

Die neue TMG-Proteinfamilie
rekombinante Proteinsynthese und Ligandensuche

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Daniel Schürmann

aus Siegen

Marburg/Lahn 2010

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen

am

Erstgutachter: Prof. Dr. Keusgen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Petersen

Tag der mündlichen Prüfung am

Meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Großeltern

ERKLÄRUNG

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

„Die neue TMG-Proteinfamilie – rekombinante Proteinsynthese und Ligandensuche“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den.....

.....
(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

Man kann ein Problem nicht mit der Denkweise lösen, die es erschaffen hat.

Albert Einstein

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Keusgen für die Übernahme meiner Betreuung und Annahme des Dissertationsthemas, seine Unterstützung und die Hilfestellung bei der Ausarbeitung neuer Versuche.

Frau Prof. Dr. Petersen danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates. Außerdem danke ich den Mitgliedern meiner Prüfungskommission, Herrn Prof. Dr. Kuschinsky und Herrn Prof. Dr. Culmsee.

Ich danke meinem netten Team der Firma CSL Behring, das mich unermüdlich unterstützt und mir den Einstieg in gentechnisches Arbeiten ermöglicht hat, ebenso wie der Arbeitsgruppe des Fachbereichs Pharmazie. Herrn Dr. Weimer, Herrn Kanzy, Herrn Dr. Schulte, Herrn Prof. Dr. Dickneite und Herrn Lind danke ich für die wissenschaftliche Hilfestellung und die experimentellen Vorschläge als wegweisende Orientierung. Bei Herrn Dersch und Herrn Rein möchte ich mich für alles was mit gentechnischem Arbeiten (PCR, Klonierung, Proteinreinigung usw.) im Zusammenhang steht bedanken. Frau Kalbass, Frau Beckmann-Scheld und Herrn Bodenbender danke ich für ihre Hilfe bei der Proteinreinigung und Analytik. Herrn Lang, Herrn Beltz, Herrn Günther, Frau Block, Frau Hebener, Herrn Debus danke ich für jegliche Hilfe bei Fragestellungen, welche die Zellkultivierung betrafen. Frau Beutel, Frau Seyfert-Brandt und Herrn Röder möchte ich für ihre Unterstützung bei ELISA, Durchflußzytometrie und SPR-Analysen danken. Herrn Simshäuser danke ich für die Einführung in die Proteinsequenzierung und Herrn Cuesta-Linker für die theoretische Hilfestellung bei der Entwicklung neuer gelanalytischer Versuche. Bei Herrn Ruhwedel möchte ich mich für die Hilfe bei allen weiteren Fragen bedanken. Für alle weiteren großen und kleinen Hilfestellungen bedanke ich mich bei dem restlichen PRD-Team.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. Gronski aussprechen. Er hat mich trotz der wissenschaftlichen Umstrukturierung des Themas weiterhin in allen wissenschaftlichen Fragen unterstützt und stand mir immer als Mentor zur Seite.

Ich danke meinen Freunden, die, obwohl sie von der Thematik keine Ahnung hatten, geduldig zugehört haben – solange ein Bier in erreichbarer Nähe war.

Besonders danke ich meinen Eltern und meinem Bruder, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
I. EINLEITUNG	9
1.1 Entdeckung einer neuen Proteinfamilie	9
1.2 Gammacarboxylierung	16
1.3 Ziel der Arbeit	19
II. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Polymerase Kettenreaktion	20
2.2 Mutagenese	23
2.3 Auftrennung und Reinigung von PCR- und geschnittenen Plasmidfragmenten	25
2.4 Isolierung von Nukleinsäurefragmenten aus der Gelmatrix	27
2.5 PCR-Konstrukte	28
2.6 Enzymatischer Verdau und anschließende Reinigung von DNA	32
2.7 Ligation	34
2.8 Plasmide	35
2.9 Transformation	38
2.10 Einzelklonselektion	39
2.11 Zelluläre Amplifikation und Reinigung von Plasmid-DNA	40
2.12 Sequenzierung von DNA	41
2.13 Transfektion	42
2.14 Vitalitätskontrolle unter Zugabe von Vitamin K und Warfarin	46
2.15 Kryokonservierung von Säugerzellen	47
2.16 Revitalisierung von kryokonservierten Säugerzellen	49
2.16.1 Auftauen der Zellen	49
2.16.2 Kultivieren der Zellen	49
2.17 Proteinreinigung	50
2.18 Proteinanalytik	54
2.18.1 Elektrophorese und Western-Blot	54
2.18.1.1 Elektrophorese	54
2.18.1.2 Blotten	55
2.18.1.3 Proteinfärbung	57

2.18.1.3.1 Coomassiefärbung	57
2.18.1.3.2 Silberfärbung	57
2.18.2 ELISA	59
2.18.3 Proteinsequenzierung	61
2.19 Zellfixierung und Anfärbung zellspezifischer Strukturen	64
2.20 Bindungsversuche mit Magnetic Beads	66
2.20.1 Metallchelate <i>Magnetic Beads</i>	66
2.20.2 NHS-aktivierte <i>Magnetic Beads</i>	68
2.21 Herstellung von heparinisiertem Plasma	70
2.22 Massenspektrometrische Auswertung der eluierten Fraktionen	71
2.23 Enzymatische Abspaltung des Albuminanteils von den Fusionsproteinen	72
2.24 SPR	73
2.24.1 Vorversuche	76
2.24.1.1 Elektrostatik und Proteinimmobilisierung	76
2.24.1.2 Untersuchung auf unspezifische Proteinbindungen	77
2.24.1.3 Bestimmung des optimalen Elutionspuffers und Bindungspartner-Suche im heparinisierten Plasma	78
2.24.2 Microrecover	79
2.24.3 Untersuchung verschiedener Plasmafraktionen	79
2.24.4 Versuche zur Verringerung der unspezifischen Bindung durch Entfernung des Plasma-Lipidanteils	80
2.24.5 Untersuchung von Thrombozyten und deren Membran-Komponenten auf mögliche Interaktionen mit den Gla-Proteinen	81
2.24.5.1 Thrombozytenpräparation	81
2.24.5.2 Thrombozytenmembranprotein-Präparation	82
2.24.6 Alpha-1-B-Glykoprotein	83
2.25 Glykoanalytik des Alpha-1-B-Glykoproteins	83
2.26 Spikeversuch	85
2.27 Elektrophoretische Plasmatrennung	86
2.28 Durchflusszytometrie	87
2.28.1 Zell-Zell Interaktionen	88
2.28.2 Inhibitionsversuch	92
2.28.2.1 Vorversuch – Anlagerung von TMG-GFP-Fusionsproteinen an Thrombozyten	92
2.28.2.2 Inhibition der Interaktion zwischen Thrombozyten und TMG-Albumin-FP exprimierenden HEK293-Zellen	93
2.29 Optische Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen	94
III. ERGEBNISSE	101
3.1 Herstellung der Fusionsproteine	101
3.1.1 Design der DNA-Sequenz	101
3.1.2 Proteinexpression und Lokalisation der nativen Proteine	103
3.1.3 Proteinreinigung	108
3.1.4 Proteinsequenzierung	113
3.1.5 Enzymatische Abspaltung des Albuminanteils von TMG3/4 Fusionprotein mittels PreScission® Protease	114
3.2 Ligandensuche im menschlichen Plasma	115
3.2.1 Heparin-Hemmkonzentration	115
3.2.2 Ligandensuche mit Magnetic Beads	116

3.2.2.1 Versuche mit M-PVA-IDA-Cu-Magnetic Beads	116
3.2.2.2 Versuche mit M-PVA-Ak-13-Magnetic Beads	122
3.2.3 Massenspektrometrie	130
3.2.4 SPR-Kinetiken	135
3.2.4.1 Plasmaverdünnungen und Elutionsbedingungen	135
3.2.4.2 Microrecovery	138
3.2.4.3 Untersuchung verschiedener Plasmafraktionen	140
3.2.4.4 Lipid Removal Agent	142
3.2.4.5 A1BG: Ein potentieller Ligand ?	144
3.2.4.5.1 Analytische Charakterisierung von A1BG aus Humanplasma	144
3.2.4.5.2 A1BG-Bindungskinetik	146
3.2.5 Plasma-FP-Spikeversuch	147
3.2.6 Elektrophoretische Plasmatrennung	149
3.3 Interaktionsanalyse mit zellulären Blutkomponenten	150
3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen	150
3.3.2 Thrombozytenversuche	151
3.3.2.1 Erste orientierende Experimente	151
3.3.2.2 Gelbildung	152
3.3.2.2.1 Volumen- und Puffereffekte	153
3.3.2.2.2 Bedeutung von Mediatorproteinen	154
3.3.2.3 Thrombozyten- und Thrombozytenmembranprotein-Kinetik	155
IV. DISKUSSION	157
4.1 Proteindesign und Expression	157
4.2 Potentielle Liganden im humanen Plasma	158
4.2.1 Separation von potentiellen Liganden aus heparinisiertem Plasma	158
4.2.2 Identifikation der potentiellen Plasma-stämmigen Liganden	159
4.2.3 Bindungskinetische Untersuchungen potentieller Plasma-stämmiger Liganden	162
4.2.4 Ligandenkomplexbildung mit den gelösten Fusionsproteinen	164
4.2.5 Ligandensuche im Gel-separierten Plasma	165
4.3 Hinweise auf einen zellulären Liganden?	166
4.3.1 Erklärungsversuche beobachteter Agglutinationseffekte	166
4.3.2 Bindungskinetische Studien zur Thrombozyten-Agglutination	168
V. SCHLUSSFOLGERUNG	170
VI. ZUSAMMENFASSUNG	174
VII. LITERATURVERZEICHNIS	176
VIII. ANHANG	187
8.1 Exprimierte Proteinsequenzen, basierend auf Plasmidkonstrukten	187
8.2 Verwendete Primer / Oligonukleotidliste	192
8.4 Proteinsequenzierung der exprimierten und gereinigten Gla-Proteine	194
8.5 Bestimmung der Warfarin Konzentration	203
8.6 Rohdaten der Massenspektrometrie	204
8.7 Kalziumkonzentration im menschlichen Plasma	215

8.8 SPR Versuche	216
8.9 Zell-Zell Interaktionen	241
8.10 Durchflusszytometrische Versuche	249
8.11 Thrombozytenversuche – Versuch IV	287

Abkürzungsverzeichnis

A1BG	Alpha-1B-Glykoprotein
AP	Alkalische Phosphatase
anti-Albumin-Ak	anti-Albumin-Antikörper
anti-Gla-Ak	anti-Gla-Antikörper
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
bsp.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementary DNA
Da, dA	Dalton, Desoxyadenosin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleicacid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Erythrozytenkonzentrat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alia (und weitere)
f	Femto
Fa	Firma
FP	Fusionsprotein

g	Gramm; Erdschwerebeschleunigung $9,81 \text{ m/s}^2$
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
GGCX	Gamma-Glutamylcarboxylase
Gla	in γ -Position carboxylierte Glutaminsäure
Glu	Glutaminsäure
HA	Hydroxylapatit
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
HSA	humanes Serum Albumin
IDA	Iminodiessigsäure
IE	Internationale Einheit
k	Kilo-
KLSM	konfokales Laser Scanning Mikroskop
l	Liter
LK	Leukozytenkonzentrat
μ	Mikro-
M	Konzentration c [mol/l]
m	Milli-
Mag. Beads	<i>Magnetic Beads</i>
MassSpek	Massenspektrometrie
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
MGP	Matrix-Gla-Protein
min	Minuten
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MW	<i>molecluar weight</i> , Molekulargewicht

n	Nano-, Stoffmenge [mol]
NBT	blaues Nitrotetrazoliumchlorid
NC	Nitrocellulose
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NTA	Nitrilotriessigsäure
p	Pico-
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PITC	Phenylisothiocyanat
PRGP1	Proline rich Gla (γ - carboxyglutamic acid) protein 1
PRGP2	Proline rich Gla (γ - carboxyglutamic acid) protein 2
Primer	Oligonukleotid
PTH	Phenylthiohydantoin
PTM	Posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
RU	Refraction Unit, Brechungsindex
SBTI	Soy Bean Trypsin-Inhibitor, Sojabohnen-Trypsininhibitor
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SEC, sec.	Size Exclusion Chromatographie, Sekunden
SPR	Surface Plasmon Resonanz
T _A	annealing temperature
TFA	Trifluoressigsäure
TK	Thrombozytenkonzentrat

T _M	melting temperature
TMB	3, 3', 5, 5'- Tetramethylbenzidin
TMG3	transmembrane Gla (γ- carboxyglutamic acid) protein 3
TMG4	transmembrane Gla (γ- carboxyglutamic acid) protein 4
Tris	1,1,1-Tris-(hydroxymethyl)-ethan
U	Units, internationale Einheiten
UpM	Umdrehungen pro Minute
vs	versus

I. Einleitung

1.1 Entdeckung einer neuen Proteinfamilie

Transmembranproteine penetrieren, im Gegensatz zu Membranproteinen, beide Phospholipidschichten einer Zellmembran und können verschiedenste Funktionen erfüllen. Sie dienen dem Transport von biologischen Molekülen oder Wirkstoffen, weisen Enzymaktivität auf, dienen der Signalübertragung, stellen Zellverbindungen her und dienen der Zell-Zell Erkennung.

Man unterscheidet Singlepass- und Multipass-Transmembranproteine. Singlepass-Transmembranproteine durchqueren die Zellmembran nur einmal, Multipass-Transmembranproteine dagegen mehrmals. Die Singlepass-Transmembranproteine werden als Typ I bezeichnet, wenn der N-Terminus extrazellulär liegt und als Typ II, wenn der N-Terminus intrazellulär liegt (vgl. Abb. 1.1).

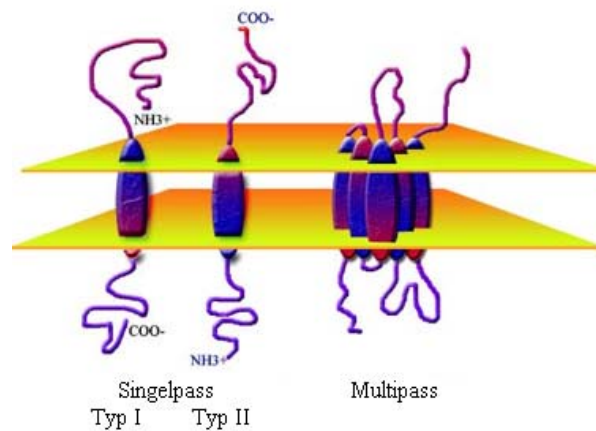


Abb. 1.1 Strukturelle Integration von Singlepass- und Multipass-Transmembranproteinen in die beiden Phospholipidschichten einer Zellmembran modifiziert nach www.proteinchemist.com/mem/mem.html

Eine neue Proteinfamilie, bestehend aus vier Transmembranproteinen, wurde von John D. Kulman et al. nachgewiesen. Die ersten beiden wurden PRGP1 und PRGP2 genannt [Kulman, Harris 1997]. Das Akronym PRGP der beiden Proteine steht für, *proline rich gamma carboxyglutamic acid protein* und beschreibt eine strukturelle Eigenschaften. Diese Proteine weisen nicht nur vermehrt die Aminosäure Prolin auf, sondern auch die in gamma (γ -) Position carboxylierte Glutaminsäure (Glu, bzw. E \rightarrow Gla [IUPAC-IUB 1968]). Die γ -

Carboxylierung stellt eine posttranslationale Veränderung dar und wird durch den Vitamin K-Epoxid-Reduktase Komplex vermittelt.

Zwei weitere Transmembranproteine, die ebenfalls zur Familie gehören, tragen die Bezeichnung TMG3 und TMG4 [Kulman, Harris 2001]. Die Proteine sind, wie PRGP1 und 2, in γ -Position carboxyliert und die Abkürzung TMG steht für *transmembrane gamma carboxyglutamic acid protein*. Die Nomenklatur variiert von PRGP bzw. PRRG bis zu TMG. Die verschiedenen Bezeichnungen sind in der Human Protein Reference Database (www.hprd.org) aufgeführt. In der vorliegenden Arbeit werden ausschließlich die gängigen Abkürzungen PRGP1, PRGP2 sowie TMG3 und TMG4 benutzt, wie sie erstmals in den Veröffentlichungen von John D. Kulman et al. eingeführt worden sind.

Innerhalb der Familie liegt eine große Homologie zwischen den einzelnen Proteinen PRGP1 und TMG3, sowie PRGP2 und TMG4 vor. Abbildung 1.2 zeigt eine vereinfachte grafische Darstellung ihrer Zusammensetzung.

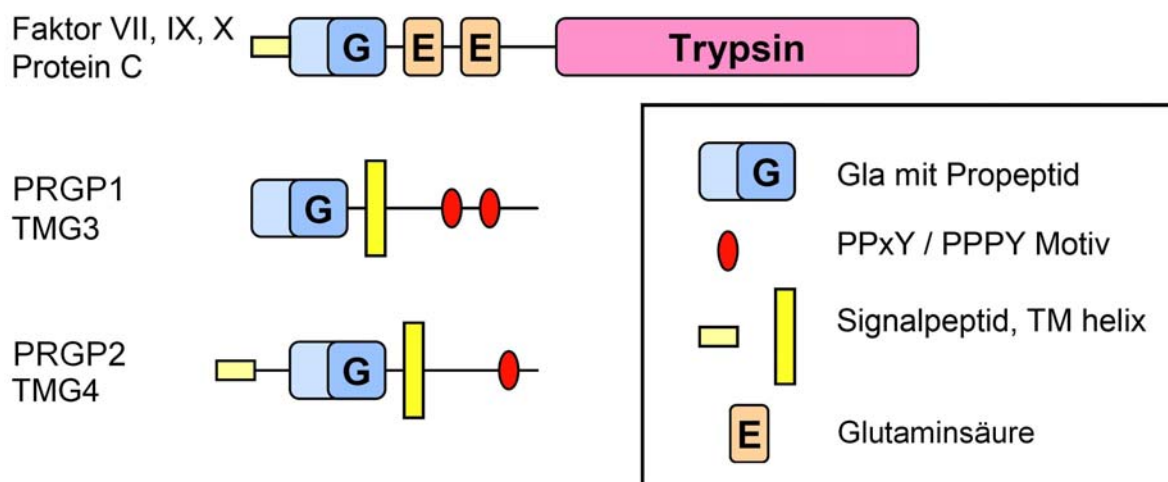


Abb. 1.2 Topologievergleich der Transmembranprotein-Familie und einigen Gerinnungsfaktoren

In Abbildung 1.2 ist zu erkennen, dass PRGP1 und TMG3 kein Signalpeptid besitzen, sondern direkt mit der Propeptidsequenz der Gla-Domäne beginnen. Das Fehlen eines Sekretions-Signals ist ungewöhnlich, wird aber durchaus auch bei anderen Rezeptoren beobachtet – insbesondere bei solchen mit sehr kurzer Ektodomäne. PRGP2 und TMG4 besitzen ein konventionelles Signalpeptid, das vermutlich nach einer Furin-ähnlichen Spaltstellenerkennungssequenz bei der ER-assoziierten Translation abgespalten wird. Das Propeptid dient als Erkennungssequenz für die γ -Carboxylase. Diese Carboxylase ist ein

Enzym, welches über die Erkennungssequenz an das jeweilige Protein anlagern kann und eine posttranslationale Modifikation in Form einer Carboxylierung in γ -Position der Glutaminsäure bewirkt (vgl. 1.2 Gammacarboxylierung). Auffällig sind die PPXY Motive der Proteinfamilie. PRGP1 und TMG3 besitzen in ihrem cytosolischen Anteil zwei PPXY Motive, während PRGP2 und TMG4 nur eines besitzen (siehe Abbildung 1.3). PPXY Motive werden von WW-Domänen [Bork, Sudol 1994] erkannt, insbesondere von der Klasse der WW-HECT Ubiquitin-Ligasen wie z.B. von NEDD4 und dessen Verwandten. In der Regel bedeutet das Vorkommen von konservierten PPXY Motiven, dass die entsprechenden Proteine in einem regulierten Prozess ubiquitiniert werden. Bei integralen Membranproteinen bedeutet diese Ubiquitinierung typischerweise, dass die Proteine in Endosomen internalisiert und möglicherweise durch das Lysosom abgebaut werden [Hershko, Ciechanover 1992]. Eine weitere interessante posttranslationale Modifikation (PTM) und ein konserviertes Merkmal der gesamten TMG-Familie ist die Anwesenheit von mehreren Cystein-Resten unmittelbar hinter der Transmembran-Domäne. Diese Cysteine sind höchstwahrscheinlich palmitoyliert und beeinflussen so ebenfalls die Lokalisation des Rezeptors [Baekkeskov, Kanaani 2009]. Außerdem weisen TMG3 und TMG4 eine Disulfidbindung zwischen den Cysteinen in Position 36 und 41, bzw. 69 und 75 auf.

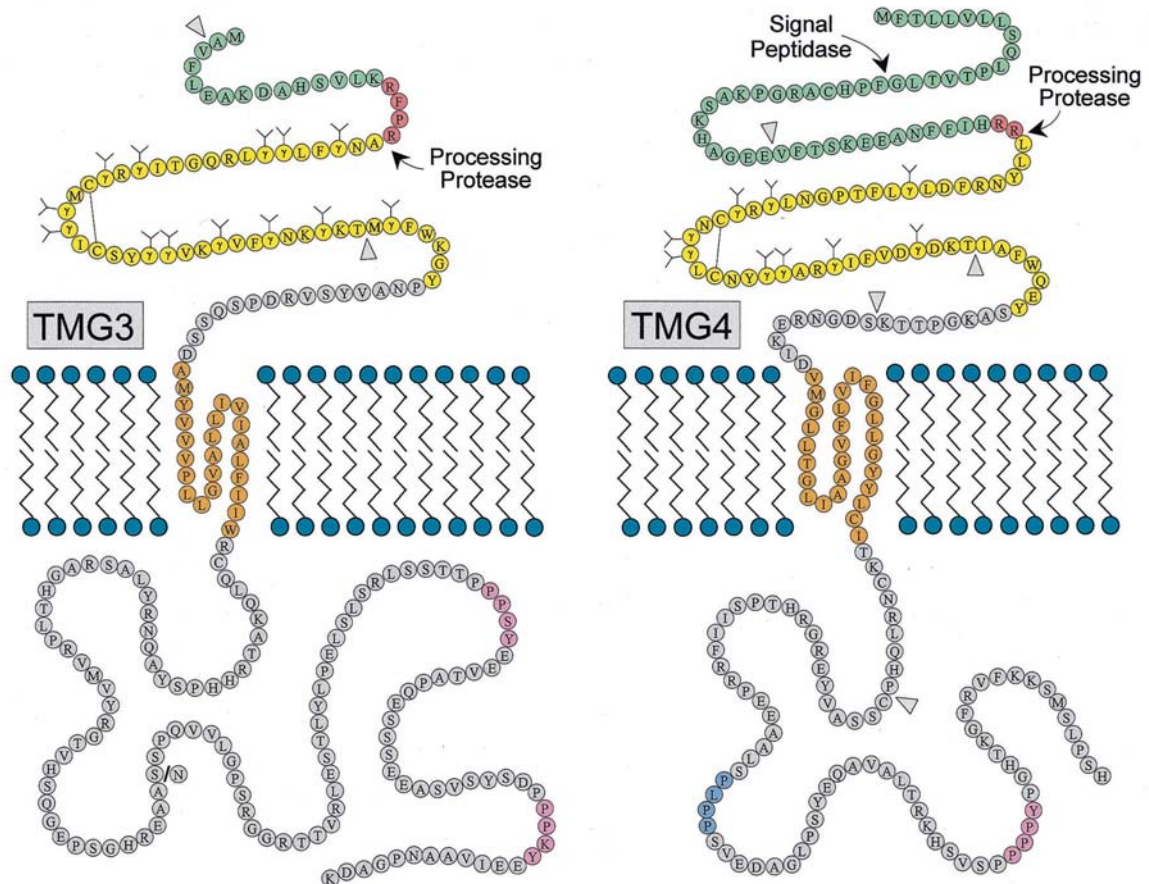


Abb. 1.3 Topologie von TMG3 und TMG4: Signalpeptid (grün), Erkennungssequenz der Propeptidase (rot), Gla Domäne (gelb), Transmembranbereich (orange), PPXY Box: Bindungsbereich für SH3 Domänen (blau), PWXY Box: Bindungsbereich für WW Domänen (pink), Spaltstelle der Signal- und Propeptidase mit Pfeilen markiert, Exonabschnitte (▽), vermutliche Polymorphie im Cytosol-Anteil des TMG3 ist abgetrennt aufgeführt von der eigentlichen Peptidasequenz, nach Kulman, Harris 2001

Die nativen Aminosäuresequenzen, die für die Arbeit benutzt worden sind, sind in der Human Protein Reference Database unter speziellen Accession Numbers zu finden (PRGP1: 05113; PRGP2: 09189; TMG3: 06742; TMG4: 15187). Dort sind ebenfalls die vielfältigen Bezeichnungen der Proteine aufgeführt.

Die Proteinfamilie ist relativ wenig erforscht und es lassen sich nur wenige Rückschlüsse bezüglich der Funktion aus der Aminosäuresequenz ableiten. Auffällig ist die Homologie zu den menschlichen Gerinnungsfaktoren, den sogenannten γ -carboxylierten Prothrombinfaktoren.

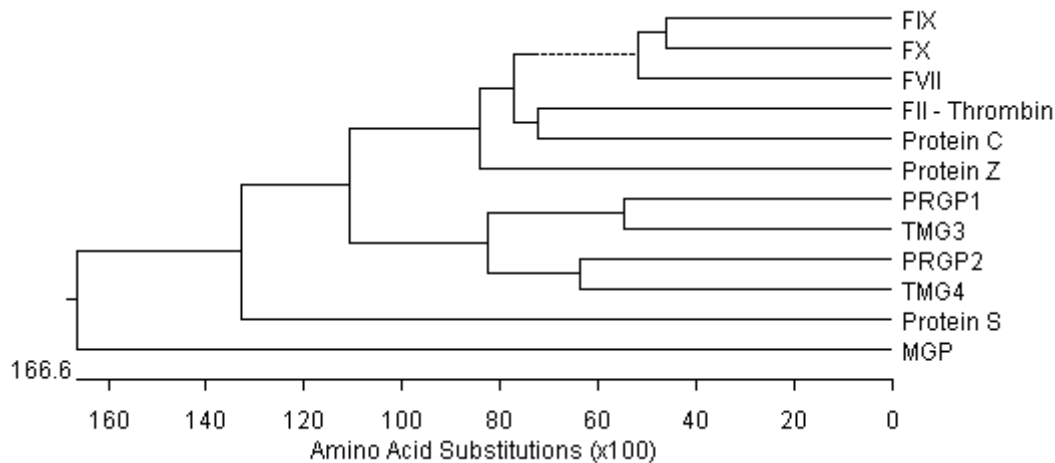


Abb. 1.4 Homologievergleich von PRGP und TMG Proteinsequenzen mit weiteren γ -carboxylierten Proteinen, erstellt mit MegAlign von DNASTAR

Die Proteine PRGP1 und TMG3 sowie PRGP2 und TMG4 weisen innerhalb der Familie eine Homologie auf. Des Weiteren ist in Abbildung 1.4 zu erkennen, dass sich die PRGPs und TMGs sequentiell homolog zu bestimmten Gerinnungsfaktoren verhalten und von einem ebenfalls γ -carboxylierten humanen Protein, dem Matrix-Gla-Protein (MGP), distanzieren. Die Funktion des MGP wurde bereits aufgeklärt [Schurgers, Cranenburg 2008]. Das MGP bindet ebenso wie die funktionell unterschiedlichen Prothrombinfaktoren Kalzium. Das Protein inhibiert die arterielle Kalzifizierung der Gefäße durch Bindung des Kristallisationskeims und Verhinderung eines fortschreitenden Kristallwachstums, sowie durch Inhibition einer morphologischen Veränderung der vaskulären glatten Muskelzellen zu Chondrozyten, Knorpelzellen. Alle Gla-Proteine binden Kalzium, bzw. benötigen es für ihre Aktivierung. Somit sollte die neue Proteinfamilie ebenfalls Kalzium binden und aufgrund der Ektodomäne mit möglicherweise im Plasma enthaltenen Proteinen kalziumvermittelt interagieren. Die Ektodomäne scheint eine wichtige Rolle für die Funktion des Proteins zu spielen, was man anhand folgender Abbildungen erklären kann.

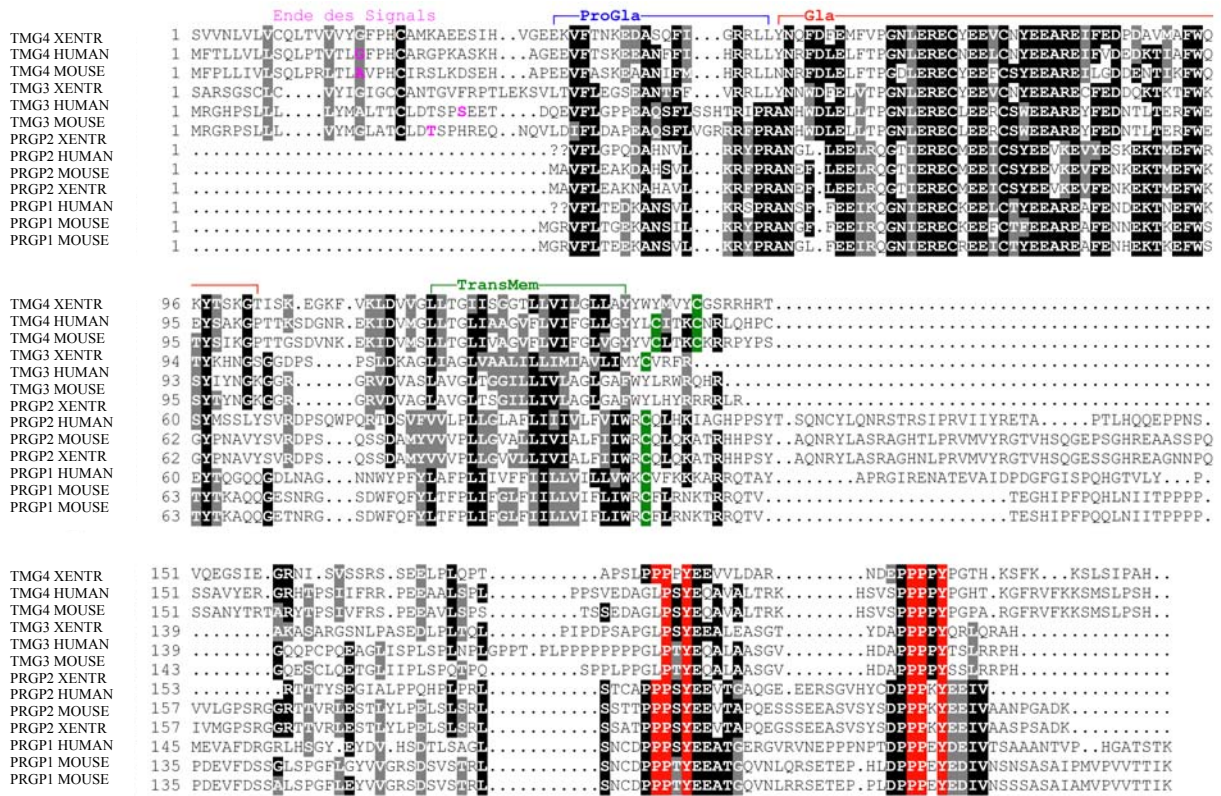


Abb. 1.5 Homologievergleich der neuen Gla-Proteinfamilie verschiedener Arten

In der Abbildung 1.5 ist zu erkennen, dass beim Menschen (HUMAN), der Hausmaus (MOUSE) und dem Tropischen Krallenfrosch (XENTR) die Proteinfamilie im Genom vorhanden ist und somit auch die Proteine exprimiert werden, was auch durch cDNA Synthese, ausgehend von mRNA in verschiedenen Geweben, Organen und Skelettkompartimenten des Menschen untersucht worden ist (siehe Abbildung 1.6).

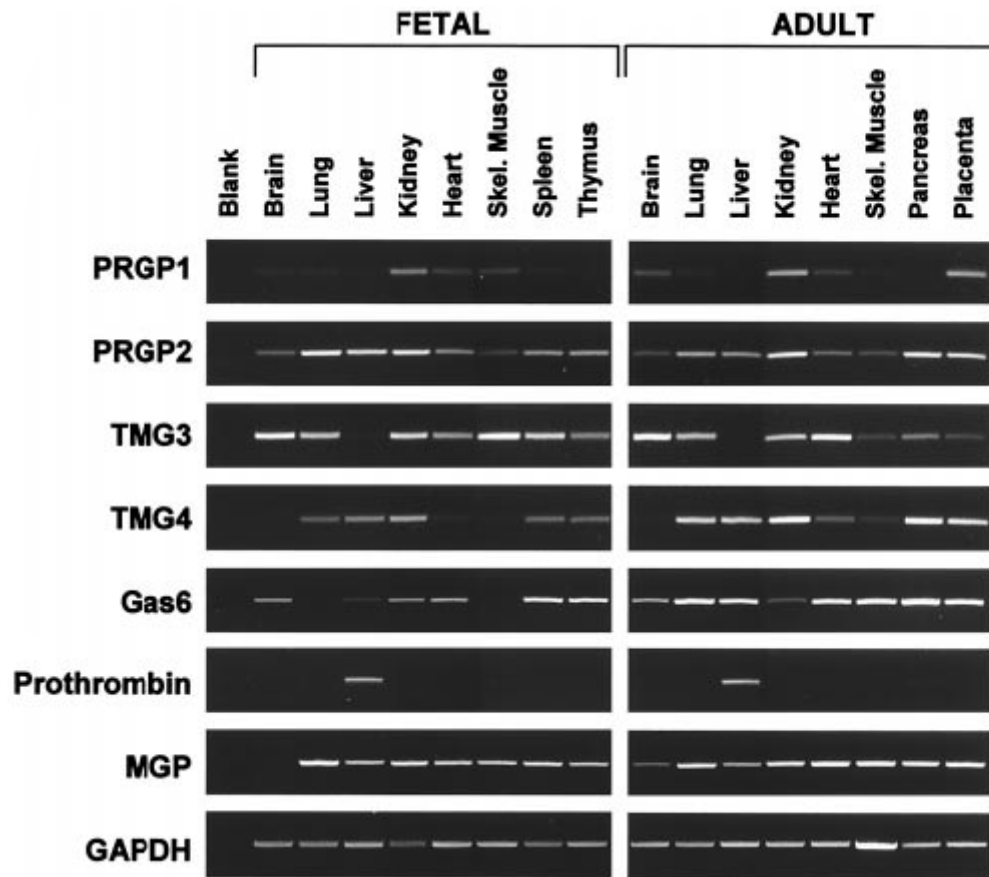


Abb. 1.6 mRNA Gewebeverteilung verschiedener Gla-Proteinen nach Kulman, Harris 2007

Dieses artenübergreifende Vorkommen der Proteinfamilie - man spricht auch von stark konservierten Merkmalen - deutet auf eben diese Bedeutung der Gla-Domäne hin, gestützt durch das ubiquitäre Vorkommen der Proteine im jeweiligen Organismus, und die damit abgeleiteten Arbeitshypothesen, wie z.B. eine kalziumvermittelte Proteinbindung. Denkbar wäre auch eine Signalkaskade die durch eine Proteinbindung ausgelöst wird. Weitere Überlegungen folgen im Diskussionsteil.

1.2 *Gammacarboxylierung*

Der bereits erwähnten γ -Carboxylierung kommt eine besondere Bedeutung zu. Die Carboxylierung wird in γ -Position zur Säurefunktion von Glutaminsäuren diverser Proteine durch das Enzym γ -Glutamylcarboxylase (GGCX), kurz γ -Carboxylase, durchgeführt. Die GGCX ist ein Membranenzym des rauen endoplasmatischen Retikulums (ER) und wird nahezu ubiquitär im Körper exprimiert. Sie ist in Herz, Lunge, Leber, Milz, Gehirn, Kolon, Jejunum, Hoden, Skelettmuskulatur, Prostata, Plazenta, Pankreas, Ovar, Nieren, Leukozyten und der Knochenmatrix zu finden. Die starke Verbreitung im Körper lässt erkennen, dass das Enzym und die ausgeübte Funktion von immenser Bedeutung für den Organismus sind.

Es ist bekannt, dass die γ -Carboxylierung für die Aktivität von vielen Proteinen von entscheidender Bedeutung ist. Dies gilt für die Vitamin K-abhängige Carboxylierung der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X und die gerinnungshemmenden Faktoren Protein C und Protein S im Besonderen. Außerdem werden auch das MGP, Osteocalcin und Liganden für Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie zum Beispiel der bekannteste Vertreter Gas6 (Growth-arrest-specific gene-6), γ -carboxyliert. Die Carboxylierung erlaubt speziell den Gerinnungsfaktoren die Bindung von Kalzium und die Bindung an Phospholipide. Vitamin K übernimmt die Funktion eines Koenzyms bei der γ -Carboxylierung. Zuerst muss das fettlösliche Vitamin aus der Nahrung aufgenommen werden. Die Aufnahme erfolgt im Dünndarm unter Einfluss von Pankreaslipasen, Emulgatoren und Gallensäure durch aktiven Transport in die Mukosazellen des Jejunums. An Chylomikronen und andere Lipoproteine gebunden gelangt Vitamin K mit der Lymphe in den Ductus thoracicus. Hier geht es über in den Blutkreislauf und gelangt so zu allen Geweben (siehe Abbildung 1.7). Im ER angekommen, muss es erst durch eine NADPH/H⁺ abhängige Chinonreduktase zum Hydrochinon reduziert werden und erhält so seine aktive Form. Durch Einwirkung von Sauerstoff entsteht das Vitamin K-Epoxid (siehe Abbildung 1.9). Dieses Epoxid kann bei der, durch das GGCX Enzym vermittelten, γ -Carboxylierung ein Proton vom Glutamylresten der Vitamin K-abhängigen Proteine binden und gibt so die Bindungsstelle für CO₂ frei, welches sich nun an die Glutaminsäurereste anlagert. Es entsteht die γ -carboxylierte Form der Glutaminsäure. Durch Hilfe der Vitamin K-Epoxidreduktase (VKOR) wird die Ausgangsform des Vitamin K-Kreislaufs hergestellt, das Menadion, bzw. 2-Methyl-1,4-naphtochinon (siehe Abbildung 1.9). Diese Epoxid-Reduktase besteht aus 2 Untereinheiten, die zusammen einen aktiven Enzymkomplex ausbilden. Die Aktivität des Vitamin K ist auf die RedOx-Funktion im Vitamin K-Kreislauf zurückzuführen, in welchem es zwischen seiner oxidierten Chinonform und der reduzierten Hydrochinonform wechseln kann, dem Ausgangsmolekül des Kreislaufs.

