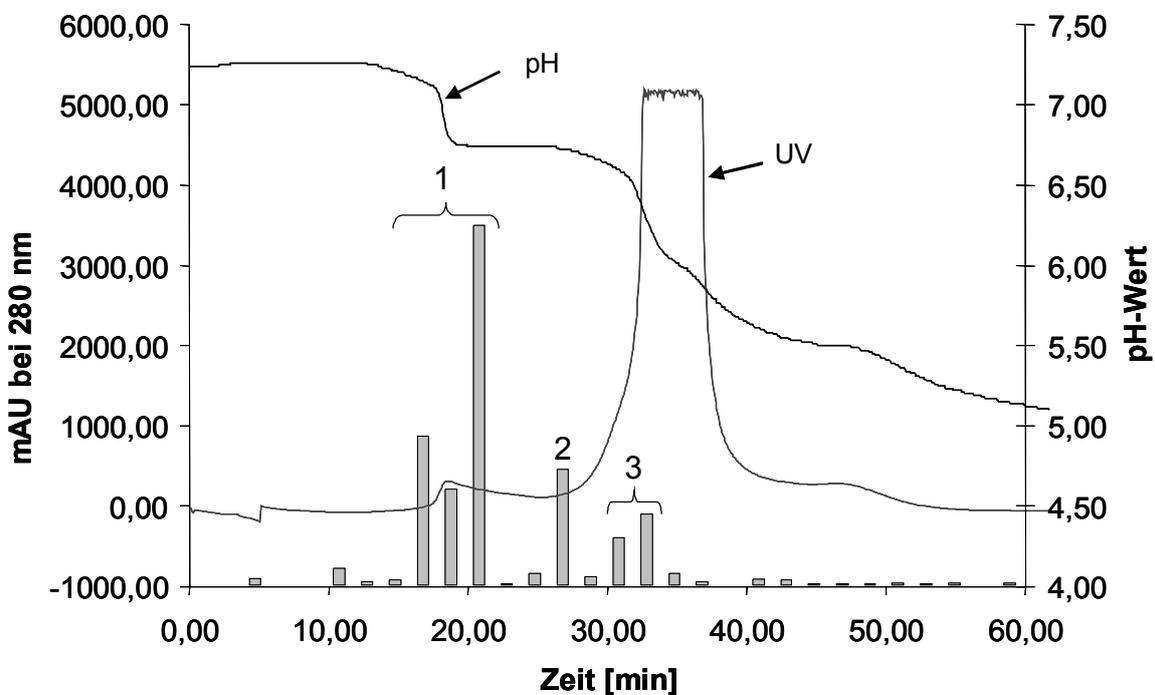


Abb.12: Chromatogramm einer Cobalt-Affinitäts-Chromatographie der Ull-generierenden Proteinfraktion aus Reinigungs-Schritt 1 (siehe: 3.3.3). Probenvolumen: 1 Liter. Säule: 20 ml Fractogel EMD Co-Chelat gepackt in HR 16/10 Säulengehäuse. Puffer A: 20 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7,2. Puffer B: 20 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 3. Flussrate: 2 ml/min. Gradient: 15% B für 15 Minuten, 100% B für 60 Minuten. X-Achse: Retentionszeit [min]. Linke Y-Achse: UV-Absorption bei 280 nm. Rechte Y-Achse: pH-Wert. Graue Säulen: Ull-generierende Aktivitäten.

Aufgrund des Aktivitätsprofils könnte man vermuten, dass 3 unterschiedliche Proteine mit Ull-generierender Aktivität getrennt worden sind. Die Fraktionen, die zwischen der 16. und 22. Minute eluierten, wurden zusammengefasst und werden im Folgenden mit Fraktion 1 bezeichnet. In diesem Bereich kam es zu einem Abfall des pH-Wertes der mobilen Phase. Fraktion 2 eluiert kurz vor dem Anstieg der UV-Absorption. Fraktion 3 eluiert innerhalb der UV-Absorption.

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

Abbildung 13 zeigt die UII-generierenden Aktivitäten der Eluate von Anionenaustauschern nach Chromatographie mit 4 verschiedenen Parametersätzen.

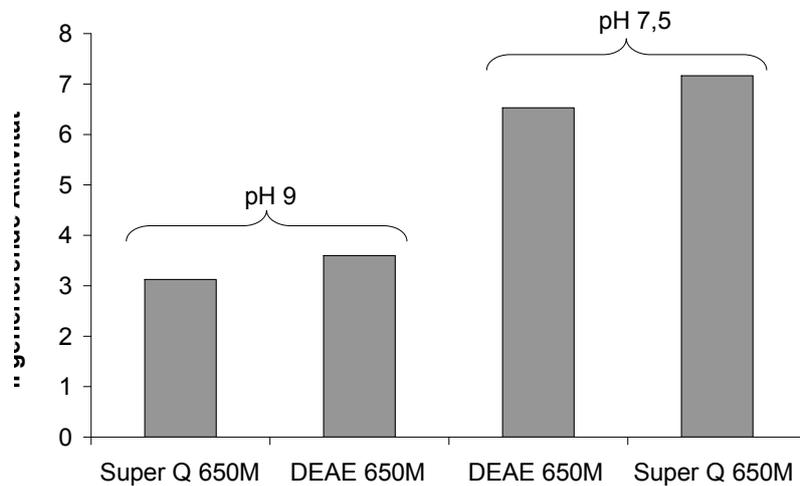


Abb.13: Aktivitätsprofil der PPS Experimente mit der UII-generierenden Fraktion 1 aus Reinigungs-Schritt 2 (Abbildung 12). Probenvolumen: 20 µl. Gelvolumen: 100 µl. X-Achse: Gelmaterial. Y-Achse: UII-generierende Aktivität.

In den Eluaten der Chromatographien bei pH 7,5 wurden höhere UII-generierende Aktivitäten gefunden als in den Eluaten der Chromatographien, die bei einem pH von 9 durchgeführt worden sind. Ein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Gelen konnte nicht festgestellt werden.

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

Nach Umpufferung und Konzentrierung der UII-generierenden Fraktion 1 aus der Cobalt-Affinitäts-Chromatographie (Abbildung 12) wurde eine Anionenaustausch-Chromatographie aufgrund der Ergebnisse der PPS-Experimente (Abbildung 13) durchgeführt. Abbildung 14 zeigt das Chromatogramm mit den gemessenen UII-generierenden Aktivitäten der gewonnenen Fraktionen.