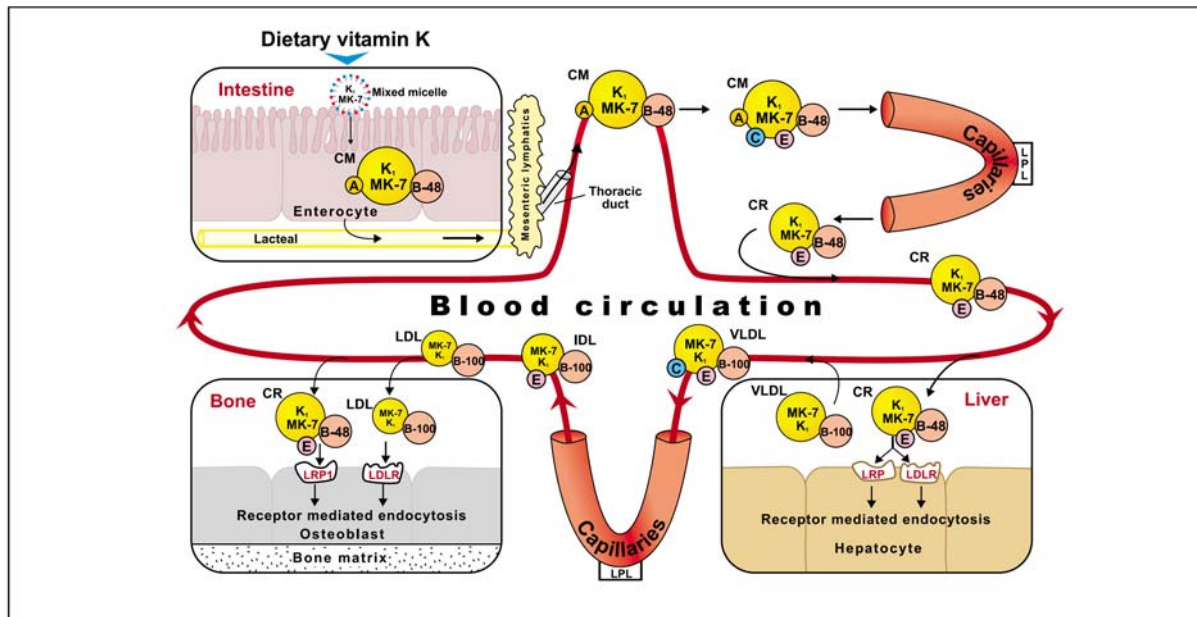


Abb. 1.7 Aufnahme, Transport und zelluläre Aufnahme von Vitamin K in Form von Phyllochinon (V₁) und Menaquinon (MK-7); Legende: Triglyzeride (TG), Lipoproteinlipase (LDL), Very Low Density Lipoproteins (VLDL), (LRP1), Lipoproteinrezeptoren (LDLR, LRP1), Chylomikronen (CM), Chylomikronenüberreste (CR), Apolipoproteine (apoA, apoB-48, apoB-100, apoC, apoE) nach Shearer, Newman 2008

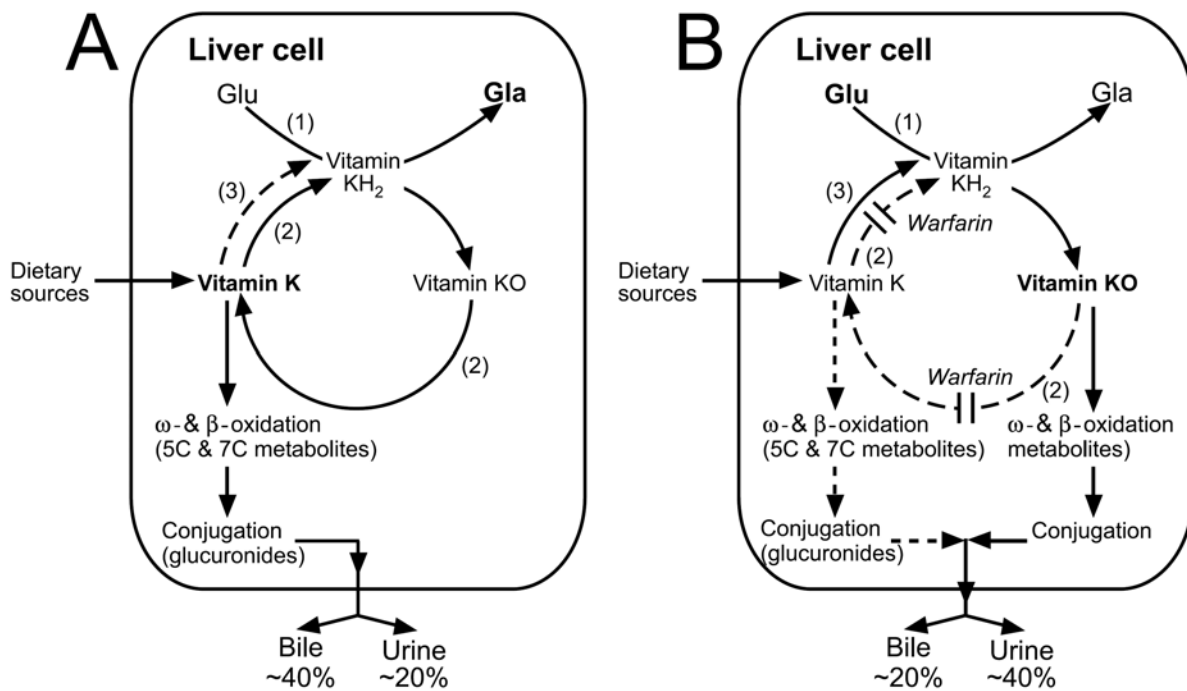


Abb. 1.8 Hepatischer Metabolismus von Vitamin K in Anwesenheit (A) und Abwesenheit (B) von Warfarin nach Shearer, Newman 2008

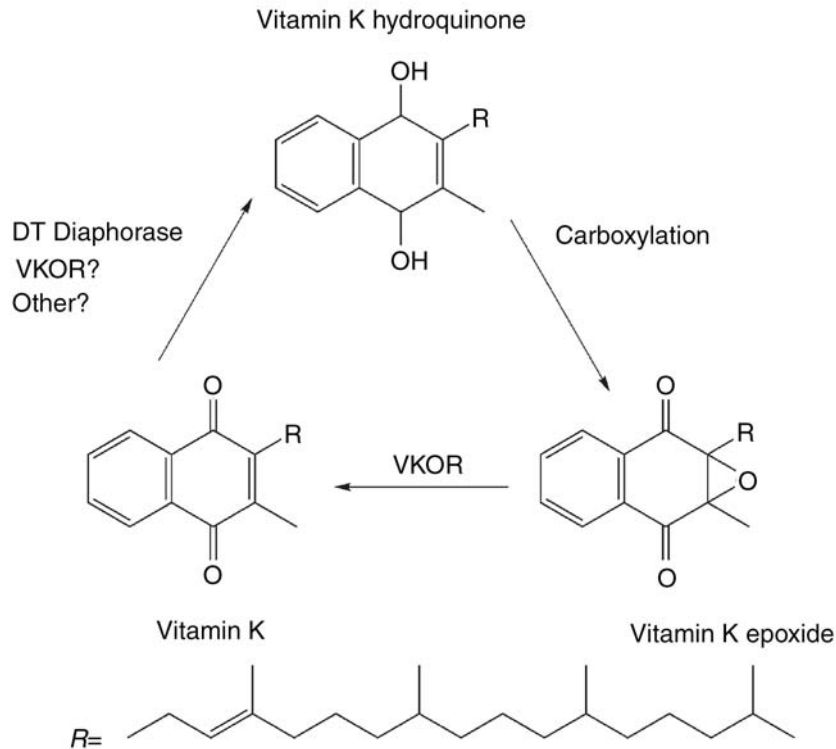


Abb. 1.9 Vitamin K-Kreislauf nach Stafford 2005

Die Carboxylierungsreaktion kann durch Zugabe von verschiedenen Cumarinderivaten inhibiert werden. Zu den bekanntesten Cumarinderivaten zählen Warfarin und Phenprocoumon (Marcumar®). Sie wirken als kompetitive Vitamin K-Antagonisten und verhindern so eine γ -Carboxylierung der Prothrombinfaktoren (siehe Abbildung 1.8). Die Wirkung setzt mit einer Latenz von 6 h ein und nach 36-48 h ist die volle Wirkstärke erreicht.

1.3 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es einen möglichen plasmatischen Bindungspartner für die Ektodomäne der Transmembranproteine zu finden. Der Bindungspartner selbst oder die Funktion der neuen Gla-Proteine könnten unter Umständen für therapeutische Zwecke verwertet werden. Der therapeutische Einsatz des Bindungspartners oder eines Analogons kann möglicherweise aus der Funktion der Gla-Proteine, welche in Studien ermittelt werden kann, abgeleitet werden. Das Projekt beginnt mit der rekombinanten Produktion der Ektodomänen und deren Modifikationen. Ein erstes Zwischenziel stellte die stabile Expression der rekombinant hergestellten Ektodomänen und deren Reinigungsverfahren dar. Mit diesem Material werden Bindungsstudien durchgeführt. Die Bindungsstudien sollen aufklären ob eine Protein- oder zelluläre-Bindung mit den Gla-Proteinen eingegangen wird. Die Studien werden sowohl mit den modifizierten Proteinen, als auch mit nativen Proteinen durchgeführt. Es werden Bindungsassays etabliert, welche eine immanente Bindung (Bindungsassays mit immobilisierten Gla-Proteinen; vgl. 2.24 Oberflächen-Plasmon-Resonanzspektroskopie), als auch einen Signalkaskaden-abhängigen Bindungsprozess (zelluläre-Bindungsassays; vgl. 2.28 Durchflusszytometrie) erfassen. Ein parallel durchgeführter Ansatz soll die in der Literatur bisher nur theoretisch bestätigte Lokalisation der Proteinfamilie in der Zellmembran – durch statistische Software-Berechnungen (vgl. 2.5 PCR-Konstrukte) und eines hydrophoben Peptidabschnitts in der Aminosäuresequenz der Gla-Proteine, welcher als Kennzeichen für Membranproteine bezeichnend ist [vgl. Kulman, Harris 2001] – durch ein Fluoreszenzmikroskopisches-Verfahren zusätzlich bestätigen. Die Vielfältigkeit der detektierten Bindungspartner wird im Anschluss an die erwähnten Bindungsassays durch *Magnetic Beads* Separation der Bindungspartner zuerst selektiert und nachfolgend durch massenspektrometrische-Auswertung der potentiellen Bindungspartner und Ausschlussverfahren spezifiziert [vgl. 3.2.3 Massenspektrometrie]. Nach dem Ausschlussverfahren werden mit dem verbleibenden potentiellen Bindungspartner in selektiven Bindungsversuchen erneut Studien durchgeführt, um das Bindungsereignis zu bestätigen. Abschließend werden die Ergebnisse diskutiert und mögliche Ansätze als auch Aussichten für weitere Forschungsansätze in der Schlussfolgerung präsentiert.

II. Material und Methoden

In den einzelnen Methoden gewidmeten Kapiteln entsprechen die Begriffe für die verwendeten Materialien denen, die in den optional am Ende des betreffenden Kapitels befindlichen Tabellen aufgeführt worden sind.

2.1 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR) dient der exponentiellen *in vitro* Anreicherung von Nukleotidsequenzen, ausgehend von mehreren Nukleotidsequenzen oder definierten Einzelsequenzen [Saiki, Gelfand 1988]. In dieser Arbeit wurde das Verfahren eingesetzt, um die für PRGP1, PRGP2, TMG3 und TMG4 kodierenden Gene zu klonieren. Der zyklisch verlaufende PCR Prozess basiert auf der Fähigkeit der Polymerasen *template*-DNA (generisch oder artifiziell) zu amplifizieren. Die beiden, für diesen Vorgang benötigten, Oligonukleotidprimer binden am proteinogenen, bzw. nicht-proteinogenen DNA-Strang, am Rand der Nukleotidsequenz, die amplifiziert werden soll (Hybridisierung). Die Kettenreaktion startet mit der Hitze-Denaturierung (95 °C, 5 min) der DNA-Matrize. An die jetzt vorliegenden DNA Einzelstränge können die Primer binden (Annealing) und die Polymerase, ausgehend von diesen Primern, unter Verbrauch von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) den fehlenden, komplementären Einzelstrang von 5' → 3' Richtung synthetisieren (Elongation). Die Anzahl der Zyklen n bestimmt die Anzahl der amplifizierten Moleküle (2^{n-1}) abhängig von der eingesetzten Menge.

Das durch die PCR gewonnene Ausgangsmaterial wurde teilweise, ausgehend von einer cDNA Bank oder fertigen Klonen, durch Anhängen von sogenannten *tags* modifiziert. *Tags* sind kleine Nukleotidabschnitte, welche nicht komplementär mit dem entsprechenden Gen hybridisieren, aber durch die Amplifikationsvorgänge während der PCR Reaktion vervielfältigt und somit an das eigentliche Gen angehängt werden. Des Weiteren wurden durch dieses Vorgehen auch Enzymschnittstellen dem eigentlichen Gen hinzugefügt, um es in einen Vektor zu klonieren, der dann als Ausgangsplasmid für die Proteinexpression benutzt wurde. Außerdem wurde die PCR auch für Mutationen eingesetzt, welche der Deletion, dem (punktuellen) Ersatz oder Insertion von Basen dienen (vgl. 2.2 Mutagenese).

Die Polymerisationszeit wird durch die Aktivität der Polymerase bestimmt. Die eingesetzte Pfu Ultra- und Phusion-Polymerase generieren durchschnittlich 1000 Basenpaare pro Minute

(bp/min). Die Primer Annealing Temperatur (T_A), eine spezifische Oligonukleotid-DNA Bindungstemperatur, wird den entsprechenden Oligonukleotiden angepasst. Die Primer selbst wurden von der Firma (Fa) Operon (vgl. 8.2 Verwendete Primer / Oligonukleotidliste) synthetisiert und entsprechend den Vorgaben gestaltet. So konnten Restriktionsschnittstellen und andere Erweiterungen eingefügt werden, sowie Start- oder Stop-Codons. Diese Primer bestanden aus dem entsprechenden *Annealing* Bereich, einem DNA Abschnitt, den die Primer komplementär zur DNA enthalten, und sogenannten „freien“, überhängenden, nicht bindenden Nukleinsäureabschnitten, die zueinander komplementär waren. Für die Reaktion wurden 10 pmol des *forward* und *reverse* Primers eingesetzt. Die entsprechende Menge an *template*-Material ist abhängig vom Ausgangsmaterial (10-20 ng Plasmid DNA; 1-2 µl cDNA, Ambion; 1 ng PCR-DNA). Nukleotide für die Amplifikation waren Bestandteil der bezogenen Polymerasekits und wurden als dNTP Mix (0,5-1 µl) mit den anderen Bestandteilen des Reaktionsansatzes gemischt. Die Polymerasen wurden mit Volumina zwischen 0,5-1 µl eingesetzt und die Polymerasepuffer entsprechend der Konzentrationsangaben des Herstellers mit Water PCR Reagent von Fa Sigma verdünnt für ein Gesamtansatzvolumen von 50 µl. Der DNA -Ansatz wurde unter entsprechender Programmierung im Thermocycler Gene Amp PCR System 9700 der Fa Applied Biosystems amplifiziert.

Thermocyclerprogramm:

Phase	Initiale Denaturierung	Zyklus (z.B. 1-30)	Verlängerung (Extension)
Denaturierung	94 °C, 3-5 min	94 °C, 1 min	
Primer Anlagerung		55-70 °C, 20 sec	
Polymerisation		68 °C, bzw. 72 °C, 0,5-3 min	68 °C, bzw. 72 °C, 7 min

Tab. 2.1 Thermocyclerprogramm für die Durchführung einer PCR

Template-Material	<ul style="list-style-type: none"> • 10-20 ng Plasmid DNA • 1-2 µl human liver cDNA Bank (entspricht 0,5-1,0 ng), Fa Ambion • 1,0 ng DNA Amplifikat aus PCR oder nested-PCR
Thermocycler	Gene Amp PCR System 9700, Fa PE Applied Biosystems
eingesetzte Polymerasen	<ul style="list-style-type: none"> • Taq-Polymerase, aus <i>Thermophilus aquaticus</i>, wurde für A-Tailing und kurze Amplikons eingesetzt Perfect Taq DNA Polymerase 1 U/µl, Fa 5Prime

	<ul style="list-style-type: none"> • Pfu Ultra-Polymerase, aus <i>Pyrococcus furiosus</i>, mit <i>proof reading</i> Funktion, die eine geringere Fehlerwahrscheinlichkeit garantierte, wurde für die Klonierung rekombinanter Plasmide benutzt Pfu Ultra High Fidelity DNA Polymerase 2,5U/μl, Fa Stratagene • Phusion-Polymerase, eine rekombinante, fusionierte Polymerase aus einer <i>Pyrococcus furiosus</i> ähnlichen Polymerase und einer DNA Bindungsdomäne Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, 2 U/μl, Fa Finnzymes
Pufferlösungen	<ul style="list-style-type: none"> • 10 x PCR Buffer, Fa 5Prime • 10 x Pfu Ultra Puffer, Fa Stratagene • Phusion Puffer (5 x GC Puffer für GC reiches Ausgangsmaterial; 5 x HF Puffer für normalverteilte Nukleotide im Amplifikationsbereich), Fa New England Biolabs
Nukleotide	dNTP Mix liegt den jeweiligen Polymerasen bei
Primer	(8.2 Verwendete Primer / Oligonukleotidliste), Fa Operon die eingesetzte Primermenge betrug 10 pmol
Ansatzvolumen	ad 50 μl H ₂ O Water PCR Reagent, Fa Sigma
Berechnung der T_M:	$T_M = (A + T) \times 2 \text{ °C} + (G + C) \times 4 \text{ °C}$
PCR: Touchdown PCR	$T_A = T_M - 5 \text{ °C}$ $T_A = T_M - 5 \text{ °C} + 2 \text{ °C}$ $T_M =$ melting temperature (sollte zwischen 55 °C und 64 °C liegen; ab dieser Temperatur lösen sich die Primer wieder von der <i>template</i> -DNA) (A + T) = Anzahl der Nukleinsäuren Desoxyadenosin/-thymidin (G + C) = Anzahl der Nukleinsäuren Desoxyguanosin/-cytidin

Tab. 2.2 Materialien und Formeln zur Durchführung einer PCR

2.2 Mutagenese:

Die Mutagenese ist eine Technik zur gezielten Mutation von DNA-Abschnitten. Dabei können Nukleinsäuren entweder deletiert, eingefügt oder variiert werden. Der Vorgang ist analog zu der bereits beschriebenen PCR. Der Unterschied besteht in der Wahl der Oligonukleotide. Die Primer werden so gewählt, dass sie im Bereich des zu mutierenden DNA Abschnitts *annealen*, aber die zu verändernden Nukleinsäuren nicht enthalten (Deletion), zusätzlich enthalten (Insertion) oder alternative Nukleinsäuren als Austauschmöglichkeit (Variation) enthalten. Zuerst wird die *template*-DNA, bzw. das Plasmid denaturiert und liegt dann in Form eines Einzelstrangs vor. Bei entsprechender Temperatur (s.u.) können die Mutageneseprimer an den jeweiligen, zumindest teilweise, komplementären DNA-Strang binden. Anschließend verlängert die zugegebene Polymerase ausgehend von den Primerbindungsstellen des abgelesenen DNA-Strangs. Somit entsteht ein neuer mutagenisierter DNA-Strang, dessen Mutation durch die Mutageneseprimer mit veränderter Nukleinsäureabfolge, bezogen auf die *template*-DNA, bestimmt wird. Die ursprüngliche *template*-DNA wird nach abgeschlossener Amplifikation durch Zugabe des Restriktionsenzym Dpn I (Fa Stratagene) abgebaut, da Dpn I nur methylierte DNA schneidet. Methylierte DNA entsteht nur nach Transformation oder Transfektion (vgl. 2.9 Transformation und 2.13 Transfektion) von Plasmiden in kompetenten Zellen. Die Methylierung markiert bei eukaryotischen Zellen aktive und inaktive Bereiche des DNA-Strangs und dient der Erkennung von Fremd-DNA, die dann durch Restriktionsenzyme abgebaut werden kann. DNA, welche durch PCR-Technik entstanden ist, ist immer demethyliert und wird somit nicht vom Enzym erkannt und verdaut. Diese Plasmid-DNA wird nun in kompetente Zellen überführt, welche die Fähigkeit besitzen, *genickte* (Einzelstrangbruch entsteht durch nicht verknüpfte Nukleinsäureenden; 3' Ende muss mit 5' Ende verknüpft werden und umgekehrt) DNA-Stränge zu verknüpfen. Die Durchführung ist analog zur PCR Methode (vgl. 2.1 Polymerase Kettenreaktion) durchgeführt worden. Polymerasen und Thermocycler Programmierung wurden angepasst.

Thermocyclerprogramm:

Phase	Initiale Denaturierung	Zyklus (z.B. 1-18)	Verlängerung (Extension)
Denaturierung	95 °C, 1min	95 °C, 50 sec	
Primer Anlagerung		60 °C, 50 sec	
Polymerisation		68 °C, 1 min/kb Plasmid	68 °C, 7 min

Tab. 2.3 Thermocyclerprogramm zur Durchführung einer Mutagenese

Template-Material	<ul style="list-style-type: none"> • 10-20 ng Plasmid DNA • 1-2 µl human liver cDNA Bank (entspricht 0,5-1 ng), Fa Ambion • 1 ng DNA Amplifikat aus PCR oder nested-PCR
Thermocycler	Gene Amp PCR System 9700, Fa PE Applied Biosystems
Primer	(8.2 Verwendete Primer / Oligonukleotidliste), Fa Operon: die eingesetzte Menge betrug 10 pmol Die Primer sollten zwischen 25 und 45 <i>basepairs</i> (bp) lang sein und einen GC Gehalt von mindestens 40 % aufweisen. Die T_M sollte ≥ 78 °C betragen
Mutagenese Kit	Quick Change II XL Site-Directed, Fa Stratagene: Pfu Ultra High Fidelity polymerase (2,5 U/µl) 10x Pfu Ultra Puffer QuikSolution reagent dNTP Mix Dpn I (10 U/µl)
	Water PCR Reagent, Fa Sigma ad 50 µl
Berechnung der T_M	$T_M = 81,5 \text{ °C} + (0,41 \times (\%GC) \times 1 \text{ °C}) - (675 \times 1 \text{ °C}) / N - (\% \text{mismatch} \times 1 \text{ °C})$ <p> T_M = melting temperature sollte ≥ 78 °C betragen (%GC) = prozentualer Anteil der Nukleinsäuren Desoxyguanosin/-cytidin, bezogen auf alle Nukleinsäuren des betroffenen Abschnitts N = Anzahl aller Nukleotide % mismatch = prozentualer Anteil der Nukleinsäuren im Primer, welche nicht mit der <i>template</i>-DNA binden </p>
Kompetente Zellen	XL10-Gold Ultracompetent cells, Fa Stratagene

Tab. 2.4 Materialien und Formeln zur Durchführung einer Mutagenese

2.3 Auftrennung und Reinigung von PCR- und geschnittenen Plasmidfragmenten

Die Reinigung von geschnittenen PCR- und Plasmidfragmenten (vgl. 2.6 Enzymatischer Verdau und anschließende Reinigung von DNA) beruht auf dem gleichen Prinzip. Nukleinsäuren können im z.B. 1 %-igen (m / V) Agarosegel (Fa Biozym) nach Masse und Konformation (linear, offenzirkulär, superhelikal) aufgetrennt werden. Die durch das Zuckerphosphatrückgrat negativ geladenen Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld zur Anode. Entsprechend ihrer Größe wandern kleine Fragmente schneller durch die Gelmatrix und befinden sich näher an der Anode; große Fragmente laufen langsamer durch das Gel. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid (Roth) in die DNA erfolgt die Anfärbung der DNA-Banden im Gel, die dann unter UV-Licht ausgewertet, bzw. dokumentiert werden. Anhand eines mitgeführten DNA-Standards können ungefähre Größenabschätzungen der jeweiligen DNA-Banden durch Vergleich der Laufstrecken vorgenommen werden. Der Verlauf der elektrophoretischen Trennung kann bei Tageslicht durch Probenpufferzugabe von farbigen Markern wie z.B. Xylene Cyanol (Fa Sigma), bzw. Bromphenol Blau kontrolliert werden. Xylene Cyanol läuft ungefähr auf einer Höhe von 4000 bp, Bromphenol Blau bei 500 bp. Außerdem ist EDTA im Probenpuffer enthalten, um enzymatische Reaktionen (Amplifikation oder Verdau von DNA) zu stoppen.

Durch Elektrophorese werden meistens DNA-Fragmente aufgetrennt, die zum Beispiel aus einem PCR- Ansatz mit *template*-DNA (Vektor-DNA) und amplifiziertem DNA-Fragment stammen. Es können auch enzymatisch verdaute Fragmente oder Plasmide gereinigt werden. Das gereinigte DNA-Fragment oder der Plasmidanteil können dann für eine weitere Ligation benutzt werden. Die DNA-Fragmente werden dann als *Insert*-DNA bezeichnet, der geschnittene Vektor wird nach der Ligation als Plasmid bezeichnet (vgl. 2.7 Ligation). Die gewünschten DNA-Fragmente, bzw. das Plasmid können aus der Agarosegelmatrix isoliert werden (vgl. 2.6 Enzymatischer Verdau und anschließende Reinigung von DNA).

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine horizontale Gelelektrophorese (Fa Bio-Rad) mit einem 1 %-igen (m / V) Agarosegel durchgeführt. 2 g Agarose wurden in 200 ml der Arbeitslösung des SB-Puffers gelöst und im Mikrowellenherd ca. 7 min aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst waren. Nach Abkühlung auf ca. 60 C° wurde die Mischung in eine Gelform gegossen [Sambrook, Fritsch 1989]. Die DNA-Proben wurden mit 5 µl Stopmixlösung versetzt und in die Gelkammern überführt. Die Elektrophorese dauerte ungefähr 30 min bei 340 V im SB-Puffer. Als Standard wurden ca. 5 ng der 1 kb ladder (Fa New England Biolabs) bei jedem Gel mitgeführt. Nach dem Anfärben der DNA-Fragmente

im Ethidiumbromidfärbebad für 15 min konnten die Gele mit dem Image Master VDS der Fa Pharmacia Biotech ausgewertet werden.

Netzteil	2301 Macrodrive Power Supply, Fa LKB Bromma
Gelkammer	Gelkammer für 20 x 30 cm Gele, Fa Renner GmbH
Geldokumentationseinheit	Image Master VDS, Fa Pharmacia Biotech
Gel	LE Genetic Pure, Fa Biozym
Probenpuffer/Stopmix	2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 25 mg Bromphenol Blau, Fa Sigma 25 mg Xylene Cyanol, Fa Sigma 2 g Saccharose, Fa Roth ad 10 ml H ₂ O
Ethidiumbromidstammlösung	Ethidiumbromid, Fa Roth: Färbekonzentration im Wasserbad: 50 ng/ml Färbedauer: 15-25 min
Reinstwasser (Milli-Q[®])	hergestellt mit: Millipore Advantage A10 Anlage, Fa. Millipore
SB-Puffer	Stammlösung: 0,25 M Natriumhydroxid 0,25 M Natriumborat Decahydrat pH 8,0 Arbeitslösung: Die Stammlösung wurde mit Milli-Q [®] -Wasser (H ₂ O) 1/25-fach verdünnt.
1 kb Marker	1 kb ladder 500 µg/ml, Fa New England BioLabs: Ansatz: 250 µl 1 kb ladder 3250 µl H ₂ O 500 µl Stopmix
alle Chemikalien wurden von der Fa Merck Reinheitsgrad p.a. bezogen; andere Hersteller sind angegeben	

Tab. 2.5 Materialien für die Auftrennung und Reinigung von PCR- und geschnittenen Plasmidfragmenten

2.4 Isolierung von Nukleinsäurefragmenten aus der Gelmatrix

Die angefärbten DNA-Fragmente können wieder aus dem Gel extrahiert werden, indem man das Gel unter einem UV-Licht positioniert, und die fluoreszierenden Banden der gewünschten Größe mit Hilfe eines Skalpell ausschneidet. Die ausgeschnittene Gelmatrix wird mit den darin enthaltenen Nukleinsäuren in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits lysiert. Das Gel wird in einem Guanidinthiocyanat Puffer bei 50 °C aufgelöst. Nach 10 min gibt man Isopropanol hinzu und überführt die Lösung auf eine im Kit enthaltene Silikasäule. Die Säule steckt in einem Eppendorfgefäß und wird 1 min bei 17900 x g zentrifugiert. Die Nukleinsäuren binden an die Silikaoberfläche und die durchgelaufenen Puffersubstanzen werden verworfen. Durch Waschen und erneutes Zentrifugieren mit einem ethanolhaltigen Puffer werden die restlichen an der Säule gebundenen Puffersalze von dieser gespült und verworfen. Die Elution der DNA erfolgt mit 35 µl MQ Wasser. Die so gewonnenen Nukleinsäuren können weiter verwendet (Lagerung bei 6 °C) oder für Langzeitaufbewahrung bei - 20 °C eingefroren werden.

Gelextraktionskit	QIAquick® Spin Kit, Fa Qiagen: QG-Puffer, Guanidinthiocyanat PE-Puffer, Ethanolpuffer
Elutionslösung	Water PCR Reagent, Fa Sigma

Tab. 2.6 Materialien für die Isolierung von Nukleinsäurefragmenten aus der Gelmatrix

2.5 PCR-Konstrukte

Die für die Arbeit verwendeten, grundlegenden, Sequenzen finden sich unter den in der Einleitung aufgeführten Accession Numbers in der Human Reference Protein Database (www.hprd.org) oder in der Proteindatenbank des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). Zur Verdeutlichung der hergestellten Konstrukte möchte ich eine kurze Übersicht aufzeigen:

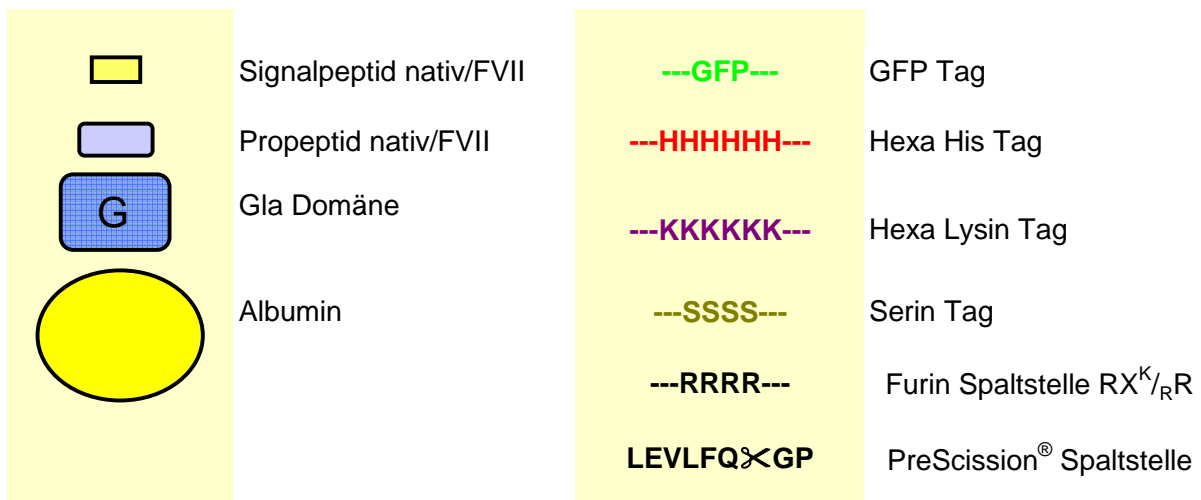


Abb. 2.1 Symbole zur farblichen Markierung der Proteinsequenzabschnitte (vgl. 8.1 Exprimierte Proteinsequenzen, basierend auf Plasmidkonstrukten)

Die exprimierten Proteinsequenzen (vgl. 8.1 Exprimierte Proteinsequenzen, basierend auf Plasmidkonstrukten), dargestellt als One-Letter Amino Acid Code [IUPAC-IUB 1968], wurden als entsprechende PCR-Amplifikate hergestellt. Die hier abgebildete farbliche Gestaltung wurde ebenfalls im Anhang verwendet, um eine optische Trennung der Proteinabschnitte zu erkennen (vgl. Abb. 3.1, 3.2). In der Tabelle (Tab. 2.7) sind die Beschreibungen der Konstrukte zu finden; nähere Informationen sind unter den Klonnummern im Anhang (vgl. 8.1 Exprimierte Proteinsequenzen, basierend auf Plasmidkonstrukten) aufgeführt.

Klon Nr	Klonname	Vektor	Insert	Resistenz	Protokoll Nr
1383	pIRES-1383	pIRES	GFP aus pTracerSV40 Vektor	amp	192.4
1533	pCR4-1533	pCR4	PRGP2 + Hist-tag in pCR4	amp	192.2
1534	pCR4-1534	pCR4	TMG3 + Hist-tag in pCR4	amp	192.3
1535	pCR4-1535	pCR4	TMG4 + Hist-tag in pCR4	amp	192.4
1536	pIRES-1536	pIRES-529	PRGP2 + Hist-tag in pIRES 529	amp	192.2
1537	pIRES-1537	pIRES-529	TMG3 + Hist-tag in pIRES 529	amp	192.3
1538	pIRES-1538	pIRES-529	TMG4 + Hist-tag in pIRES 529	amp	192.4
1539	pCR4-1539	pCR4	PRGP2 + Lys-tag in pCR4	amp	192.2
1540	pCR4-1540	pCR4	TMG3 + Lys-tag in pCR4	amp	192.3
1541	pCR4-1541	pCR4	TMG4 + Lys-tag in pCR4	amp	192.4
1542	pIRES-1542	pIRES-529	PRGP2 + Lys-tag in pIRES 529	amp	192.2
1543	pIRES-1543	pIRES-529	TMG4 + Lys-tag in pIRES 529	amp	192.4
1544	pCR4-1544	pCR4	PRGP2 + HisLys-tag in pCR4	amp	192.2
1545	pCR4-1545	pCR4	TMG4 + HisLys-tag in pCR4	amp	192.4
1546	pCR4-1546	pCR4	PRGP2 + Strep-tag in pCR4	amp	192.2
1547	pCR4-1547	pCR4	TMG3 + Strep-tag in pCR4	amp	192.3
1548	pCR4-1548	pCR4	TMG4 + Strep-tag in pCR4	amp	192.4
1549	pIRES-1549	pIRES-529	PRGP2 + Strep-tag in pIRES	amp	192.2
1550	pIRES-1550	pIRES-529	TMG3 + Strep-tag in pIRES	amp	192.3
1551	pIRES-1551	pCR4	PRGP2 + GFP in pCR4	amp	192.2
1552	pIRES-1552	pCR4	TMG4 + GFP in PCR4	amp	192.3
1553	pCR4-1553	pCR4	PRGP2	amp	192.2
1554	pCR2.1-1554	pCR2.1	TMG3 hergestellt von der Fa Geneart	amp	192.3
1555	pCR4-1555	pCR4	TMG4	amp	192.4
1558	pIRES-1558	pIRES-1334	TMG4 mit Albumin vorne	amp	192.5
1559	pIRES-1559	pIRES-1430	Vorklon von 1558/1560 = TMG4 mit Signalpeptid und Propeptid von FVII und His-tag	amp	192.5
1560	pIRES-1560	pIRES-1559	TMG4 mit His-tag und PreScission und Albumin C-terminal	amp	192.5
1575	pIRES-1575	pIRES-1334	Albumin N-terminal + TMG3	amp	192.5
1592	pIRES-1592	pIRES-1430	Vorklon von 1593/1575 = TMG3 mit Signalpeptid und Propeptid von FVII und His-tag	amp	192.5
1595	pIRES-1595	pIRES-1434	TMG3 mit His-tag und PreScission und Albumin C-terminal	amp	192.5
1686	pCR4-1686	pIRES-997	GFP Fragment mit deletierter BamHI site in der DNA-Sequenz	amp	192.3 /192.4

Klon Nr	Klonname	Vektor	Insert	Resistenz	Protokoll Nr
			des GFP		
1689	pIRES-1689	pIRES-529	TMG3nativ+GS linker+GFP	amp	192.3
1690	pIRES-1690	pIRES-529	TMG4nativ+GS linker+GFP	amp	192.4
1928	pIRES-1928	pIRES-529	TMG3 nativ ohne HSA +His+Ser+Lys Ausgangskonstrukt für 1931/1933	amp	192.17
1929	pIRES-1929	pIRES-529	TMG4 nativ ohne HSA +His+Ser+Lys Ausgangskonstrukt für 1932/1934	amp	192.17
1931	pIRES-1931	pIRES-1383	TMG3 in 1383 (GFP inkl. EcoRI)	amp	192.17
1932	pIRES-1932	pIRES-1383	TMG4 in 1383 (GFP inkl. EcoRI)	amp	192.17
1933	pIRES-1933	pIRES-1383	TMG3 in 1383 (GFP)	amp	192.17
1934	pIRES-1934	pIRES-1383	TMG4 in 1383 (GFP)	amp	192.17
2122	pIRES-2122*	pIRES-1931	TMG3+ pmax GFP ~eGFP mit Stop	amp	192.17
2123	pIRES-2123*	pIRES-1932	TMG4+ pmax GFP ~eGFP mit Stop	amp	192.17

Tab. 2.7 Klonnummern der Plasmide mit Beschreibung der eingefügten DNA-Sequenz; *Plasmide wurde nicht zur Expression und weiteren Versuchen verwendet

Die fett gedruckten Plasmide (pIRES-1560, pIRES-1595, pIRES-1689, pIRES-1690) wurden hauptsächlich eingesetzt. Die entsprechend exprimierten Proteine sind zur Verdeutlichung, im Ergebnisteil der Arbeit, schematisch dargestellt.

Nach der Transformation (vgl. 2.9 Transformation) stellte sich heraus, dass die nativen Proteinsequenzen mit Signal-, Propeptid und Peptidanteil bis zum Transmembrananteil ausschließlich, inklusive diverser Modifikationen wie *tags*, nur eine äußerst schlechte Proteinexpression lieferten (vgl. 3.1.1 Design der DNA-Sequenz, 2.13 Transfektion). Die Expressionsleistung wurde entweder visuell nach Western-Blot und Antikörperinkubation (vgl. 2.18.1.2 Blotten) oder per ELISA (vgl. 2.18.2 ELISA) beurteilt.

Signal- und Propeptid der Gla-Proteine wurden gegen das entsprechende Pendant des humanen Koagulations-Faktors VII ausgetauscht. Nach der Modifikation des Signal- und Propeptidanteils der Proteine konnte die Expressionsleistung signifikant gesteigert werden ohne die Abspaltung von Signal- und Propeptid nach PTM zu beeinflussen. Außerdem zeigte sich nach der Proteinsequenzierung, dass die gereinigten Proteine eine sehr gute γ -Carboxylierung aufwiesen (vgl. 2.18.3 Proteinsequenzierung).

Die Konstrukte wurden alle bezüglich ihrer Abspaltungsposition von Signal- und Propeptid mit Hilfe des online verfügbaren Programms SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/X; X = SecretomeP, TargetP, SignalP) untersucht und entsprechend optimiert [Nielsen, Engelbrecht 1997; Emanuelsson, Brunak 2007]. Das Programm benutzt statistische Berechnungen, basierend auf dem Markov Modell, zur Vorhersage von Spaltstellen in der Aminosäuresequenz, basierend auf bekannten Sequenzmodellen. Weitere Programme waren für grundsätzliche Proteininformationen dienlich.

- SecretomeP: nicht klassische Proteinsekretion
- TargetP: subzelluläre Lokalisation von Proteinen: Mitochondrien, Chloroplasten, Sekretionsweg usw.
- SignalP: Signalpeptid und Spaltstellenvorhersage

Für die Amplifikation der Gene ausgehend von der Ausgangs-DNA, der Leber cDNA Bank, wurden Primer (Oligonukleotide) eingesetzt, die entsprechend der DNA-Sequenz und Modifikationen designiert worden sind (vgl. 8.1 Verwendete Primer / Oligonukleotidliste).

2.6 Enzymatischer Verdau und anschließende Reinigung von DNA

Durch Verdau der PCR-Konstrukte konnten die Fragmente in Vektorsysteme ligiert werden (vgl. 2.7 Ligation), welche der Transfektion (vgl. 2.13 Transfektion) als pIRES- oder für weitere Modifikationen und zelluläre Amplifikation des genetischen Materials als pCR4-Vektoren dienlich waren. Die für die Ligation benötigten DNA-Fragmente können mit *blunt ends* oder *sticky ends* vorliegen. „Blunt ends“ entstehen durch PCR-Amplifikation oder Restriktionsenzyme welche die DNA entsprechend spalten können aus. Bei sogenannten „Blunt ends“ liegt das 3' Ende des komplementären und das 5' Ende des codogenen DNA-Stranges mit gleicher Länge vor, d.h. sie weisen keine überhängenden Nukleinsäuren auf. Als *sticky ends* bezeichnet man überhängende Nukleinsäuren an jeweils einem der beiden DNA-Strang-Enden. Die Enzyme wurden im definierten Verhältnis der DNA Menge hinzugesetzt und erkennen meistens palindromische Sequenzen, wie zum Beispiel die Sequenz GG(⌘)ATCC, die das Enzym BamHI als Spaltstelle erkennt und an spezifischer Stelle (⌘) schneidet. Je kürzer diese Erkennungssequenz, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit des Verdau im eingesetzten, unbekanntem DNA-Material. Man spricht von *single* oder *double cutter*, wenn das Enzym die eingesetzte DNA-Sequenz einmal, bzw. zweimal trennt.

Die benötigte Menge des jeweiligen Verdauungsenzyms wird in Units angegeben und 1 Unit (U) ist die Menge an Enzym, die 1 µg Referenz-DNA in 1 h bei 37 °C verdaut. Als Referenz-DNA dient der Lambda Phage (λ-Phage), die aus ca. 49000 bp besteht.

$$U = m_{\text{Plasmid}} \frac{l_{\text{Referenz-DNA}} \times n_{\text{Plasmid}}}{l_{\text{Plasmid}} \times n_{\text{Referenz-DNA}}} \times 1/\mu\text{g}$$

U: Units absolut

m_{Plasmid} : Masse des zu spaltenden Plasmids in [µg]

l_{Plasmid} : Länge des zu spaltenden Plasmids [bp]

n_{Plasmid} : Zahl der Schnittstellen auf dem Plasmid

$l_{\text{Referenz-DNA}}$: Länge der Referenz DNA, meistens Lambda Phage [bp]

$n_{\text{Referenz-DNA}}$: Zahl der Schnittstellen auf der Referenz-DNA

Die für den Verdau eingesetzten Puffer enthalten Magnesiumionen, als Koenzym für die Restriktionsenzyme und sind auf einen definierten, für die Enzyme optimalen pH Bereich eingestellt. Der Verdauvorgang findet im Bereich des Temperaturoptimums der eingesetzten Enzyme statt.

Enzyme	Erkennungssequenz (5'-3')	Überhang	REACT/ NEB- Puffer	Inkubations- temperatur (°C)	Methylierung (dam*/ dcm**)	dam:GmATC dcm: CmC(A/T)GG*
Apal	GGGCC/C	3'	4	30	dcm	CC _{(A/T)GG}
BamHI	G/GATCC	5'	3	37	-	-
<i>BglII</i>	<i>A/GATCT</i>	5'	3	37	-	-
ClaI	AT/CGAT	5'	1	37	dam	GAT _C
EcoRI	G/AATTC	5'	3	37	-	-
EcoRV	GAT/ATC	blunt	2	37	-	-
HindIII	A/AGCTT	5'	2	37	-	-
KpnI	GGTAC/C	3'	4	37	-	-
NheI	G/CTAGC	5'	4	37	-	-
NotI	GC/GGCCGC	5'	3	37	-	-
PinAI	A/CCGGT	5'	4	37	-	-
SpeI	A/CTAGT	5'	4	37	-	-
SphI	GCATG/C	3'	6	37	-	-
<i>SwaI</i>	<i>ATTT/AAAT</i>	<i>blunt</i>		25	-	-
XbaI	T/CTAGA	5'	2	37	dam	TCTAGA _{Tc}
XhoI	C/TCGAG	5'	2	37	-	-

Tab. 2.8 Enzyme und Puffer wurden von der Fa Invitrogen, sowie von der Fa New England Biolabs (*kursiv* gedruckt) bezogen; *dam Methylierung an Position N6 des Adenins, **dcm Methylierung an Position C5 des Cytosins

Das DNA-Material musste vor der Vereinigung von Vektor und PCR-Fragment erneut von Pufferbestandteilen der PCR, des Verdau (vgl. 2.3 Auftrennung und Reinigung von PCR- und geschnittenen Plasmidfragmenten) oder Zellproteinen/-kompartimenten nach zellulärer Amplifikation (vgl. 2.9 Transformation / 2.13 Transfektion und 2.11 Zelluläre Amplifikation und Reinigung von Plasmid-DNA) befreit werden. Als Alternative zur bereits erklärten Gelreinigung der DNA-Fragmente können kurze (bis 50 bp), durch den Verdau entstandene, DNA-Stücke oder Pufferreste durch eine Säulenchromatographietechnik entfernt werden. Für die Entfernung von kurzen Nukleotidresten, wie sie beim direkten enzymatischen Verdau von PCR-Amplifikaten entstehen oder zum Entfernen von Pufferbestandteilen anderer DNA Reaktionen wurde das QIAquick® PCR Purification Kit (Fa Qiagen) eingesetzt. Die DNA wird durch hohe Konzentrationen chaotroper Salze aus dem wässrigen Milieu verdrängt und an die Silikamatrix der präparativen Säulen pH-Wert abhängig gebunden. Die Säule hat eine Bindungskapazität von bis zu 10 µg DNA. Kurze Nukleotide ≤ 40 bp, die eine schwache Wechselwirkung zur Säulenmatrix aufweisen und auch Pufferbestandteile, werden durch mehrere Waschschrten bei einem pH-Wert ≥ 7,5 von der Säule gespült. Ein Teil verdauter DNA-Präparation oder PCR-Amplifikat wird zu diesem Zweck mit fünf Teilen PB Puffer versetzt, auf die mitgelieferten Einweg-Silikasäulen gegeben und bei 17900 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und es folgt ein Waschschrten mit 0,75 ml PE Puffer, der

durch erneute Zentrifugation entfernt wird. Die noch an die Säule gebundene DNA wird durch Zugabe von 30 µl H₂O durch Zentrifugation eluiert.

PCR Reinigungskit	QIAquick [®] PCR Purification Kit, Fa Qiagen: PB Buffer enthält Guanidin HCl und Isopropanol PE Buffer, Ethanolpuffer Silikasäulen
Elutionsmedium	Water PCR Reagent, Fa Sigma

Tab. 2.9 Materialien für den enzymatischen Verdau und die anschließende Reinigung der DNA

2.7 Ligation

Unter dem Begriff der Ligation versteht man eine Verknüpfung von DNA-Fragmenten. Meistens handelt es sich um kurze PCR-Fragmente und Vektoren. Nach der Ligation kann die DNA-Sequenz des entstandenen Plasmids bestimmt werden und zur klonselektiven Amplifikation der DNA, bzw. auch der Expression des gewünschten Proteins in ein Vektorsystem ligiert werden (vgl. 2.9 Transformation und 2.13 Transfektion). Für den Vorgang der Ligation inkubiert man die beiden Fragmente mit den entsprechenden Puffern und dem für die Ligation benötigten Enzym, der Ligase. Es gibt verschiedene Arten der Ligation. Die *blunt end*-Ligation ligiert Fragmente, z.B. linearisiertes Plasmid und PCR-Fragment, die keine überhängenden Nukleinsäureenden haben und somit als direktes PCR-Produkt nach der Aufreinigung verwendet werden können. Die *sticky ends*-Ligation ligiert überhängende Enden, die durch enzymatischen DNA-Verdau entstanden sind (vgl. 2.6 Enzymatischer Verdau und anschließende Reinigung von DNA). Die Ligationsmethoden unterscheiden sich in der Ligationszeit und im gewählten Temperaturoptimum. Die Fragmente (3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatende einer doppelsträngigen DNA) werden unter ATP-Verbrauch durch Bildung einer Phosphodiesterbindung verknüpft [Weiss, Jacquemin-Sablon 1968]. Es werden ca. 9 - 90 fmol *Insert*-DNA und 3 - 30 fmol Vektor-DNA eingesetzt. Die Ligationsdauer bei Raumtemperatur betrug ca. 1 h oder ca. 12 h bei 14 °C, beziehungsweise abhängig von den vorliegenden Fragmentenden, *sticky* oder *blunt*, können die ligase- und fragmentspezifischen Ligationszeiten und Temperaturen auch entsprechend den Vorgaben des Herstellers eingehalten werden. Die so präparierten Plasmide werden in *E.coli* transformiert oder HEK-Zellen transfiziert, abhängig vom Plasmidtyp (vgl. 2.9 Transformation/2.13 Transfektion).

Ligase	T4 DNA Ligase 1 U / μ l, Fa Invitrogen
Ligase Puffer	5 x DNA Ligase Reaction Buffer, Fa Invitrogen: 50 mM MgCl ₂ 5 mM ATP 5 mM DTT 25 % (m / V) Polyethylenglykol-8000

Tab. 2.10 Materialien der Ligationsreaktion

2.8 Plasmide

Die mittels PCR gewonnenen DNA-Fragmente wurden in Vektoren umgesetzt, die im Weiteren entweder zur Sequenzierung oder Proteinexpression benutzt wurden. Ausschließlich für die Proteinexpression wurde das pIRES-Vektor System benutzt. Die Vektoren enthalten einen Replikationsursprung und haben, sofern sie als funktionierendes System vorliegen, die Fähigkeit zur autonomen Replikation. Diese Fähigkeit fehlt ihnen, sobald sie unter Selektionsdruck wachsen müssen und das Resistenzgen nicht abgelesen werden kann, da es z.B. nicht *in frame* durch Fehlen des *inserts* abgelesen werden kann. Die verwendeten Plasmide sind modifizierte Konstrukte des synthetisch hergestellten pBR322 [Bolivar, Rodriguez 1977].

pCR[®]4-TOPO[®]

Dieser Vektor (Fa Invitrogen; vgl. Abb.2.2) wird zum Subklonieren von PCR Fragmenten benutzt, die mit Taq-Polymerase amplifiziert worden sind. Durch eine Fragment-unabhängige Transferase-Aktivität der Taq werden einzelne Desoxyadenosin (dA) an die jeweiligen 3' Enden der PCR-Produkte angefügt. Diese Transferase-Aktivität wird benutzt, um die so erhaltenen Fragmente in den linearisiert vorliegenden pCR[®]4-TOPO[®] Vektor zu klonieren. Der Vektor besitzt 3'-Desoxythymidin (dT) Überhänge, so dass die Fragmente effektiv ligiert werden. An die dT-Überhänge des Vektors ist kovalent die Topoisomerase I gebunden. Diese Bindung wird bei Anwesenheit von DNA-Fragmenten mit dA-Überhängen gespalten und durch die Ligaseaktivität der nun „freien“ Topoisomerase I entsteht eine neue Phosphodiesterbindung zwischen Vektor- und DNA-Fragment. Für diese Arbeit wurde der Vektor hauptsächlich zum ersten Sequenzieren von neu amplifizierten DNA-Sequenzen benutzt.

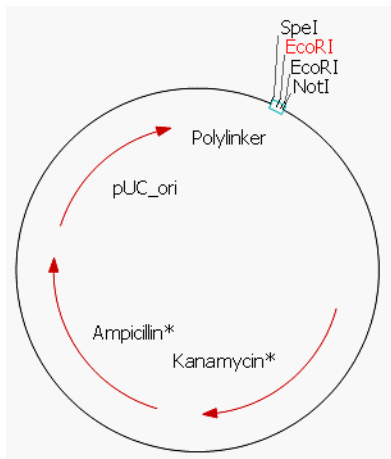


Abb. 2.2 pCR4 Vektor mit relevanten Schnittstellen

pIRES puro, Clontech Laboratories

Der pIRES-Vektor (vgl. Abb. 2.3) zeichnet sich durch eine sogenannte *internal ribosome entry site* (IRES) des Enzephalomyokarditis-Virus aus. Diese erlaubt die gleichzeitige Translation von zwei DNA-Leserastern; *gene of interest* und Selektionsmarker. Der Selektionsmarker Puromycin sorgt für eine stabile Expression des *gene of interest*. Die Expressionskassette enthält den humanen Cytomegalie Virus (CMV) Promoter und sorgt so für eine starke Expression des *gene of interest*. Für stabile Transfektionen werden 4 - 10 µg/ml empfohlen. Eingesetzt wurden 4 µg/ml.

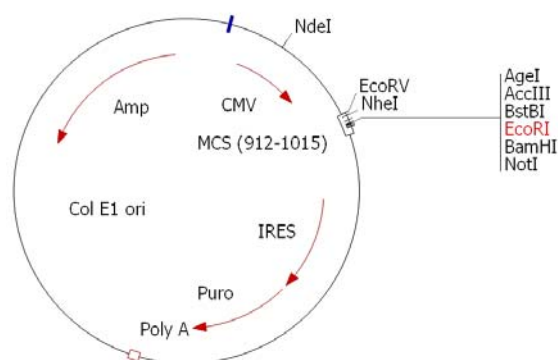


Abb. 2.3 pIRES Vektor mit relevanten Schnittstellen

pTracer-SV40, Fa Invitrogen

Der pTracer-Vektor (vgl. Abb. 2.4) enthält die codogene Proteinsequenz für ein modifiziertes Green Fluorescent Protein (GFP), Cycle 3-GFP, welches eine verbesserte Fluoreszenz aufweist und außerdem weniger toxisch für die jeweiligen Zellen ist. Zur Expression von GFP oder Fusionskonstrukten, bestehend aus dem plasmidinternen GFP, können sowohl *E.coli*, als

auch Säugetierzellen verwendet werden. Die Expressionsleistung des GFP wird, wie auch im pIRES-Vektor, durch einen CMV-Promoter potenziert. Der SV40-Promoter verstärkt die Expression des *gene of interest*. GFP-Anregungs- (395nm, 478nm) und Emissionswellenlänge (507nm) entsprechen dem GFP-Wildtyp.

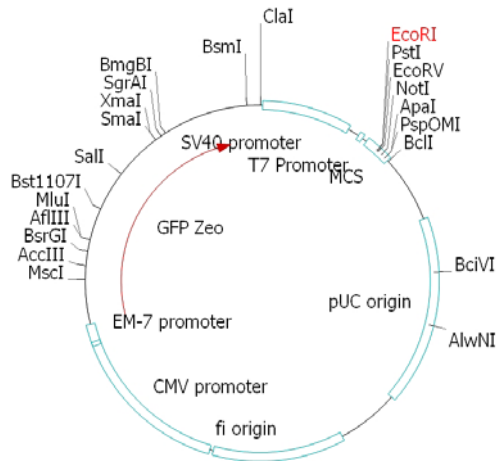


Abb. 2.4 pTracer Vektor mit relevanten Schnittstellen

Dieser Vektor wurde nur zum Umsetzen der codogenen Sequenz des GFP benutzt. Der benutzte Vektor basiert auf dem pIRES-Vektor (vgl. Abb. 2.3) und wurde bezüglich der Sequenz nicht modifiziert. Durch Umsetzen erhielt man einen besser nutzbaren Polylinker und den gewünschten Selektionsmarker Puromycin (vgl. Abb. 2.5).

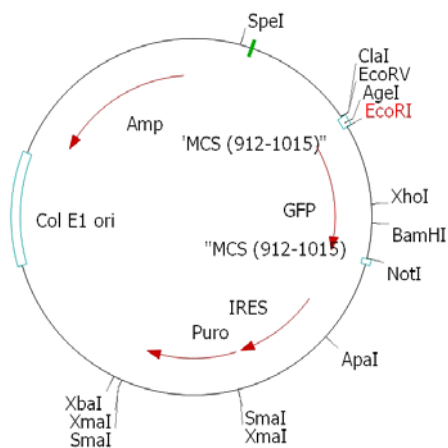


Abb. 2.5 pIRES Vektor (Klonnummer 1383) mit GFP ausgehend von GFP Sequenz pTracer SV40 Vektor mit relevanten Schnittstellen

Die durch den Vorgang der Ligation entstandene Plasmid-DNA wurde nun in *E.coli* Zellen transformiert.

2.9 Transformation

Als Transformation [Mandel, Higa 1970] wird das Einbringen von DNA in Bakterienzellen beschrieben. Ein von den Zellen aufgenommenes Plasmid wird während der Populationszunahme auf die Tochterzellen vererbt. Durch den Selektionsdruck können nur die Zellen überleben, die zusammen mit dem Plasmid auch die auf dem Plasmid enthaltene genetische Information für die Antibiotikaresistenz erworben haben. Maximal 10 ng Plasmid-DNA wurden für 50 µl kompetente Zellen verwendet, die zuvor auf Eis aufgetaut worden sind. Nach 30 – 45 min wurde dieser Ansatz einem sogenannten Hitzeschockverfahren unterzogen, bei dem die Zellen samt DNA für 40 Sekunden im Wasserbad bei 42 °C inkubiert wurden. Nach weiteren 5 min auf Eis wurde SOC Medium hinzugegeben und bei 37 °C für weitere 30 – 45 min inkubiert. Anschließend konnte man den Ansatz auf Agar-Platten ausplattieren. Nach 20 h wurden Einzelklone selektiert und im LB - Broth Medium bei 37 °C über Nacht bebrütet (vgl. 2.11 Zelluläre Amplifikation und Reinigung von Plasmid-DNA).

<p><i>E.coli</i> Zellen zur Transformation nach Ligation</p>	<p>One Shot® TOP10, Fa Invitrogen</p> <p>Die <i>E.coli</i> Zellen One Shot® TOP10 wurden zur Amplifikation von PCR Fragmenten benutzt, die durch A-Tailing in ein TA-Vektor gesetzt worden sind (TA-Cloning® Kit, Fa Invitrogen).</p> <p>Der Genotyp wird wie folgt beschrieben: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</p>
<p><i>E.coli</i> Zellen zur Transformation nach Mutagenese</p>	<p>XL1 Blue MRF', Fa Stratagene</p> <p>Zur Amplifikation von mutierten Plasmiden wurde der <i>E.coli</i> Stamm XL1 Blue MRF' (Fa Stratagene) eingesetzt.</p> <p>Der Genotyp wird wie folgt beschrieben: Δ(mcrA)183 Δ(mrcCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F'proABlacIq ZΔM15 Tn10(Tetr)]</p>

Glukosemedium	SOC Medium, Fa Invitrogen: 2 % Trypton 0,5 % Hefe Extrakt 10 mM Natriumchlorid 2,5 mM Kaliumchlorid 10 mM Magnesiumchlorid 10 mM Magnesiumsulfat 20 mM Glukose
----------------------	---

Tab. 2.11 Transformationsreagenzien

2.10 Einzelklonselektion

Die für die Klonselektion benötigten Agar-Agar Platten wurden mit technischem Agar-Agar hergestellt und für das Klonwachstum über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. 15 g Agar-Agar wurden in 1 l Kulturmedium gelöst und aufgekocht. Nach dem Aufkochen kühlte die Lösung auf ca. 60 °C ab und im Anschluss wurde Ampicillin als Selektionsdruck hinzugeben, da es nicht hitzestabil ist. Bei ca. 45 °C wurde das Agarmedium in Petrischalen überführt und abgekühlt. Dieser Vorgang fand unter der sterilen Atmosphäre einer Sicherheitswerkbank statt. Die transformierten Zellen (vgl. 2.13 Transformation) wurden auf den Agarplatten ausplattiert und nach 20 h konnten Einzelklone als kleine, gewachsene Kolonien selektiert werden.

Petrischalen	Petrischalen, Fa Gibco
Selektionsmarker	AmpTabs 25mg/Tab Fa Stratagene: eingesetzte Konzentration 100mg/l
Brutschrank	Typ B5042, Fa Heraeus
Agar-Agar	Agar-Agar technisch, Fa Merck

Tab. 2.12 Verwendete Materialien zur Einzelklonselektion

2.11 Zelluläre Amplifikation und Reinigung von Plasmid-DNA

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA wurde das QIAprep[®] Kit benutzt. Die plasmidtragenden Bakterien werden mit NaOH und SDS lysiert. Die Methode [Birnboim, Doly 1979] macht sich zu Nutze, dass durch die alkalische Lyse und Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) Proteine und DNA denaturieren und durch anschließende Neutralisation, die im Verhältnis zum Bakterienchromosom kleine Plasmid-DNA wieder renaturiert, und von übrigen Zellbestandteilen abgetrennt werden kann. Die so erhaltene DNA wurde mittels Isopropanol gefällt und mit Ethanol 70 % (V / V) von unlöslichen Salzen und Isopropanol befreit werden. Im Kit wird ein weiterer Reinigungsschritt über eine Silikasäule eingeführt, an die die Plasmid-DNA gebunden wird. Für die zelluläre Amplifikation und anschließende Reinigung von Plasmid-DNA wurden 10 ml einer Kultur für ca. 15 h bei 37 °C und 220 - 230 U/min in LB Broth-Medium angelegt, ausgehend von einer einzelnen, auf Agar-Agar Platten gewachsenen, *E.coli*-Kolonie. Die Kolonie wurde mit Plastiksticks von den Platten abgestreift und ins LB Broth-Medium (Fa Gibco) überführt. Nach 16 h wurden die Bakterien abzentrifugiert (4600 x g, 10 min, RT) und in 250 µl P1 Puffer resuspendiert; als Reinigungskit kam das QIAprep[®] Kit von der Fa Qiagen zum Einsatz. Die Zellen wurden durch Zugabe von alkalischem Puffer P2 aufgeschlossen und dann durch erneute N3 Pufferzugabe neutralisiert. Durch die folgende Zentrifugation (13000 x g, 10 min, RT) wurden die nicht löslichen Zellbestandteile abgetrennt und der Überstand auf eine Silikasäule gegeben. Die Pufferreste wurden mittels Unterdruck abgesaugt und die ans Silikamaterial gebundene DNA mit PE Puffer gewaschen und mit 35 µl H₂O eluiert. Der DNA-Gehalt wurde UV photometrisch ($E_{260nm}^{1\%(m/V)} = 5,8$) bestimmt [Schultze, Heremans 1966]. Als Nullabgleich wurde das Elutionsmittel H₂O verwendet. Dieses Verfahren ermöglichte die Suche nach korrekten rekombinanten Klonen, da mit der gewonnenen Plasmid-DNA Restriktions- (vgl. 2.6 Enzymatischer Verdau und anschließende Reinigung von DNA) und Sequenzanalysen (vgl. 2.12 Sequenzierung von DNA) durchgeführt werden können.

Zellkulturmedium	LB Broth-Medium, Fa Gibco
Plasmidreinigungskit	QIAprep [®] Kit, Fa Qiagen: P1 Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) P2 Puffer (200 mM NaOH, 1% (m / V) SDS) PE Puffer (enthält EtOH) N3 Puffer (enthält Guanidinhydrochlorid und Isopropanol)

Elutionsmittel	Water PCR Reagent, Fa Sigma
UV-Photometer	Du530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer, Fa Beckman
Zellinkubator	Minitron, Fa Infros Umdrehungszahl: 230 U/min Temperatur: 37 °C Inkubationszeit: 14-16 h

Tab. 2.13 Materialien für die zelluläre Amplifikation und Reinigung von Plasmid-DNA

2.12 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von der Fa Eurofins MWG durchgeführt und basiert auf dem Prinzip der von Sanger entwickelten Didesoxymethode [Sanger et al. 1977]. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase, ausgehend von einer als Einzelstrang vorliegenden DNA-Matrize, den komplementären Strang. Die Sequenzierungs-Startsequenz wird bestimmt durch ein jeweils am Einzelstrang bindende Oligonukleotid (Sequenzieroligo). In Anwesenheit von 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) kommt es zu Kettenabbrüchen, bedingt durch eine fehlende OH-Gruppe in 3'-Position der Nukleotide, die für eine Verlängerung der DNA notwendig ist. Durch definierte Verhältnisse zwischen dNTPs und ddNTPs entsteht eine Mischung von DNA-Fragmenten jeder möglichen Länge. Durch radioaktive oder Fluoreszenzfarbstoff-Markierung der Didesoxynukleotide können die DNA-Fragmente markiert werden und in einem Sequenziervorgang analysiert werden, da jede Base einen anderen Farbstoff trägt.

Als Primer wurden definierte Oligonukleotide der Fa Operon eingesetzt, die komplementär zur angrenzenden Vektorsequenz waren. Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden mittels Kapillarelektrophorese analysiert und die gefundene Sequenz in elektronischer Form als lesbares .seq file zugestellt. Diese Datei konnte mit im Voraus definierten Sequenzen und der Software DNASTar verglichen werden. Stimmt ein Klon mit der gewünschten Sequenz überein, wird dieser für weitere Versuche verwendet. Nach bestandem Sequenzvergleich von artifizieller (digitale Plasmid-Sequenz) und produzierter Plasmid-DNA konnten weitere Schritte unternommen werden. Entweder stellte das entstandene Plasmid eine Zwischenstufe für Folgeprodukte dar und es folgten weitere PCR- und Mutageneseschritte (vgl. 2.1 Polymerase Kettenreaktion, 2.2 Mutagenese) oder das Plasmid wurde zur rekombinanten Proteinproduktion eingesetzt. Dieser Vorgang beginnt mit der Transfektion.

Software	<ul style="list-style-type: none"> • Megalign, Fa DNASTar • EditSeq, Fa DNASTar • SequMan, Fa DNASTar • Clonemanager, Fa Lasergene
Sequencer	ABI 3730XL 96-capillary sequencers, sequencing kit: BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-2500, Fa Applied Biosystems
Sequenzieroligos	<ul style="list-style-type: none"> • pCR4: M13 uni, M13 rev, Fa Medigenomix • pIRES: 1334, 1335 Fa Medigenomix

Tab. 2.14 Materialien/Software für die Durchführung einer DNA-Sequenzierung/Analytik

2.13 Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man das direkte Einbringen von fremden Genen, bzw. Plasmiden, in Säugerzellen. Das eingeschleuste Expressionsplasmid integriert normalerweise nicht stabil ins Genom der Säugerzelle. Zur stabilen Transfektion wird ein Selektionsdruck in Form eines Antibiotikums benötigt, welcher, im Vergleich zur transienten Transfektion, die weitere Vermehrung der Zellen sicherstellt, die das gewünschte Gen samt Selektionsmarker ins Genom integriert haben. Der Selektionsmarker ist eine zusätzlich zum gewünschten Protein exprimierte Puromycin-N-acetyltransferase (PAC), welche die Zellen vor dem Einfluss des Antibiotikums schützt. Ist das Gen durch Selektionsdruck stabil ins Zellgenom integriert worden, kann auf den Selektionsdruck verzichtet werden. Verwendet wurde das Verfahren der Lipofektion. Durch Zugabe von Lipofektaminreagenz zur Plasmid-DNA kann sich diese in Liposome einlagern und von den human embryonic kidney (HEK) Zellen der HEK293-Zelllinie endozytiert werden. Zur Selektion der Zellen mit integriertem Gen wurde Puromycin eingesetzt. Die HEK293-Primärzellen wurden für die Expression der humanen Gla-Proteine verwendet.

An den beiden Tagen vor der Transfektion wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 passagiert, um sicherzustellen, dass sie sich in der Phase des exponentiellen Wachstums befanden. Die HEK293-Zellen wurden gesammelt und mit dem Enzym Accutase behandelt, um eine Vereinzelung zu erreichen und einen größeren Transfektionserfolg zu erhalten. Anschließend wurden sie mit Medium aufgefüllt und ausgezählt. Die Accutase wurde nach erneuter Zentrifugation des Ansatzes und Einstellung auf eine Zellzahl von 10^6 Zellen/ml verdünnt. In diesem Stadium dürfen die Medien noch kein Antibiotikum oder andere Selektionsmarker enthalten, da die Zellen noch keine Resistenz aufgrund des noch nicht inkorporierten Plasmids entwickelt haben. Lipofektamin wurde mit HEK293-Medium auf eine

Konzentration von 40 µg/ml verdünnt, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. In eine Platte mit 12 Mikroreaktionsräumen (*wells*) wurden in ein *well* 100 µl HEK293-Medium vorgelegt und 3 µg des gewünschten Plasmids 5 min inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Lipofektaminansatzes (40 µg/ml) hinzugegeben und vermischt. Nach 15 – 20 min wurde die DNA vom Lipofektamin komplexiert. Der Komplex konnte nun durch Zugabe von 1 ml Zellsuspension nach sorgfältigem Schwenken der Platte von den Zellen aufgenommen werden. Nach 5 h im Brutschrank (7,5 % (V / V) CO₂; 37 °C) wurde das jeweilige *well* auf 4 ml aufgefüllt und jeweils 1 ml auf die benachbarten drei *wells* aufgeteilt. Nach 48 h konnte man davon ausgehen, dass Selektionsmarker und *gene of interest* ins Genom der Zellen integriert worden waren. Die Zellen wurden mit Puromycin (4 µg/ml) unter Selektionsdruck gesetzt und vermehrt. Als Kontrolle wurde eine speziellen DNA (DNA Nr. 900) mitgeführt, mit und ohne Puromycin. Diese DNA ist ein Plasmid, welches sich in die Zellen integriert, aber kein Protein exprimiert. So konnte kontrolliert werden, falls die Zellen nicht wachsen, ob fehlende Wachstum der Zellen durch das exprimierten Konstrukt oder den Selektionsdruck verursacht wurde, bzw. vitalitätsbedingt war.

Der Transfektionsmix wurde bei 7,5 % (V / V) CO₂ und 37 °C inkubiert. Die Zellvitalität und Nährstoffparameter wurden alle 1 - 2 Tage bestimmt (Bioprofile[®] Flex, Fa Novabiomedical). Die Zellen wurden gegebenenfalls mit Medium erneut auf 1 x 10⁶ Zellen verdünnt, falls die Zelldichte zu hoch oder der Glucosegehalt ≤ 2 g/l betrug. Die Großproduktion wurde in Glasfermentern durchgeführt, welche einer automatischen Steuerung von pH Bereich, O₂- und CO₂-Volumenanteil, Temperatur und Durchmischung unterlagen. Die für die γ-Carboxylierung benötigte Vitamin K-Konzentration wurde in Form von Menadion den verschiedenen Medien zugefügt. Falls nicht carboxylierte Proteine benötigt wurden, wurde dem Medium Warfarin zugesetzt und die Transfektion von Anfang an ohne Vitamin K durchgeführt.

HEK293-Medium	Freestyle 293 SFM, Fa Gibco
Accutase	Accutase, Fa Sigma 5 ml, 5 min RT, um adhärenente Zellen zu lösen und sie später auf die gewünschte Zelldichte mit konditioniertem Zellkulturüberstand einstellen zu können
Lipofektamin	Lipofektamin 2000 CD Reagent, Fa Gibco: 4 µl/Ansatz
Konditioniertes Medium	konditionierter, zellfreier Zellkulturüberstand

Plasmid DNA	2 – 4 µg Plasmid DNA pro Ansatz, 5 h mit 4 µl Lipofektamin und 100 µl HEK293-Medium inkubieren
Laborzentrifuge	Cryofuge, Fa Heraeus
Tiefenfilter für Zellabtrennung	Kleenpak Nova (0,64 µm → 0,2 µm), Fa Pall
ph-Sonde	Easyferm Plus K8 425, Fa Hamilton
O₂-Sonde	Oxyferm FDA 425, Fa Hamilton
Kontroll DNA	DNA 900, Laborpräparation, Fa CSL Behring
Zellanalysator	Bioprofile [®] Flex, Fa Novabiomedical (Counter, pH extern, Metaboliten etc.)
Fermentersteuerung	BioStat B-DCU, Fa Sartorius Allgemeine Fermentereinstellungen: 200 U/min, 37°C, pH 7,0 konstanter <i>Overlay</i> : 1 l/min Luftsauerstoff automatische Regulation des pH-Parameters und der Gassättigung über <i>Sparger</i> : 0,01 %-ige Sättigung unter Luftatmosphäre ($V_{\text{Gas}} / V_{\text{Fermentervolumen}} / \text{min}$) durch automatischen O ₂ -Eintrag von max. 200 ml/min und CO ₂ -Eintrag von max. 200 ml/min. Der maximale Sauerstoffeintrag (100 %) bei 37 °C unter Luftatmosphäre beträgt ca. 6,5 mg _{O₂} /l _{Kulturmedium}
Glasfermentergefäß	20 l Glasfermenter mit Doppelwand, Fa Sartorius Sonderanfertigung
Primärzellen	HEK293, Fa Invitrogen Die Zytogenetik der Zelllinie wird wie folgt beschrieben: human near-triploid karyotype with 6% polyploidy - 69(64-69)XX?X, +1, +6, -10, -13, -16, -18, -20, +21, +22, +mar, add(?X)(p22), inv(1)(p35q43), del(1)(p35), i(5p), del(6)(q11), add(8)(q24), add(13)(p13), add(17)(qter), der(?)t(5;?)(q13;?) 1 x 10 ⁶ Zellen pro Ansatz, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden

Inkubationsplatten (6, 12 <i>well</i> Platten)	Multidishes Non-treated, Fa Nunc
Selektionsantibiotikum	Puromycin 10 mg/ml 2 ml/Abfüllung, Fa InvivoGen: Eingesetzte Konzentration: 4 µg/ml
Vitamin K	Menadionnatriumbisulfit ca. 95 % (m / V), Fa Sigma: 50 ng/ml Vitamin K wurde regelmäßig beim Umsetzen der Zellen dem neuen Kulturmedium zugesetzt oder alle 2 – 3 Tage, abhängig vom visuellen Zustand und der Anzahl der Zellen, in den Fermenter neu eingepft.
Warfarin	Warfarin, Fa Sigma: die eingesetzte Konzentration betrug 1 µM in 1 l HEK293-Medium

Tab. 2.15 Verwendete Materialien zur Durchführung einer Transfektion

Die Zellen wurden nach abgeschlossener Fermentation in Rollerflaschen vom Kulturüberstand durch Zentrifugation (1500 x g) abgetrennt. Nach der Fermentation im 20 l Fermenter erfolgte eine Zellabtrennung durch Tiefenfiltration. Der geerntete Kulturüberstand wurde bei - 20 °C eingefroren. Die Transformation diente der Produktion von rekombinanten Proteinkonstrukten, speziell TMG3 und TMG4 mit verschiedensten Modifikationen (vgl. 8.1 Exprimierte Proteinsequenzen, basierend auf Plasmidkonstrukten). Zur Konservierung der Zellkonstrukte, bzw. Transfektandenpools wurden die Transfektandenpools kryokonserviert.

2.14 Vitalitätskontrolle unter Zugabe von Vitamin K und Warfarin

Der zellschädigende Einfluss von Vitamin K wurde ausgehend von einem HEK293-Pool von TMG3- und TMG4-Albumin-Fusionsproteinen (FP) exprimierenden Zellen untersucht. Der Pool wurde unter Zugabe von Vitamin K und Puromycin vermehrt, eingefroren und wieder aufgetaut. Zwei Kryoröhrchen wurden aufgetaut und in 18 ml Kulturmedium in eine T80 Zellkulturflasche überführt. Die beiden aufgetauten Klone wurden jeweils dreimal in neues Medium, welches ausschließlich Puromycin enthielt, passagiert, um ein Ausverdünnen von Vitamin K zu erreichen. Diese derart vermehrten, von Vitamin K befreiten Zellkulturen, wurden nach vier und nochmals nach neun Tagen, bei einer Zellzahl von jeweils $3 - 5 \times 10^5$ Zellen/ml, aliquotiert. Aliquots wurden einmal mit HEK293-Medium mit Vitamin K und einmal mit Warfarin ohne Vitamin K auf eine definierte Zellzahl eingestellt. Die Zellen wurden in vier Schüttelkolben überführt. Das Wachstum wurde nach optischen Merkmalen, sowie der Vitalität beurteilt.

Klon + Kolben	HEK293-Medium: Freestyle 293, Fa Invitrogen	Vitamink K: Menadionnatriumbis ulfit, Fa Sigma	Warfarin: Warfarin, Fa Sigma
Klon 1595 (Transfektionsnummer 1348) Kolben 1	✓	✓	-
Klon 1595 (Transfektionsnummer 1348) Kolben 2	✓	-	✓
Klon 1560 (Transfektionsnummer 1350) Kolben 3	✓	✓	-
Klon 1560 (Transfektionsnummer 1350) Kolben 4	✓	-	✓

Tab. 2.16 Materialien und Versuchsaufbau der Vitalitätskontrolle unter Vitamin K und Warfarin Einfluss

Wie die tabellarische Auswertung (vgl. Tab. 8.9 Zell-Vitalitätsbeurteilung unter Einfluss von Warfarin und Vitamin K) zeigt, hatte die eingesetzte Vitamin K-Konzentration keinen übermäßig zellschädigenden Einfluss. Die Zellvitalität nahm stetig im Verlauf der Expression zu und die Schwankungen befanden sich im Bereich der Messungenauigkeit (verwendete Materialien: vgl. 2.9 Transfektion).

2.15 Kryokonservierung von Säugerzellen

Säugerzellen werden kryokonserviert, um Kontamination und genetischen Veränderungen in permanenten Zelllinien sowie Alterung und Transformation von Zelllinien vorzubeugen. Des Weiteren werden Zellbänke kryokonserviert gelagert. Unter Kryokonservierung wird generell die Aufbewahrung von lebenden Zellen bei ultratiefen Temperaturen von unter -130 °C verstanden. Bei dieser Temperatur kommen nahezu alle Stoffwechselfvorgänge zum Stillstand. Die Lagerung erfolgt in flüssigem Stickstoff bei -196 °C (in der Dampfphase des flüssigen Stickstoffs bei -150 °C) oder in einem -150 °C Ultratiefkühlgerät.

Das Ziel ist die Erhaltung der Vitalität der Zellen nach dem Auftauen. Durch Zugabe von Gefrierschutzmitteln zum Einfriermedium können Schäden an der Zellwand, die im Verlauf des Kryokonservierungs- und Auftauprozesses entstehen können, vermieden bzw. vermindert werden. Es gibt verschiedene Medien, um Zellen einzufrieren, je nachdem, ob es sich um ein serumhaltiges oder serumfreies Medium handelt. Die Bedingungen für serumhaltiges Medium werden an dieser Stelle nicht beschrieben, da für die Arbeit ausschließlich serumfreies Medium benutzt wurde. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen auf eine Zelldichte von 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen sollten sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden und eine Vitalität von 90 % ($\text{Zellzahl}_{\text{lebend}} / \text{Zellzahl}_{\text{tot}}$) nicht unterschreiten. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde eine Zellzählung durchgeführt. Suspensionszellen können nach Durchmischen direkt eingesetzt und gezählt werden. Die verwendeten adhärenenten und teilweise stark verklumpten HEK293-Kulturen wurden nach einer Sedimentationsdauer von ca. 5 min vom Kulturmedium befreit und mit Accutase inkubiert (1 ml pro 10 cm^2 Kulturfläche; 37 °C). Das Kulturmedium konnte für weitere Analytik, z.B. ELISA (vgl. 2.18.2 ELISA) aliquotiert und bei -20 °C eingefroren (Überstand vorher zentrifugieren) werden. Nach der Inkubationszeit von 5 – 15 min hatten sich die Zellen abgerundet, die Verklumpungen gelöst oder ließen sich durch leichtes Anstoßen des Gefäßes von der Oberfläche lösen und wurden mit Kulturmedium auf das Ursprungsvolumen resuspendiert (z. B. 25 ml für eine T-80 Flasche). Das Ablösen der Zellen bzw. das Auflösen

der Zellverklumpungen kann mikroskopisch kontrolliert werden. Die enthaltene Accutase wurde durch den Auffüllvorgang mit Kulturmedium so stark verdünnt, dass die Zellen keinen weiteren Schaden nahmen. Anschließend konnte eine Probe für die Zellzählung entnommen werden. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 270 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in + 4 °C kaltem Kryo-Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde auf 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen/ml eingestellt werden. Proteinfreies Kryo-Medium besteht aus dem jeweiligen Zellkulturmedium und 7,5 % (V / V) DMSO. DMSO verhindert die Bildung spitzer Eiskristalle und schützt so die Zellmembran vor Verletzung. Die Bildung von Eiskristallen wird auch durch einen langsamen Einfriervorgang unterbunden (s.o.). 1,5 – 2,0 ml eingestellter Zellen überführte man in ein Kryoröhrchen, welches dann in das auf + 4 °C vorgekühlte Kryo-Einfriergerät gestellt wurde. Das Kryo-Einfriergerät wird 24 Stunden in einem Tiefkühlschrank oder einer Tiefkühltruhe (- 80 °C) gelagert und nach weiteren 24 Stunden kann man die Röhrchen in die Tiefkühltruhe (- 150 °C) überführen. Aggregierte Zellen treten fast ausschließlich bei serumfreier/proteinfreier Kultivierung auf und können meistens durch die beim Pipettieren auftretenden Scherkräfte voneinander gelöst werden. Falls dies erfolglos war, wurden die Zellen ebenfalls mit Accutase behandelt (s.o.).

Zellkulturmedium	Freestyle 293 SFM, Fa Gibco
Einmalpipetten	Sterile Einmalpipetten: 1; 2; 5, 10 und 25 ml, Fa Nunc
Zentrifugenröhrchen	Zentrifugenröhrchen (steril), 14 ml, Polystyrol (17 x 100 mm) mit Schnapp-Deckel, Fa Becton Dickinson Zentrifugenröhrchen (steril), 50 ml, Polypropylen (30 x 115 mm) mit Schraubdeckel, Fa Greiner
Einfrierröhrchen	Einfrier (Kryo)-Röhrchen 2 ml, Fa Greiner
Sicherheitswerkbank	Sicherheitswerkbänke der Klasse 2: BDK-S 1200, Typ UVF 6.12S, Fa BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH UVF 6.18.S, Fa BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Laborzentrifuge	<ul style="list-style-type: none"> • Megafuge 1.0, Fa Heraeus • Labofuge GL, Fa Thermo Electron
Kryo-Einfriergerät	Freezing Container, Fa Nalgene

Dimethylsulfoxid	DMSO, Fa Sigma
Accutase	Accutase, Fa Sigma 5 ml, 5 min RT, um adhärenente Zellen zu lösen und sie später auf die gewünschte Zelldichte mit konditioniertem Zellkulturüberstand einstellen zu können
Zellzählgerät	Cell Viability Analyzer Vi-Cell XR, Fa Beckman

Tab. 2.17 Materialien für die Kryokonservierung von Säugerzellen

2.16 Revitalisierung von kryokonservierten Säugerzellen

2.16.1 Auftauen der Zellen

Die entsprechenden Kryoröhrchen wurden im Wasserbad bei 37 °C sofort aufgetaut und vor dem Öffnen mit Mikrocid[®] Liquid (Fa Schülke & Mayr) abgesprüht. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt und 30 ml vorgewärmtes Kulturmedium (+ 37 °C) wurde tropfenweise zugegeben. Die so gewonnene Suspension wurde 5 min bei 270 x g zentrifugiert (= 1200 Umdrehungen pro Minute, UpM in der Laborzentrifuge, vgl. Tab. 2.17) und der Überstand abgenommen und verworfen. Dies diente dem Ausverdünnen von DMSO.

2.16.2 Kultivieren der Zellen

Die von DMSO befreiten Zellen konnten dann in 5 ml des vorgewärmten Kulturmediums (+ 37 °C) resuspendiert und in eine Zellkulturflasche oder Zellkulturplatte überführt werden. Die Kulturflasche oder Kulturplatte wurde mit Kulturmedium (+ 37 °C) entsprechend des Volumens des Kulturgefäßes aufgefüllt. Für eine Zellzählung wurde 1 ml der Zellsuspension entnommen, um das Wachstum der Zellen und ihre Vitalität zu kontrollieren. Die Zellen wurden im CO₂-Inkubator (7,5 % (V / V) CO₂, + 37 °C) gelagert. Nach 1 - 2 Tagen wurde die Sterilität und Vitalität überprüft und gegebenenfalls das Medium gewechselt, um neue Nährstoffe hinzuzuführen.

2.17 Proteinreinigung

Der rekombinant exprimierte und von Zellen befreite Überstand wurde im Anschluss an die Fermentation oder nach Auftauen des eingefrorenen Überstands aufgereinigt. Durch die Reinigung wurden störende Bestandteile des Kulturmediums, wie Detergenzien und Fremdproteine, von den gewünschten Proteinen separiert. Für die Proteinreinigung und Ankonzentrierung sind präparative Säulenchromatographietechniken geeignet. Die zu reinigende Substanzmischung wird in Abhängigkeit vom Laufmittel und Säulenmaterial in seine verschiedenen Komponenten aufgetrennt. Das fraktionierte Eluat enthält die aufgetrennten Komponenten entsprechend ihrer Retention. Die Wechselwirkung der zu isolierenden Komponente, bzw. das Verhalten im chromatographischen Trennsystem, lässt sich in verschiedene Trennverfahren unterteilen. Findet eine Trennung nach Molekülgröße statt, spricht man von Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatographie, SEC). Als Affinitätschromatographie wird eine Trennung bezeichnet, bei der das Molekül eine spezifische biochemische Wechselwirkung mit der stationären Phase, der Säulenmatrix, eingeht. Bei der Ionenaustauschchromatographie treten ionische Gruppen der Säulenmatrix in Wechselwirkung mit ionischen Gruppen der zu isolierenden Komponente. Lagern sich polare Substanzen an ein polares Säulenmaterial mit hoher spezifischer Oberfläche an, spricht man von Adsorptionschromatographie. Beim Verfahren der Reversed-Phase Chromatographie ist das Säulenmaterial apolar und die mobile Phase polar. An der Säulenmatrix lagern sich apolare Substanzen an.

Die Reinigung der rekombinant hergestellten Proteine, ausgehend vom Zellkulturüberstand, erfolgte durch einen mehrstufigen Reinigungsprozess. Der eingefrorene Zellkulturüberstand wurde aufgetaut und sterilfiltriert, um durch den Einfrierprozess entstandene Schwebepartikel zu entfernen, welche die Säulenmatrix und Ventile der präparativen Chromatographie-Anlage zugesetzt hätten. Der erste Aufreinigungsschritt mit einem Hydroxylapatit-Säulenmaterial (Macro-Prep[®] Ceramic Hydroxyapatite Type I, Fa Bio-Rad) stellte eine geeignete Affinitätschromatographie durch Bildung eines Metallchelatkomples dar. Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HA) bildet über positiv geladene Kalziumionen enthaltende Domänen den Metallchelatkomples mit den γ -carboxylierten Glutaminsäuren der Proteine. Des Weiteren kann HA auch als Kationenaustauscher oder Anionenaustauscher verwendet werden (vgl. Abb. 2.6). Zu vernachlässigen sind die Wasserstoffbrückenbindungen, die über die Hydroxylgruppen auftreten könnten.

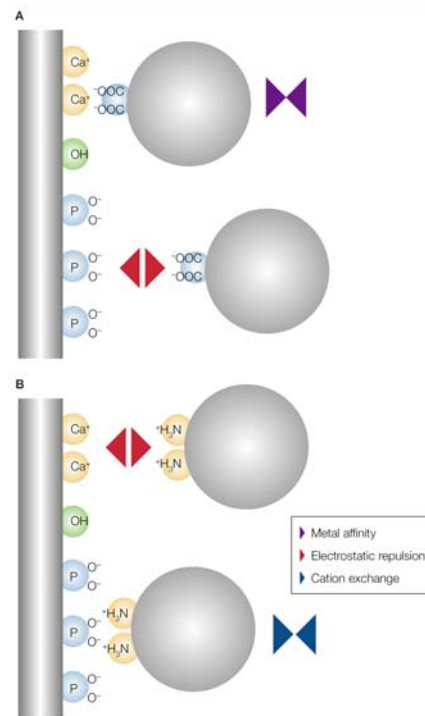


Abb. 2.6 Interaktion von Proteinen mit HA; A: Interaktion zwischen Carboxylfunktion und HA; B: Interaktion von Aminogruppen mit HA aus Bio-Rad Produktbroschüre

Die sterilfiltrierten Proteine wurden auf die mit HA-Äquilibrierpuffer behandelte Säule aufgetragen. Es folgte ein Waschschriff mit HA-Waschpuffer, der schlecht γ -carboxylierte Proteine entfernen sollte. Die Elution der Proteine erfolgte mit einer höheren Phosphatkonzentration durch HA-Elutionspuffer. Im Anschluss an die Proteinreinigung wurde die Säule regeneriert (HA-Regenerationspuffer) und wieder äquilibriert, jeweils mit zwei Säulenvolumen. Die Volumina der Reinigungsschritte wurden so gewählt, dass nach dem jeweiligen Schritt die Basislinie des Chromatogramms erreicht wurde. Die anschließende SEC sollte verschiedene Fragmentierungsstufen der Proteine oder Fremdproteine abreichern. Verwendet wurde ein Sepharosematerial (HiLoad 16/60 SuperdexTM 200 pg, Fa GE). Die mit HA gereinigten Proteine würden in das ÄktaTM System injiziert und auf die Säule überführt. Die Proteinkonzentration sollte nicht mehr als 16 % (m / V) betragen und das Auftragvolumen 10 % (V / V) des Säulenvolumens nicht überschreiten. Der Laufpuffer für die Größenseparation (SEC-Laufpuffer) wurde auch als Regenerationspuffer und Äquilibrierpuffer eingesetzt. Nach abgeschlossener SEC wurde mit SEC-Laufpuffer so lange gespült, bis die Basislinie des Chromatogramms erreicht war. Das anfänglich gewählte Reinigungsverfahren wurde später durch eine Affinitätschromatographie ersetzt. An das Säulenmaterial (SepharoseTM 4 Fast Flow, Fa GE), eine Bromcyan-aktivierte Sepharose, wurde ein monoklonaler anti-Albumin Antikörper (MAK3E8lia, Fa CSL Behring) gekoppelt.