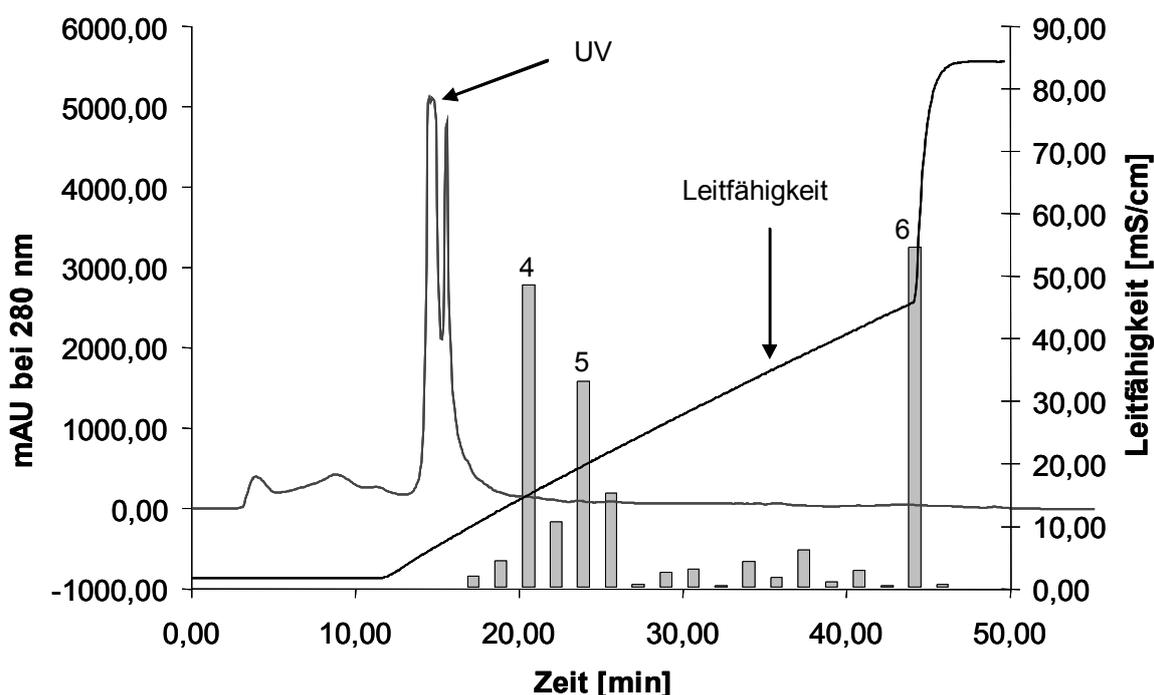


Abb.14: Chromatogramm einer Anionenaustausch-Chromatographie der UII-generierenden Fraktion 1 aus Reinigungs-Schritt 2 (Abbildung 12). Probenvolumen: 1 ml. Säule: DEAE 5PW. Puffer A: 25 mM Triethanolamin; pH 7,5. Puffer B: 25 mM Triethanolamin; 1 M NaCl; pH 7,5. Flussrate: 1 ml/min. Gradient: 0% - 50% B in 37 Minuten, 100% B für 5 Minuten. X-Achse: Retentionszeit [min]. Linke Y-Achse: UV-Absorption bei 280 nm. Rechte Y-Achse: Leitfähigkeit [mS/cm]. Graue Säulen: UII-generierende Aktivitäten

Aufgrund des Aktivitätsprofils könnte man auch hier vermuten, dass 3 unterschiedliche Proteine mit UII-generierender Aktivität getrennt worden sind. Die Fraktion mit der Retentionszeit von der 20. bis 21. Minute wurde zur Identifizierung der UII-generierenden Aktivität verwendet und wird im weiten Verlauf als Fraktion 4 bezeichnet.

Abbildung 15 zeigt MALDI Spektren von UII-S nach 4h und 16h Inkubation mit der immobilisierten Proteinfraction 4. Nach 4h sind die Signale von UII-S, KR-UII, R-UII und UII zu sehen. Nach 24h Inkubation ist fast ausschließlich das Signal von UII zu sehen.

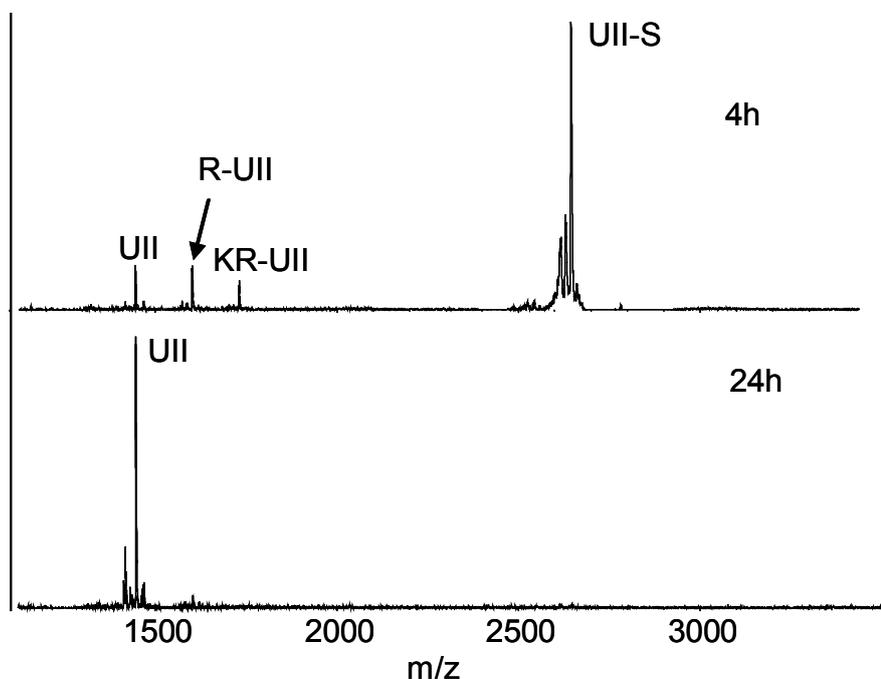


Abb.15: MALDI Spektren der Reaktionsprodukte nach Inkubation von UII-S mit der immobilisierten Proteinfraction 4 aus der Anionenaustausch-Chromatographie (Abbildung 14). Signale nach 4h: UII-S: 2610,39 Da, KR-UII: 1696,80 Da, R-UII: 1568,71 Da, UII: 1412,60 Da. Signale nach 24h: UII: 1413,60 Da. Peptidsequenzen: siehe Anhang.

3.3.7 2-dimensionale Gelelektrophorese einer UII-generierenden Fraktion aus der Anionenaustausch-Chromatographie

Die UII-generierende Fraktion 4 der Anionenaustausch-Chromatographie (Abbildung 14) wurde auf ein 2D Gel der Größe 20x30 cm aufgetragen und in der ersten Dimension nach dem isoelektrischen Punkt, und in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht getrennt. Abbildung 16 zeigt das mit Coomassie gefärbte Gel.

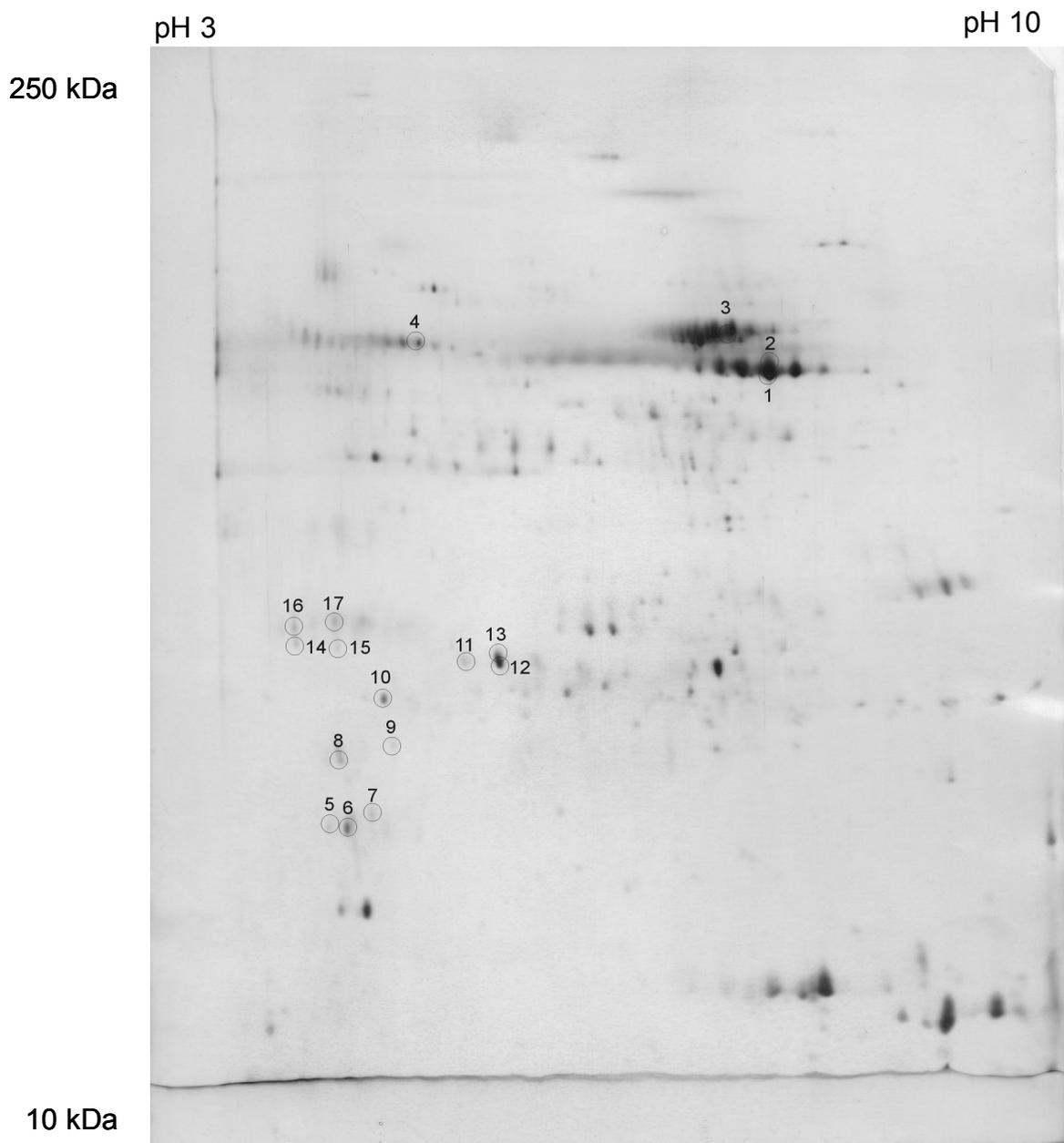


Abb.16: 2-dimensionale Gelelektrophorese der UII-generierenden Proteinfraction 4 (Abbildung 14). X-Achse: pH-Bereich. Y-Achse: Molekulargewichtsbereich.

Es sind noch sehr viele Proteinspots auf dem Gel zu sehen. Aufgrund der Charakterisierungsversuche war bekannt, das UIIP1 ein Molekulargewicht zwischen 30-50 kDa haben musste und der Ip zwischen 3,8 und 6,7 liegt. Proteinspots, die in diesem Bereich des 2-dimensionalen Gels zu sehen waren, (Spot 5-17) wurden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels MALDI Fingerprint analysiert.

3.3.8 Identifizierung der Proteine aus Spot 5-17 mittels MALDI Fingerprint

Abbildung 17 zeigt ein MALDI Fingerprint Spektrum des Proteinspots 9.

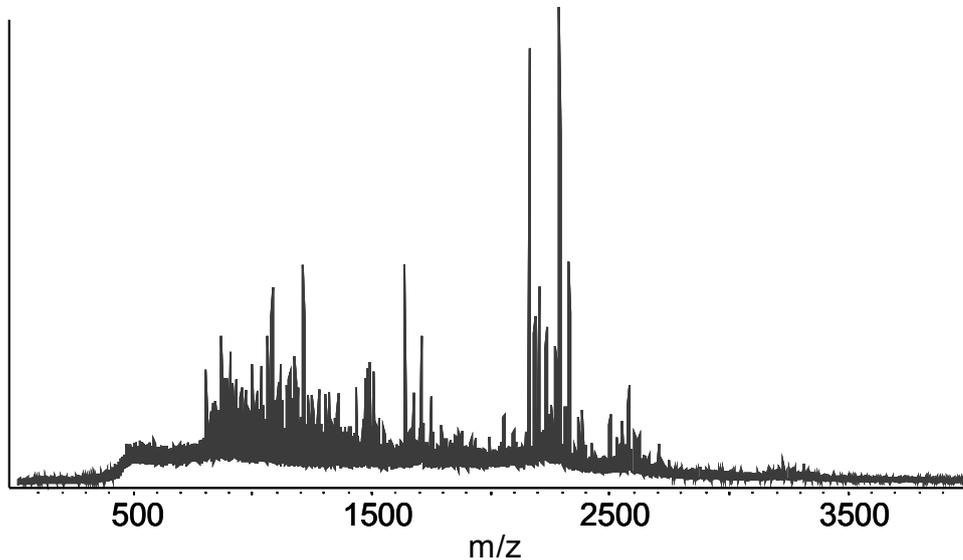


Abb.17: Typisches MALDI Spektrum eines tryptischen Verdaus des Proteinspots 9 aus der 2-dimensionalen Gelelektrophorese (Abbildung 16).