Trotz anfänglicher Bedenken, dass γ -carboxylierte Proteine bei sauren Elutionsbedingungen hydrolysiert werden könnten, lieferte diese Reinigung weniger Verunreinigungen als die HA-Reinigung der Gla-Proteine. Die γ -Carboxylierung konnte im Anschluss an die Reinigung mit einem anti-Gla-Antikörper (anti-Gla-Ak) nachgewiesen werden. Die Äquilibration der Affinitätssäule erfolgte mit zwei Säulenvolumen Anti-Albumin-Äquilibratorpuffer. Die Säule wurde nach dem Proteinauftrag mit Anti-Albumin-Waschpuffer 1 und anschließend mit Anti-Albumin-Waschpuffer 2 gewaschen, bis die Basislinie des aufgezeichneten Chromatogramms erreicht war. Die nicht γ -carboxylierten Proteine, welche ohne Zusatz von Vitamin K und unter Zugabe von Warfarin generiert worden sind, mussten aufgrund der fehlenden, bzw. geringeren Affinität zur HA-Säule über eine Metallchelatsäule gereinigt werden. Zum Einsatz kam eine Nickel- Nitrilotriessigsäure (NTA)-Säule (Ni SepharoseTM 6 Fast Flow, Fa GE), an die der PolyHis-tag der zu reinigenden Proteine binden konnte. Die Proteine wurden auf die mit Nickel-NTA-Waschlösung äquilibrierte Säule aufgetragen. Nach dem Auftrag wurde die Säule mit dem gleichen Puffer gewaschen, bis die Basislinie des Chromatogramms erreicht war. Die Elution erfolgte mit dem Nickel-NTA-Elutionspuffer. Im Anschluss wurde die Säule mit dem Elutionspuffer gespült, bis die Basislinie erreicht wurde. Die eluierten Fraktionen der Reinigungen wurden gesammelt, vereint und eingefroren.

Hydroxylapatit (HA) Säule	Macro-Prep [®] Ceramic Hydroxyapatite Type I 20 μ m, Fa Bio-Rad
HA-Äquilibratorpuffer	50 mM 1,1,1-Tris-(hydroxymethyl)-ethan 100 mM NaCl pH 7,2
HA-Waschpuffer	38,2 mM K ₂ HPO ₄ 11,9 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2
HA-Elutionspuffer	228,9 mM K ₂ HPO ₄ 71,1 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2
HA-Regenerationspuffer	381,5 mM K ₂ HPO ₄ 118,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2
Anti-Albumin-Säule	monoklonaler anti-human Albumin Antikörper: MAK3E8Iia, Fa CSL Behring Sepharose TM 4 Fast Flow - gebunden, Fa GE

Anti-Albumin-Äquibrierpuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ 100 mM NaCl pH 7,0
Anti-Albumin-Waschpuffer 1	20 mM Na ₂ HPO ₄ 1 M NaCl 2 mM Na-Caprylat pH 7,0
Anti-Albumin-Waschpuffer 2	20 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM Na-Caprylat pH 7,0
Anti-Albumin-Elutionspuffer	0,1 M Glycin pH 2,5
Anti-Albumin-Vorlagepuffer	1 M Tris 1 M NaCl 20 mM Na-Caprylat pH 9,0
SEC-Säulenmaterial	HiLoad 16/60 Superdex™ 200 pg, Fa GE
SEC-Laufpuffer	40 mmol Phosphat (27,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 12,5 mM NaH ₂ PO ₄) 200 mM NaCl 0,005 % (m / V) NaN ₃ pH 7,0
Nickel-NTA	Ni Sepharose™ 6 Fast Flow, Fa GE
Nickel-NTA-Waschpuffer	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 0,5 M NaCl, 30 mM Imidazol, pH 7,4
Nickel-NTA-Elutionspuffer	20 mM NaH ₂ PO ₄ 0,5 M NaCl 0,5 M Imidazol pH 7,4
Chromatographieanlage	Äkta™ explorer, Fa GE
alle Chemikalien wurden von der Fa Merck Reinheitsgrad p.a. bezogen; andere Hersteller sind angegeben	

Tab. 2.18 Materialien zur chromatographischen Proteinreinigung

Die gereinigten Proteine wurden anschließend einer umfangreichen Analytik (vgl. 2.18 Proteinanalytik) unterzogen.

2.18 Proteinanalytik

2.18.1 Elektrophorese und Western-Blot

Gelanalytik wurde eingesetzt, um eine visuelle Möglichkeit der Auswertung von Proteinbanden vorzunehmen. Verschiedenste Gele (z. B. Sodiumdodecylsulfate (SDS)-Gele, nativ-Gele) wurden eingesetzt, um Informationen über die Effizienz der Reinigung des Kulturüberstandes zu erhalten oder zur Detektion von Proteinen und Proteinfragmenten mittels spezifischem Antikörper. In der Gelmatrix werden Proteine im elektrischen Feld aufgetrennt.

2.18.1.1 Elektrophorese

Verwendet wurden Polyacrylamidgele der Fa Invitrogen mit verschiedenen Gradienten. Zum Einsatz kamen sowohl Nupage[®] Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (Bis-Tris)- Gele, als auch Novex[®] Tris-Glycin Gele. Nupage[®]-Gele wurden für die SDS-Elektrophorese benutzt, Tris-Glycin-Gele als Nativ-Elektrophorese.

SDS-Gele werden zur Größentrennung von Proteinen eingesetzt. SDS lagert sich an Proteine an und kompensiert ihre positive Eigenladung, entsprechend dem jeweiligen pI-Wert. Diese Ladungskompensation sorgt im Gel für eine Auftrennung der Proteine, welche im elektrischen Feld, im Wesentlichen nach der Molekülgröße erfolgt. Anhand der mitgeführten Proteinstandards können Größenabschätzungen der Proteinbanden vorgenommen werden.

Nativ-Gele werden eingesetzt, um Proteine möglichst schonend aufzutrennen entsprechend ihrer Eigenladung und Größe im verwendeten Puffersystem. Verwendet werden eher basische Puffer, um den Effekt des SDS ersetzen zu können.

Die Durchführung der Gelanalytik erfolgte nach Herstellervorgaben (NuPAGE[®]-Gele: NuPAGE[®] Technical Guide Version E 2003; Novex[®]-Gele: Novex[®] Pre-Cast Gel Electrophoresis Guide Version B 2003). Das eingesetzte Probenvolumen betrug 5 µl, andere Volumina sind in den Legenden der abgebildeten Gele aufgeführt.

Gele	<ul style="list-style-type: none"> • NuPAGE[®] Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1.0mm • NuPAGE[®] Novex 10% Bis-Tris Gel 1.0mm • Novex[®] Tris-Glycine 4-12% Gel 1.0mm • Novex[®] Tris-Glycine 4-20% Gel 1.0mm • Novex[®] Tris-Glycine 8-16% Gel 1.0mm
Laufpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • NuPAGE[®] MES / MOPS Running Buffer (20x)* • Novex[®] Tris-Glycine Native Running Buffer (10x)* • Novex[®] Tris-Glycine SDS Running Buffer (10x)*
Probenpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • NuPAGE[®] LDS Sample Buffer (4x)* • Novex[®] Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2x)* • Novex[®] Tris-Glycine Native Sample Buffer (2x)*
Reduzieragenz	NuPAGE [®] Sample Reducing Agent (10x)*
Standard	SeeBlue [®] Plus2 Pre-Stained Standard
Elektrophorese/Bloteinheit	<ul style="list-style-type: none"> • PowerEase[®] 500 Power Supply • XCell SureLock[™] Mini-Cell • XCell II[™] Blot Module
Färbereagenzien	<ul style="list-style-type: none"> • SimplyBlue[™] SafeStain • SilverXpress[®] Kit
alle Produkte von der Fa Invitrogen	

Tab. 2.19 Materialien für die Durchführung einer Gelelektrophorese; (Verdünnung der Gebrauchslösung)*

2.18.1.2 Blotten

Blotten beschreibt ein Verfahren zum Transfer von in einem Gel getrennter DNA (Southern-Blot), RNA (Northern-Blot) oder getrennten Proteinen (Western-Blot) auf eine Membran. Das für den Transfer benötigte elektrische Feld legt man senkrecht zur Trennrichtung an. Die immobilisierten Moleküle können mittels Sonden und Antikörpern markiert und anschließende enzymatische Farbreaktion detektiert werden.

SDS- oder Nativ-Gele wurden im Transferpuffer luftblasenfrei mit der Nitrocellulose (NC)- oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran bedeckt und anschließend in das Blotmodul eingeführt. Der eingefüllte Transferpuffer sorgt für die elektrische Leitfähigkeit im Blot-Modul. Die Membran ist dabei der Anode zugewandt, damit die Proteine aus der Gelmatrix,

dem elektrischen Feld folgend, auf der Membran durch hydrophobe Interaktion immobilisiert werden.

Die auf der NC-Membran immobilisierten Proteine können durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden. Ein sogenannter Erstantikörper lagert sich aufgrund seiner Affinität an das jeweilige Protein an, welches dann durch eine Farbreaktion direkt oder indirekt mittels Zweitantikörper, der gegen den Erstantikörper gerichtet ist, optisch nachgewiesen wird. Das für Farbreaktion benötigte Enzym ist mit dem Erst- oder Zweitantikörper konjugiert und setzt den zugegebenen Farbstoff um. Verwendet wurden mit alkalischer Phosphatase (AP) oder horseradish Peroxidase (HRP) konjugierte Antikörper. Um eine Reaktion der Antikörper mit der NC-Membran zu verhindern, werden die freien Bindungsstellen auf der Membran nach dem Blotten mit Blocklösung abgesättigt. Anschließend wird der Antikörper der Magermilch zugesetzt und mindestens vier Stunden inkubiert. Nicht oder nur unspezifisch gebundener Antikörper wird durch Waschen mit Tris-Puffer entfernt.

Transferpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • NuPAGE® Transfer Buffer (20x), Fa Invitrogen • Novex® Tris-Glycine Transfer Buffer (25x), Fa Invitrogen
Blotmembran	<ul style="list-style-type: none"> • Nitrocellulose/Filter Paper Sandwich, 0,2 µm pore size, Fa Invitrogen • Invitrolon™ PVDF/Filter Paper Sandwich 0,45 µm pore size, Fa Invitrogen
Blocklösung	Tris Buffered Saline, pH 8,0, with 3 % Nonfat Milk, Fa Sigma
Waschpuffer	Tris Buffered Saline, with Tween® 20, pH 8,0, Fa Sigma
Antikörper (Erst- und Zweitantikörper)	<ul style="list-style-type: none"> • Tetra His Antibody, BSA free Fa Qiagen • Penta His Antibody, BSA free Fa Qiagen • Penta His HRP Conjugate Kit Fa Qiagen • Strep-tag Antibody Fa Qiagen • Anti Mouse IgG, Alkaline Phosphatase, Fa Sigma
Färbereagenz	Sigma Fast BCIP / NBT, Fa Sigma

Tab. 2.20 Materialien für die Durchführung eines Western-Blots

2.18.1.3 Proteinfärbung

Die durch Gelelektrophorese getrennten Proteinbanden können durch verschiedenste chemische Reaktionen sichtbar gemacht werden. Benutzt wurden im Speziellen die Coomassie- und Silberfärbung.

2.18.1.3.1 Coomassiefärbung

Die Coomassiefärbung basiert auf der Anlagerung eines Triphenylmethanfarbstoffes an basische Seitenketten von Aminosäuren. Diese Methode kann auch zur Quantifizierung des Proteingehalts benutzt werden. Die Methode weist eine geringere Sensitivität als die im Folgenden beschriebene Silberfärbung auf; dennoch können Banden mit ca. 10 ng detektiert werden. Die Gele und Membranen wurden direkt mit der Färbelösung für (SimplyBlue™ SafeStain, Fa Invitrogen, vgl. Tab. 2.19) ca. 1 h inkubiert, anschließend mit Milli-Q® Wasser (H₂O) gewaschen und ausgewertet.

2.18.1.3.2 Silberfärbung

Durch Inkubation des Gels mit einer Silbernitratlösung lagern sich zunächst Silberionen an Proteine an. Überschüssigen Silberionen werden durch Waschen mit Wasser entfernt. Durch anschließende Behandlung mit Form- oder Glutaraldehyd werden Silberionen zu elementarem Silber reduziert. Elementares Silber färbt die Proteinbanden schwarz. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 ng – 1 ng pro Bande. Für die Silberfärbung wurde das SilverXpress® Kit der Fa Invitrogen (vgl. Tab. 2.19) benutzt. Die Reihenfolge der verwendeten Lösungen entspricht der in Tabelle 2.21 angegebenen Sequenz.

Lösungen	Komponentenmischung	Volumen / Gel	Zeit
Fixing Solution	90 ml Milli-Q [®] H ₂ O	200 ml	10 min
	100 ml Ethanol, Fa Merck 20 ml Eisessigsäure, Fa Merck		
Sensitizing Solution	105 ml Milli-Q [®] H ₂ O	100 ml	30 min
	100 ml Ethanol, Fa Merck 5 ml Sensitizer (Glutaraldehyd), Fa Invitrogen	100 ml	30 min
Washing Solution	Milli-Q [®] H ₂ O, Fa Millipore	200 ml	10 min
		200 ml	10 min
Staining Solution	5 ml Stainer A (Silbernitrat), Fa Invitrogen	100 ml	15 min
	5 ml Stainer B (Ammoniumhydroxid und Natriumhydroxid), Fa Invitrogen 90 ml Milli-Q [®] H ₂ O		
Washing Solution	Milli-Q [®] H ₂ O	200 ml	5 min
		200 ml	5 min
Developing Solution	95 ml Milli-Q [®] H ₂ O 5 ml Developer (Formaldehyd und Zitronensäure), Fa Invitrogen	100 ml	3 – 15 min
Stopping Solution	5 ml Stopper (Zitronensäure), Fa Invitrogen	5 ml	5 min
Washing Solution	Milli-Q [®] H ₂ O	200 ml	10 min
		200 ml	10 min
		200 ml	10 min

Tab. 2.21 Ablauf der Silberfärbung (SilverXpress[®] Silver Staining Kit, Fa Invitrogen) und verwendete Materialien

2.18.2 ELISA

Der Begriff Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) beschreibt ein immunologisches Verfahren, welches die Affinität zwischen Antigen und Antikörper zum quantitativen Nachweis von Strukturelementen (z.B. Oligopeptidbausteine von Proteinen und Viren, niedermolekulare Verbindungen) nutzt. Antigen oder Antikörper werden mit einem Enzym markiert, welches ein Substrat umsetzt. Das umgesetzte Substrat erzeugt ein Signal, welches als Farbumschlag, Fluoreszenz oder Lumineszenz erfasst werden kann. Der Sandwich-ELISA verwendet zwei Antikörper, die verschiedene Teilstrukturen des Antigens (Epitope) binden. Der Erstantikörper wird auf einer 96 *well* Mikrotiterplatte immobilisiert und anschließend mit dem Antigen inkubiert. Nach dem Entfernen des nicht gebundenen Antigens wird der Zweitantikörper hinzugegeben, der mit horseradish Peroxidase (HRP) markiert ist und das Substrat 3, 3', 5, 5'- Tetramethylbenzidin (TMB) umsetzt. Der Sandwich-ELISA diente dem Nachweis der Expressionsleistung der rekombinant hergestellten TMG-Albumin-FP durch Detektion des Farbumschlags von Blau (655 nm) zu Gelb (450 nm). Der Farbumschlag wurde mittels Plattenreader detektiert. 96 *well* Mikrotiterplatten wurden vor der ELISA-Testung mit dem Erstantikörper (anti-human Albumin-Antikörper) beschichtet, der auf 2 µg/ml mit Beschichtungspuffer verdünnt worden ist. Nach 24 h wurde die Beschichtungslösung verworfen und mit Waschlösung gespült. Die *wells* wurden anschließend mit Blocklösung inkubiert und nach 1,5 h wieder gespült. Nun wurden 100 µl Aliquots der Proben hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit Waschlösung (200 µl/*well*) gewaschen. Das Konjugat - der Nachweisantikörper - wird ebenfalls bei 37 °C für 1 h inkubiert, nicht gebundener Antikörper durch Waschen entfernt und mit Chromogen für 30 min unter Lichtausschluss inkubiert. Die Reaktion wird nach abgelaufener Zeit mit Stopplösung unterbrochen. Die ELISA-Technik wurde eingesetzt, um den Gehalt der mit humanem Albumin fusionierten Proteine zu bestimmen.

Materialien / Apparatur	Bezeichnung	Eingesetztes Volumen
Verdünnungspuffer für Standard und Proben	LowCross Buffer [®] , Fa Candor Bioscience GmbH	
Verdünnungspuffer für Konjugat	siehe Blocklösung	
Mikrotiterplatten	Nunc-Immuno Plate U96 Maxisorp, Fa Nunc	

Materialien / Apparatur	Bezeichnung	Eingesetztes Volumen
Beschichtungsmaterial	Capture Antibody anti-hu Albumin A80-229A 0,5 mg/ml, Fa Bethyl: Gebrauchslösung: 2 µg/ml (1:250)	100 µl/well
Beschichtungspuffer	0,05 M Carbonat-Bicarbonat Buffer Capsules, Fa Sigma: Gebrauchslösung:	
Waschlösung	PBS-T with Tween [®] 20, pH 7,4 , Fa Sigma Gebrauchslösung: 1 Beutel auf 1 Liter	
Blocklösung	Blocking Solution, Fa Candor Bioscience GmbH	200 µl/well
Standard	N Protein Standard SL REF, Fa Dade Behring: Gebrauchslösung: 0,2 - 20 ng/ml	100 µl/well
Konjugat	Rabbit-anti-hu Albumin-POD 0,89 mg/ml, Fa Dako Gebrauchslösung: 1:9000 verdünnt	100 µl/well
Chromogen	Chromogen TMB, Fa Dade Behring: Gebrauchslösung: 1:11 verdünnt	
Puffer – Substrat (Verd.-Puffer für Chromogen)	Puffer/Substrat TMB, Fa Dade Behring	
Stopplösung	Stopplösung POD, Fa Dade Behring	
Plattenreader	Behring Elisa Processor II, Fa Dade Behring	

Tab. 2.22 Materialien zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen mittels ELISA-Technik

Die gereinigten und mittels Gelanalytik untersuchten Proteine mussten des Weiteren auf ihre posttranslationale Modifikation, die γ -Carboxylierung, analysiert werden. Diese Fragestellung konnte mit Hilfe der Proteinsequenzierung bearbeitet werden.

2.18.3 Proteinsequenzierung

Die Bestimmung einer Aminosäuresequenz wurde erstmals von P. Edmann im Jahre 1950 entwickelt und 1967 automatisiert. Bei der Proteinsequenzierung werden Proteine vom N-Terminus ausgehend abgebaut. Die Aminogruppe der endständigen Aminosäure reagiert mit Phenylisothiocyanat unter Bildung eines Phenylthiocarbamoylderivat. Durch schwach saure Bedingungen wird die Aminosäure dann abgespalten und es entsteht ein um eine Aminosäure verkürztes Peptid. Die abgespaltene, zyklische Verbindung ist ein Phenylthiohydantoin (PTH)-Aminosäurederivat, welches chromatographisch aufgetrennt und identifiziert werden kann. Die Bestimmung der Peptidsequenz erfolgt durch mehrfaches Abspalten einzelner Aminosäuren vom untersuchten Protein. Die abgespaltenen Aminosäuren werden chromatographisch aufgetrennt und mit einem ebenfalls per HPLC bestimmten PTH-Proteinstandard verglichen. Durch den Vergleich der Retentionszeiten von Standard und aufgebener Probe werden die abgespaltenen Aminosäuren zugeordnet. Über die Abnahme der Proteinmenge wird die Hauptsequenz eines Proteingemisches bestimmt. Eine durchschnittlich bestimmbare Sequenzlänge beträgt ca. 25 – 40 Aminosäuren bei einer Proteinausgangsmenge von 200 – 400 pmol. Möchte man eine komplette Proteinsequenz bestimmen, führt man im Vorfeld einen proteolytischen Verdau, z.B. mit Trypsin, durch. Trypsin spaltet Peptide spezifisch auf der Carboxylseite von Arginin und Lysin. Nach der Sequenzierung der einzelnen Peptidfragmente kann man die Gesamtsequenz des Proteins aus überlappenden Sequenzabschnitten ableiten. Die Bestimmung der Sequenz wurde mit einem automatisierten Proteinsequenzer Sequenator Procise 492, der Fa Applied Biosystems, durchgeführt. Die Reagenzvolumina (siehe Tab. 2.23) sind herstellerepezifisch festgelegt. Die für die Sequenzierung benötigte Proteinmenge wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Blot auf eine PVDF-Membran gewonnen. Die PVDF-Membran wurde auf das Glasfaserfilterpapier gegeben und bei der anschließenden Reaktion in den Sequencer überführt. Die Reaktionskammer, in die das Glasfilterpapier überführt wurde, sollte vorher mit Aceton oder Acetonitril gereinigt werden. Vor der Sequenzierung wurde das Glasfilterpapier mit BiobreneTM behandelt, was der Immobilisierung der Probe während des Edman-Abbauverfahrens diente. Nach Einsetzen des Filters wurde das System mit Argon gefüllt und anhand des aufgebauten konstanten Drucks kontrolliert, ob ein geschlossenes Meßsystem vorlag. Störende Verbindungen wurden durch 2 – 3 Edman-Abbauzyklen ohne Probe, vor der eigentlichen Sequenzierung, entfernt. Die erhaltenen Daten können als visuelle Kontrolle des HPLC-Systems benutzt werden. Die eigentliche Probe wird im Anschluss aufgegeben und die abgespaltenen PTH-Aminosäuren über eine auf 55 °C vortemperierte *Reversed Phase* (RP) HPLC-Säule getrennt. Die Proteinsequenzierung kann auch ohne vorherigen Transfer auf eine PVDF-Membran durchgeführt werden. Die Probe sollte einen

hohen Reinheitsgrad aufweisen, um eine eindeutige Auswertung zu ermöglichen. Die Funktionstüchtigkeit des Geräts wird regelmäßig durch Analyse eines Proteinstandards (β -Lactoglobulin) kontrolliert.

Proteinsequenzierer	Protein Sequenator Procise 492, Fa Applied Biosystems
HPLC	140C Microgradient System, Fa Applied Biosystems
HPLC-Säule	Modell PTH-C18, Fa Applied Biosystems
HPLC-Vorsäule	Modell RP 18 (7 micron), Fa Applied Biosystems
UV- / VIS-Detektor	Detector Serie 200 UV / VIS ABSORB, Fa Applied Biosystems: Wellenlänge 269 nm
Probenauftrag	Glasfaserfilterpapier, Fa Applied Biosystems
Immobilisierungsagensz	Biobrene TM 75mg lyophilisiert, Fa Applied Biosystems: 1 Abfüllung Biobrene + 750 μ l Milli-Q [®] H ₂ O
Aminosäurestandard	PTH Standard Lösung, Fa Applied Biosystems
Proteinstandard	Lactoglobulin, Fa Applied Biosystems
PTH Gebrauchslösung	z.B. 4 ml R5B + 1 ml PTH Standard Lösung entspricht nach Injektion 10 pmol jeder im Gemisch vorliegenden PTH-Aminosäuren
Puffer zur Verbesserung der Trennleistung	Premix Puffer, Applied Biosystems: enthält Essigsäure
Kaliumhydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄ , Fa VWR: angesetzte Konzentration 1 mol/l KH ₂ PO ₄
Aceton	Aceton für die Spektroskopie, Fa VWR
S4B	20 % (V / V) Acetonitril in H ₂ O, Fa Applied Biosystems
S3	1-Chlorbutan, Fa Applied Biosystems
S2B	Ethylacetat, Fa Applied Biosystems
R5B	Acetonitril mit N-Acetylcystein, Fa Applied Biosystems
R4A	25 % (V / V) Trifluoressigsäure (TFA) in H ₂ O mit 0,001 % (m / V) Dithiothreitol, Fa Applied Biosystems

R3	Trifluoressigsäure unverdünnt, mit 0,002 % (m / V) Dithiothreitol, Fa Applied Biosystems
R1	5 % Phenylisothiocyanat (PITC) in n-Heptan, Fa Applied Biosystems
Lösung B2	(Acetonitril / 2-Propanol), Fa Applied Biosystems
Lösung A3 (Stamm-Lösung)	3,5 % (V / V) Tetrahydrofuran (THF) in H ₂ O, Fa Applied Biosystems
Lösung A3 (Gebrauchs-Lösung)	3,5 % THF in H ₂ O + 10 - 25 ml Premix ad 960 ml A3 (Premix-Volumen entsprechend der optimalen PTH-Aminosäure Trennleistung ermitteln) Zusätze bei Bedarf: <ul style="list-style-type: none"> • 0,3 – 1,3 ml Aceton (zur Glättung der Basislinie der Elutionsdiagramme) • bis zu 1 ml 1 mol/l KH₂PO₄ (zur Vorbeugung gegen einen Abfall der Basislinie im Injektionsbereich) • 10 – 150 µl TFA (zur besseren Separierung von DTT und D)
R2B	N-Methyl-Piperidin in H ₂ O / CH ₃ OH, Fa Applied Biosystems

Tab. 2.23 Verwendete Materialien für die Durchführung einer Proteinsequenzierung

2.19 Zellfixierung und Anfärbung zellspezifischer Strukturen

Um die Lokalisation von TMG3 und TMG4 in der Zelle zu bestimmen, wurden die nativen, mit Membran- und Intrazelluläranteil ausgestatteten, TMG3- und TMG4-GFP-FP in HEK293-Zellen exprimiert. Die Proteine sollten sich aufgrund ihres vorhandenen Membranankers in der Zellmembran verankern (vgl. 3.1.2 Proteinexpression und Lokalisation der nativen Proteine). Die Wildtyp HEK293-Zellen stellten die Negativkontrolle dar. Außerdem konnte durch die Fluoreszenz eine Beurteilung der Expressionseffizienz vorgenommen werden. Weitere Anfärbungen zellspezifischer Strukturen wurden mit definierten Farbstoffen (4',6-Diamidino-2-phenylindol, DAPI; PKH26 red) durchgeführt. DAPI färbt DNA und RNA in toten und intakten Zellen blau an. PKH26 red färbt die Zellmembran durch Anlagerung an hydrophobe Abschnitte über aliphatische Molekülstrukturen rot an. Die Zellfixierung auf einem Trägermaterial diente dem Zweck der weiteren Untersuchung unter dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (KLSM) oder Fluoreszenzmikroskop. Die Zellen wurden in Chamber SlidesTM, einer Art Mehrwellplatte mit entfernbarem Kammersystem, kultiviert und wuchsen als Monolayer so lange, bis 100.000 - 200.000 Zellen/well vorhanden waren. Falls die Zelladhäsion am Trägermaterial nicht ausreicht, kann diese durch Behandlung mit Fibronectin verstärkt werden. Die Konzentration in den Wells sollte 15 - 25 ng/ml betragen und Fibronectin sollte im Zellmedium gelöst werden. Die Einwirkzeit beträgt mindestens 6 Stunden. Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums und mehrmaligem Waschen mit Phosphate Buffered Saline (PBS) durch Zugabe von 3 % (m / V)-iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Nach ca. 20 min waren die Zellen auf dem Träger fixiert und konnten nach weiterem Waschen mit PBS der Färbung unterzogen werden. Für die Kernfärbung benutzt man DAPI, welches nach der Einwirkzeit von 20 min wieder mit PBS abgewaschen wurde. Die Zellmembranfärbung wird mit PKH26 red durchgeführt. Es lagert sich an hydrophobe Teile der Zellmembran mit seinen aliphatischen Molekülstrukturen an. PKH26 red wurde 5min mit den Zellen inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 % (m / V)-iger Bovine Serum Albumin (BSA)-Lösung gestoppt. Durch Waschen mit PBS wurde anschließend restlicher Farbstoff entfernt. Das Einbetten erfolgte nach Entfernung der Chamber SlidesTM und schützte die Proben vor Lufteinschlüssen, welche zur Oxidation des Farbstoffs geführt hätten. Die Zellen wurden mit einer PBS / Glycerol-Mischung bedeckt und das aufgesetzte Deckglas wurde mit FluorSaveTM versiegelt.

Objektträger mit aufgesetzten Kammern	Chamber Slides TM (mit 2,4 oder 8 wells) Permanox, Fa Nunc
Paraformaldehyd	Paraformaldehyd powder 95 %, Fa Sigma: Paraformaldehyd-Lösung 4 % (m / V) in PBS, pH 11
PBS	PBS Folienpackungen, Fa Sigma: 0,01 M Phosphat, 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 7,4
Glycerol	Glycerol 85%-ig (V / V), Fa Merck: angesetzte Glycerol / PBS-Mischung: Glycerol mit dem doppelten Volumen PBS mischen
Färbereagenzien	<ol style="list-style-type: none"> 1. PKH26 red, Fa Sigma PKH26 red-Arbeitslösung: im Verhältnis 1/1 (V / V) mit beigefügtem Diluent C (isoosmotischer Puffer mit physiologischen Salzen, Puffern und Detergenzien um Zellvitalität zu erhalten) mischen Exzitationswellenlänge: 551 nm Emissionswellenlänge: 567 nm 2. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindoledihydrochloride), Fa Molecular Probes Exzitationswellenlänge: 358 nm Emissionswellenlänge: 461 nm (DNA), 500 nm (RNA) DAPI-Stammlösung in MilliQ[®]-H₂O: 6 mg/l (kann eingefroren werden) DAPI-Arbeitslösung: 30µl Stock solution mit 1ml PBS verdünnen
Deckgläser	Deckglas, Fa Menzel
nicht fluoreszierender Klebstoff	FluorSafe TM , Fa Calbiochem
Konfokales Laser Scanning	LSM 510 Scanning Module und Axiovert 100M, Fa Carl Zeiss Jena
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager Z1 mit AxioCam HRc und Apotome, Fa Carl Zeiss Jena

Tab. 2.24 Materialien der Zellfixierung und Anfärbung zellspezifischer Strukturen

2.20 Bindungsversuche mit Magnetic Beads

Ziel des Versuches war es, die Proteine an den *Beads* zu immobilisieren, um im hergestellten, heparinisierten Plasma nach Bindungspartner zu suchen. Die *Magnetic Beads* konnten mittels eines starken Permanentmagneten aus dem Plasma separiert werden, um sie dann Wasch- und Elutionsschritten für den postulierten Bindungspartner zu unterziehen.

2.20.1 Metallchelat *Magnetic Beads*

Zuerst wurde die Adsorption der TMG3- / TMG4-Albumin-FP, gelagert in 300 mM PBS, bei 280 nm photometrisch ($E_{280\text{nm}}^{1\%(\text{m/V})} = 5,8$) vermessen. Es folgte die Kopplung der Proteine an die *Magnetic Beads* bei Raumtemperatur. Nach der Proteinimmobilisierung wurde die verbleibende Proteinkonzentration erneut zur Abschätzung der Kopplungseffizienz photometrisch bestimmt. Die gewünschte resuspendierte *Beadmenge* (Berechnung siehe unten) wurde pipettiert und mit 3 x 20 ml Kopplungs-/Waschpuffer gewaschen. Die gewünschte Menge an Protein wurde zu den vom Kopplungs-/Waschpuffer mit Magneten separierten *Beads* gegeben und 30 min – 60 min bei RT inkubiert. TMG3- und TMG4-Albumin-FP wurden als Bindungsanker an *Magnetic Beads* gekoppelt. Als eingesetzte Kontrolle diente Recombumin® 20 % (m / V) (Fa Delta) ohne His-tag, welches unspezifisch an die *Beads* binden sollte. Nach der entsprechenden Zeit wurden die *Beads* wieder mittels eines einzelnen Magnet separiert und vor Gebrauch mit 3 x 20 ml Kopplungs-/Waschpuffer gewaschen. Falls erforderlich wurden die *Beads* in 5 ml Lagerpuffer bis zu 12 h gelagert. Vor den Proteinbindungsversuchen mit den mit TMG3- / TMG4-Albumin-FP beladenen *Beads* wurden diese mit 3 x 20 ml Lagerpuffer gewaschen werden, weil Phosphatreste eine Ca^{2+} -Bindung verhindern würden. Die separierten *Beads* wurden nun mit ca. 300 ml heparinisiertem und filtriertem Plasma für ca. 12 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurde mit Waschpuffer gewaschen. Die Elution der gebundenen Liganden erfolgte durch Waschen der mit Magnet separierten *Beads* mit Elutionspuffer (3 x 5 ml). Für weitere Verwendung wurden die mit Protein beladenen *Beads* wieder in Lagerpuffer überführt. Die eluierten Aliquots wurden bei - 80 °C eingefroren und gelagert.

Die Ermittlung der Proteinmenge wird nachfolgend beschrieben. Ausgehend von der molaren Proteinmasse der TMG-Albumin-FP ($M_{\text{rTMG3-Albumin-FP}} \sim 75349$ Dalton, $M_{\text{rTMG4-Albumin-FP}} \sim 75688$ Dalton, $M_{\text{r}_{\text{eGFP}} + \text{His-tag}} \sim 27717$ Dalton) und des *enhancedGFP* (eGFP) Referenzproteins konnte die Proteinmenge berechnet werden, die mit der maximalen Packungsdichte an die *Magnetic Beads* gekoppelt werden konnte. Deren Bindungskapazität (1 g *Beads* bindet

270 mg eGFP) für ein eGFP-Protein war als Referenz vom Hersteller angegeben. Mit Hilfe der gegebenen Daten konnte die Menge an gebundenen eGFP-Referenz-Proteinmolekülen berechnet werden ($n_{\text{GFP}} = 0,270 \text{ g} / 27717 \text{ g/mol} = 9,74 \times 10^{-6} \text{ mol}$). Die molare Masse der TMG-Albumin-FP wurde in Relation zum eGFP-Referenzprotein gesetzt ($M_{\text{rGFP}} \times 3 = M_{\text{rTMG3-/TMG4-Albumin-FP}}$). Aufgrund des korrelierenden Verhältnisses von Molekülmasse und Molekülgröße wurde die Molekülanzahl von bindungsfähigen TMG-Albumin-FP neu berechnet ($1/3 \times n_{\text{GFP}} = n_{\text{TMG-FP}}$; $n_{\text{TMG-FP}} = 3,25 \times 10^{-6} \text{ mol}$). Entsprechend konnten 244,66 mg TMG3-Albumin-FP und 245,76 mg TMG4-Albumin-FP pro 1,0 g *Magnetic Beads* gebunden werden. Es wurden 40 mg des jeweiligen TMG-Albumin-FP an die entsprechende *Bead*-Masse (0,16 g) gekoppelt. Ein Überschuss von 10 mg des jeweiligen FP wurde eingesetzt, um eine ausreichende Oberflächenbelegung der *Magnetic Beads* zu erhalten. Die für die Elution des potentiellen Bindungspartners benötigte Zitratpuffermenge wurde unter folgenden Annahmen berechnet. Die Protein – Protein Bindung wird durch mindestens ein Ca^{2+} -Ion vermittelt und ein Zitratmolekül bindet mindestens ein einziges Ca^{2+} -Ion. Entsprechend der eingesetzten Proteinmenge wurde die gleiche Menge an Zitratpuffer benötigt ($3,25 \times 10^{-6} \text{ mol}$). Das Elutionsvolumen betrug mindestens 4 ml; in der Praxis wurden 5 ml Elutionspuffer (s.o.) eingesetzt (0,004 mol Zitratpuffer \triangleq 4 ml Elution; 0,004 mol Zitratpuffer \geq minimal benötigte Konzentration $3,25 \times 10^{-6} \text{ mol}$).

Kopplungs-/Waschpuffer	50 mM Na-phosphat pH 8,0; 300 mM NaCl, 0,01 % (V / V) Tween [®] 20
Lagerpuffer	Tris Buffered Saline, Fa Sigma
Elutionspuffer	Zitratpuffer 0,1 M, pH 4,5
PBS	300 mM (228,9 mM K ₂ HPO ₄ , 71,1 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2)
Inkubationsgefäß	250 / 500 ml Enghalsplastikflaschen, Fa Nalgene
Permanentmagnet	Quadermagnet 100 x 50 x 40 mm Haftkraft: 200 kg, Fa magnets4you GmbH www.magnet-shop.net
<i>Magnetic Beads</i>	M-PVA IDA Cu, Fa Chemagen
Filter	Faltenfilter 602 H 1/2 Ø 185 mm, Fa Whatman
UV-Photometer	Du530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer, Fa Beckman
alle Chemikalien wurden von der Fa Merck Reinheitsgrad p.a. bezogen; andere Hersteller sind angegeben	

Tab. 2.25 Materialien der Proteinimmobilisierung an M-PVA IDA *Magnetic Beads*

2.20.2 NHS-aktivierte *Magnetic Beads*

Die *Bead*-Suspension wurde vorsichtig aufgeschüttelt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die magnetische Separation der *Beads* erfolgte solange, bis der Überstand klar war. Anschließend wurden die *Beads* mit der doppelten Menge von kaltem Waschpuffer gewaschen. Der Puffer muss einen pH-Wert unterhalb von 7,0 aufweisen, weil sonst eine hydrolytische Spaltung des N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Esters auftritt. Anschließend wurden die *Beads* mit dem Kopplungspuffer gewaschen. Die gewünschte Menge an Protein, bezogen auf die Bindungskapazität der *Beads*, wurde im Kopplungspuffer gelöst und auf die vorgewaschenen *Beads* gegeben. Die in Kopplungspuffer dialysierte Proteinlösung wurde vor der Kopplungsreaktion bei 280 nm photometrisch ($E_{280\text{nm}}^{1\%(\text{m/V})} = 5,8$) vermessen. Ein doppelter Proteinüberschuss wurde eingesetzt, um eine möglichst hohe Sättigung der *Beads* zu erreichen. Unter vorsichtigem Schütteln und Rotieren wurde 3 h bei RT oder 12 Stunden bei 4 °C inkubiert. Vor dem nächsten Waschschrift wird der Überstand abgetrennt und ebenfalls photometrisch bei 280 nm vermessen. Aus der Differenz der gemessenen Werte ergibt sich die gekoppelte Proteinmenge. Es folgte zweimal ein Waschschrift mit dem doppelten Volumen an Kopplungspuffer, bezogen auf das Gesamtinkubationsvolumen. Das doppelte Volumen *Quenching*-Puffer wurde hinzugegeben und mindestens 1 h bei RT geschüttelt. Der *Quenching*-Puffer wurde durch dreimaliges Waschen mit Lagerpuffer verdrängt. Die *Beads* wurden im Lagerpuffer resuspendiert und bei 4 °C gelagert werden.

Zusätzlich wurde zur Kontrolle der gebundenen Proteinmenge ein *Silverstain-Gel* der Proben angefertigt, die sowohl vor als auch nach der Bindung gezogen worden sind.

Pro Kopplungsansatz wurde 1 g *Magnetic Beads* pro eingesetzt. TMG3- und TMG4-Albumin-FP wurden als Bindungspartner für ein gesuchtes, unbekanntes Protein eingesetzt und mit humanem Serumalbumin beladene *Beads* dienten als Kontrolle. Die mit Protein beladenen *Beads* wurden in heparinisiertes, gefiltertes Plasma gegeben und 12 h bei 4 °C inkubiert. Zwei verschiedene Versuchsansätze wurden mit jeweils erneut an die *Beads* gekoppelten Proteinen durchgeführt.

Versuch 1: Gewaschen wurde dreimal mit 40 ml Lagerpuffer. Von jedem Wasch- und folgenden Elutionsschrift wurde eine Probe gezogen und bei – 80 °C eingefroren. Der zweite Waschschrift erfolgte dreimal mit 40 ml 0,5 M NaCl Lösung eingestellt auf einen pH-Wert von 7,0. Der entscheidende Elutionsschrift war das dreimalige Waschen mit 40 ml 0,5 M

EDTA-Lösung pH 8,0. Anschließend wurde noch dreimal mit 40 ml 0,3 M HCl-Lösung mit pH 3,0 gewaschen, um Fette zu lösen.

Versuch 2: Gewaschen wurde dreimal mit 40 ml Lagerpuffer. Von jedem Wasch- und folgenden Elutionsschritt wurde eine Probe gezogen und bei – 80 °C eingefroren. Es folgte diesmal direkt die dreifache Elution mit 40 ml 0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0, um einen Verlust schwach affin gebundener Proteine, verursacht durch die hohe Salzkonzentration des NaCl-Waschpuffers (vgl. Versuch 1), zu unterbinden. Abschließend wurde noch dreimal mit 40 ml 0,3 M HCl-Lösung pH 3,0 gewaschen.

Waschpuffer	0,05 M 2-Morpholino-ethansulfonsäure (MES), pH 5,4
Kopplungspuffer	0,02 M MES, pH 6,5
Quenching-Puffer	0,05 M Tris, 0,1 % (V / V) Ethanolamin, pH 7,5
Lagerpuffer	0,05 M Tris, pH 7,5
Elutionspuffer	0,5 M EDTA pH 8,0
NaCl-Waschpuffer	0,5 M NaCl, pH 7,0
HCl	0,3 M HCl, pH 3,0
Magnetic Beads	M-PVA Ak 13 beads, Fa Chemagen: Konzentration: 1 g Abfüllungen enthalten 25 mg <i>Beads</i> /ml Bindungskapazität ca. 5 mg Protein/g <i>Beads</i>
Filter	Faltenfilter 602 H 1/2 Ø 185 mm, Fa Whatman
UV-Photometer	Du530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer, Fa Beckman
alle Chemikalien wurden von der Fa Merck Reinheitsgrad p.a. bezogen; andere Hersteller sind angegeben	

Tab. 2.26 Materialien für die Proteinimmobilisierung an NHS aktivierte M-PVA Ak 13 *Magnetic Beads*

2.21 Herstellung von heparinisiertem Plasma

Die Einzelblutspenden wurden von der Fa Dade Behring bezogen und auf Wunsch direkt mit Heparin (Liquemin[®]) versetzt. Das heparinisierte (10 U/ml) Blut wurde bei mindestens 2500 x g bei 16 °C für 18 min zentrifugiert. Der Blutkuchen setzte sich ab und das überstehende Plasma wurde mit einer Saugflaschenapparatur abgezogen. Durch Sterilfiltration oder erneute Zentrifugation des Plasmas bei 8000 x g und Separation mit der Saugflaschenapparatur wurden gegebenenfalls enthaltene restliche Thrombozyten entfernt. Die Herstellung von humanem Plasma durch Zentrifugation, ausgehend von Blutspenden, wurde entsprechend der DIN 58905-1 des Normenausschusses Medizin (NaMed) durchgeführt.