Das Protein aus Spot 2 wurde als Glutamat Dehydrogenase und das Protein aus Spot 3 als Catalase identifiziert. In den Spots 9, 10, 11 und 14 ergaben sich Hinweise auf ein "Pregnancy-Associated-Glycoprotein" (PAG2) (EC 3.4.23.-). Die Wahrscheinlichkeit für eine richtige Identifizierungen (Score) wurde als nicht signifikant angegeben.

3.3.9 Substratspezifität von Pepsin A

Abbildung 18 zeigt das MALDI Spektrum von UII-S nach 16h Inkubation mit immobilisiertem Pepsin. UII-S wurde vollständig zu KR-UII(des-Val), R-UII(des-Val) und UII(des-Val) abgebaut.

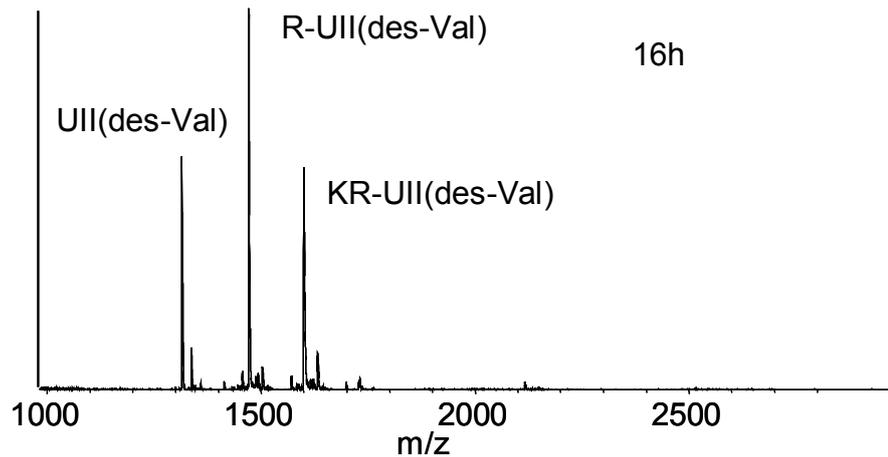


Abb.18: MALDI Spektrum von UII-S nach Inkubation mit immobilisiertem Pepsin A nach 16h Inkubation. Signale: KR-UII(des-Val): 1597,73 Da, R-UII(des-Val): 1469,64 Da, UII(des-Val): 1313,54 Da. Peptidsequenzen: siehe Anhang.

3.3.10 Reinigung von Pepsin A

Pepsin A wurde mit einer Cobalt-Affinitäts-Chromatographie gereinigt und anschließend immobilisiert. Abbildung 19 zeigt das MES-MALDI Spektrum von UII-S nach 16h Inkubation mit gereinigtem Pepsin.

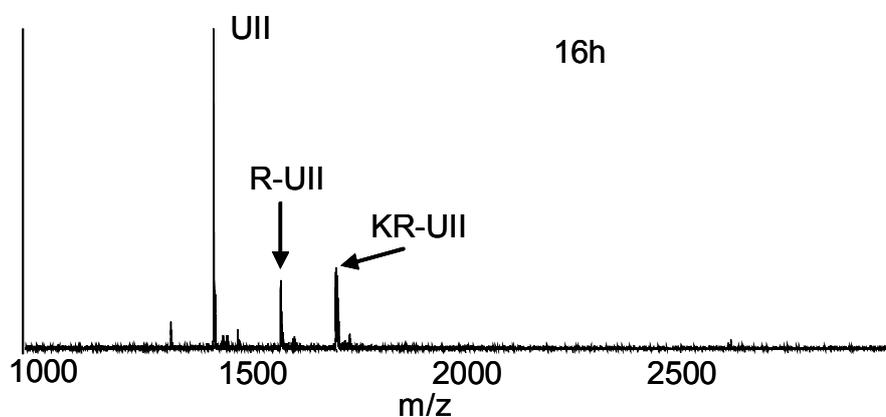


Abb.19: MALDI Spektrum von UII-S nach Inkubation mit gereinigtem immobilisiertem Pepsin A nach 16h Inkubation. Signale: KR-UII: 1696,80 Da, R-UII: 1568,71 Da, UII: 1412,60 Da. Peptidsequenzen: siehe Anhang.

3.4 Reinigungsweg-2

Ein schematischer Überblick über den Reinigungsweg-2 ist in Abbildung 3, Kapitel 2.2.8 zu sehen.

3.4.1 Konzentrierung und Reinigung von UIIP2 mit der Sample-Displacement-Chromatographie (Reinigungs-Schritt 1)

Die PPS-Experimente mit Kationenaustauscher zeigen, dass die höchste UII-generierende Aktivität bei einem pH von 7 in Anwesenheit von 100 mM NaCl zu finden ist (Abbildung 9A). Dieser Parametersatz wurde für eine Sample-Displacement-Chromatographie (SDC) benutzt. In Abbildung 20 ist ein Aktivitätsprofil einer SDC die mit einem Extrakt aus Nierengewebe durchgeführt wurde, zu sehen.

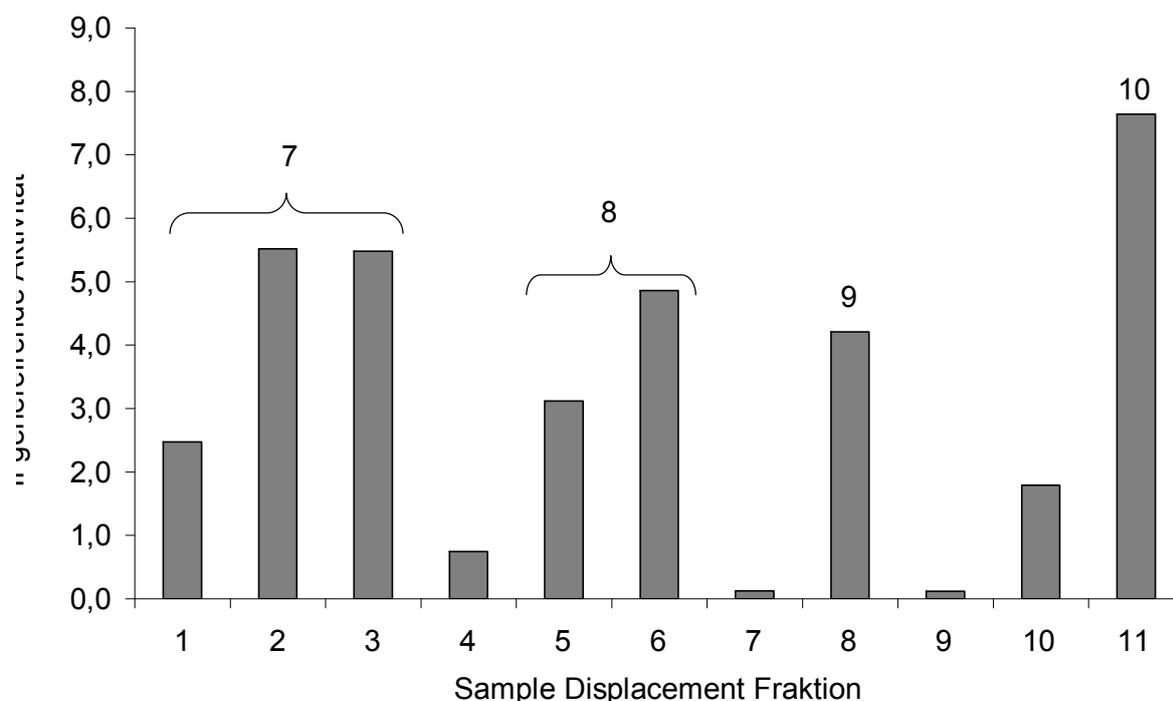


Abb.20: Aktivitätsprofil einer Sample-Displacement-Chromatographie. Probe: Extrakt aus Nierengewebe. Probenvolumen: 390 ml (ca. 5,8 g Protein). Gelmaterial: 60 ml Fractogel EMD SO_3^- (M) pro Fraktion. Probenauftragspuffer: 40 mM Na-Phosphat; 100 mM NaCl; pH 7. Elutionspuffer: 40 mM Na-Phosphat; 1 M NaCl; pH 7. X-Achse: Fraktionsnummer (Fraktion 11 bezeichnet eine Probe mit nicht retendierten Probenbestandteilen). Y-Achse: UII-generierende Aktivität.

Aufgrund des Aktivitätsprofils könnte man vermuten, dass 4 unterschiedliche Proteine mit UII-generierender Aktivität getrennt worden sind. SD-Fraktion 11 enthält die Moleküle, die nicht an das Chromatographiegel gebunden haben (Effluat). Dort ist die Aktivität am höchsten. Die SD-Fraktionen 2 und 3 haben die zweithöchsten Aktivitäten.

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

Die Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse von PPS-Experimenten mit Metall-Chelat-(IMAC)-Gelen, beladen mit verschiedenen Metallionen (siehe B), einem Hydroxylapatitgel und 8 verschiedenen Hydrophobe-Interaktions-Gelen (siehe A). Die Hydrophobe-Interaktions-Chromatographien (HIC) wurden mit 3 verschiedenen pH-Werten durchgeführt.

Gel pH	Toyopearl	Toyopearl	Toyopearl	t-Butyl	Methyl	Butyl	Phenyl	Octyl
	Butyl	Ether	Phenyl	MacroPrep	MacroPrep	Sepharose	Sepharose	Sepharose
4	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0,1	0	0	0	0	0,6

	Fractogel	Hydroxyapatit						
	Co-Chelat	Ni-Chelat	Ca-Chelat	Mg-Chelat	Cu-Chelat	Zn-Chelat	Fe-Chelat	Bio-Gel HT
	0	0	0	0	0	0	0	0

Abb.21: Ergebnismatrix der PPS-Experimente einer UII-generierenden Sample-Displacement Fraktion. Probenvolumen: 100 µl (ca. 0,5 mg Protein). Gelvolumen: 100 µl. Zahlen: UII-generierende Aktivitäten (dunkle Felder geben hohe Aktivitäten an). A: X-Achse: Variation des Gelmaterials. Y-Achse: Variation der pH-Werte. B: X-Achse: Variation des Gelmaterials.

Es konnten 2 Eluate mit UII-generierender Aktivität detektiert werden. Im Eluat der Chromatographie mit Octyl Sepharose ist die UII-generierende Aktivität wesentlich höher als in dem Eluat der Chromatographie mit Toyopearl Phenyl. Beide Chromatographien wurden bei einem pH-Wert von 8 durchgeführt.

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

Aufgrund der Ergebnisse der PPS-Experimente (Abbildung 21) wurde eine Chromatographie mit Octyl Sepharose 4FF bei einem pH-Wert von 8 durchgeführt. Das Chromatogramm der HIC mit der SD-Fraktion 3 (Abbildung 20) ist in Abbildung 22 zu sehen. Eine signifikante UV-Absorption bei 280nm ist erst bei sehr niedriger Leitfähigkeit zu erkennen. Die Balken geben die UII-generierenden Aktivitäten an, die in den entsprechenden Fraktionen detektiert worden sind. Die Fraktionen von der 99. Minute bis zur 105. Minute wurden vereinigt und wird im weiteren Verlauf als Fraktion 11 bezeichnet.