Plasma	Blutspenden (mit Heparinzusatz), Fa Dade Behring
Antikoagulantien	Liquemin [®] N 5000, Fa Roche
Zentrifuge	Cryofuge 8000, Fa Heraeus

Tab. 2.27 Materialien der Herstellung von heparinisiertem Plasma

2.22 Massenspektrometrische Auswertung der eluierten Fraktionen

Die Eluate wurden per Massenspektrometrie (MassSpek) (Fa Toplab, Martinsried) untersucht, um geringste Unterschiede der gebundenen Proteine zwischen Probe und Kontrolle zu erkennen und eine höhere Auflösung zu erhalten, als es per Gelanalytik möglich war. Folgende Angaben wurden zur Verfügung gestellt, um die Ergebnisse zu deuten:

Ein Probenvolumen von 500 μl wurde über eine Filtermembran der Fa Pall mit einer Molekülgrößen-Ausschlussgrenze von 3 kDa auf 50 μl ankonzentriert. Von diesem Volumen wurden 20 μl mit 30 μl einer 8 M Harnstoff-Lösung versetzt und mit Ammoniumcarbonatpuffer auf einen pH von 7,8 eingestellt. Nach Zugabe von 5 μl einer 45 mM Dithiothreitol (DTT)-Lösung wurde der Ansatz für 30 min bei 55 °C inkubiert und folgend mit 5 μl Indol-3-Essigsäure (100 mM) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mit 110 μl H₂O und 0,5 μl einer Trypsin-Lösung (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ca. 12 h bei 37 °C enzymatisch verdaut. Von diesen Proben wurde eine *Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation-Mass Spectrometry* (sogenannte LC-ESI-MS) ausgeführt. Die verdauten Ansätze wurden zuerst auf eine RP-Säule (C18 PepMap 100) geladen und chromatographisch getrennt. Die Flussrate betrug 6 $\mu\text{l}/\text{min}$. Als Laufpuffer wurde eine 0,1 %-ige (V / V) Ameisensäure (Puffer A) verwendet. Die so umgepufferten und von Enzymen befreiten Proben wurden im weiteren Verlauf auf einer analytischen RP-Säule (C18 PepMap 100) mit einem 120 min Gradienten (0-30 % (V / V) Puffer B in 80 min, 30-60 % (V / V) Puffer B in 30 min, 100 % (V / V) Puffer B in 10 min; Puffer A: 0,1 % (V / V) Ameisensäure, Puffer B: 84 % (V / V) Acetonitril und 0,1 % (V / V) Ameisensäure) bei einer Flussrate von 260 nl/min getrennt. Die so separierten Peptide wurden direkt in ein Massenspektrometer überführt.

HPLC	Ettan MDLC, Fa GE
Massenspektrometer	Linear Ion Trap Mass Thermo LTQ, Fa Thermo Electron
Nadel	SilicaTip, FS-360-50-15-D-20, Fa Thermo Electron Nadelspannung: 1,4 kV
Methode	Massenbereich: 300-2000 m/z (Masse/Ladung)

Tab. 2.28 Herstellerangaben zur Massenspektrometrie

Die Datenbanksuche, der Abgleich von gefundenen Sequenzen mit bekannten Proteinen, erfolgte mit der Suchmaschine Mascot. Die Rohdaten wurden tabellarisch ausgewertet und Proteine, die sowohl bei Kontrolle und TMG3- oder TMG4-Albumin-FP Probe vorkamen, als spezifischer Bindungspartner verworfen. Proteine, die nur in der Kontrolle auftraten, wurden ebenfalls verworfen.

Die übrigen, nach Entfernung der Redundanzen, verbleibenden möglichen Bindungspartner sind in einer Tabelle aufgelistet (vgl. 8.6 Rohdaten der Massenspektrometrie).

2.23 Enzymatische Abspaltung des Albuminteils von den Fusionsproteinen

Um für Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie (*Surface-Plasmon-Resonance*, SPR) auf die Ektodomäne begrenztes TMG3/4 einsetzen zu können, muss der Albuminteil mittels PreScission[®]-Protease (5 °C) abgespalten werden. Diese Protease ist eine Fusion aus der Glutathion-S-Transferase und der Rhinovirus-3C-Protease. Die zu spaltenden Proben lagen in physiologischer NaCl-Lösung vor und waren im geforderten pH Bereich von 7-8.

Protease	PreScission [®] Protease, Fa GE 80 units / 1 ml Ansatz 10ml Ansatz: 3ml Albumin-FP (TMG3+4) + 3 ml Spaltpuffer + benötigte Enzymmenge (125 µl = 250 units) + H ₂ O ad 10 ml
Spaltpuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 1 mM DTT 150 mM NaCl 1 mM EDTA 0,01 % (V / V) Tween [®] 20
Alle Chemikalien wurden von der Fa Merck Reinheitsgrad p.a. bezogen; andere Hersteller sind angegeben	

Tab. 2.29 Materialien für die enzymatische Abspaltung der Albuminfusion

2.24 SPR

Das Prinzip der SPR wurde zuerst von Liedberg et al. (1983) beschrieben. Mit Hilfe der SPR kann man gezielt Bindungsvorgänge an Oberflächen untersuchen, wie z.B. Reaktionskinetiken, mit denen sich auch Bindungskonstanten von Proteininteraktionen ermitteln lassen. *Label*-freie Detektionen mit hoher Sensitivität und Spezifität können durch Einsatz der SPR-Technik in kurzer Zeit durchgeführt werden. Die Messeinheit besteht aus einem Prisma, welches an eine Metalloberfläche (meistens Gold) angrenzt. Auf diesem Metall wird durch eine spezielle Oberflächenchemie einer der Bindungspartner immobilisiert, mit welchem der Interaktionspartner reagiert. Am Metall selbst findet man an der Grenzfläche zu einem Dielektrikum (im vorliegenden Fall die Puffersubstanz in der der Interaktionspartner vorliegt) ein Elektronengas, das durch Licht in Schwingung versetzt werden kann. Die resultierende evaneszente Plasmaschwingung der freien Metallelektronen wird als Oberflächenplasmon bezeichnet. Als evaneszente Wellen werden grundsätzlich Wellen bezeichnet, deren Amplitude nach einem Auftreffen auf ein Medium, in dem sie sich nicht ausbreiten können, exponentiell abnimmt. Für diese Art der Anregung verwendet das Biacore 3000-Gerät eine *near-infrared*-Leuchtdiode [Jason-Moller, Murphy 2006], welche durch das Prisma und die Goldschicht auf den Analyten trifft. Die Resonanzbedingungen werden bei konstantem Einfallswinkel des Lichts durch den Brechungsindex des Mediums bestimmt, durch welches das Licht auf die Metalloberfläche trifft. Oberhalb des Winkels der Totalreflektion nimmt die Lichtintensität bis auf ein Minimum ab, an dem sich die maximale Anregung des Plasmons befindet. Die Intensität des Plasmons nimmt mit zunehmendem Abstand von der Oberfläche ab. Die Veränderung des Brechungsindex oberhalb der Goldschicht, z. B. durch Bindung von Molekülen, durch die sich auch die Ausbreitung des Plasmons verändert, wird als Messsignal abgenommen. Der Umfang der Veränderung des Brechungsindex ist abhängig von der Molekülgröße und -anzahl. Die zeitabhängige Bindungskurve, bestimmt durch die Veränderung des Brechungsindex, dient der Ermittlung der Bindungskinetik. Das verwendete Biacore 3000-System ist ein Durchfluss-System. Der verwendete Goldchip ist mit Carboxylgruppen-tragenden Dextranfäden oberflächenmodifiziert, um unspezifische Interaktionen zu reduzieren und um Proteine gezielt an den Chip zu binden. Die Moleküle, die an den Dextranfäden des Goldchips immobilisiert wurden, lagen in einer Konzentration von ca. 40 µg/ml vor. Die Proteine wurden mit einem Natriumacetatpuffer auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Dies waren die TMG3- und TMG4-Albumin-FP, sowie nicht fusioniertes Albumin für den Referenzkanal. Die Immobilisierung erfolgte bei einem pH-Wert von 4,0 für TMG3- und TMG4-Albumin-FP, bzw. 5,0 für Albumin alleine. Bevor die Proteine an die Carboxylgruppen der Dextranfäden koppeln, müssen erstere aktiviert werden. Durch Zugabe eines 1-Ethyl-(3-

dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) / NHS-Gemisches entsteht zuerst ein instabiler Acylisoharnstoff- und danach ein NHS-ester. An diese semi-stabile Verbindung können dann primäre, Protein-ständige Aminogruppen binden. Die Auswertung erfolgte in Form einer Differenzbildung des Messsignals zwischen dem jeweiligen Mess- und Referenzkanal.

Alle verwendeten selbst hergestellten Puffer wurden steril filtriert. TMG3- und TMG4-Albumin-FP mussten vor der Kopplung in Systempuffer umdialysiert und filtriert werden, da nach dem Auftauen nicht sichtbare Partikel auftraten, welche vom Biacore-System detektiert wurden. Zur Immobilisierung an den Chip wurde jeweils pro Messzelle eine Proteinlösung mit 40 µg / ml eingesetzt; andere Konzentrationen sind in den Versuchen extra aufgeführt.

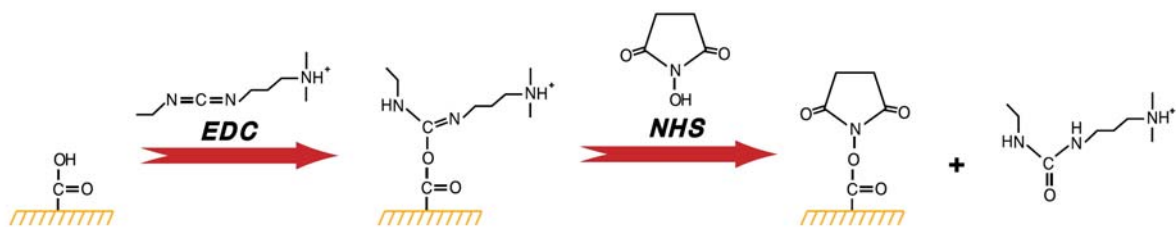


Abb. 2.7 Aktivierung der Carboxymethyl-Dextranfäden mit EDC / NHS zur anschließenden Immobilisierung von Aminen, übernommen aus Biacore Sensor Surface Handbook 2003, Version AA

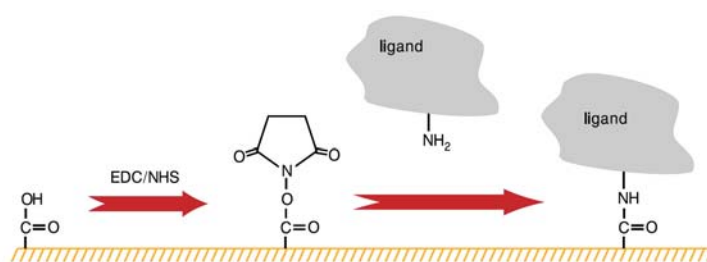


Abb. 2.8 Immobilisierung von Aminen an aktivierte Dextranfäden, übernommen aus Biacore Sensor Surface Handbook 2003, Version AA

SPR-Gerät	Biacore 3000, Fa GE
Albumin	Albumin 20 % (m / V), Fa ZLB Behring Recombumin [®] 20 % (m / V), Fa Delta
Chip	Sensor Chip CM3, Fa GE
Chip-Aktivierkit	<ul style="list-style-type: none"> • Amine Coupling Kit, Fa GE 750 mg EDC, 115 mg NHS, 10,5 ml 1 M ethanolamine-HCl pH 8,5 • BIA Maintenance Kit, Fa GE: BIA normalizing solution glycerol 70 % (m / m) BIAdesorb solution 1 BIAdesorb solution 2 BIA disinfectant HBS-EP buffer Sensor Chip Maintenance Sensor Chip System Check
Immobilisierungspuffer	Natriumacetatpuffer pH 4,0 / 5,0, Fa GE
Kalziumchloridlösung	Kalziumchloridlösung, 2,5 mM, pH 7,2: CaCl ₂ x 2 H ₂ O Konzentration entsprechend der Konzentration im humanen Plasma (vgl. 8.7 Kalziumkonzentration im menschlichen Plasma)
Systempuffer 1	HBS-P Puffer, Fa GE: 0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,005 % (V / V) Surfactant P20
Systempuffer 2	HBS-N, Fa GE: 0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl
alle Chemikalien wurden von der Fa Merck Reinheitsgrad p.a. bezogen; andere Hersteller sind angegeben	

Tab. 2.30 Verwendete Materialien für die Durchführung einer SPR-Analytik

2.24.1 Vorversuche

2.24.1.1 Elektrostatik und Proteinimmobilisierung

Vor der eigentlichen Proteinimmobilisierung (vgl. Abb. 2.10) wurde noch ohne Verwendung der Immobilisierungs-Chemikalien für jedes noch nicht eingesetzte Protein eine Bindungskinetik bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen: die sogenannte Elektrostatik (vgl. Abb. 2.9). So wurde der pH-Wert der Proteinlösung ermittelt und für nachfolgende Immobilisierungen eingestellt werden, bei dem die größte molare Proteinmenge gebunden werden konnte.

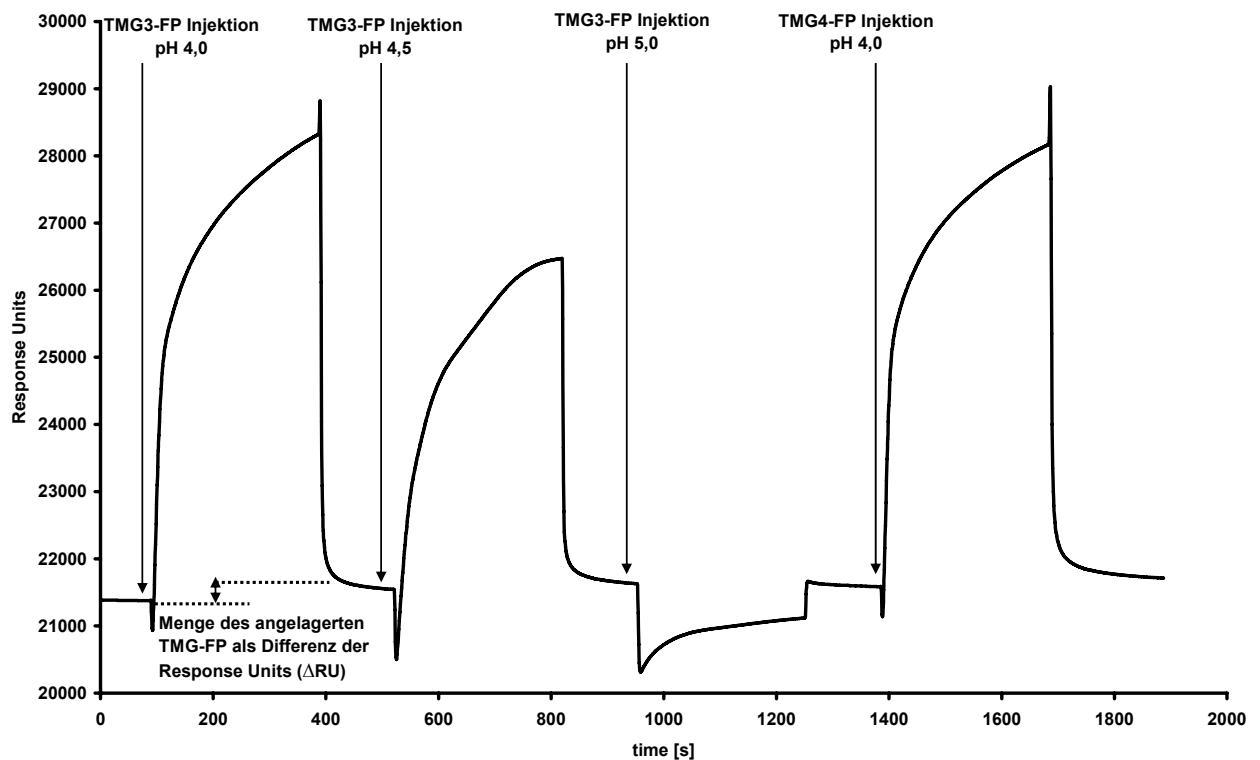


Abb. 2.9 Exemplarisches Elektrostatiksensogramm einer TMG3-Albumin-FP Immobilisierung

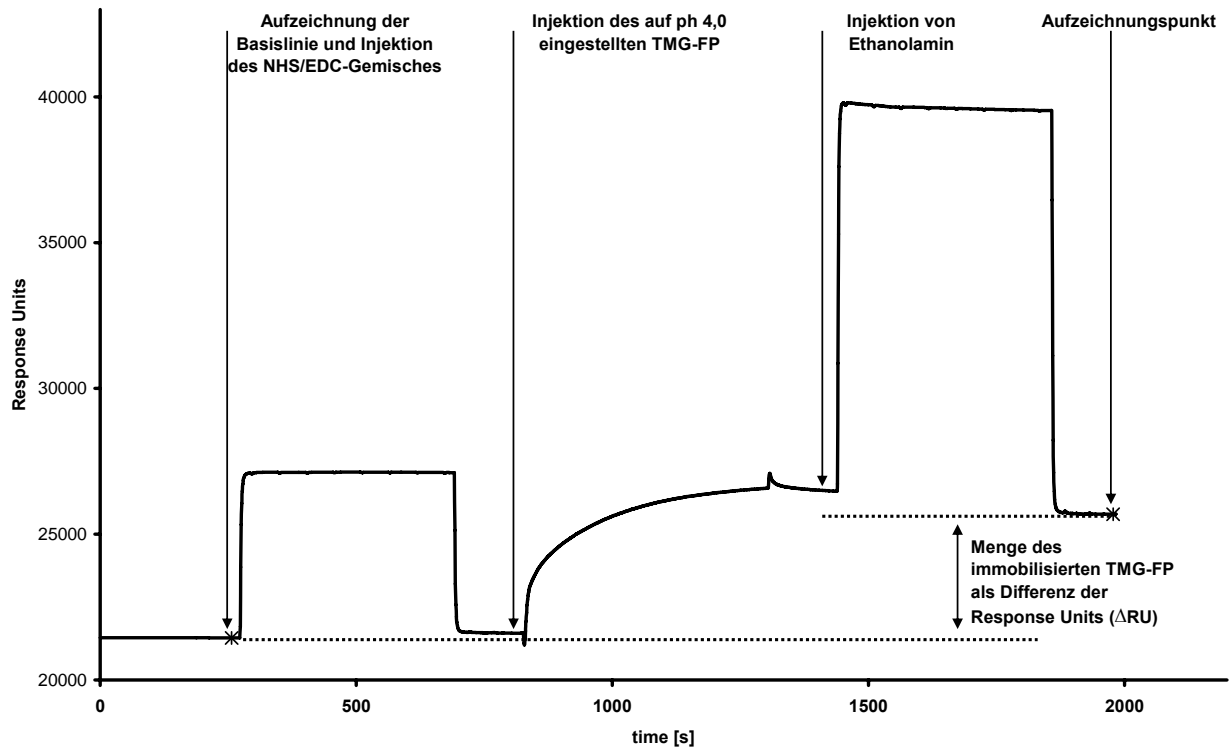


Abb. 2.10 Exemplarisches Immobilisierungssensogramm einer FP-Kopplung an einen CM3-Chip

2.24.1.2 Untersuchung auf unspezifische Proteinbindungen

Zuerst wurde getestet, ob unspezifische Bindungen von Plasmaproteinen an den Chip, bzw. Wechselwirkungen mit dem Kontrollprotein Albumin auftraten. Verschiedene Verdünnungen von heparinisiertem Plasma (vgl. Abb. 8.3-8.8) wurden eingesetzt, um unspezifische Proteinbindungen zu reduzieren. Es standen vier Messkanäle zur Verfügung. Kanal 1 wurde mit Ethanolamin abgesättigt, Kanal 2 wurde mit TMG3-Albumin-FP beladen und Ethanolamin abgesättigt, Kanal 3 stellte wieder einen Kontrollkanal dar, der mit Recombumin[®] beladen wurde und Kanal 4 wurde mit TMG4-Albumin-FP und Ethanolamin abgesättigt. Die TMG-Albumin-FP wurden mit Natriumacetatpuffer (pH 4,0) versetzt (vgl. Abb. 2.9). Vom Albumin alleine konnte die größte Proteinmenge an den Chip bei einem pH-Wert von 5,0 gebunden werden. Die Fließgeschwindigkeit der untersuchten Lösung betrug 5 µl/min. Das verwendete Plasma wurde in einem Mischungsverhältnis von 1:1 (V/V) entweder mit einem 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) enthaltenden Puffer (Systempuffer 1; vgl. Tab. 2.30), mit LowCross Buffer[®] oder mit einer 2,5 mM NaCl-Lösung versetzt.

Vor dem Einleiten der Plasmaverdünnungen wurde zur Absättigung der Gla-Proteinständigen Ca^{2+} -Bindungsstellen eine 2,5 mM Kalziumchloridlösung durch das fluidische System des SPR-Geräts geleitet und als Basislinie definiert.

In den nachfolgenden SPR-Tests werden die Chipbelegung und die Fließgeschwindigkeit in Form einer Tabelle dargestellt.

Messkanal	1	2	3	4
immobilisiertes Protein	Ethanolamin	TMG3-Albumin-FP	Recombumin®	TMG3-Albumin-FP

Tab. 2.31 Belegung der Messkanäle 1-4; das Messergebnis wird durch Differenzieren der einzelnen Messwerte (Messsignal von Kanal 2-1 bzw. 4-3) erhalten

2.24.1.3 Bestimmung des optimalen Elutionspuffers und Bindungspartner-Suche im heparinisierten Plasma

Hierfür wurde zunächst verdünntes, heparinisiertes Plasma über den Chip geleitet. Für die Verdünnungen kamen verschiedene Plasmaverdünnungspuffer zum Einsatz. Im Folgenden wurden verschiedene Wasch- und Elutionspuffer getestet (vgl. Abb. 8.3-8.8). Die Waschpuffer 1-3 sollten unspezifisch gebundene Proteine verdrängen. Die Elution der potentiell spezifischen Bindungspartner erfolgte mit den Elutionspuffern 1-3 (vgl. Tab. 2.33). Die Elutionsvolumina wurden gesammelt und gelanalytisch untersucht.

Messkanal	1	2	3	4
immobilisiertes Protein	Ethanolamin	TMG3-Albumin-FP	Recombumin®	TMG4-Albumin-FP

Tab. 2.32 Belegung der Messkanäle 1-4; das Messergebnis wird durch Differenzieren der einzelnen Messwerte (Messsignal von Kanal 2-1 bzw. 4-3) erhalten; Fließgeschwindigkeit 5 $\mu\text{l}/\text{min}$

Plasmaverdünnungspuffer	<ul style="list-style-type: none"> • Systempuffer 1 (vgl. Tab. 2.30) • 2,5 mM NaCl-Lösung, pH 7,2 • LowCross® Buffer, Fa Candor Biosciences GmbH
Kalziumchloridlösung	2,5 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung, pH 7,2
Waschpuffer 1	0,5 M Tris Buffered Saline, Fa Sigma

Waschpuffer 2	1 M NaCl-Lösung, pH 7,0
Waschpuffer 3	2 M NaCl-Lösung, pH 7,0
Elutionspuffer 1	0,1 M Zitratpuffer, pH 4,5
Elutionspuffer 2	1 M NaSCN, pH 7,0
Elutionspuffer 3	0,5 M Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O, pH 8,0
alle Chemikalien wurden von der Fa Merck Reinheitsgrad p.a. bezogen; andere Hersteller sind angegeben	

Tab. 2.33 Pufferzusammensetzungen des Tests auf unspezifische Proteinbindungen und der Elutionspuffer Bestimmung

2.24.2 Microrecover

Die SPR-Kinetiken enthalten per se noch keine Information über den möglichen Bindungspartner. Es bestand aber die Möglichkeit mit der Software Schleifen zu programmieren, welche das Gerät veranlassten zyklisch Plasma über den Chip zu leiten und mit einem definierten Puffer zu eluieren. Eingesetzt wurde der Elutionspuffer 3 (Tab. 2.33), mit dem die Basislinie in vorherigen Versuchen vor Bindung eines potentiellen Liganden wieder erreicht werden konnte. Die Eluate von 32 Zyklen wurden in einem Auffanggefäß gesammelt. Diese wurden untersucht und gelanalytisch mit den Ergebnissen der *Magnetic Beads*-Experimente verglichen. Die Chipbelegung, bzw. die Immobilisierung der FP war analog zu dem vorher beschriebenen (vgl. Tab 2.31).

2.24.3 Untersuchung verschiedener Plasmafraktionen

Für diese Untersuchung wurden verschiedene Intermediate der Plasmafraktionierung (Plasmafraktionen, Fa CSL Behring) eingesetzt. Die verschiedenen Fraktionen wurden alle in Systempuffer 1 (vgl. Tab. 2.30) umdialysiert. Die Proben mussten vor Benutzung zur Entfernung von Aggregaten sterilfiltriert werden. Für die Testung der Fraktionen wurde das TMG3- und TMG4-Albumin-FP auf einem CM3-Chip immobilisiert und humanes Serum Albumin (HSA) (Fa CSL Behring) als Kontrolle eingesetzt.

Nach einem Waschschrift mit Systempuffer 1 (vgl. Tab. 2.30), wurde konsekutiv mit Elutionspuffer 1 oder Elutionspuffer 3 und anschließend mit Elutionspuffer 2 (vgl. Tab. 2.33)

eluiert. In einem letzten Versuch wurden Dextranfäden zu der injizierten Lösung gegeben, um die mit dieser Matrix wechselwirkenden Proteine durch Adsorption zu entfernen.

Messkanal	1	2	3	4
immobilisiertes Protein	HSA, Fa CSL Behring	TMG3-Albumin-FP	HSA, Fa CSL Behring	TMG4-Albumin-FP

Tab. 2.34 Belegung der Messkanäle 1-4; das Messergebnis wird durch Differenzieren der einzelnen Messwerte (Messsignal von Kanal 2-1 bzw. 4-3) erhalten; ; Fließgeschwindigkeit 5 µl/min

Plasmafraktionen:	<ul style="list-style-type: none"> • Überstand nach DEAE-Adsorption • Überstand nach QAE-Adsorption • Überstand nach Heparin-Behandlung • Überstand nach 8 % (V / V) EtOH-Fällungsschritt • Überstand nach 25 % (V / V) EtOH-Fällungsschritt • gelöstes Kryopräzipitat • gelöste Paste II/III
Systempuffer 1	HBS-P Puffer, Fa GE (gl. Tab. 2.32)

Tab. 2.35 Verwendete Plasmafraktionen für die Ligandensuche

2.24.4 Versuche zur Verringerung der unspezifischen Bindung durch Entfernung des Plasma-Lipidanteils

Verschiedene Plasmaprotein-Zubereitungen (s.u.) wurden mit einem Lipidbinder behandelt und darauf folgend, wie auch die unbehandelte Kontrolle, zentrifugiert (13000 U/min). Die zugegebene Konzentration des Lipidbinders entsprach den Herstellerangaben (15 g / l). Mit einem Spritzenfilter wurde eine partikelfreie Probe gezogen. Durch den Einsatz von Intermediaten der Plasmafraktionierung wurde ebenfalls versucht unspezifische Bindungen zu reduzieren, bzw. die Anzahl möglicher Bindungspartner zu verringern.

Messkanal	1	2
immobilisiertes Protein	HSA, Fa CSL Behring	TMG3-Albumin-FP

Tab. 2.36 Belegung der Messkanäle 1-2; das Messergebnis wird durch Differenzieren der einzelnen Messwerte (Messsignal von Kanal 2-1) erhalten; Fließgeschwindigkeit 5 µl/min

Plasma	heparinisiertes Plasma (vgl. 2.21 Herstellung von heparinisiertem Plasma)
Plasmafraktionen	<ul style="list-style-type: none"> • gelöste Paste II/III • gelöstes Kryopräzipitat
Zentrifuge	Biofuge pico, Fa Heraeus
Lipidbinder	Lipid Removal Agent [®] , Fa Suppelco: ein synthetisches Kalziumsilikat, eingesetzte Konzentration 15 g / l

Tab. 2.37 Verwendete Komponenten für die Entfernung des Plasma-Lipidanteils

2.24.5 Untersuchung von Thrombozyten und deren Membran-Komponenten auf mögliche Interaktionen mit den Gla-Proteinen

Die Zell-Zell-Interaktionen gaben Anlass, eine Thrombozyten-vermittelte Interaktion näher zu analysieren (vgl. 2.28.1 Zell-Zell Interaktionen). Diese Wechselwirkung wurde auf Zell- und Proteinebene untersucht. Zu diesem Zweck wurde das jeweilige TMG-Albumin-FP auf einem CM3-Chip immobilisiert Als Referenz diente das TMG3-Albumin-FP, welches mit einem anti-Gla-Ak abgesättigt worden war, um jegliche Interaktion mit der Gla-Domäne zu hemmen. Im zweiten Referenzkanal wurde eine Bindungskinetik mit immobilisiertem, rekombinantem Albumin gemessen.

2.24.5.1 Thrombozytenpräparation

In einem ersten Versuch wurden Thrombozyten in Thrombozytenkonzentrat (TK)-Puffer (vgl. Tab 2.49) über den wie oben beschriebenen Chip geleitet und auf Interaktionen untersucht. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer 3 (vgl. Tab. 2.33).

Messkanal	1	2	3	4
immobilisiertes Protein	rek. Albumin, CSL Behring	TMG3-Albumin-FP	TMG3-Albumin-FP + Zugabe von anti-Gla- Ak	TMG3-Albumin-FP

Tab. 2.38 Belegung der Messkanäle 1-4; das Messergebnis wird durch Differenzieren der einzelnen Messwerte (Messsignal von Kanal 2-1 bzw. 4-3) erhalten; Fließgeschwindigkeit 3 µl/min

2.24.5.2 Thrombozytenmembranprotein-Präparation

Thrombozyten wurden zunächst abzentrifugiert und im TK-Resuspensionspuffer aufgenommen. Das Volumen wurde in Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Jeweils 1,5 ml wurden mit 300 µl *Glasbeads* versetzt und 5 min auf einem Vortexer geschüttelt. Die restlichen vitalen Zellen und *Beads* wurden durch Zentrifugation (250 x g, 8 min, RT) abgetrennt. Bei 12000 x g wurde der klare Überstand (30 min, 4 °C) zentrifugiert und das so entstandene Pellet im TK-Lysepuffer 2 h geschüttelt. Nicht gelöste Bestandteile wurden durch Zentrifugieren bei 55000 x g (30 min, 4°C) entfernt. Verwendet wurde der Überstand. Die Bindungsstudie erfolgte mit einer bereits beschriebenen Chipbelegung (vgl. Tab. 2.39).

Messkanal	1	2	3	4
immobilisiertes Protein	HSA, Fa CSL Behring	TMG3/4-Albumin-FP	TMG3/4-Albumin-FP + Zugabe von anti- Gla-Ak	TMG3/4-Albumin-FP

Tab. 2.39 Belegung der Messkanäle 1-4; das Messergebnis wird durch Differenzieren der einzelnen Messwerte (Messsignal von Kanal 2-1 bzw. 4-3) erhalten; Fließgeschwindigkeit 5 µl/min

TK-Resuspensionspuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 25 mM Tris-HCl • 150 mM KCl • 3 mM MgCl₂ • 1 mM EGTA, Fa VWR • 2 µg/ml Apyrase • 1 Tablette Complete Mini Protease Inhibitors, complete EDTA-free, Fa Roche
TK-Lysepuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 1% (m / V) [(3-Cholamidopropyl) dimethylammonium]-1-propansulfonat, Fa Sigma • 1 % (m / V) N-dodecyl β-d-glucopyranoside, Fa Sigma • 0,2 % (m / V) Cholesterylhemisuccinate, Fa Sigma • 25 mM Tris-HCl • 150 mM NaCl <p>pH 7,5</p>
Glasbeads	Glasbeads 425-600 microns, Fa Sigma
Schüttler	Mini Beadbeater (Vortexer), Fa Biospec Products
alle Chemikalien wurden von der Fa Merck Reinheitsgrad p.a. bezogen; andere Hersteller sind angegeben	

Tab. 2.40 Reagenzien der Membranprotein-Präparation

2.24.6 Alpha-1-B-Glykoprotein

Der mögliche Bindungspartner von TMG3- und TMG4-Albumin-FP A1BG, der als Bindungskandidat nach der MassSpek identifiziert werden konnte, wurde ebenfalls mittels SPR untersucht. Die FP wurden, wie es in Tabelle 2.41 beschrieben ist, immobilisiert. Das Protein wurde von der Fa Dade Behring bezogen. Es wurde Mitte der 80er Jahre aus humanem Plasma gewonnen, gegen Wasser dialysiert und zur Konservierung lyophilisiert. Ein angefertigtes *Silverstain*-Gel des rekonstituierten Proteins wies im Wesentlichen eine einzige Bande auf (vgl. Abb. 3.33).

Messkanal	2	1	4	3
immobilisiertes Protein	TMG3-Albumin-FP	Ethanolamin	TMG4-Albumin-FP	HSA, Fa CSL Behring

Tab. 2.41 Tab. 2.38 Belegung der Messkanäle 1-4; das Messergebnis wird durch Differenzieren der einzelnen Messwerte (Messsignal von Kanal 2-1 bzw. 4-3) erhalten; Fließgeschwindigkeit 5 µl/min

A1BG	<ul style="list-style-type: none"> • A1BG lyophilisiert, Fa Dade Behring • A1BG Recombinant Protein (P01), Fa Abnova
-------------	--

Tab. 2.42 Verwendete A1BG-Produkte

2.25 Glykoanalytik des Alpha-1-B-Glykoproteins

Um sicherzustellen, dass A1BG die charakteristische Glykostruktur aufwies und somit von einem funktionsfähigen Protein im Sinne der SPR-Kinetik ausgegangen werden konnte, wurde eine Glykoanalytik mit Hilfe eines DIG-Glycan-Differentiation-Kits durchgeführt. Im Prinzip basiert die Analytik auf einer immunologischen Auswertung eines Western-Blots (vgl. 2.18.1.2 Blotten) und macht sich die Bindung von spezifischen Lektinen an Glykostrukturen zu Nutze. Es wurden fünf Tris-Glycin SDS 8-16 % Gele der Probe angefertigt (vgl. 2.18.1.1 Elektrophorese) und anschließend mit den im Kit enthaltenen Materialien geblottet. Zum Nachweis der Glykostrukturen wurden Agglutinin-spezifische Erstantikörper (Agglutinin: GNA, SNA, MAA, PNA, DSA) und vor der abschließenden Farbreaktion ein anti-Digoxigenin Nachweisantikörper verwendet. Die Assaydurchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

<p>DIG Glycan Differentiation Kit, Fa Roche</p>	<ul style="list-style-type: none"> • GNA (Galanthus nivalis agglutinin) Digoxigenin labeled erkennt endständige Mannose • SNA (Sambucus nigra agglutinin) Digoxigenin labeled erkennt an Galaktose gebundene Sialylsäure (2-6) • MAA (Maackia amurensis agglutinin) Digoxigenin labeled erkennt an Galaktose gebundene Sialylsäure (2-3) • PNA (Peanut agglutinin) Digoxigenin labeled erkennt Dissacharide der Form Galactose-1,3-N-acetylgalactosamin • DSA (Datura stramonium agglutinin) erkennt Komplexe des Typs Galactose-(1,4)- N-acetylglucosamin und N-Glykane • Anti-Digoxigenin-AP • NBT/BCIP • Control glycoprotein carboxypeptidase Y (for GNA) • Control glycoprotein transferrin (for SNA) • Control glycoprotein fetuin (for SNA, MAA and DSA) • Control glycoprotein asialofetuin (desialylated fetuin for PNA and DSA) • Blocking Reagent • Ponceau S solution
--	--

Tab. 2.43 Bestandteile des DIG Glycan Differentiation Kits

2.26 Spikeversuch

Der Versuch sollte eine matrixunabhängige Möglichkeit bieten, im Plasma nach einem Bindungspartner zu suchen. Die Proteinkonformation sollte hierbei weitgehend unbeeinflusst bleiben.

TMG3-Albumin-FP wurde mittels 10-kDa-Schlauch gegen physiologische NaCl-Lösung dialysiert, um eine Ca^{2+} -Komplexierung durch den HA-Elutionspuffer (vgl. 2.17 Proteinreinigung) zu unterbinden. Zusätzlich wurde die ungepufferte Proteinlösung nach der Dialyse erneut photometrisch ($E_{280\text{nm}}^{1\%(\text{m/V})} = 5,8, 333,4 \mu\text{g/ml}$) vermessen und auf eine Kalziumionenkonzentration von 2,5 mM eingestellt. Eine Lösung entsprechend 2,0 mg des TMG3-Albumin-FP wurde nun zu 100 ml heparinisiertem Plasma gegeben. Ein möglicherweise entstandener Proteinkomplex, bestehend aus TMG3-Albumin-FP und einem an die TMG3-Domäne gebundenem Protein, wurde über den His-tag an ein Co^{2+} -NTA Material gebunden und aus dem Plasma isoliert. Das FP wurde durch 12-stündiges Schütteln mit einem Überkopfschüttler mit heparinisiertem Plasma inkubiert. Die Separation erfolgte für 3,5 h durch Zugabe von 4 ml des resuspendierten Säulenmaterials (\triangleq 2 ml Säulevolumen). Die Kontrolle bestand aus dem lediglich aus heparinisiertem Plasma, welches nach der 12-stündigen Inkubation mit dem Säulenmaterial versetzt wurde. Die Abtrennung des beladenen Säulenmaterials aus dem Plasma erfolgte mit einer Separationssäule. Vor dem Einsatz des Säulenmaterials musste es mit Equilibrierungspuffer, der gleichzeitig als Waschpuffer eingesetzt werden konnte, equilibriert werden. Nach dreimaligem Waschen mit 6 ml Waschpuffer sollte der Proteinkomplex mit einer Elutionslösung in 2 ml Schritten fraktionierend desorbiert werden.

Säulenmaterial	Talon Metal Affinity Resin, Fa Becton Dickinson
Separationssäule	PD-10, GE
Waschpuffer / Equilibrierungspuffer	50 mM Natriumphosphat 300 mM NaCl pH 7,0
Elutionslösung	Imidazolösung (300 mM, pH 7,0); Bestandteil des Talon Kits, Fa Becton Dickinson
alle Chemikalien wurden von der Fa Merck Reinheitsgrad p.a. bezogen; andere Hersteller sind angegeben	

Tab. 2.44 Materialien des Spikeversuchs

2.27 Elektrophoretische Plasmatrennung

Der Spikeversuch zeigte, dass viele Proteine miteluiert wurden, die unspezifisch an die Co^{2+} -Chelat-Matrix des benutzten Talon-Materials oder an das Trägermaterial gebunden hatten. Als logische Konsequenz wurde das Plasma (500 μl Probenpuffer + 500 μl Probe) an Stelle des Fängers immobilisiert. Plasma wurde elektrophoretisch aufgetrennt und einem Western-Blot unterzogen. Im Folgenden wurden die TMG3- und TMG4-Albumin-FP als „Fängerantikörper“ (4 h, RT) verwendet. Zum Einsatz kam ein 1 %-iges (m / V) Agarosegel (Fa Bio-Rad), welches ermöglichte, große Proteinmengen in Form von unverdünntem heparinisierendem Plasma auf das Gel aufzutragen. Die horizontale Elektrophorese wurde bei 1000 mA und 40 V durchgeführt, der Western-Blot bei 1000 mA und 20V (1,5 h). Die PVDF-Membran wurde in Streifen geschnitten und mit Antikörpern inkubiert (vgl. 2.18.1.2 Blotten) oder es wurde eine Coomassiefärbung durchgeführt, um die Blot-Effizienz zu kontrollieren.

Kontrolle 1	Albumin / Coomassie-Färbung
Kontrolle 2	Plasma / Coomassie-Färbung
Kontrolle 3	His-ladder / Nachweisantikörper
Probe 1	Plasma / TMG3-Albumin-FP / Nachweisantikörper
Probe 2	Plasma / TMG4-Albumin-FP / Nachweisantikörper
Kontrolle 4	TMG3-Albumin-FP / Nachweisantikörper
Kontrolle 5	TMG4-Albumin-FP / Nachweisantikörper
Kontrolle 6	Plasma / Nachweisantikörper

Tab. 2.45 Western-Blot von Plasma und Kontrollen mit anschließenden Nachweis-/Färbemethoden

1 % (m / V) Agarose Gel	Certified Molecular Biology Agarose, Fa Bio-Rad
Probenpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 25 mg Bromphenol Blau (\triangleq 50 bp-DNA) • 25 mg Xylene Cyanol (\triangleq 3000 bp-DNA) • 25 mg Orange G (\triangleq 50 bp-DNA) • 2 g Succhrose ad 10 ml mit Milli-Q [®] H ₂ O
Elektrophorese Laufpuffer	20 mM Tris-HCl, pH 9,5
Blot-Puffer	Novex [®] Tris-Glycine Transfer Buffer (25 x), Fa Invitrogen
Marker	His ladder, Fa Invitrogen

Netzteil	2301 Macrodrive Power Supply, Fa LKB Bromma
Blot-Modul	TRANS-BLOT CELL, Fa Bio-Rad
Nachweisantikörper	Penta His HRP Conjugate Kit, Fa Qiagen
Färbereagenz	Vector Vip [®] Substrate Kit for Peroxidase, Fa Vector Laboratories
alle Chemikalien wurden von der Fa Merck Reinheitsgrad p.a. bezogen; andere Hersteller sind angegeben	

Tab. 2.46 Verwendete Materialien für die elektrophoretische Plasmatrennung

2.28 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie mit dem *Cell-Scanner* basiert auf der Messung von emittierten Wellenlängen nach Anregung durch einen Argonlaser (488 nm). Die Zellen werden durch Überdruck in das Kapillarsystem geleitet. Der Laser wird auf jeweils eine Zelle gerichtet, die für die resultierende Lichtstreuung verantwortlich ist. Das Streulicht wird von Photomultipliern detektiert, welche Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht unterscheiden können. Das Vorwärts-Streulicht (FSC = *Forward Scatter*) ist ein Maß für die Beugung des Lichts und ist abhängig vom Volumen der jeweiligen Zelle. Das Seitwärts-Streulicht (SSC = *Sideward Scatter*) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel zum einfallenden Strahlengang und beschreibt die Granularität, die Größe des Zellkerns und Vesikelmenge der Zelle. Neben dem Streulicht können auch Fluorophore gemessen werden. Die Zellen selbst weisen keine Fluorophore auf und können nur durch spezifische Marker oder speziell rekombinant exprimierte Proteine zur Emission angeregt werden, verbunden mit einem resultierenden geringen Signal-Rausch-Verhältnis. Die Abkürzung des Analysators FACS[™] steht für *fluorescence activated cell sorting*, bzw. *fluorescence activated cell scanner*. Der *Cell Scanner* untersucht nur die Beschaffenheit der Zellen, während der *Cell Sorter* auch eine Sortierung entsprechend den beobachteten Eigenschaften vornimmt.

Die Durchflusszytometrie ermöglichte unter anderem auch eine Kontrolle der Expressionsleistung von rekombinanten Proteinen. Mit dieser Methode wurden die HEK293-Zellen, welche die nativen, mit GFP fusionierten, Proteine TMG3 und TMG4 exprimierten (vgl. Tab. 2.7; pIRES-1689, pIRES-1690) und ansonsten nicht weiter modifizierten, untersucht. Außerdem wurde untersucht, ob sich die rekombinanten Proteine an Thrombozyten, Erythrozyten oder Leukozyten anlagern (vgl. 2.28.1 Zell-Zell Interaktionen und 2.28.2 Inhibition der Interaktion zwischen Thrombozyten und TMG-Albumin-FP

exprimierenden HEK293-Zellen). Alle Zellkonzentrate wurden von verschiedenen Spendern bezogen. Zur Durchführung einer Analyse wurden mit 2,5 ml gefüllte Probenröhrchen unter die Saugvorrichtung des Gerätes gehalten und nach Umlegen des Starthebels, welcher zuvor zur Seite geklappt worden war, automatisch in das Gerät überführt und analysiert (s.o.). Die Auswertung der ermittelten Daten mit der Software erfolgte manuell und entsprechend den gewünschten Parametern (*FSC*, *SSC* und Fluorophore), welche in den Diagrammen separat gewählt wurden.

Durchflusszytometrie	FACS™ Calibur, Fa Becton Dickinson
Zellen / Proteine	<ul style="list-style-type: none"> • TMG3-Albumin-FP und TMG4-Albumin-FP, die unter Vitamin K Zufuhr exprimiert und kultiviert worden sind • HEK293-Zellen, welche GFP-FP mit nativer TMG3/4-Sequenz exprimieren • <i>MOCK</i>-Kontrollzellen, HEK293 ohne <i>gene of interest</i>
Humane Zellkonzentrate	Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, alle von verschiedenen Einzelspendern, Fa Blutbank Marburg
Antikörper	<ul style="list-style-type: none"> • anti His Tag FITC, Fa Acris • Platelet Glycoprotein IIb / FITC, Fa Dako • Platelet Glycoprotein IIIa / FITC, Fa Dako • Rb pAb to HAS (FITC), Fa Abcam

Tab. 2.47 Für durchflusszytometrische Versuche verwendete Materialien

2.28.1 Zell-Zell Interaktionen

Untersucht wurde die potentielle Interaktion zwischen unterschiedlichen humanen Blutzellen und Zellmembran-ständigen TMG-GFP-FP (vgl. Tab. 2.48). Die humanen Blutzellen waren Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Alle wurden als Erythrozyten-/Leukozyten- oder Thrombozyten-Zellkonzentrat (EK/LK/TK) von der Blutbank in Marburg bezogen. 10 ml Aliquots der Zellkonzentrate wurden 5 min bei 350 x g abzentrifugiert (RT) und im entsprechenden Puffer gewaschen, nach dem Waschen wieder abzentrifugiert und nach drei Waschwiederholungen im selben Puffer (10 ml) aufgenommen. Für Erythrozyten, Leukozyten und HEK293-Zellen wurde hierfür eine modifizierte NaCl-Lösung, für die

Thrombozyten der TK-Puffer verwendet. Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Zellanalysators CASY[®] Counters automatisch bestimmt und auf 1×10^6 / ml eingestellt. Der CASY[®] Counter bestimmt die Zellzahl durch Pulsflächenanalyse. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran fungieren im elektrischen Feld als Isolatoren. Die unterschiedlichen Zellgrößen werden aus den unterschiedlich großen Bereichen abgeleitet, in denen kein Stromfluss auftritt, die Zellen also den Stromfluss inhibieren. Eine Trypanblaufärbung (s.u.) ist für Thrombozyten aufgrund des fehlenden Zellkerns nicht geeignet und für Erythrozyten und Leukozyten war kein Programm im Zellanalysator Bioprofile[®] Flex hinterlegt. Die Anzahl der HEK Zellen, welche die TMG-GFP-FP exprimieren, wurde mittels Trypanblaufärbung (Bioprofile[®] Flex, Fa Novabiomedical) automatisch bestimmt. Der saure Farbstoff Trypanblau lagert sich in Form seines Anions an Zellproteine an und färbt diese, nach der Penetration defekter Zellmembranen der toten Zellen, im Zytosol blau an. Die Zellzahl wurde ebenfalls auf 1×10^6 / ml eingestellt. Jede Zell-Zell Interaktion, die sich als Zusammenlagerung von Zellen äußert, verursacht bei der durchflusszytometrischen Analyse einen Größenshift.

Zur Befreiung der Thrombozyten von den im Zellkonzentrat enthaltenen Erythrozyten wurden die Thrombozyten mit Erythrozyten-Lyse-Puffer behandelt. Zum eingesetzten TK-Volumen wurde das gleiche Volumen des Lyse-Puffers hinzugesetzt und für 10 min mit diesem inkubiert. Nach Hämolyse werden die Zellreste im Überstand nach Zentrifugation bei $300 \times g$ verworfen. Die von den Erythrozyten befreiten Thrombozyten werden nun der folgenden Analytik unterzogen.

Vor der durchflusszytometrischen Analyse (vgl. 2.28 Durchflusszytometrie) wurden 2,5 ml aller eingestellten Zellkonzentrate zentrifugiert ($350 \times g$, 12 min, RT) und in 100 μ l des jeweiligen Puffers aufgenommen (s.o.). Zu diesem Volumen wurde optional 1 μ l des Antikörpers (vgl. Tab 2.47) gegen das aus zwei Untereinheiten bestehende Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa; anti-GPIIa/IIIb-Ak) gegeben oder vor diesem Antikörperzusatz 100 μ l der Zellsuspension, deren potentielle Interaktionsfähigkeit geprüft werden sollte, hinzugefügt. Zu Kontrollzwecken wurde bei Probe 34 anstelle der Zellsuspension TK-Puffer verwendet. Die Zellkonzentrate wurden nach 1,5 h erneut zentrifugiert ($350 \times g$, 12 min, RT) und im Anfangsvolumen aufgenommen. Sequentiell folgten zwei, durch Zentrifugationsvorgänge ($350 \times g$, 12 min, RT) unterbrochene, Waschschrte. Das nach dem letzten Waschvorgang erhaltene Ausgangsvolumen der Zellkonzentrate wurde für die durchflusszytometrische Analyse verwendet.

1	Thrombozyten
2	Thrombozyten + anti-GPIIb/IIIa-Ak
3	Thrombozyten + anti-GPIIb/IIIa-Ak
4	Erythrozyten
5	Leukozyten
6	HEK293- <i>MOCK</i>
7	TMG3-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁺
8	TMG3-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁻
9	TMG4-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁺
10	TMG4-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁻
11	TMG3-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁺ + Thrombozyten + anti-GPIIb/IIIa-Ak
12	TMG3-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁺ + Erythrozyten
13	TMG3-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁺ + HEK293- <i>MOCK</i>
14	TMG3-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁺ + Leukozyten
15	TMG4-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁺ + Thrombozyten + anti-GPIIb/IIIa-Ak
16	TMG4-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁺ + Erythrozyten
17	TMG4-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁺ + HEK293- <i>MOCK</i>
18	TMG4-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁺ + Leukozyten
19	TMG3-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁻ + Thrombozyten + anti-GPIIb/IIIa-Ak
20	TMG3-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁻ + Erythrozyten
21	TMG3-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁻ + HEK293- <i>MOCK</i>
22	TMG3-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁻ + Leukozyten
23	TMG4-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁻ + Thrombozyten + anti-GPIIb/IIIa-Ak
24	TMG4-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁻ + Erythrozyten
25	TMG4-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁻ + HEK293- <i>MOCK</i>
26	TMG4-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁻ + Leukozyten
27	TMG3-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁺ + Thrombozyten
28	TMG3-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁻ + Thrombozyten
29	TMG4-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁺ + Thrombozyten
30	TMG4-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁻ + Thrombozyten
31	HEK293- <i>MOCK</i> + Thrombozyten
32	HEK293- <i>MOCK</i> + Erythrozyten
33	HEK293- <i>MOCK</i> + Leukozyten
34	Thrombozyten* + TK-Puffer

Tab. 2.48 Durchflusszytometrische Versuchsansätze; Zellkultivierung mit / ohne Vitamin K: ⁺ / ⁻; Thrombozyten*: gewaschen und resuspendiert (100 µl) mit modifizierter NaCl-Lösung

Zellkonzentrate	Buffy Coats (LK), Thrombozytenkonzentrate (TK), Erythrozytenkonzentrate (EK), Fa Blutbank Marburg
Zellanalysator	<ul style="list-style-type: none"> • CASY[®] Counter, Fa Innovatis AG • Bioprofile[®] Flex, Fa Novabiomedical
Kontrollzelle	HEK293- <i>MOCK</i> -Zelle, Fa CSL-Behring
TK-Lagerpuffer	0,76 – 0,83 ml Humanplasma des Spenders + 0,17 – 0,24 ml Stabilisatorlösung CPD 1000,0 ml Stabilisatorlösung enthalten: Natriumzitat-Dihydrat 25,0 – 27,6 g Zitronensäure-Monohydrat 2,94 – 3,60 g Wasserfreie Glucose 22,0 – 24,3 g Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat 2,38 – 2,64 g in Wasser für Injektionszwecke ad 1000,0 ml, Fa Blutbank Marburg
modifizierter NaCl-Lösung	physiologische NaCl Lösung, Fa Braun 1 % (m / V) BSA, Fa Sigma 2,5 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O pH 7,1
TK-Puffer	129 mM NaCl 89 mM NaHCO ₃ 2,8 mM KCl 5,6 mM Glukose 10 mM HEPES 0,8 mM MgCl ₂ 2,5 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O pH 7,0
Erythrozyten-Lyse-Puffer	155 mM NH ₄ Cl 0,2 mM EDTA (Titriplex 2 x H ₂ O) 10 mM KHCO ₃ pH 7,8
Laborzentrifuge	Multifuge 3 R-S, Fa Heraeus
alle Chemikalien wurden von der Fa Merck Reinheitsgrad p.a. bezogen; andere Hersteller sind angegeben	

Tab. 2.49 Materialien der Zell-Zell-Interaktionsexperimente

2.28.2 Inhibitionsversuch

2.28.2.1 Vorversuch – Anlagerung von TMG-GFP-Fusionsproteinen an Thrombozyten

In einem Vorversuch wurde die Wechselwirkung von löslichen TMG-Albumin-FP mit Thrombozyten durchflusszytometrisch untersucht. Definierte Volumina einer Thrombozytensuspension (2,0 ml, 10^7 Zellen/ml; Herstellung vgl. 2.28.1 Zell-Zell Interaktionen) wurden abzentrifugiert (350 x g) und in 100 μ l TK-Puffer (vgl. Tab. 2.49) durch den Pipettiervorgang resuspendiert. Dieser Zentrifugations- und Resuspensionsschritt wurde zweimal wiederholt (Probe 1). Nach diesem Reinigungsverfahren wurde ein derart hergestelltes Aliquot entweder mit 1,0 μ l einer anti-GPIIb/IIIa-Ak- (Probe 2) oder 2,0 μ l einer anti-HSA-Ak-Lösung (Rb pAb to HAS; Probe 3) für 30 min inkubiert (vgl. Tab. 2.50). Weitere Aliquots wurden vor der Inkubation mit der anti-HSA-Ak-Lösung erneut abzentrifugiert (250 x g) und mit 70 μ l einer Lösung des TMG3- (Probe 4) oder TMG4-Albumin-FP (Probe 5; Proteingehalt \triangleq 390 / 403 μ g/ml für TMG3-/TMG4-Albumin-FP, kultiviert mit Vitamin K und dialysiert gegen modifizierter NaCl-Lösung, vgl. Tab. 2.50) für 30 min inkubiert. Abschließend wurde mit allen Ansätzen zweimal ein Wasch- und Zentrifugationsvorgang (250 x g) vollzogen. Nach der letzten Zentrifugation der Zellen wurden diese in 2,0 ml TK-Puffer resuspendiert. Alle Verfahrensschritte wurden bei RT durchgeführt. Die Proben 1-5 wurden im FACSTM-Gerät vermessen (vgl. Abb. 8.62-8.64).

1	Thrombozyten
2	Thrombozyten + anti-GPIIb/IIIa-Ak
3	Thrombozyten + anti-HSA-Ak-Lösung
4	Thrombozyten + TMG3-Albumin-FP + anti-HSA-Ak-Lösung
5	Thrombozyten + TMG4-Albumin-FP + anti-HSA-Ak-Lösung

Tab. 2.50 Durchflusszytometrischer Vorversuch: Anlagerung von TMG-Albumin-FP an Thrombozyten

2.28.2.2 Inhibition der Interaktion zwischen Thrombozyten und TMG-Albumin-FP exprimierenden HEK293-Zellen

Aliquots von 1,0 ml der Thrombozytensuspension (2×10^9 /ml) wurden abzentrifugiert ($250 \times g$) und im gleichen TK-Puffervolumen (vgl. Tab. 2.49) resuspendiert. Zu diesen wurden entweder 1,0 ml HEK293-Zellen (1×10^6 /ml; gelagert in HEK293-Medium, vgl. Tab. 2.7 pIRES 1689 und pIRES 1690), die das TMG3-GFP-FP mit natürlicher TMG-Sequenz exprimieren und mit Vitamin K kultiviert worden sind (Probe 1) oder diejenigen, die das TMG3-GFP-FP, welche ohne Vitamin K kultiviert worden sind (Probe 2), hinzugegeben. Die gleichen Ansätze mit den jeweils entsprechenden TMG4-GFP-FP exprimierenden HEK293-Zellen stellen Probe 3 und 4 dar. Bei den Proben 5 und 6 wurden die Zellen nach der Zentrifugation und vor der Inkubation mit den TMG-GFP-FP exprimierenden HEK293-Zellen analog zu Probe 1 und 3 mit 1,0 ml löslichem TMG3- / TMG4-Albmin-FP (Kultivierung mit Vitamin K; 390 / 405 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in modifizierter NaCl-Lösung vgl. Tab. 2.49) für 30 min inkubiert. Probe 7 und 8 wurden analog zu 5 und 6 erhalten, jedoch unter Verwendung der TMG-GFP-FP exprimierenden HEK293-Zellen, welche ohne Vitamin K kultiviert worden sind. Das Kontrollexperiment für die Proben 1-8 wird durch Probe 9 dargestellt. 1,0 ml der Thrombozyten wurden ebenfalls abzentrifugiert und im gleichen Volumen TK-Puffer resuspendiert. Es folgt die Zugabe von 1,0 ml HEK293-Mock-Zellen (1×10^6 /ml), welche in HEK293-Medium (vgl. Tab. 2.15) kultiviert worden sind. Alle Experimente wurden bei RT durchgeführt.

1	Thrombozyten + TMG3-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁺
2	Thrombozyten + TMG3-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁻
3	Thrombozyten + TMG4-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁺
4	Thrombozyten + TMG4-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁻
5	Thrombozyten + TMG3-Albumin-FP + TMG3-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁺
6	Thrombozyten + TMG3-Albumin-FP + TMG4-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁺
7	Thrombozyten + TMG3-Albumin-FP + TMG3-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁻
8	Thrombozyten + TMG3-Albumin-FP + TMG4-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen ⁻
9	Thrombozyten + HEK293-MOCK

Tab. 2.51 Durchflusszytometrische Untersuchungen der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen; Zellkultivierung mit / ohne Vitamin K: ^{+/-}

2.29 Optische Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen

Vier weitere Versuche mit Thrombozyten und HEK293-Zellen dienten zur optischen Beurteilung ihrer Interaktion. Die Zellkonzentrate wurden auf eine Zellzahl von 2×10^6 /ml (HEK293-Zellen), bzw. 1×10^8 /ml (Thrombozyten) eingestellt. Die Herstellung der gewaschenen und resuspendierten, präparierten Zellansätze wurde bereits im Kapitel 2.28.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben. Im Unterschied zu dieser wurde jetzt 1,0 ml des jeweiligen Zellkonzentrats (vgl. 2.49) eingesetzt und im gleichen Volumen resuspendiert. Die verwendeten Puffer sind in den folgenden Tabellen (vgl. Tab. 2.53-2.56) angegeben, ihre Zusammensetzung ist in Tabelle 2.49 oder Tabelle 2.52 angegeben.

Im ersten Versuch (Versuch I, vgl. Tab. 2.53) wurde die Einwirkung verschiedener Puffer untersucht. Die für 1,5 h im angegebenen Puffer inkubierten Zellen werden als Reaktionsvolumen bezeichnet. Es waren in einer als Doppelbestimmung angelegten Versuchsreihe keine einheitlichen, konsistenten Daten zu erhalten. Die Ergebnisse in den folgenden Tabellen wurden von einer zweiten unabhängigen Person beurteilt und als gemeinsame Beobachtung dokumentiert (Rohdaten: vgl. Tab. 8.12).

Der zweite Versuch (Versuch II, vgl. Abb. 2.54) wurde ausgeführt, um eine im TK-Lagerpuffer gelöste Komponente als Effektor der Gelbildung zu identifizieren. Die Thrombozyten selbst sollten als Effektor ausgeschlossen werden. Für diesen Zweck wurde Ca^{2+} -freier Puffer (TK-Puffer) verwendet, um eine Aktivierung von Thrombozytenresten, welche zur Gerinselbildung führen könnte, zu unterbinden. Zwei verschiedene Versuchsreihen wurden durchgeführt. Die als Doppelbestimmung inkubierten Reaktionsvolumen wurden entweder mit 0,5 ml eines Zitratpuffers oder mit 0,4 ml des abzentrifugierten TK-Lagerpuffers/TK-Zellüberstand inkubiert. Nach einer anfänglichen Inkubationsdauer von 1,5 h wurden zu den mit Zitratpuffer inkubierten Reaktionsvolumina 0,4 ml des, durch Abzentrifugieren gewonnenen, TK-Zellüberstandes gegeben (Rohdaten: vgl. Tab. 8.13).

Der dritte Versuch (Versuch III, vgl. Abb. 2.55) war eine erweiterte Reproduktion des ersten Versuches, unter Zugabe von 0,5 ml sterilfiltriertem TK-Zellüberstand. Eine nicht in der Tabelle aufgeführte Kontrolle war durch eine Inkubation von 0,5 ml TK-Puffer mit 0,5 ml modifizierter NaCl-Lösung und 0,4 ml des TK-Zellüberstandes gegeben. Eine Trübung dieser Lösung war nicht zu beobachten (Rohdaten: vgl. Tab. 8.14).

Im vierten und letzten Versuch (Versuch IV 2.56) wurde neben der Untersuchung eines Ca^{2+} -abhängigen Effektes eine zusätzliche Inkubation mit speziell behandeltem TK-Zellüberstand (Reaktionsvolumen III) durchgeführt, um eine Gelbildung durch eine lösliche Komponente auszuschließen. In einem ersten Ansatz wurde ein sterilfiltrierter, nicht hitzeinaktivierter und in einem zweiten Ansatz ein sterilfiltrierter, dann hitzeinaktivierter [Soltis, Hasz 1979] und erneut sterilfiltrierter TK-Zellüberstand (jeweils 0,4 ml) eingesetzt. Die Hitzeinaktivierung wurde durch Erwärmen auf 75 °C für eine Dauer von 12 min erhalten. Für den Fall, dass es sich bei der gelösten Komponente um ein Protein handeln sollte, führt die Hitzeinaktivierung [Soltis, Hasz 1979] zu deren Denaturierung. Zu den für 1,5 h bzw. 25 min inkubierten Reaktionsvolumen (I+II/+III) wurde 1,0 ml einer 25 mM (Probe 1, 2, 3, 4, 7, 8, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46) oder 1 M (Probe 39) Kalziumchloridlösung gegeben. Alle mit Kalziumchlorid inkubierten Versuchsansätze, außer Probe 4 und 8, bei denen ein nicht aufschüttelbarer Gewebeklumpen entstand, bildeten eine Gelstruktur aus. Reaktionsvolumina, welche mit dem nicht hitzeinaktivierten TK-Zellüberstand inkubiert worden waren, bildeten die Gelstruktur schneller aus (ca. 3 min vs. 14 min; Rohdaten: vgl. Tab. 8.15).

Phosphatpuffer ohne Ca^{2+}	PBS without Ca, Mg, Fa Dulbecco
Zitratpuffer	1 M Zitratpuffer, pH 6,8
alle Chemikalien wurden von der Fa Merck Reinheitsgrad p.a. bezogen; andere Hersteller sind angegeben	

Tab. 2.52 Materialien der optischen Interaktionsversuche zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen

Probe	Reaktionsvolumen I		Reaktionsvolumen II	
	Zelltyp	Puffer	Zelltyp	Puffer
1	Thrombozyten	TK-Puffer	-	-
2	Thrombozyten	mod. ¹ NaCl-Lsg ²	-	-
3	Thrombozyten	mod. NaCl-Lsg	Thrombozyten	TK-Puffer
4	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lsg	-	-
5	HEK293-MOCK	TK-Puffer	-	-
6	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lsg	HEK293-MOCK	TK-Puffer
7	TMG3-GFP-FP expr. ³ HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lsg	-	-
8	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lsg	-	-
9	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	-	-
10	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	-	-
11	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lsg	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer
12	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lsg	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer
13	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lsg	-	-
14	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lsg	-	-
15	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	-	-
16	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	-	-
17	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lsg	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer
18	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lsg	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer
19	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lsg	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lsg
20	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lsg	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lsg
21	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lsg	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lsg
22	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lsg	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lsg
23	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lsg	Thrombozyten	TK-Puffer
24	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lsg	Thrombozyten	TK-Puffer
25	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lsg	Thrombozyten	TK-Puffer
26	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lsg	Thrombozyten	TK-Puffer
27	Thrombozyten	TK-Puffer	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lsg

Tab. 2.53 Versuch I: Visuelle Beurteilung von Puffereffekten auf Zellinteraktionen; Zellkultivierung mit / ohne Vitamin K: ⁺/⁻; mod. ¹: modifiziert, Lsg²: Lösung, expr. ³: exprimiert

Probe	Reaktionsvolumen I		Reaktionsvolumen II		Reaktionsvolumen III (Puffer)
	Zelltyp	Puffer	Zelltyp	Puffer	
1	Thrombozyten	TK-Puffer	-	-	Zitratpuffer
2	Thrombozyten	TK-Puffer	-	-	TK-Lagerpuffer
3	HEK293-MOCK	TK-Puffer	-	-	Zitratpuffer
4	HEK293-MOCK	TK-Puffer	-	-	TK-Lagerpuffer
5	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	-	-	Zitratpuffer
6	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	-	-	TK-Lagerpuffer
7	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	-	-	Zitratpuffer
8	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	-	-	TK-Lagerpuffer
9	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	-	-	Zitratpuffer
10	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	-	-	TK-Lagerpuffer
11	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	-	-	Zitratpuffer
12	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	-	-	TK-Lagerpuffer
13	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	Zitratpuffer

Probe	Reaktionsvolumen I		Reaktionsvolumen II		Reaktionsvolumen III (Puffer)
	Zelltyp	Puffer	Zelltyp	Puffer	
14	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	TK-Lagerpuffer
15	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	Zitratpuffer
16	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	TK-Lagerpuffer
17	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	Zitratpuffer
18	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	TK-Lagerpuffer
19	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	Zitratpuffer
20	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	TK-Lagerpuffer
21	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	Thrombozyten	TK-Puffer	Zitratpuffer
22	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	Thrombozyten	TK-Puffer	TK-Lagerpuffer
23	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	Thrombozyten	TK-Puffer	Zitratpuffer
24	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	Thrombozyten	TK-Puffer	TK-Lagerpuffer
25	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	Thrombozyten	TK-Puffer	Zitratpuffer
26	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	Thrombozyten	TK-Puffer	TK-Lagerpuffer
27	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	Thrombozyten	TK-Puffer	Zitratpuffer
28	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	Thrombozyten	TK-Puffer	TK-Lagerpuffer
29	Thrombozyten	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	Zitratpuffer
30	Thrombozyten	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	TK-Lagerpuffer

Tab. 2.54 Visuelle Beobachtung der Interaktionen von Thrombozyten und HEK293-Zellen (inkl. Kontrollen) - Versuch II; Zellkultivierung mit / ohne Vitamin K: ⁺/⁻

Probe	Reaktionsvolumen I		Reaktionsvolumen II		Reaktionsvolumen III (Puffer)
	Zelltyp	Puffer	Zelltyp	Puffer	
1	Thrombozyten	TK-Puffer	-	-	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
2	Thrombozyten	mod. ² NaCl-Lsg ³	-	-	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
3	Thrombozyten	TK-Puffer	Thrombozyten	mod. NaCl-Lsg	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
4	HEK293-MOCK	TK-Puffer	-	-	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
5	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lsg	-	-	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
6	HEK293-MOCK	TK-Puffer	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lsg	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
7	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lsg	-	-	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
8	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lsg	-	-	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
9	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lsg	-	-	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
10	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lsg	-	-	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
11	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lsg	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lsg	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
12	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lsg	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lsg	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
13	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lsg	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lsg	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
14	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lsg	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lsg	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
15	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lsg	Thrombozyten	TK-Puffer	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
16	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lsg	Thrombozyten	TK-Puffer	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
17	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lsg	Thrombozyten	TK-Puffer	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
18	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lsg	Thrombozyten	TK-Puffer	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer
19	Thrombozyten	TK-Puffer	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lsg	filtr. ¹ TK-Lagerpuffer

Tab. 2.55 Visuelle Beobachtung der Interaktionen von Thrombozyten und HEK293-Zellen (inkl. Kontrollen) - Versuch III; Zellkultivierung mit / ohne Vitamin K: ⁺/⁻; filtr.¹: filtrierter, mod.²: modifiziert, Lsg³: Lösung, expr.³: exprimiert

Probe	Reaktionsvolumen I		Reaktionsvolumen II		Reaktionsvolumen III (Puffer)
	Zelltyp	Puffer	Zelltyp	Puffer	
1	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
2	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
3	HEK293-MOCK	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
4	HEK293-MOCK	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
5	HEK293-MOCK	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
6	HEK293-MOCK	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
7	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
8	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
9	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
10	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
11	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
12	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
13	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
14	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
15	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
16	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
17	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
18	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
19	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer

Probe	Reaktionsvolumen I		Reaktionsvolumen II		Reaktionsvolumen III (Puffer)
	Zelltyp	Puffer	Zelltyp	Puffer	
25	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	HEK293- <i>MOCK</i>	HEK293 Medium	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
26	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	HEK293- <i>MOCK</i>	HEK293 Medium	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
27	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	HEK293- <i>MOCK</i>	HEK293 Medium	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
28	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	HEK293- <i>MOCK</i>	HEK293 Medium	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
29	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	HEK293- <i>MOCK</i>	HEK293 Medium	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
30	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	HEK293- <i>MOCK</i>	HEK293 Medium	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
31	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	HEK293- <i>MOCK</i>	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
32	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	HEK293- <i>MOCK</i>	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
33	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	HEK293- <i>MOCK</i>	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
34	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	HEK293- <i>MOCK</i>	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
35	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	HEK293- <i>MOCK</i>	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
36	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	HEK293- <i>MOCK</i>	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
37	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	HEK293- <i>MOCK</i>	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
38	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	HEK293- <i>MOCK</i>	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
39	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
40	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
41	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
42	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
43	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
44	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
45	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
46	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
47	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	HEK293- <i>MOCK</i>	HEK293 Medium	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer

Probe	Reaktionsvolumen I		Reaktionsvolumen II		Reaktionsvolumen III (Puffer)
	Zelltyp	Puffer	Zelltyp	Puffer	
48	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	HEK293- <i>MOCK</i>	HEK293 Medium	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
49	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	HEK293- <i>MOCK</i>	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
50	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	HEK293- <i>MOCK</i>	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
51	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
52	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
53	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
54	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
55	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
56	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
57	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer
58	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer

Tab. 2.56 Visuelle Beobachtung der Interaktionen von Thrombozyten und HEK293-Zellen (inkl. Kontrollen) Versuch IV; Zellkultivierung mit / ohne Vitamin K: ⁺/⁻; expr. ¹: exprimiert

III. Ergebnisse

3.1 Herstellung der Fusionsproteine

3.1.1 Design der DNA-Sequenz

Im ersten Schritt Promotionsarbeit wurde das Design der Plasmide entwickelt. Verschiedenste Modifikationen, die bereits erwähnten *tags*, veränderten die DNA-Sequenz und somit die Aminosäuresequenz der exprimierten Proteine. Es zeigte sich, dass diese Modifikationen und die verkürzte Ektodomäne der Proteine eine geringe Proteinexpression zur Folge hatten (ELISA). Erst durch den Einsatz des Signal- und Propeptids des Koagulationsfaktors FVII und die C-terminale Albuminfusion konnte die Proteinexpression gesteigert und somit auch die Ausbeute der Reinigung erhöht werden (vgl. Abb. 3.1, 3.2; 3.1.2 Proteinexpression und Lokalisation der nativen Proteine). Die DNA-Sequenz des TMG3 konnte nicht, ausgehend von einer Leber-cDNA-Bank, mittels PCR amplifiziert werden und musste als artifizielles Plasmid als Auftragsarbeit bezogen werden, um weitere Modifikationen, wie die C-terminale Albumin-Fusion, vorzunehmen. Es erwies sich hilfreich *nested*-Primer zu verwenden, falls die erste PCR-Amplifikation nicht erfolgreich war. Durch den Einsatz von Primern, die etwas außerhalb des gewünschten DNA-Bereichs lagen, konnte in einem ersten Amplifikationsschritt ein größerer DNA-Abschnitt gewonnen werden, der in einem zweiten Amplifikationsschritt durch sogenannte *nested*-Primer spezifiziert wurde. Die PCR, die mit *nested*-Primer durchgeführt wurde, basierte auf dem ersten gereinigten PCR-Ansatz, der die gewünschte DNA-Sequenz noch nicht oder nur schwach sichtbar im Gel enthielt. Der die gesuchte DNA enthaltende Gelbereich wurde ausgeschnitten und eine Gelextraktion der DNA wurde durchgeführt. Von diesem gereinigten Fragment ausgehend konnte die *nested*-PCR durchgeführt werden. So wurden die verschiedenen Konstrukte gewonnen. Alle vorgenommenen Modifikationen, wie zum Beispiel ein eingefügter *His-tag* oder eine PreScission[®]-Spaltstelle, zeigten durch die Fusion mit Albumin und einem Austausch von Signal- und Propeptid keinen verschlechternden Einfluss auf die Expressionsleistung der Proteine.

Für die Proteinexpression wurden die Klone 1560 und 1595 benutzt, welche nach der Transfektion eine gute Proteinexpressionseffizienz lieferten und deren mögliche Bindungspartner, aufgrund der Homologie zu PRGP1 und PRGP2, Rückschlüsse für die anderen beiden Familienmitglieder zulassen.

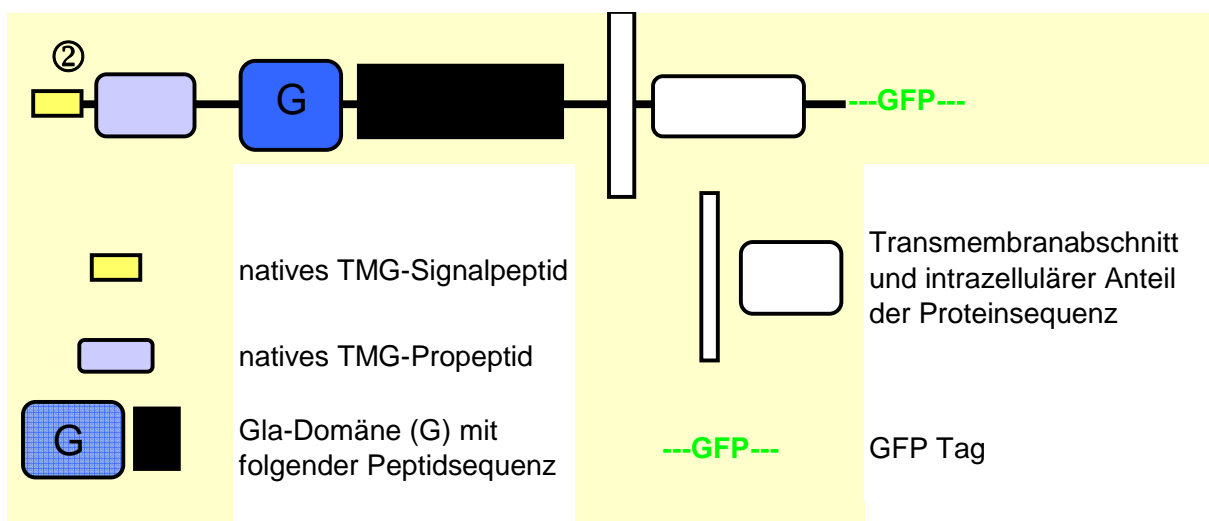
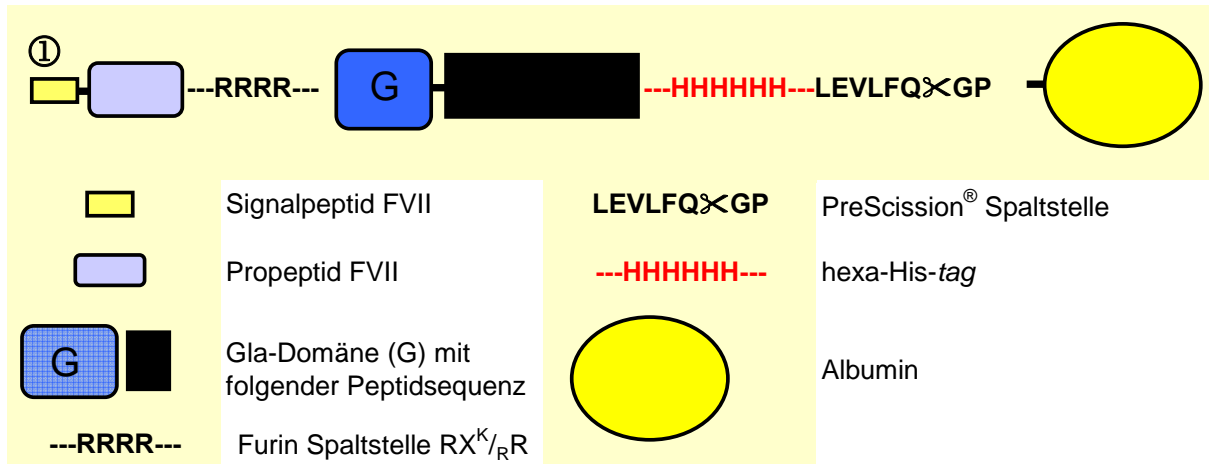


Abb. 3.1 (①) Schematischer Aufbau der exprimierten TMG3- und TMG4-Albumin-FP, basierend auf pIRES-1560, pIRES-1595; (②) Schematischer Aufbau der natürlichen TMG3 und TMG4 Proteine als C-terminale GFP Fusion, pIRES-1689, pIRES-1690

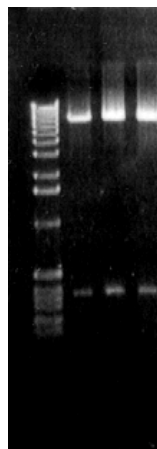


Abb. 3.2 Enzymatischer Kontrollverdau (AgeI/NotI) des DNA-Klons 1560 (vgl. XXX) vor der Sequenzierung des Plasmids, um eine Vorselektionierung vor der eigentlichen externen Sequenzierung zu erreichen. In diesem Fall ist ein TMG4-Fragment aus den Plasmiden getrennt worden; links im Gel ist ein Standard mitgelaufen. Klon ② und ③ wurden entsprechend der gewünschten Sequenz vollständig sequenziert.

3.1.2 Proteinexpression und Lokalisation der nativen Proteine

Aufgrund des verkürzten Peptidanteils stellte sich die Frage, weshalb die Zellen (vgl. 2.13 Transfektion) die gewünschten Proteine ohne Modifikation des Signal- und Propeptids nur unzureichend exprimierten, obwohl die Sequenz kürzer und somit weniger komplex war. Anhand von Dotblots konnten nach Zellaufschluss keine Unterschiede zwischen Kulturüberstand und Zellaufschluss erkannt werden, was jedoch nicht bedeutet, dass die Proteine nicht exprimiert worden sind. Es musste also erst geklärt werden, ob es sich grundsätzlich um Membranproteine handelt oder ob sie intrazellulär vorliegen und in vivo nicht membranständig sind. Diese Fragestellung konnte mit Hilfe von GFP-Fusions-Proteinen (vgl. 8.1 Exprimierte Proteinsequenzen, basierend auf Plasmidkonstrukten; 2.5 PCR-Konstrukte) beantwortet werden. Die mit GFP fusionierten Proteine wurden in der angefärbten Zellmembran, getrennt von gefärbter DNA und RNA, mikroskopisch lokalisiert (vgl. Abb. 3.3-3.5). In den Abbildungen 3.3 und 3.4 (vgl. Abb. 3.3-3.5) ist jeweils in Bild 1 das TMG-GFP-FP grün fluoreszierend dargestellt. In Bild 2 sieht man ein durchlichtmikroskopisches Abbild der untersuchten Zellen und in Bild 3 ist die mit PKH26 red angefärbte Zellmembran abgebildet und in Bild 4 sind intrazelluläre DNA und RNA mit DAPI blau angefärbt worden (Färbemethode: vgl. 2.19 Zellfixierung und Anfärbung). In Abbildung 3.5 (vgl. Abb. 3.5) ist ein 3D-Querschnitt durch die Zelle abgebildet, ausgehend von 300 Einzelaufnahmen, welche durch Renderverfahren zu einem 3D-Modell zusammengesetzt worden sind. Das Signal- und Propeptid von FVII konnten durch die bestätigte Zellmembranlokalisation der nativen Gla-Proteine gegen die nativen Signal- und Propeptide der Gla-Proteine ausgetauscht werden, um expressionsfähige TMG-FP zu erhalten.