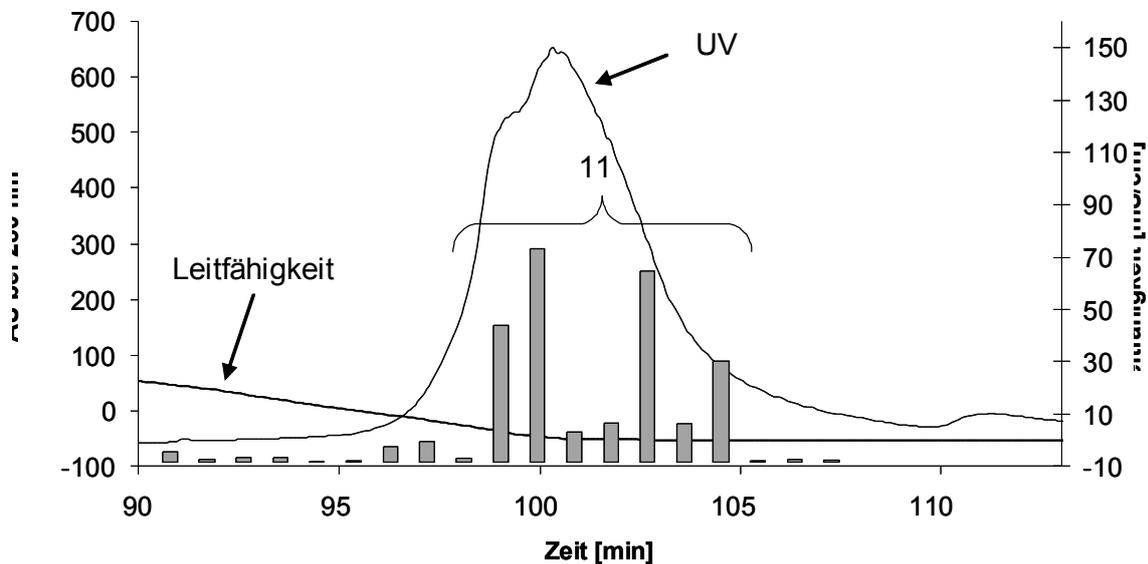


Abb.22: Chromatogramm einer Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie der UII-generierenden Sample-Displacement Fraktion 3 aus Reinigungs-Schritt 1 (Abbildung 20). Probenvolumen: 180 ml (ca. 900 mg Protein). Säule: 180 ml Octyl Sepharose FF gepackt in XK 26/40 Säulengehäuse. Puffer A: 50 mM HEPES; 2 M NaCl; pH 8. Lösungsmittel B: Wasser. Flussrate: 10 ml/min. Gradient: 0% - 100% B in 80 Minuten, 100% B für 20 Minuten. X-Achse: Retentionszeit [min]. Linke Y-Achse: UV-Absorption bei 280 nm. Rechte Y-Achse: Leitfähigkeit [mS/cm]. Graue Säulen: UII-generierende Aktivitäten.

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

In Abbildung 23 ist zu sehen, dass nur mit einem bestimmten Anionenaustauscher Eluate mit Ull-generierender Aktivität gewonnen werden konnten. Die höchste Ull-generierende Aktivität ist im Eluat der Chromatographie mit DEAE Toyopearl, die mit einem Puffer von pH 7 durchgeführt wurde, zu erkennen.

Gel \ pH	5	6	7	7,5	8	8,5	9	10
Toyopearl Super Q	0	0	0	0	0	0	0	0
Toyopearl DEAE	0	0	1,3*	0,5	0	0	0	0
Unoshere Q	0	0	0	0	0	0	0	0

Abb.23: Ergebnismatrix von Anionenaustausch-PPS-Experimenten mit der Ull-generierenden Fraktion 11 aus Reinigungs-Schritt 2 (Abbildung 22). Probenvolumen: 100 µl (ca. 50 µg Protein). Gelvolumen: 100 µl. Zahlen: Ull-generierende Aktivitäten (dunkle Felder geben hohe Aktivitäten an). X-Achse: Variation der pH-Werte. Y-Achse: Variation des Gelmaterials

*Wert konnte nicht genau bestimmt werden!

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

Die PPS-Experimente zeigen (Abbildung 23), dass sich UIIP2 mit DEAE Toyopearl bei einem pH-Wert von 7,5 chromatographieren lässt. Nach Pufferung der UII-generierenden Fraktion 11 aus der Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (Abbildung 22) konnte die Probe auf eine Anionenaustauschersäule aufgetragen werden. Abbildung 24 zeigt das Chromatogramm der Anionenaustausch-Chromatographie und die gemessenen UII-generierenden Aktivitäten der einzelnen Fraktionen.

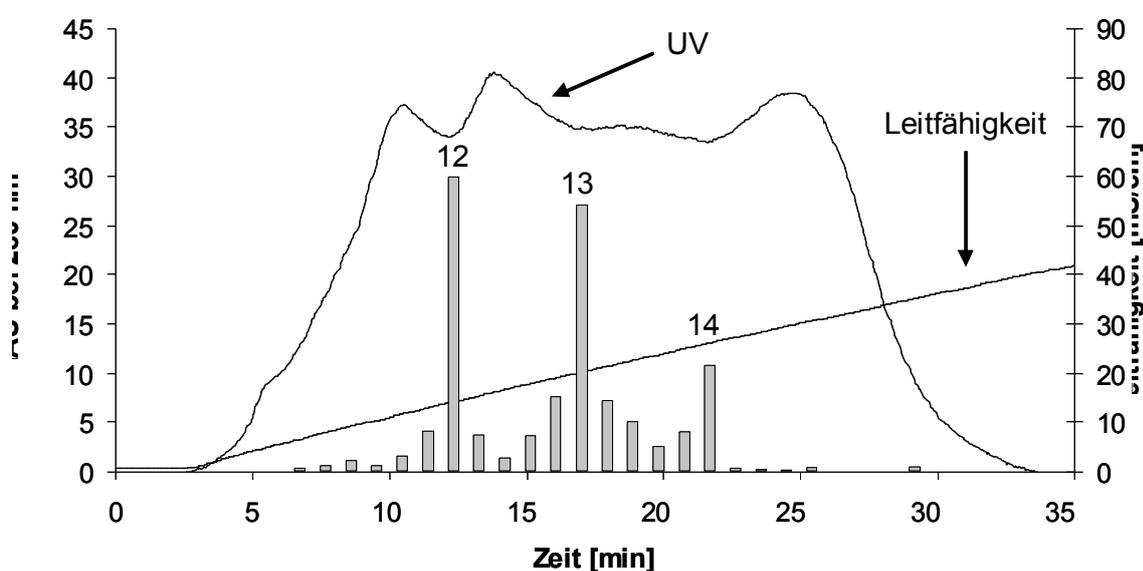


Abb.24: Chromatogramm einer Anionenaustausch-Chromatographie der UII-generierenden Fraktion 11 aus Reinigungs-Schritt 2 (Abbildung 22). Probenvolumen: 50 ml (ca. 23 mg Protein). Säule: 10 ml DEAE Toyopearl 650 M gepackt in HR16/10 Säulengehäuse. Puffer A: 40 mM Triethanolamin; pH 7,5. Puffer B: 40 mM Triethanolamin; 1 M NaCl; pH 7,5. Flussrate: 4 ml/min. Gradient: 0% - 50% B in 38 Minuten, 100% B für 2,5 Minuten. X-Achse: Retentionszeit [min]. Linke Y-Achse: UV-Absorption bei 280 nm. Rechte Y-Achse: Leitfähigkeit [mS/cm]. Graue Säulen: UII-generierende Aktivitäten

In drei Bereichen (Fraktionen 12, 13 und 14) ist eine relativ hohe UII-generierende Aktivität gemessen worden. Die Fraktion mit den Retentionszeiten zwischen der 16. bis 19. Minute wurden vereinigt, und werden im weiteren Verlauf mit Fraktion 13 bezeichnet.