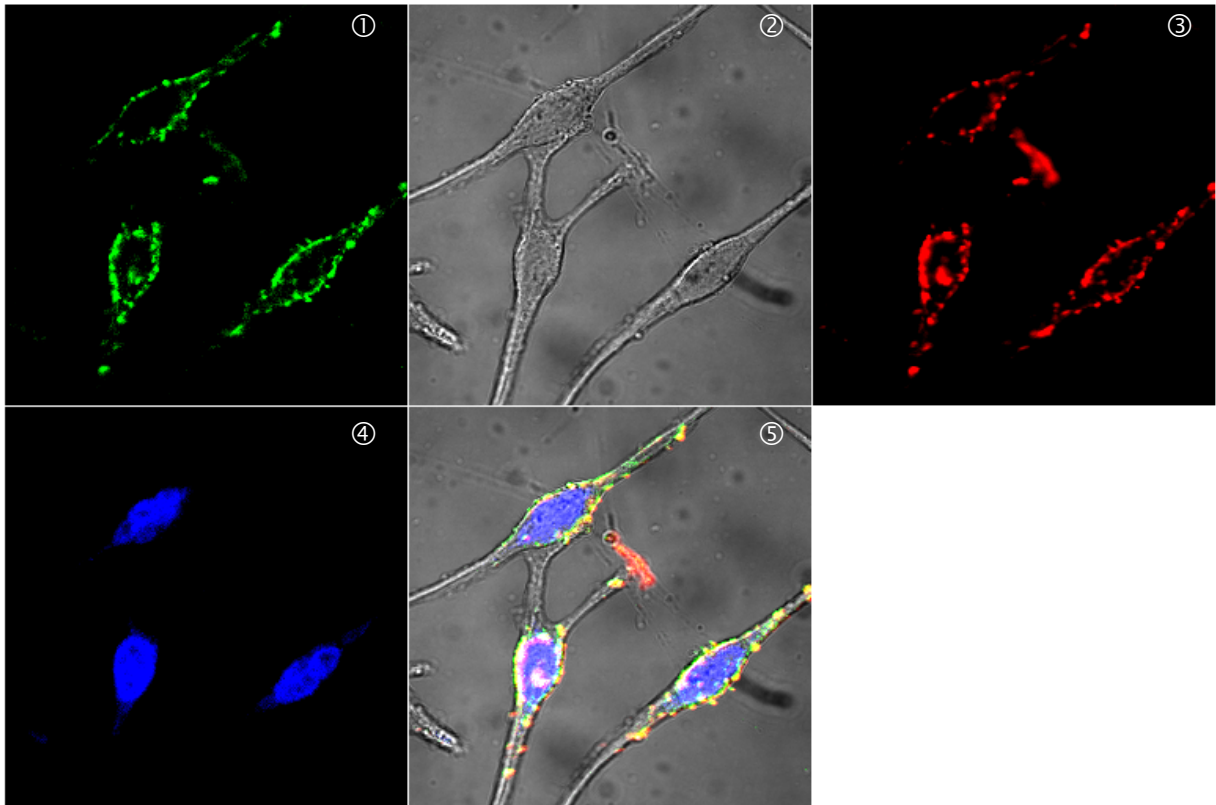


Abb. 3.3 TMG3-GFP-FP exprimierende Zellen (Klon 1689), Fusionsproteine grün (1), Zellmembran rot (3), DNA / RNA blau (4; Färbemethode: vgl. 2.19 Zellfixierung und Anfärbung zellspezifischer Strukturen), Bild 5: Overlay 1+3+4

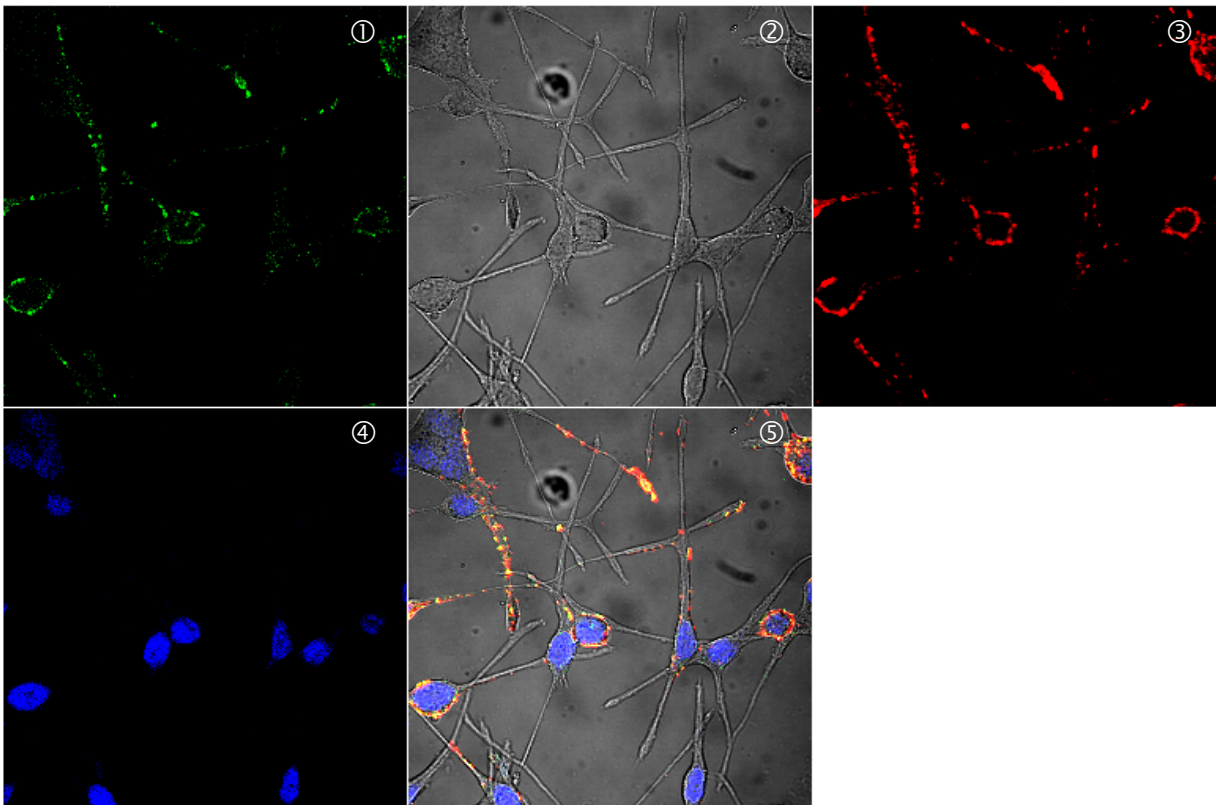


Abb. 3.4 TMG4-GFP-FP exprimierende Zellen (Klon 1690), Fusionsproteine grün (1), Zellmembran rot (3), DNA / RNA blau (4; Färbemethode: vgl. 2.19 Zellfixierung und Anfärbung zellspezifischer Strukturen), Bild 5: Overlay 1+3+4

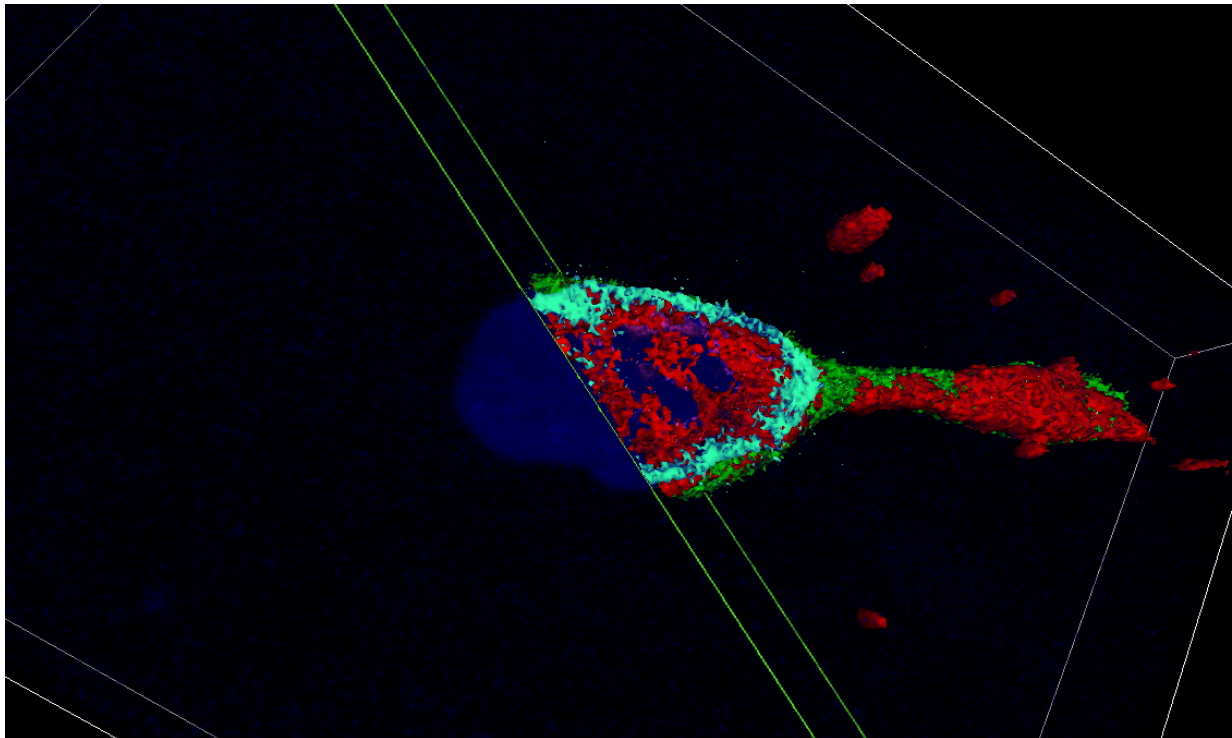
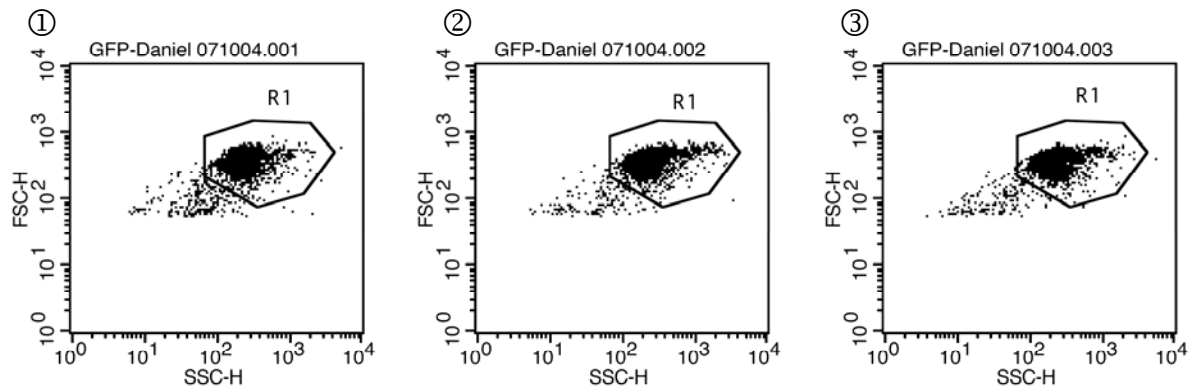


Abb. 3.5 TMG4-GFP-FP exprimierende Zellen (Klon 1690), Querschnitt durch die Zelle, erstellt durch Rendern von 300 digitalen Einzelaufnahmen, Fusionsproteine grün, Zellmembran rot, DNA / RNA blau (Färbemethode: vgl. 2.19 Zellfixierung und Anfärbung zellspezifischer Strukturen)

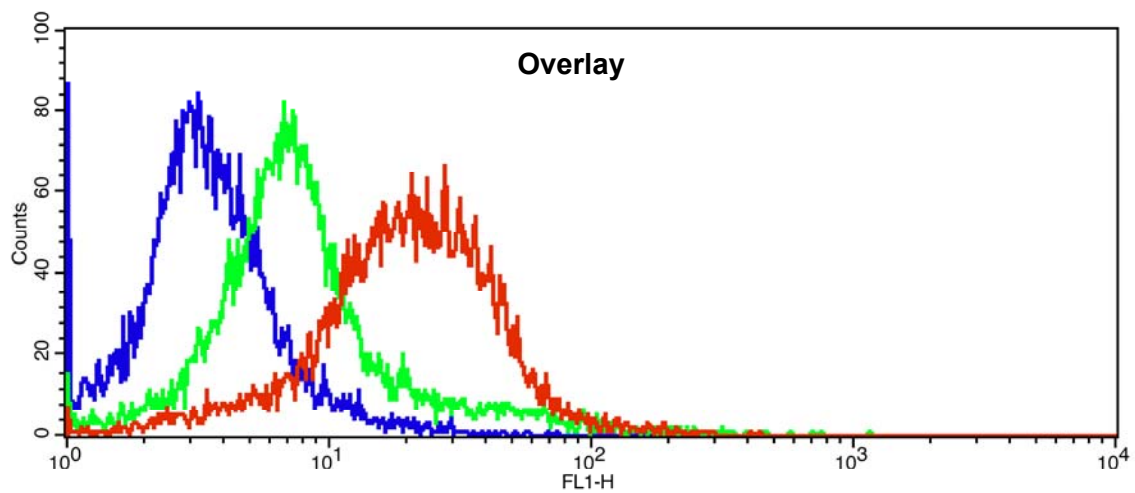
Die notwendige Steigerung der Proteinkonzentration konnte durch eine C-terminale Fusion mit humanem Albumin erreicht werden. Albumin ist eines der Massenproteine im humanen Plasma und verstärkte die Produktion der FP signifikant. Albumin wird in der rekombinanten Proteinexpression bereits als Halbwertszeit-verlängernder Fusionspartner eingesetzt [Weimer, Wormsbächer 2008]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Expression eines unterhalb der ELISA-Nachweisgrenze exprimierten Proteins durch eine Albuminfusion desselbigen bewirkt werden konnte, ohne die Kultivierungsparameter zu verändern oder den Kulturüberstand anzukonzentrieren. Durch die Modifikation des Pro- und Signalpeptids, sowie die C-terminale Albuminfusion konnten die TMG-Albumin-FP exprimiert werden. Der Einfluss von Vitamin K oder Warfarin auf die Zellvitalität (vgl. 2.14 Vitalitätskontrolle unter Zugabe von Vitamin K und Warfarin, vgl. Tab. 8.10) befand sich im Bereich der Gerät-spezifischen Messungenauigkeit und lichtmikroskopisch wurde kein Unterschied festgestellt. Unter Zugabe der eingesetzten Vitamin K-Menge konnte eine sehr gute Carboxylierungseffizienz erreicht werden, welche durch Proteinsequenzierung nachgewiesen wurde (vgl. 3.1.4 Proteinsequenzierung; 8.4 Proteinsequenzierung der exprimierten und gereinigten Gla-Proteine). Dennoch zeigte sich, dass die Gesamtproteinmenge, ausgehend von einem 20 l-Fermentationsüberstand von durchschnittlich 10,45 µg/ml (TMG3-Albumin-FP), bzw. 10,65 µg/ml (TMG4-Albumin-FP), im Vergleich zur Fermentation von generischem

humanem Albumin mit einer Gesamtproteinmenge von ca. 37 µg/ml, gering ausfiel. Beide Ergebnisse wurden als Kulturüberstand im ELISA getestet.

Die Expression der TMG3- und TMG4-GFP-FP mit natürlicher TMG-Sequenz verlief erfolgreich, jedoch war sie auch hier nicht besonders hoch (vgl. Abb. 3.6). Die Expressionseffizienz, bzw. Gesamtproteinmenge konnte wegen der zellulären Fixierung der FP nicht mit ELISA getestet werden. Die grundsätzliche Diskrepanz zu Kontrollzellen (vgl. Abb. 3.6; HEK neg. Kontrolle) konnte jedoch durchflusszytometrisch bestätigt werden. So konnte bei vergleichbarer Zellzahl/-vitalität von Kontrollzelle und untersuchten Zellen (vgl. Abb. 3.6 HEK neg. Kontrolle und TMG3-GFP Fusionsprotein in HEK239 / TMG4-GFP Fusionsprotein in HEK239) im *Overlay* der einzelnen Fluoreszenzintensitäten ein Unterschied nachgewiesen werden.



HEK neg. Kontrolle

TMG3-GFP Fusionsprotein
in HEK293TMG4-GFP Fusionsprotein
in HEK293

Key	Name	Parameter	Gate
—	GFP-Daniel 071004.001	FL1-H	G1
—	GFP-Daniel 071004.002	FL1-H	G1
—	GFP-Daniel 071004.003	FL1-H	G1

GFP-Daniel 071004.001=HEK negativ Kontrolle

GFP-Daniel 071004.002=TMG 3-GFP Fusionsprotein in HEK293

GFP-Daniel 071004.003=TMG 4-GFP Fusionsprotein in HEK293

Abb. 3.6 Abbildung der drei ausgewählten durch Zellgrößen (FSC) und Granularität (SSC) definierten Bereiche (①②③), sowie ein als *Overlay* dargestellter durchflusszytometrische Fluoreszenzvergleich des TMG3(grün)-/TMG4(rot)-GFP-FP in HEK293-Zellen und einer HEK293-MOCK-Kontrollzelle (blau)

3.1.3 Proteinreinigung

Aufgrund des fehlenden Membranankers (vgl. Abb. 3.1) sezernierten die Zellen die FP wie gewünscht direkt ins Kulturmedium. Die eingesetzten Proteine lagen deshalb nach der Reinigung in löslicher Form vor. So war sichergestellt, dass in weiteren Versuchen eine Interaktion mit den Gla-Proteinen und nicht, wie im Falle einer Expression der membranständigen nativen Proteine, mit anderen Membranproteinen der Expressionszellen stattfinden würde. Zur Reinigung der Proteine aus dem Kulturmedium wurden verschiedenste Materialien getestet. Weil noch kein kommerziell verfügbarer spezifischer Antikörper für die einzelnen Gla-Proteine erhältlich war, wurden aufeinanderfolgend Materialkombinationen eingesetzt. Die Verwendung von HA war wichtig für die Unterscheidung von γ -carboxyliertem und nicht γ -carboxyliertem Material (vgl. Abb. 3.7). Die γ -carboxylierten Proteine konnten über eine Metallchelatabindung besonders gut an die Kalziumionen enthaltenden Domänen des HAs binden (vgl. Abb. 3.7). Nicht oder nur geringfügig γ -carboxylierte Proteine sollten durch den Waschpuffer eluiert werden (vgl. Abb. 3.10). Im Anschluss an die HA-Reinigung wurde eine SEC (vgl. Abb. 3.8, 3.9) des HA-Wasch- und HA-Elutionspeaks eingesetzt, um durch Größendifferenzierung Proteinfragmente oder zelluläre Fremdproteine abzutrennen. Sowohl Gele (vgl. z.B. Abb. 3.16, Spur 3) mit gepoolten Spitzenfraktionen der HA-Reinigung, als auch Gele mit SEC-gereinigten HA-Elutionsfraktionen (vgl. Abb. 3.11, 3.12, Spur 9) zeigten neben einer Hauptbande der FP weitere Banden. Ein hoher Reinheitsgrad wäre weiter verfolgt worden, wenn mit der Rohfraktion der HA- oder HA-SEC-gereinigten Fraktionen ein Bindungsnachweis gelungen wäre. Eine Optimierung des Reinigungsprozesses durch eine im Anschluss an die HA-Reinigung durchgeführte SEC wurde deshalb nicht weiter verfolgt. Die Reinigung des nicht γ -carboxylierten Materials erfolgte über Nickel-NTA-Sepharose, die ähnliche und vergleichbar viele unspezifische Proteinbindungen aufwies wie das HA-Material. Aus diesem Grund zeigten auch Kombinationen der Reinigungsmatrizes keine wesentliche Verbesserung der Reinheit. Vermutlich könnte man die Reinigung nur durch eine wirklich proteinspezifische Reinigung verbessern. Dies zeigte die Verwendung einer anti-Albumin Säule (vgl. Abb. 3.13), die in einen höheren Reinheitsgrad resultierte. Im Vergleich zu den verwendeten Materialien, wie Nickel-NTA oder HA, die aufgrund ihres ionischen Charakters eine relativ hohe unspezifische Affinität zu diversen Plasmaproteinen hatten, wurden diese möglicherweise durch den sauren Elutionsgradienten von der anti-Albumin Säule gewaschen oder konnten erst gar nicht binden. Der saure pH-Wert während der Elution wurde nach dem Säulenaustritt durch einen basischen Vorlagepuffer neutralisiert, um die Proteine weitestgehend zu schonen. Diese Reinigungsmethode wurde deshalb benutzt, um nicht γ -carboxylierte Proteine zu reinigen (vgl. Abb. 3.13). Insgesamt betrachtet lag ein Reinheitsgrad

der gereinigten Proteine vor, der keinerlei Bedenken bezüglich der Versuchsdurchführung aufkommen lies. Der Reinigungsprozess erwies sich insgesamt als sehr effizient und nur die HA-Reinigung konnte durch Wasch- und Elutionsschritt sicherstellen, dass vollständig γ -carboxyliertes Material erhalten wurde. Die HA-Reinigung unter ausschließlicher Verwendung des Waschpuffers als Elutionsmedium mit anschließender Fraktionierung hätte weniger Nebenbanden zur Folge gehabt, aber auch unvollständig γ -carboxylierte TMG-FP als Ergebnis produziert (vgl. 3.1.4 Proteinsequenzierung).

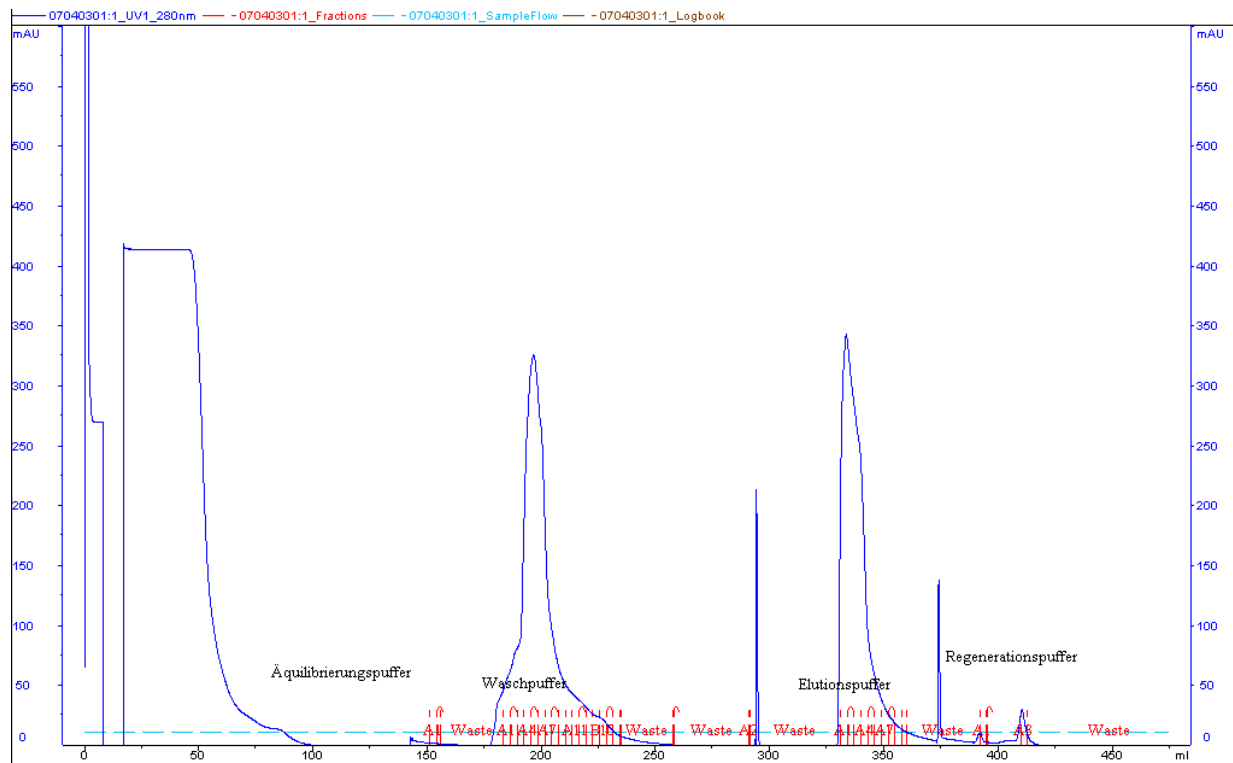


Abb. 3.7 Exemplarisches Chromatogramm einer HA-Reinigung des TMG4-Albumin-FP mit verschiedenen Pufferlösungen

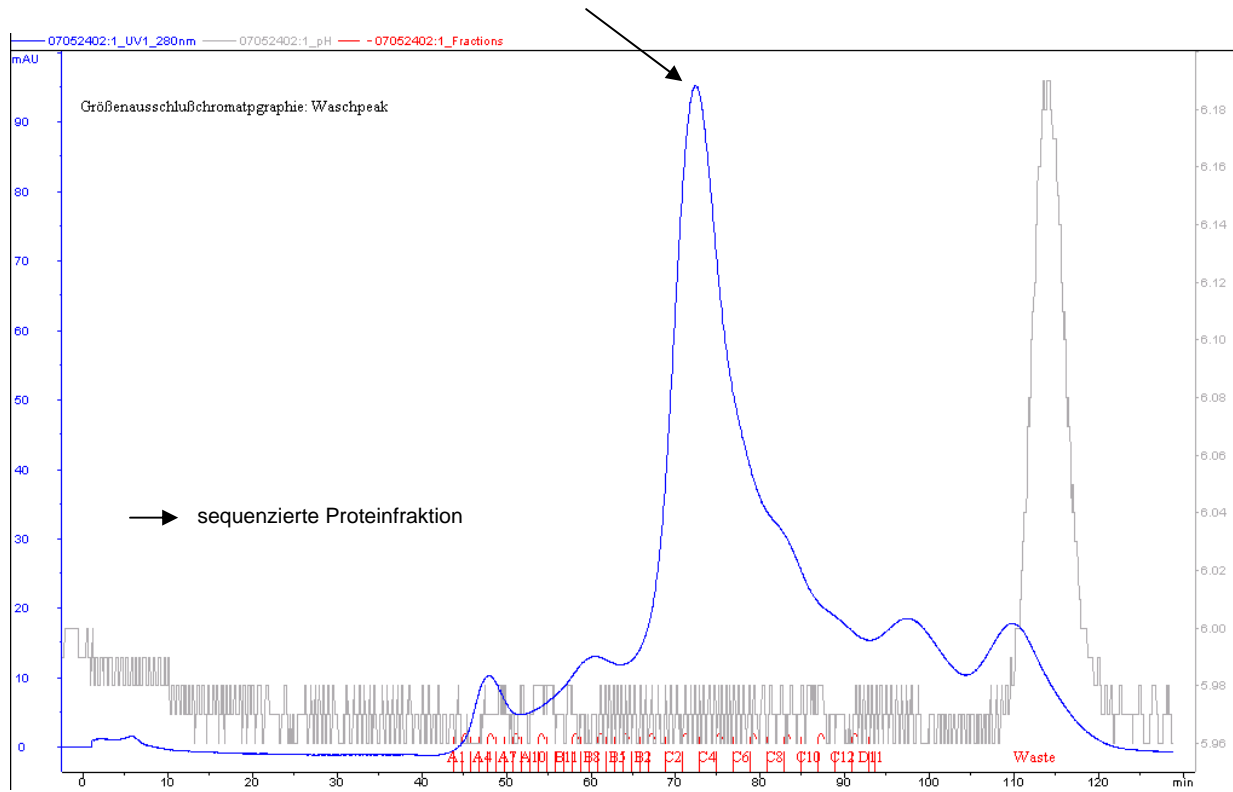


Abb. 3.8 SEC des Waschpeaks (vgl. Abb. 3.7) der TMG4-Albumin-FP – HA-Reinigung

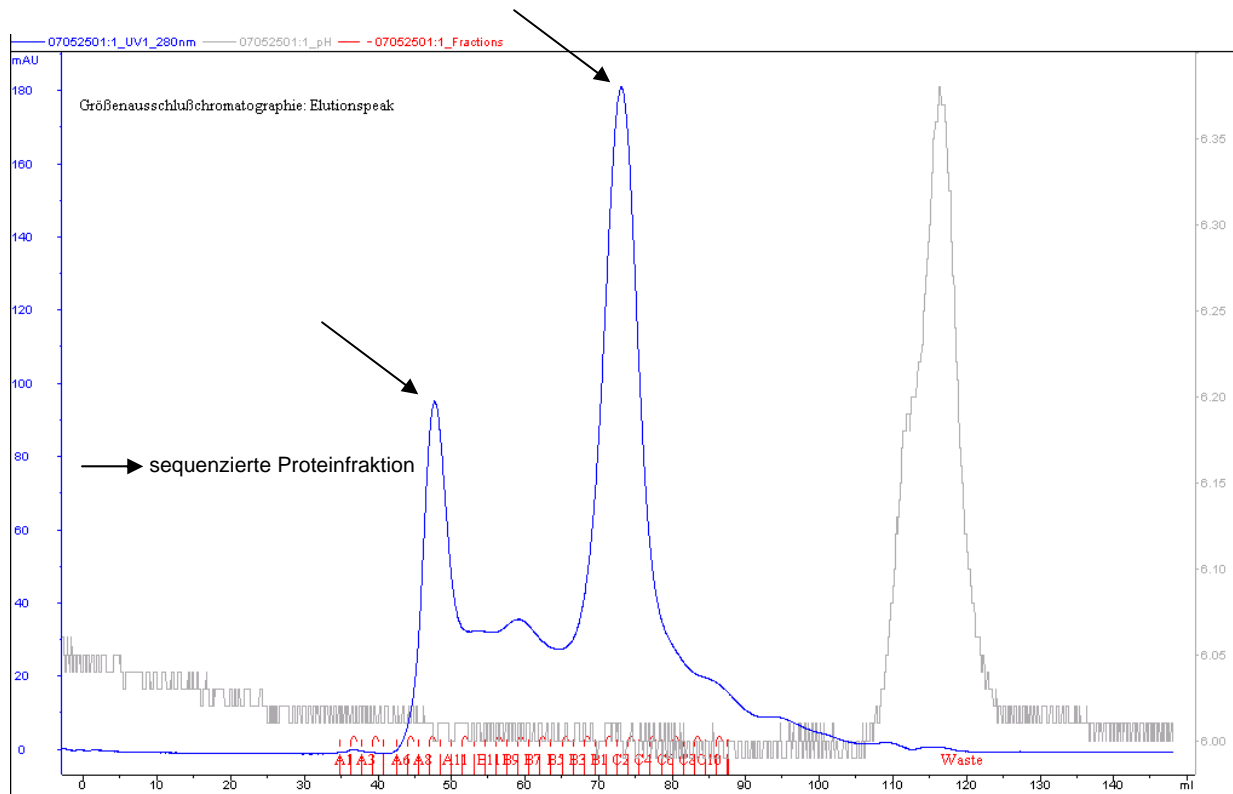
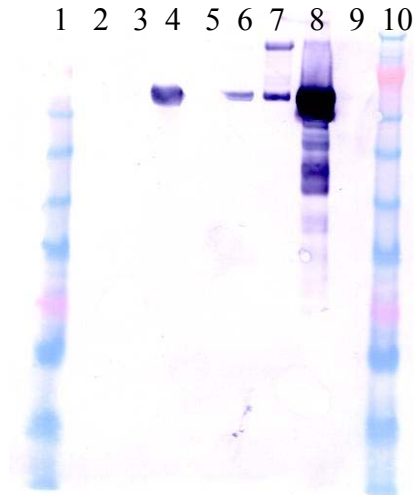
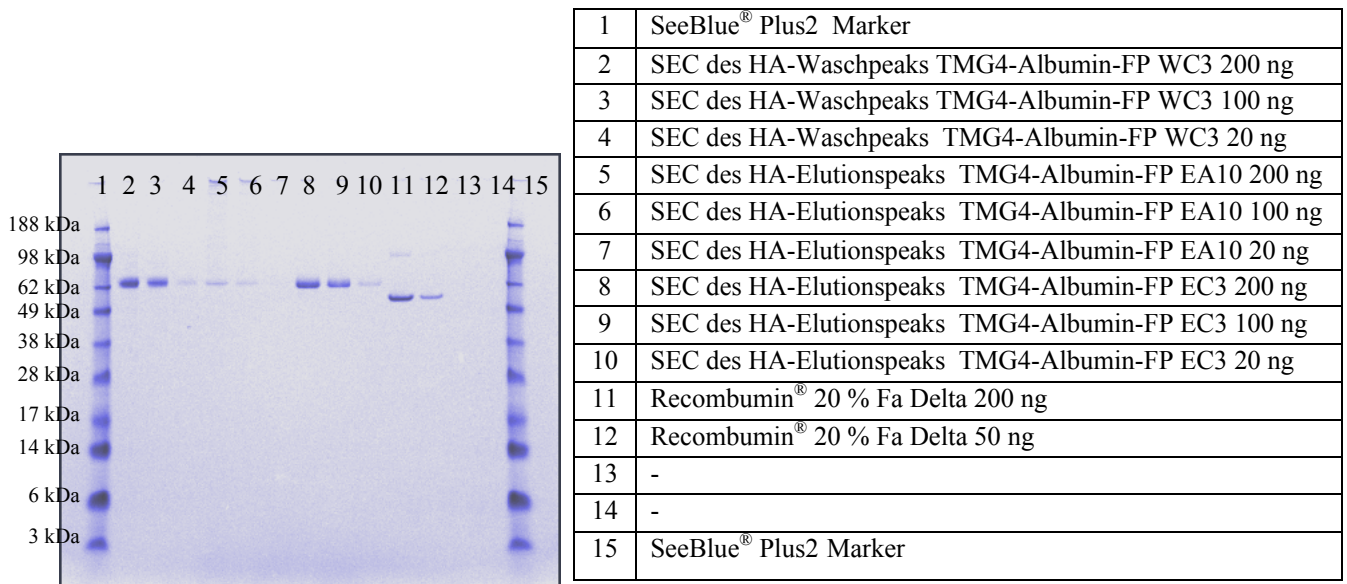


Abb. 3.9 SEC des Elutionspeaks (vgl. Abb. 3.7) der TMG4-Albumin-FP - HA-Reinigung



1	SeeBlue [®] Plus2 Marker
2	SEC des HA Waschpeaks TMG4-Albumin-FP A5
3	SEC des HA Waschpeaks TMG4-Albumin-FP B8
4	SEC des HA Waschpeaks TMG4-Albumin-FP C3
5	SEC des HA Waschpeaks TMG4-Albumin-FP D11
6	SEC des HA Elutionspeaks TMG4-Albumin-FP EA10
7	SEC des HA Elutionspeaks TMG4-Albumin-FP B8
8	SEC des HA Elutionspeaks TMG4-Albumin-FP C3
9	Recombumini [®] 20 % Fa Delta
10	SeeBlue [®] Plus2 Marker

Abb. 3.10 Western-Blot (anti-Gla-Ak) der HA- und SEC-gereinigten TMG4-Albumin-FP Fraktionen; Nupage[®] Bis-Tris Gel 10 %-ig (nicht reduziert) mit MES-Puffer (SDS)



1	SeeBlue [®] Plus2 Marker
2	SEC des HA-Waschpeaks TMG4-Albumin-FP WC3 200 ng
3	SEC des HA-Waschpeaks TMG4-Albumin-FP WC3 100 ng
4	SEC des HA-Waschpeaks TMG4-Albumin-FP WC3 20 ng
5	SEC des HA-Elutionspeaks TMG4-Albumin-FP EA10 200 ng
6	SEC des HA-Elutionspeaks TMG4-Albumin-FP EA10 100 ng
7	SEC des HA-Elutionspeaks TMG4-Albumin-FP EA10 20 ng
8	SEC des HA-Elutionspeaks TMG4-Albumin-FP EC3 200 ng
9	SEC des HA-Elutionspeaks TMG4-Albumin-FP EC3 100 ng
10	SEC des HA-Elutionspeaks TMG4-Albumin-FP EC3 20 ng
11	Recombumini [®] 20 % Fa Delta 200 ng
12	Recombumini [®] 20 % Fa Delta 50 ng
13	-
14	-
15	SeeBlue [®] Plus2 Marker

Abb. 3.11 Coomassie-Färbung von SEC-Fractionen der HA-gereinigten TMG4-Albumin-FP; Nupage[®] Bis-Tris Gel 10 %-ig (nicht reduziert) mit MES-Puffer (SDS)

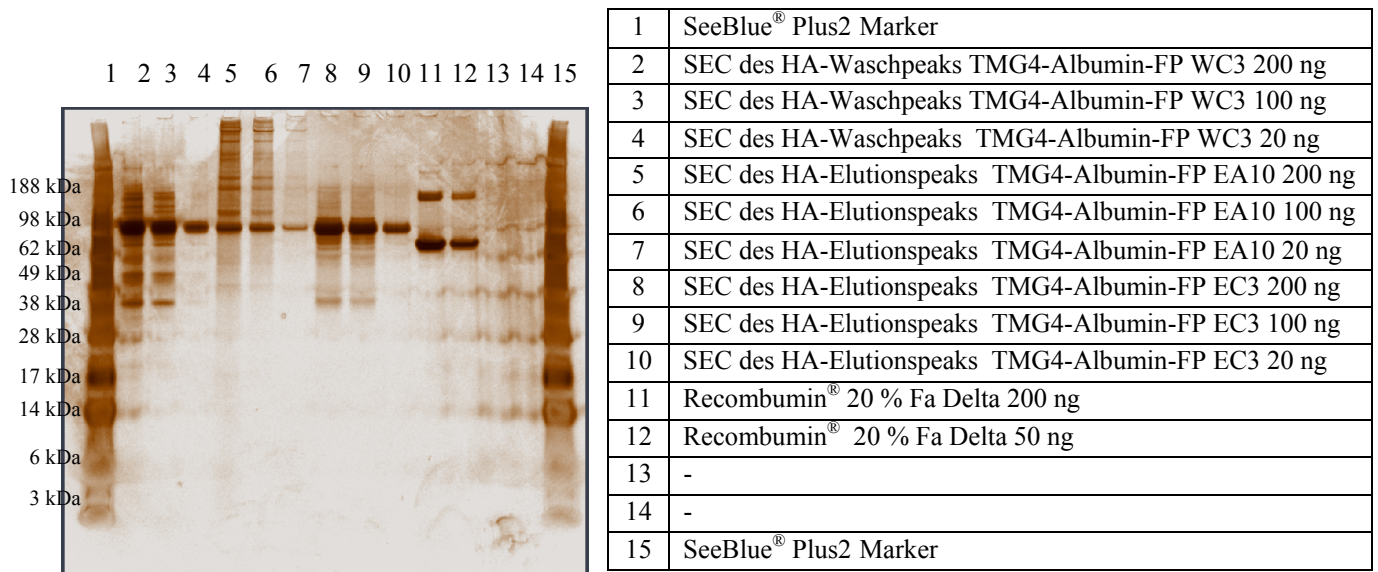


Abb. 3.12 Silberfärbung von SEC Fraktionen der HA-gereinigten TMG4-Albumin-FP; Nupage[®] Bis-Tris Gel 10 %-ig (nicht reduziert) mit MES-Puffer (SDS)

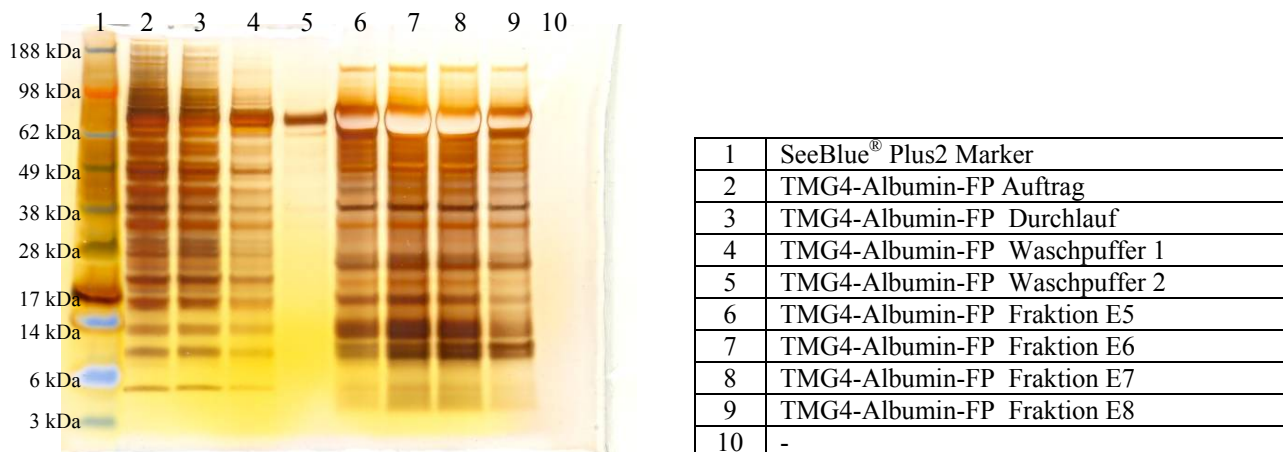


Abb. 3.13 Silberfärbung von über die anti-Albumin-Säule gereinigten Fraktionen des TMG4-Albumin-FP (8,0 µl/Spur $\hat{=}$ ca. 3,2 µg Gesamtproteingehalt); Nupage[®] Bis-Tris Gel 4-12 %-ig (reduziert) mit MES-Puffer (SDS)

3.1.4 Proteinsequenzierung

In der Proteinsequenzierung zeigte sich, dass die Reinigung und Expression erfolgreich bezüglich der γ -Carboxylierung war. Der Carboxyierungsgrad betrug 95 % bezogen auf die sequenzierten Proteinbanden.

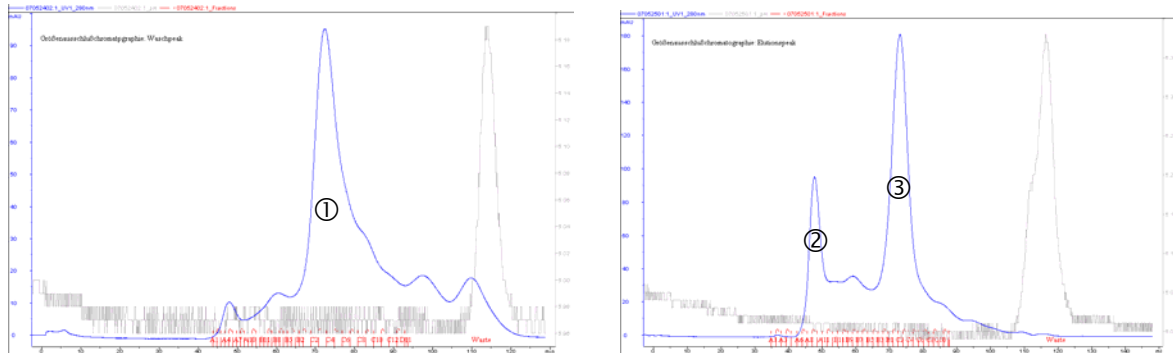


Abb. 3.14 SEC-Waschpeak ① und SEC-Elutionspeak ②+ ③ der zuvor HA gereinigten Gla-Proteine, welche einer Proteinsequenzierung unterzogen wurden

gefundene Proteinsequenzen im Waschpeak: WC03 des HA/SEC-gereinigten TMG4-Albumin-FP ①

- YNRFDLELFTPGNLERE...
- AVFVTQEEAHGVLHRRRRYN...
- VTQEEAHGVLHRRRRYNRFD...

gefundene Proteinsequenzen im Elutionspeak: EA10 des HA/SEC-gereinigten TMG4-Albumin-FP ②

- AVFVTQEEAHGVLHRRRRYN...

gefundene Proteinsequenzen im Elutionspeak: EC03 des HA/SEC-gereinigten TMG4-Albumin-FP ③

- YNRFDLELFTPGNLERE...
- AVFVTQEEAHGVLHRRRRYN...
- VTQEEAHGVLHRRRRYNRFD...

3.1.5 Enzymatische Abspaltung des Albuminteils von TMG3/4 Fusionprotein mittels PreScission® Protease

Da Albumin bekanntlich gewisse Wechselwirkungen mit einer Reihe von Proteinen [Quinlan, Martin 2005] zeigt und somit für unspezifische Wechselwirkungen mit den FP verantwortlich sein könnte, wurde versucht den Albuminanteil von den FP enzymatisch abzuspalten. Diese enzymatische Abspaltung des Albuminteils war in physiologischer Kochsalzlösung, in der die Proteine gelagert waren, nicht möglich. Der vom Hersteller empfohlene, DTT enthaltende Puffer ermöglichte die Spaltung der FP (vgl. Abb. 3.15). Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass die TMG-Domänen internen Disulfidbrücken ebenfalls gespalten wurden und somit mit einem erheblichen Einfluss auf die Konformation gerechnet werden musste. Eine derartige Konformationsänderung hätte alle Bindungsversuche in Frage gestellt. Beim Verzicht auf DTT fand keine Spaltung statt. Die Abspaltung des Albuminteils war deshalb nicht möglich. Aus diesem Grund wurden in den folgenden Versuchen alle Gla-Proteine als Albuminfusion eingesetzt.