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

Abbildung 25 zeigt das Chromatogramm einer Größenausschluss-Chromatographie der UII-generierenden Fraktion 13 der Anionenaustausch-Chromatographie (Abbildung 24). Fraktion 15 wurde für einen Identifizierungsversuch von UIIP2 herangezogen.

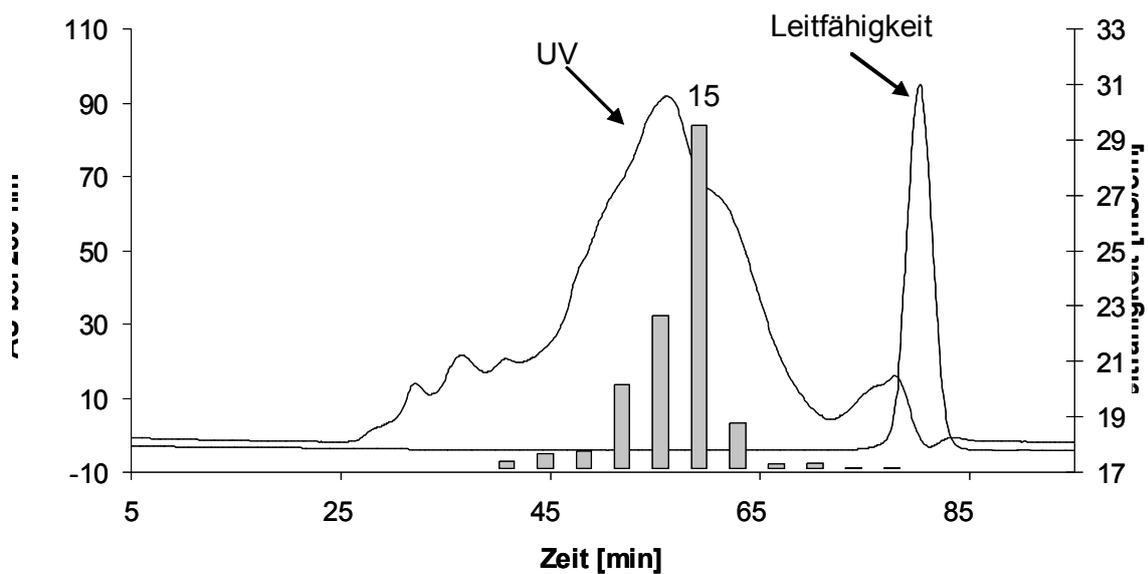


Abb.25: Chromatogramm einer Größenausschluss-Chromatographie der UII-generierenden Fraktion 13 aus Reinigungs-Schritt 3 (Abbildung 24). Probenvolumen: 200 μ l Säule: Superdex 200 HR 10/30. Puffer A: 20 mM Na-Phosphat; 150 mM NaCl; pH 7. Flussrate: 250 μ l/min. X-Achse: Retentionszeit [min]. Linke Y-Achse: UV-Absorption bei 280 nm. Rechte Y-Achse: Leitfähigkeit [mS/cm]. Graue Säulen: UII-generierende Aktivitäten

3.4.7 Klassifizierung der Protease UIIP2

Es wurde versucht, über Inhibitionsversuche die Klasse der Protease zu identifizieren.

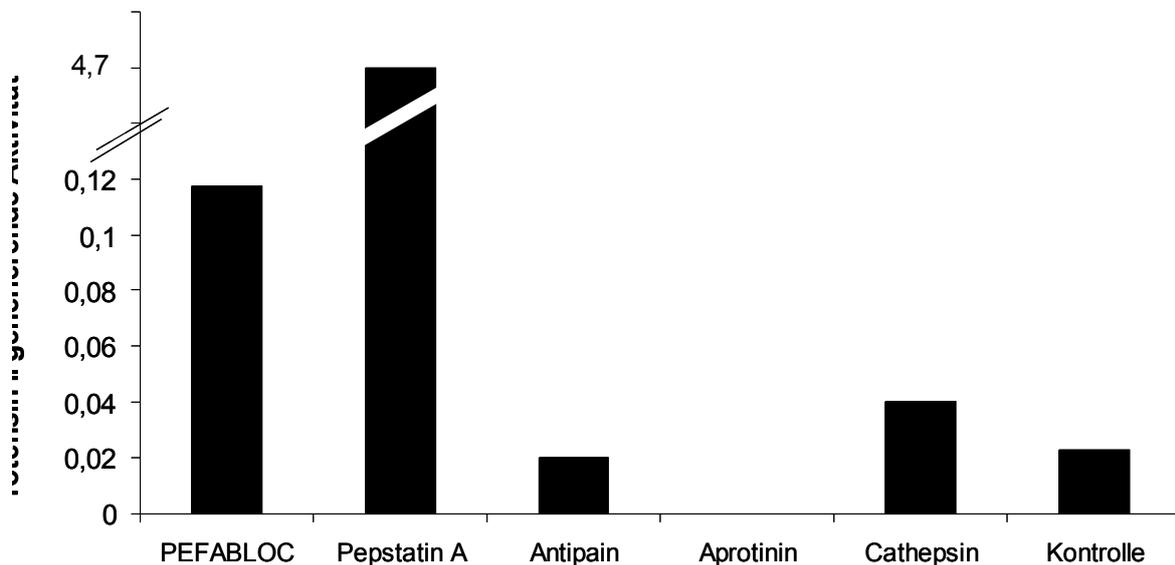


Abb.26: Inhibitionsprofil der UII-generierenden Fraktion 13 aus Reinigungs-Schritt 3 (Abbildung 24). Probenvolumen: 200 μ l. Inhibitorkonzentrationen: 1 mM PEFABLOC, 10 μ M Pepstatin A, 10 μ M Antipain, 250 μ g/ml Aprotinin, 1 μ M Cathepsin-Inhibitor.

Aus Abbildung 26 geht hervor, dass Aprotinin die UII Generierung stark hemmt. PEFABLOC hat dagegen keine hemmende Wirkung auf UIIP2. Die UII-generierenden Aktivitäten sind in Anwesenheit von PEFABLOC und Pepstatin-A gegenüber der Kontrolle stark erhöht.

3.4.8 SDS-Page der UII-generierenden Fraktion aus der Größenausschluss-Chromatographie

Mit Hilfe der SDS-Page wurden die in der UII-generierende Fraktion 15 aus der Größenausschluss-Chromatographie (Abbildung 25) enthaltenen Proteine getrennt. Es konnten mit Coomassie 7 Proteine gefärbt werden. Diese Proteinbanden wurden ausgeschnitten und für eine weitere Analyse tryptisch verdaut.

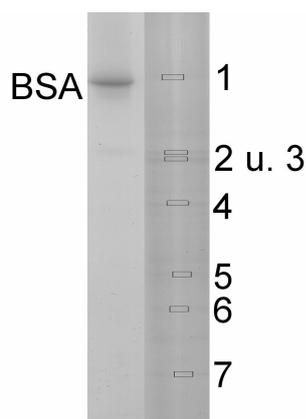


Abb.27: SDS-Page der UII-generierenden Fraktion 15 aus Reinigungsschritt 4 (Abbildung 25). Linke Seite: BSA Bande. Rechte Seite: Fraktion 15 aus Reinigungsschritt 4 (Abbildung 25). Gel: 12%iges Polyacrylamid Gel. Die Banden waren nur auf dem Originalgel zu erkennen und sind hier mit einem Rahmen gekennzeichnet!

Die verdauten Proben wurden anschließend für eine massenspektrometrische Untersuchung mittels LC-ESI MS/MS vorbereitet.

3.4.9 Identifizierung von UIIP2 mittels LC-ESI MS/MS

Abbildung 28 zeigt das Chromatogramm einer Reversed-Phase-Chromatographie der tryptischen Peptide der Proteinbande 1 (Abbildung 27). Zwischen der 30. und der 70. Minute sind sowohl Absorptionen bei 214 nm als auch Signale im MS detektiert worden. Jedes Signal wurde mit Hilfe der MS/MS Technologie analysiert.

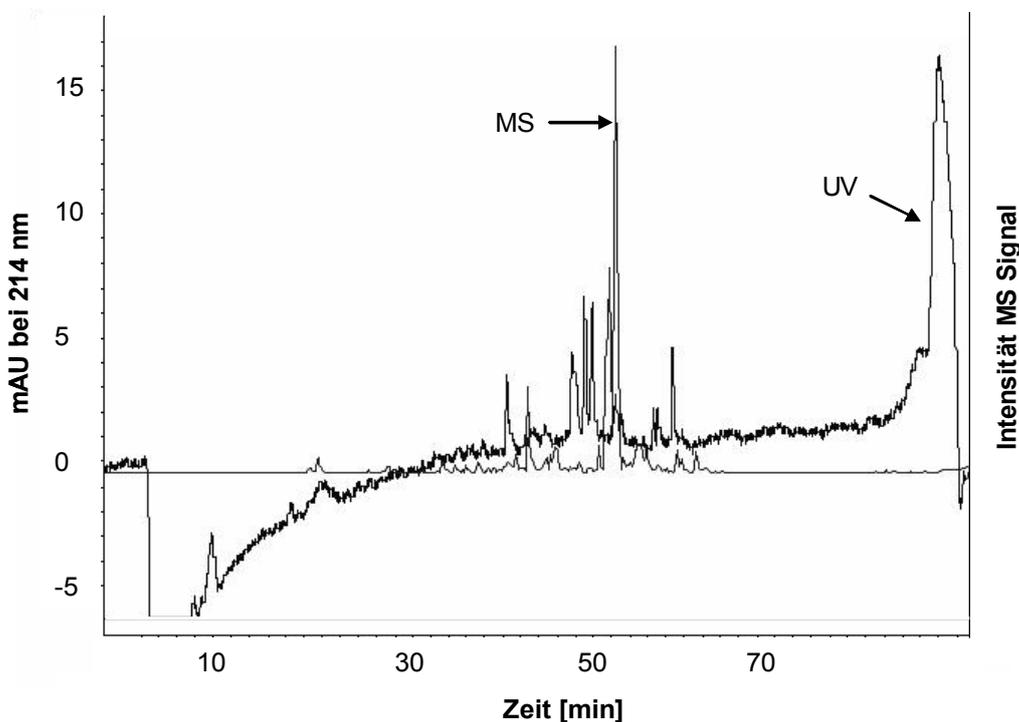


Abb.28: Chromatogramm einer Reversed-Phase-Chromatographie der tryptischen Peptide der Proteinbande 1 aus der SDS-Page (Abbildung 27). Säule: PepMap C18 3 μ m (75 μ m x 115 cm). Lösungsmittel A: 0,1% TFA. Lösungsmittel B: 0,1% TFA in ACN. Flussrate: 0,17 nl/min. X-Achse: Retentionszeit [min]. Linke Y-Achse: UV-Absorption bei 214 nm. Rechte Y-Achse: Signalintensität

Die MS Spektren sind automatisch in Aminosäuresequenzen übersetzt worden. Mit diesen Informationen wurde eine Mascot Datenbank Abfrage durchgeführt.

Das Programm konnte 17 Peptide mit den Peptidsequenzen KQAGPASVPLRT, RTADGIVSHLKK, KYGVSGYPTLKI, RTADGIVSHLKKQ, RLAPEYEEAATRL, RDGEEAGAYDGPRT, RDGEEAGAYDGPRT, RGFPTIYFSPANKK, KRLAPEYEEAATRL, RFLQDYFDGNLKR, RFLQDYFDGNLKR, KSEPIPESNDGPVKV, RGFPTIYFSPANKKL, RFLQDYFDGNLKRY, KIFRDGEEAGAYDGPRT, KDLLIAYYDVDYKNAKG, KDLLIAYYDVDYKNAK einer Disulfid-Isomerase-A3 des Menschen (EC 5.3.4.1) zuordnen. Es wurde ein signifikanter Score von 558 erreicht. Die Analyse aller weiteren Banden aus der SDS-Page führte zu keiner Protease.