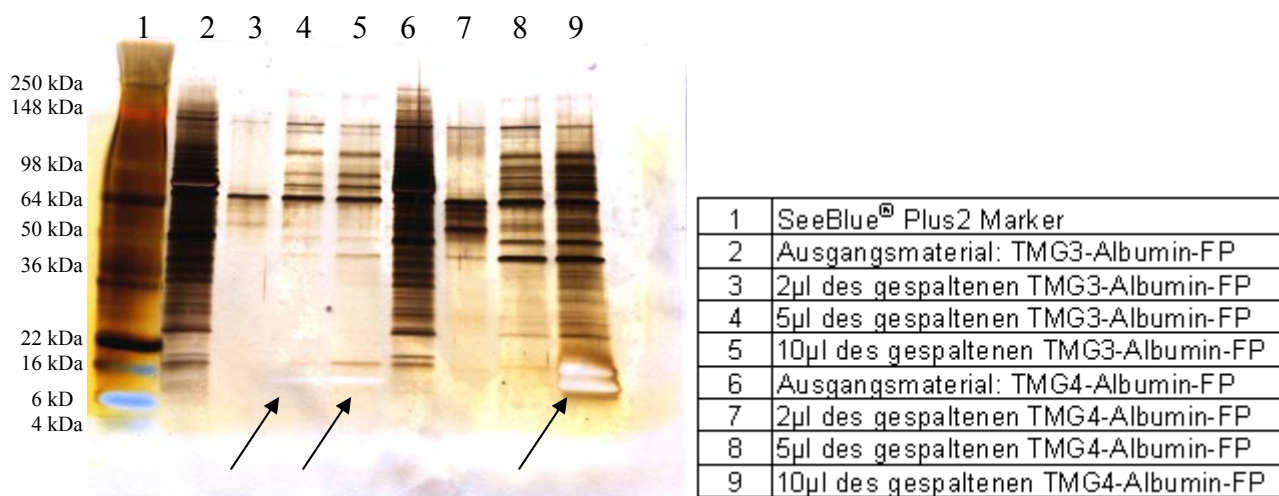


Abb. 3.15 Silverstain-Gel der FP Spaltansätze mit PreScission® Protease (abgespaltene TMG-Ektodomänen sind durch Pfeile markiert); Novex® Tris Glycin Gel 4-20% (reduziert) mit Tris-Glycin SDS Puffer

3.2 Ligandensuche im menschlichen Plasma

3.2.1 Heparin-Hemmkonzentration

Durch die Zugabe von Heparin (Liquemin[®]) wird die Gerinnung des Blutes inhibiert. In Konserven wird zur Inhibierung Zitrat zugegeben. Heparin bindet an Antithrombin (AT III) und aktiviert dieses durch dessen Konformationsänderung. Die Hemmung von Thrombin durch ATIII erfolgt nur, wenn die Kettenlänge des Gesamtmoleküls aus mehr als 18 Monomeren besteht. Die reine Bindung kurzkettiger Heparine an Thrombin kann ebenfalls die Hemmung der Gerinnungsfaktoren IXa, Xa auslösen, ohne Veränderung der Konformation [Mutschler, Geisslinger 2001]. Heparin setzt sich aus repetitiven Glucuronsäure- und Glucosaminmolekülen zusammensetzt, deren Sulfat- und Säuregruppen potentiell auch Ca^{2+} -Ionen binden können. Die vollständige Komplexierung aller freien Ca^{2+} -Ionen hätte zur Folge, dass eine Kalziumionen vermittelte Bindung von Plasmaproteinen an die FP nicht stattfinden könnte (vgl. 2.20 Bindungsversuche mit *Magnetic Beads*). In der Literatur wird eine grundsätzliche Bindung von Kalziumionen an Heparin erwähnt [Grant, Long 1991; Chevalier, Lucas 2004], aber als eher schwach affin, bzw. delokalisiert beschrieben. Eine Untersuchung des Einflusses der Gla-Domäne des aktivierten FX bei dessen Heparin verstärkter Inhibition durch ATIII zeigen, dass die Gla-Domäne bei physiologischer Ca^{2+} -Konzentration (ca. 2,5 mmol) in der Lage ist, bei Anwesenheit von Heparin Kalzium zu binden [Rezaie 1998]. Das derart behandelte Blut und das daraus hergestellte Plasma (vgl. 2.21 Herstellung von heparinisiertem Plasma) konnte somit, aufgrund der dargelegten Begründungen, für analytische Zwecke im Sinne einer Ca^{2+} -vermittelten Gla-Protein Interaktion mit einem möglicherweise Plasma-stämmigen Protein verwendet werden.

3.2.2 Ligandensuche mit Magnetic Beads

3.2.2.1 Versuche mit M-PVA-IDA-Cu-Magnetic Beads

Nach der Reinigung und Analyse wurden die Proteine, für erste Bindungsversuche von Plasmaproteinen (*Proteinfishing*), an *Magnetic Beads* gekoppelt. Der Versuch war die erfolgversprechendste Möglichkeit, um auch Proteine zu binden, die nur in Spuren im Plasma enthalten sind. Der Einsatz der *Beads* sorgte für die beste Dispersion im Plasma und somit für die größte Interaktionswahrscheinlichkeit mit dem gesuchten Bindungspartner. Die verwendeten *Beads* zeigten im Vergleich mit anderen die geringsten unspezifischen Anlagerungen, bei der jeweils maximalen Beladungskapazität. Außerdem konnte durch den Wechsel von Kupfer-IDA-*Beads* zu NHS-aktivierten-*Beads* eine Koelution der TMG-Albumin-FP ausgeschlossen werden, wie sich mittels geeigneter Analyseverfahren herausstellte (vgl. Abb. 3.16 Spur 3 mit Spur 6). Der wiederholte Einsatz der *Beads* war aufgrund der Verklebung durch Fibrin nur einmal durchführbar. Bei den durchgeführten Versuchen zeigte sich eine relativ hohe Anzahl an Proteinbanden im Gel, die nur unspezifisch an die *Bead*-Matrix oder auch an die Gla-Proteine gebunden hatten (vgl. Abb. 3.16). Die Gesamtmenge an gebundener Proteinmasse konnte durch eine Verkürzung der Inkubationszeit von ca. 12 h auf 4 h bei RT verringert werden. Die Verklebung der *Beads* unterblieb und die eluierte Proteinmenge nahm im ähnlichen Umfang ab.

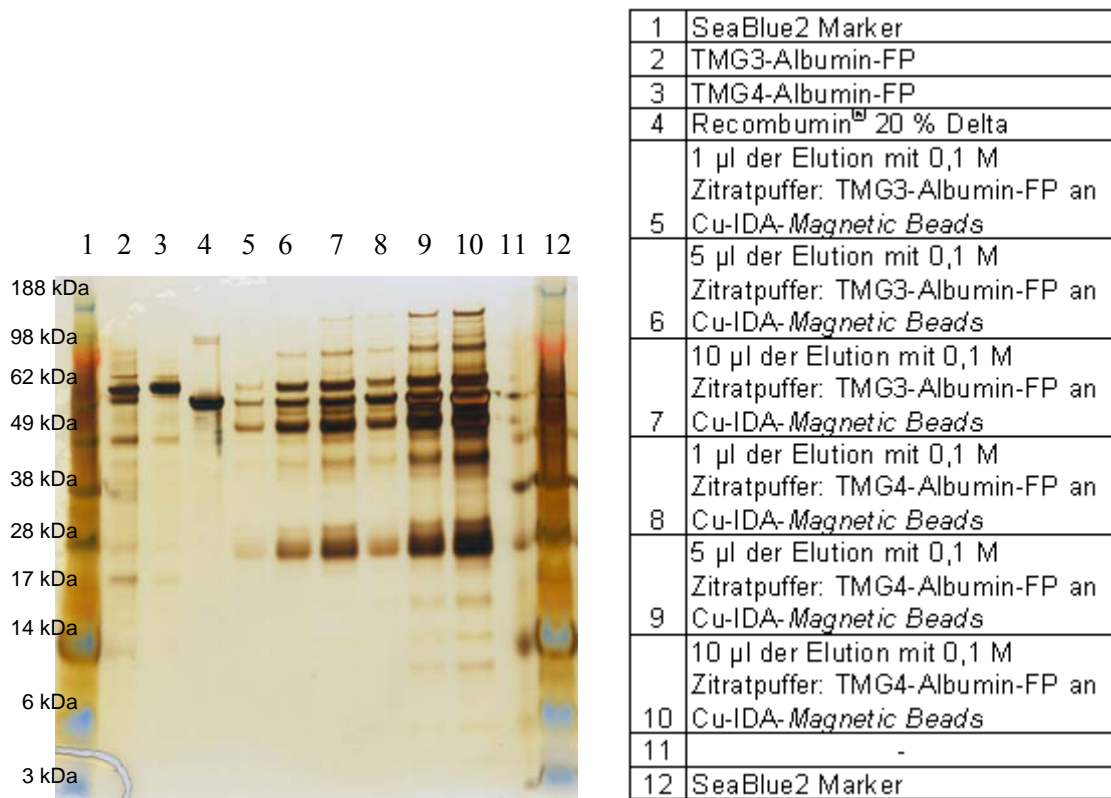


Abb. 3.16 Eluate (1 µl/Spur) von M-PVA-IDA-Cu-Magnetic Beads mit immobilisierten FP; Nupage® Bis-Tris Gel 10 %-ig (reduziert) mit MES-Puffer (SDS)

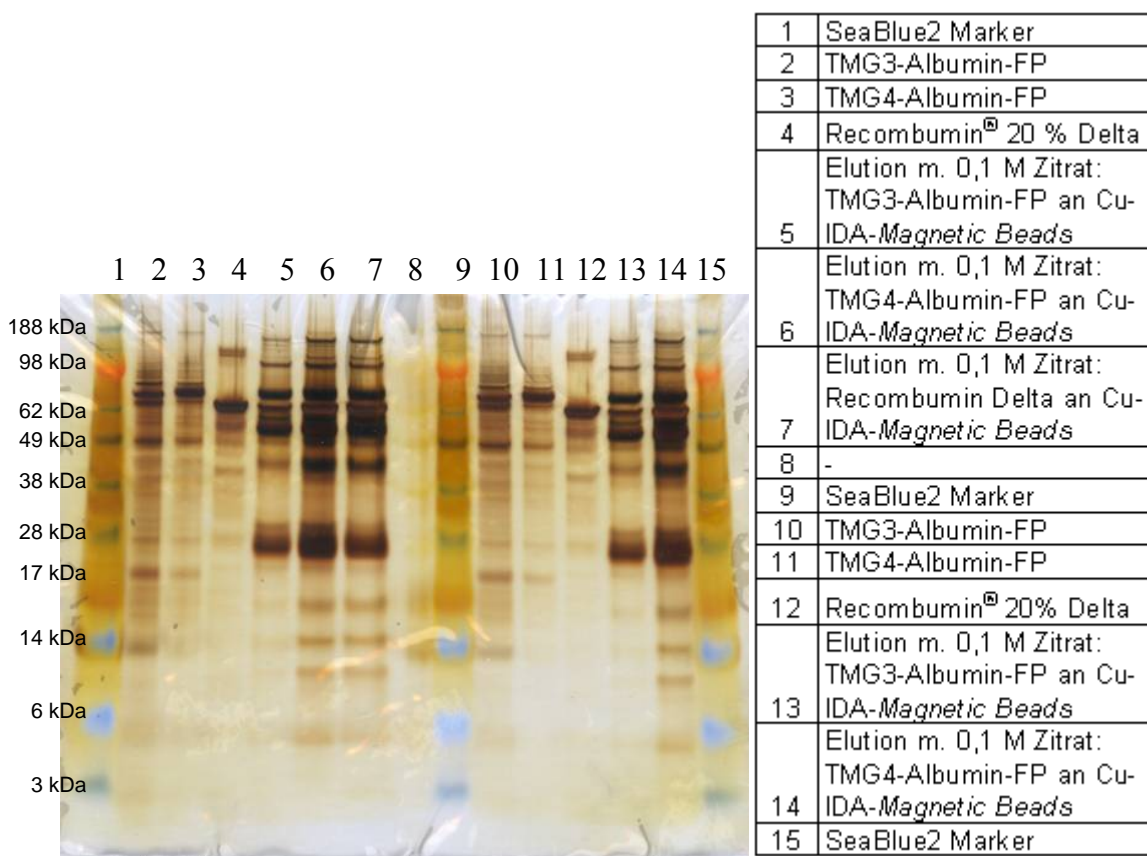


Abb. 3.17 Eluate (1 µl/Spur) von M-PVA-IDA-Cu-Magnetic Beads mit immobilisierten FP und Recombumin®-Kontrolle; Nupage® Bis-Tris Gel 10 %-ig (reduziert) mit MES-Puffer (SDS)

In den Gelen kann man erkennen (vgl. Abb. 3.17 Spur 5 und 6 mit Spur 7), dass es keine Unterschiede zwischen Kontrolle und den Proben gibt, was bedeutet, dass die gebundenen Proteine unspezifisch an die *Beads* und/oder die TMG-Albumin-FP gebunden hatten. Die Auflösung der Banden ist nicht immer hoch, besonders, wenn sie ineinander laufen oder mehrere Proteinbanden übereinander liegen. Dieses Problem wurde durch weitere Gel- und Blotversuche ausgeschlossen. In den Elutionsvolumina befand sich durch die EDTA-Inkubation nicht nur eine Masse an unspezifisch an die FP oder *Bead*-Matrix gebundenen Proteinen (vgl. auch 3.2.4 SPR-Kinetiken), sondern auch der mögliche Bindungspartner und die durch das Strippen der *Beadmatrix* gelösten TMG3- und TMG4-Albumin-FP (vgl. Abb. 3.23). Durch eine native Tris-Glycin-Gelseparation und folgendem Western-Blot auf eine PVDF-Membran (vgl. Abb. 3.20, 3.21) sollten die mit Zitratpuffer eluierten Proteine ihre native Konformation weitestgehend beibehalten und nicht so stark deformiert werden wie durch Blotten auf eine NC-Membran. Geblockt wurde mit Magermilchlösung und unter Zugabe von CaCl_2 (Endkonzentration 2,5 mM). TMG3- und TMG4-Albumin-FP wurden als „Fängerantikörper“ eingesetzt und für ca. 12 h inkubiert. Als Detektionsantikörper diente ein anti-Albumin-Antikörper (anti-Albumin-Ak), der abschließend 2 h inkubiert wurde (vgl. Abb. 3.18, 3.19). Die Gele zeigen auf der Laufhöhe des Recombumins[®] in den untersuchten Fraktionen ebenfalls eine Bande, die mit großer Wahrscheinlichkeit humanem, Plasma-stämmigem Albumin zuzuordnen ist. Neben den jeweils am stärksten ausgeprägten Banden treten Banden auf, bei denen es sich um Dimere, welche auch bei rekombinantem Albumin beobachtet werden, handelt (vgl. Abb. 3.20). Der Blot (vgl. Abb. 3.20) wurde direkt, ohne Inkubation mit dem TMG3- oder TMG4-Albumin-FP, mit einem anti-Albumin-Antikörper inkubiert, um eine Dimerbildung von einer TMG-Albumin-FP Verbindung mit Albumin über eine Disulfidbrückenbindung zu unterscheiden. Der in Abb. 3.18 und 3.19 neben der Hauptbande aufgetretenen Proteinbanden sind somit als reine Albumindimere identifiziert worden und stellen keine Bindung von Albumin zu TMG-Albumin-FP dar. Die Inkubationen (vgl. Abb. 3.21 und 3.22), im Anschluss an den Einsatz der TMG-Albumin-FP als Fängerantikörper (s.o.), mit anti-Gla und anti-His Antikörper zeigten die geringe Koelution der FP und außerdem hätten sie im Falle einer Proteinbindung eine zusätzliche Möglichkeit des Nachweises geboten und seine Spezifität erhöht.

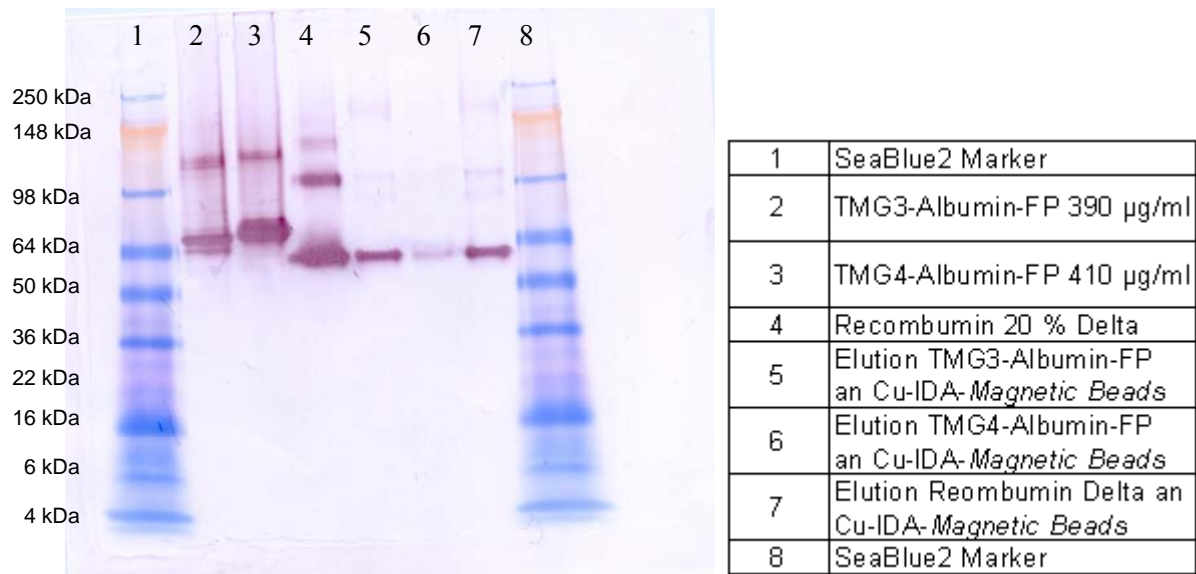


Abb. 3.18 Nativer Western-Blot (auf PVDF-Membran) der eluierten M-PVA-IDA-Cu-Magnetic Beads-Fractionen (Auftragsvolumen Spur 2-4: 0,5 µl, Spur 5-7: 7,5 µl) inkubiert mit TMG3-Albumin-FP: Nachweisantikörper anti-Albumin (Fa Dako) POD markiert; Novex® Tris-Glycine Gele 4-12%-ig (nicht reduziert)

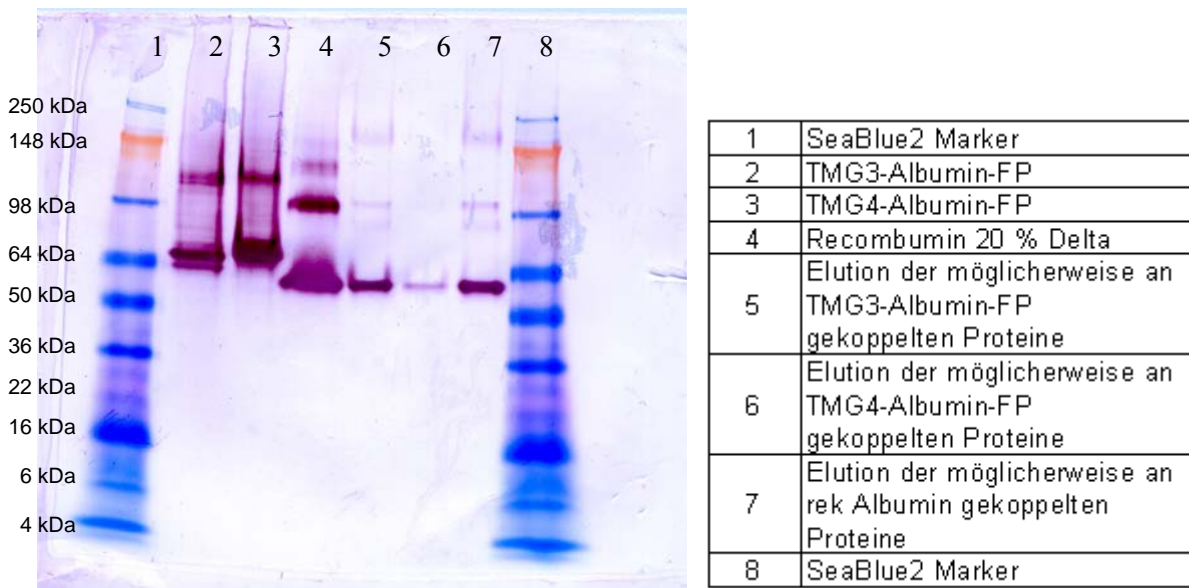


Abb. 3.19 Nativer Western-Blot (auf PVDF-Membran) der eluierten M-PVA-IDA-Cu-Magnetic Beads-Fractionen (Spur 2-4: 0,5 µl, Spur 5-7: 7,5 µl) inkubiert mit TMG4-Albumin-FP: Nachweisantikörper anti-Albumin (Fa Dako) POD markiert; Novex® Tris-Glycine Gele 4-12%-ig (nicht reduziert)

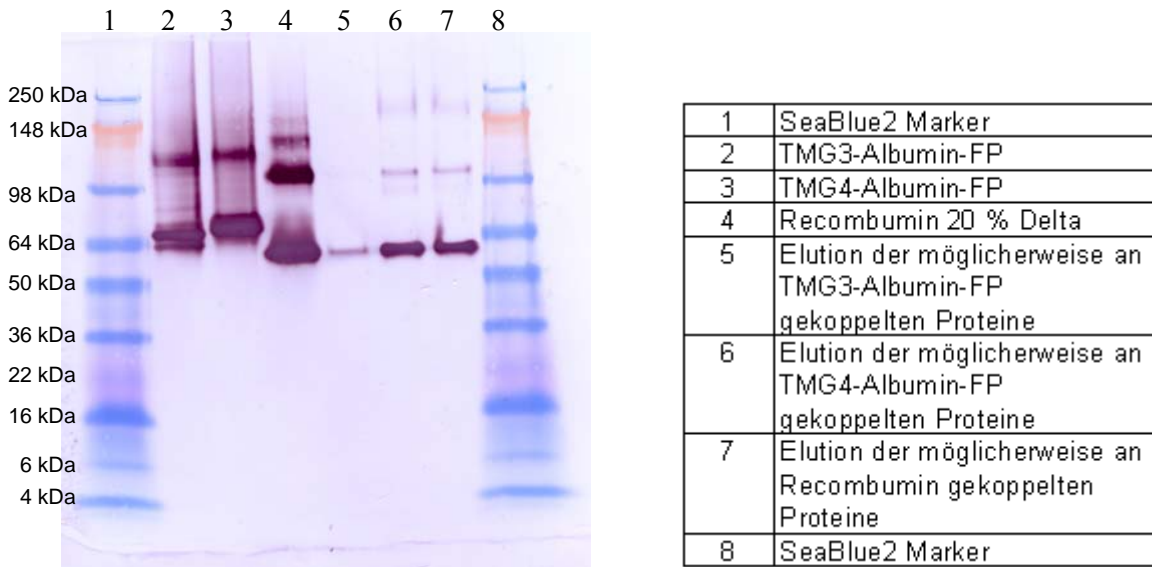


Abb. 3.20 Nativer Western-Blot (auf PVDF-Membran) der eluierten M-PVA-IDA-Cu-Magnetic Beads-Fractionen (Auftragsvolumen Spur 2-4: 0,5 µl, Spur 5-7: 7,5 µl); nicht inkubiert mit TMG-FP, sondern direkt inkubiert mit anti-Albumin-Antikörper (Fa Dako) markiert; Novex® Tris-Glycine Gele 4-12%-ig (nicht reduziert)

Es ist kein Unterschied nach der anti-Albumin-Antikörper Inkubation zwischen vorheriger Inkubation mit und ohne TMG3-, bzw. TMG4-Albumin-FP zu erkennen.

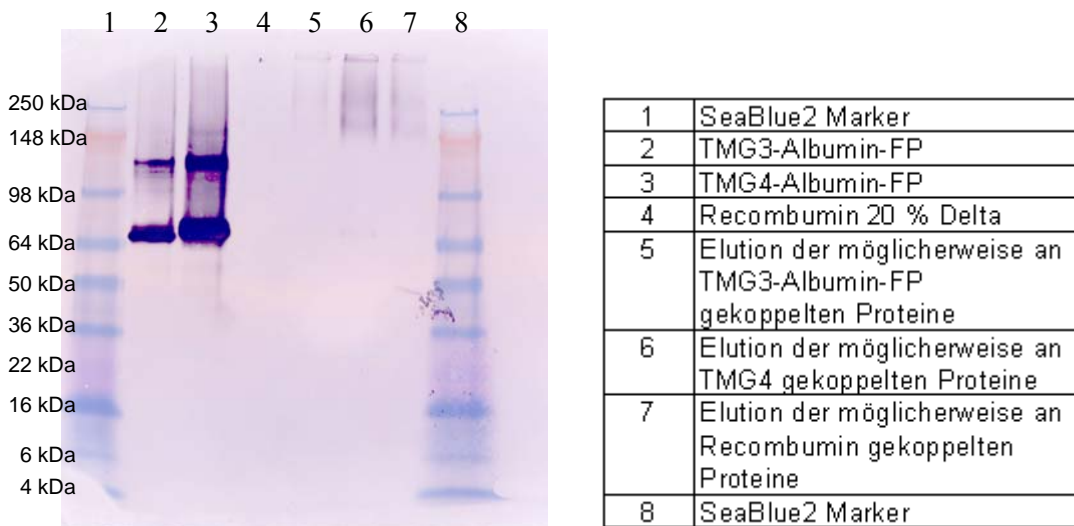


Abb. 3.21 Nativer Western-Blot (auf PVDF-Membran) der eluierten M-PVA-IDA-Cu-Magnetic Beads-Fractionen (Auftragsvolumen Spur 2-4: 0,5 µl, Spur 5-7: 7,5 µl); nicht inkubiert mit TMG-Albumin-FP – direkt inkubiert mit anti-Gla Antikörper, Fa American Diagnostics; Novex® Tris-Glycine Gele 4-12%-ig (nicht reduziert)

Es ist zu erkennen, dass der anti-Gla Antikörper nur die TMG-Albumin-FP erkennt, die sich in den gereinigten Fractionen befinden.

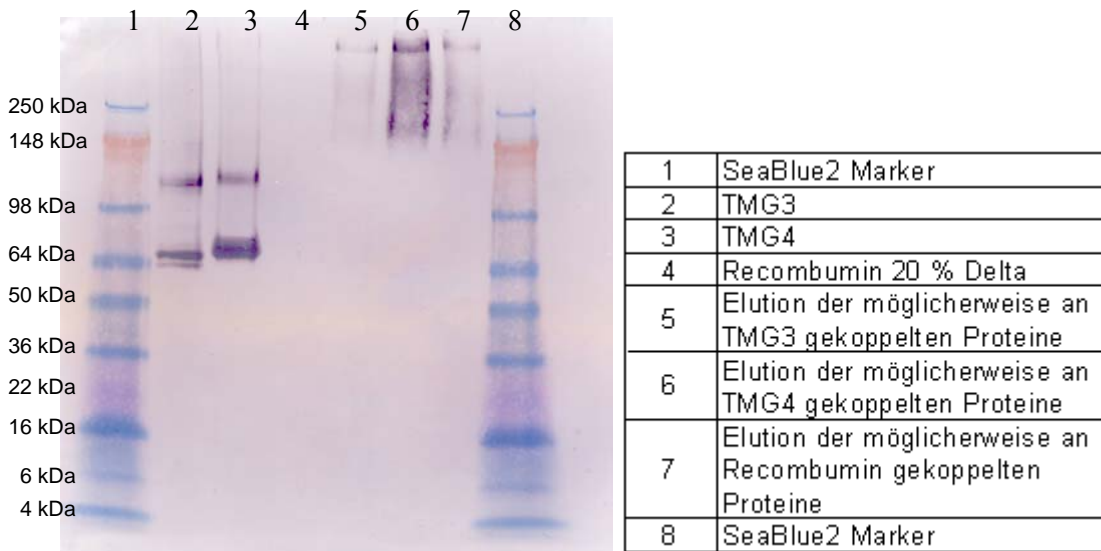


Abb. 3.22 Nativer Western-Blot der eluierten M-PVA-IDA-Cu-Magnetic Beads-Fractionen (Auftragsvolumen Spur 2-4: 0,5 μ l, Spur 5-7: 7,5 μ l); nicht inkubiert mit TMG-Albumin-FP – direkte Inkubation mit anti-His Antikörper; Novex® Tris-Glycine Gele 4-12%-ig (nicht reduziert)

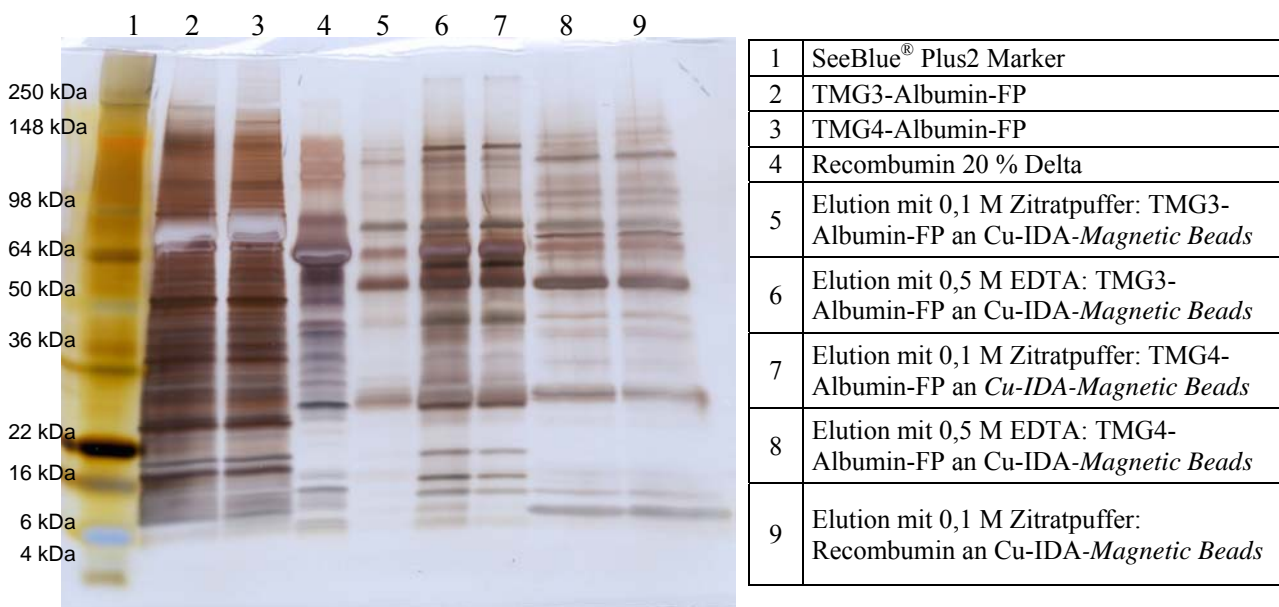


Abb. 3.23 Silverstain eines Tris-Glycin Gels mit den von den Cu-IDA-Magnetic Beads eluierten Fraktionen (Auftragsvolumen Spur 2-4: 0,5 μ l, Spur 5-7: 7,5 μ l); Novex® Tris-Glycine Gele 4-12%-ig (nicht reduziert)

Durch Vergleich mit der Recombumin®-Kontrolle (vgl. Abb. 3.23, Spur 9) können diverse von den FP gebundene Proteinbanden erkannt werden, deren Intensität im Silverstain-Gel vergleichbar oder unterschiedlich sein kann. Die mögliche Existenz spezifischer, an die FP bindender Proteine (vgl. Abb.3.23, z.B. Spur 6,7), ließ sich jedoch in den oben beschriebenen Bindungsexperimenten mit speziellen Antikörpern nicht bestätigen (vgl. Abb. 3.18.-3.22). Es lassen sich zwei Rückschlüsse ziehen: Entweder ist die *Beadmatrix* ungeeignet für einen

Fishing-Versuch und es wurden zu viele Proteine unspezifisch adsorbiert, unter Umständen auch an noch freie, nicht abgesättigte Cu-IDA Bindungsstellen oder die PVDF Membran veränderte die Proteinkonformation so stark, dass der Fängerantikörper (TMG3/4-Albumin-FP) nicht mehr binden konnte.

Es wurden neue *Magnetic Beads* bestellt, um nach Rücksprache mit der Fa Chemagen die unspezifischen Bindungen an die *Beadmatrix* zu reduzieren. Zum Einsatz kamen NHS-aktivierte *Magnetic Beads*, die aufgrund ihrer Matrix weniger Proteine unspezifisch binden. Außerdem konnten freie kovalente Proteinbindungsstellen nach der Proteinkopplung durch Behandlung mit Ethanolamin oder Glycin abgesättigt werden.

3.2.2.2 Versuche mit M-PVA-Ak-13-Magnetic Beads

Daher wurden verschiedene NHS-aktivierte *Beads* (M-PVA Ak 13) getestet. Der Kopplungsmechanismus findet analog zur Immobilisierung der mit SPR getesteten Proteine statt (vgl. Abb. 2.7-2.8). Von den zuvor eingesetzten Kupfer-Iminodiessigsäure derivatisierten *Beads* (M-PVA IDA Cu) können die immobilisierten Proteine durch die Elution von den *Beads* gelöst werden, was eine Deutung der Elutionen stören würde. Außerdem kann in einem solchen Fall nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden, dass die Proteinbindung an die Gla-Proteine Kalziumionen-vermittelt stattgefunden hätte. Aus diesem Grund wurden NHS-aktivierten *Magnetic Beads* in zwei weiteren *Protein fishing*-Versuchen eingesetzt.

Die Ausgangs- und Endkonzentrationen von TMG3- und TMG4-Albumin-FP wurden nach der Kopplung an die *Magnetic Beads* mittels Western-Blot und Inkubation mit einem anti-Gla Antikörper bestimmt (vgl. Abb. 3.24).

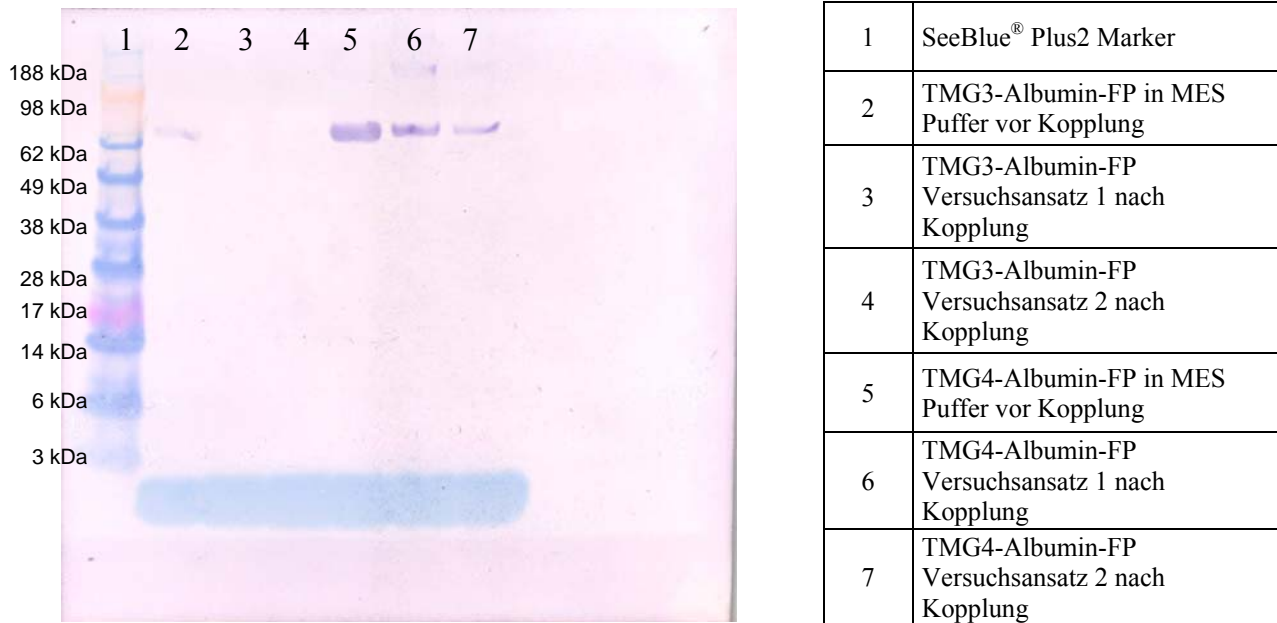


Abb. 3.24 Bestimmung der an M-PVA Ak 13 Magnetic-Beads (NHS-aktiviert) gekoppelten Proteinmenge (13 µl/Spur); Nupage® Bis-Tris Gel 4-12 % (reduziert)

Mit den *Magnetic Beads* und den an diesen immobilisierten TMGs wurde erneut eine Ligandensuche im heparinisierten Plasma durchgeführt. Die durch Elution gewonnenen Fraktionen wurden mittels Elektrophorese untersucht.

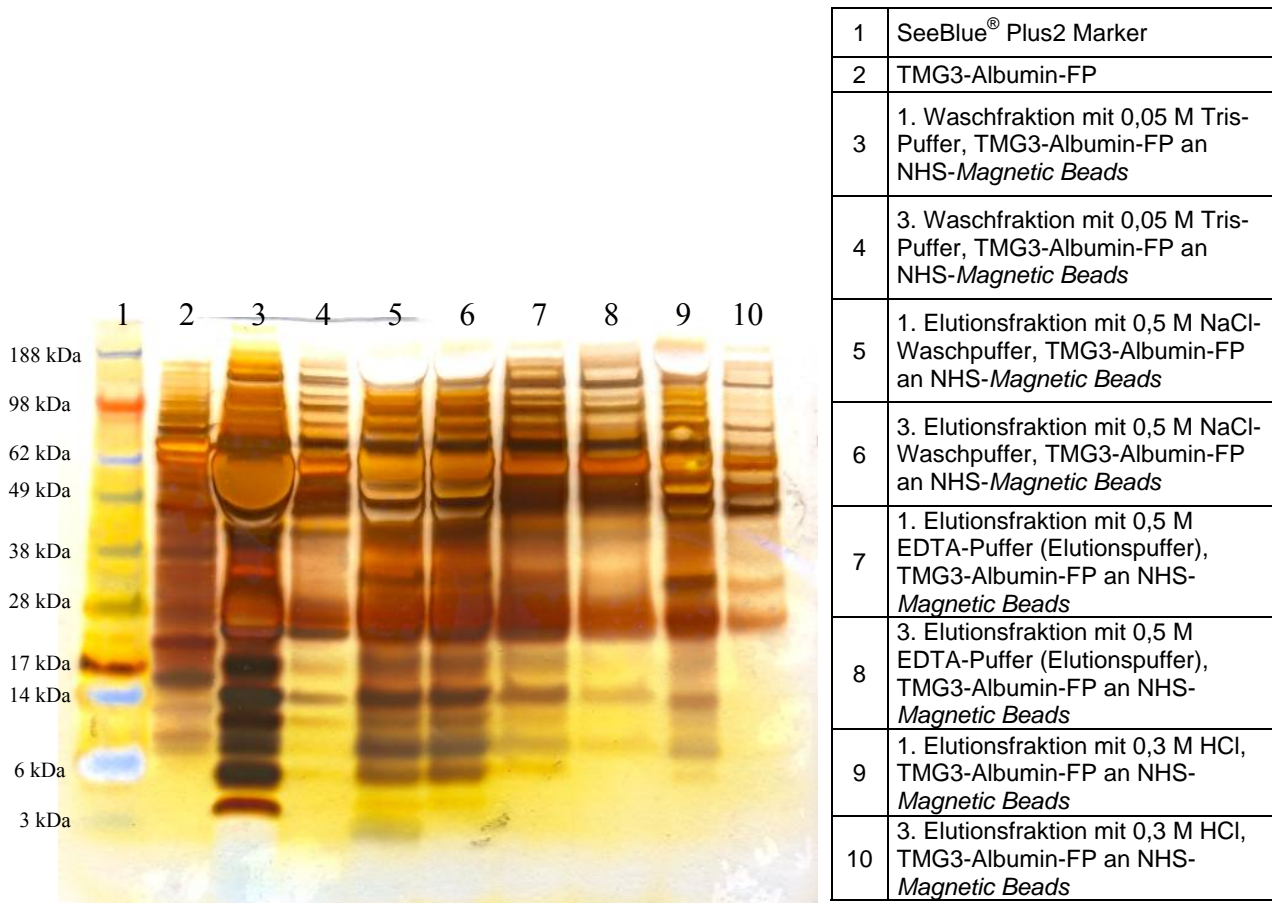


Abb. 3.25 Silverstain: Durch verschiedene Wasch- und Elutionspuffer gewonnene potentielle Liganden-Fractionen (Auftragsvolumen: 13 µl/Spur der Elutionsfraktionen und 5 µl/Spur bzw. 380 µg/ml des TMG3-Albumin-FP); Nupage® 4-12 % (reduziert) mit MES-Puffer

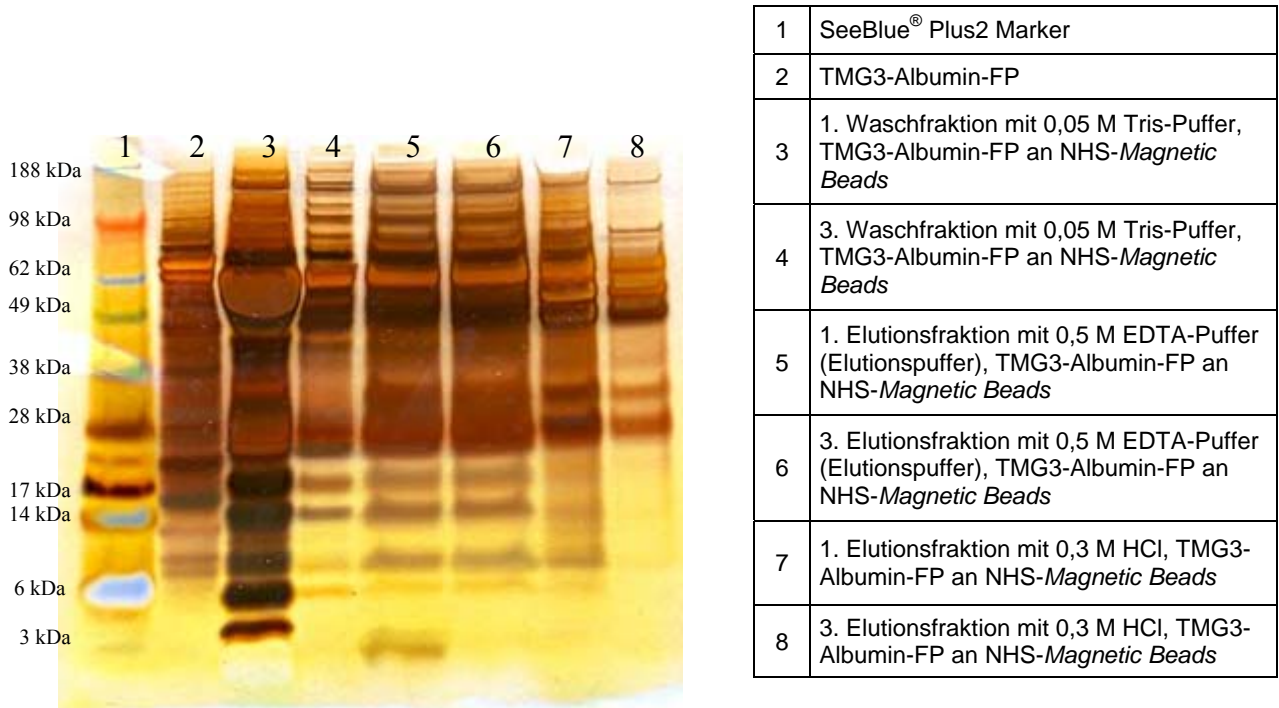


Abb. 3.26 Silverstain: Durch verschiedene Wasch- und Elutionspuffer gewonnene potentielle Liganden-Fractionen (Auftragsvolumen: 13 µl/Spur der Elutionsfraktionen und 5 µl/Spur bzw. 380 µg/ml des TMG3-Albumin-FP); auf 4 h verkürzte Inkubationsdauer bei der Ligandensuche im Plasma; Nupage® 4-12 % (reduziert) mit MES-Puffer

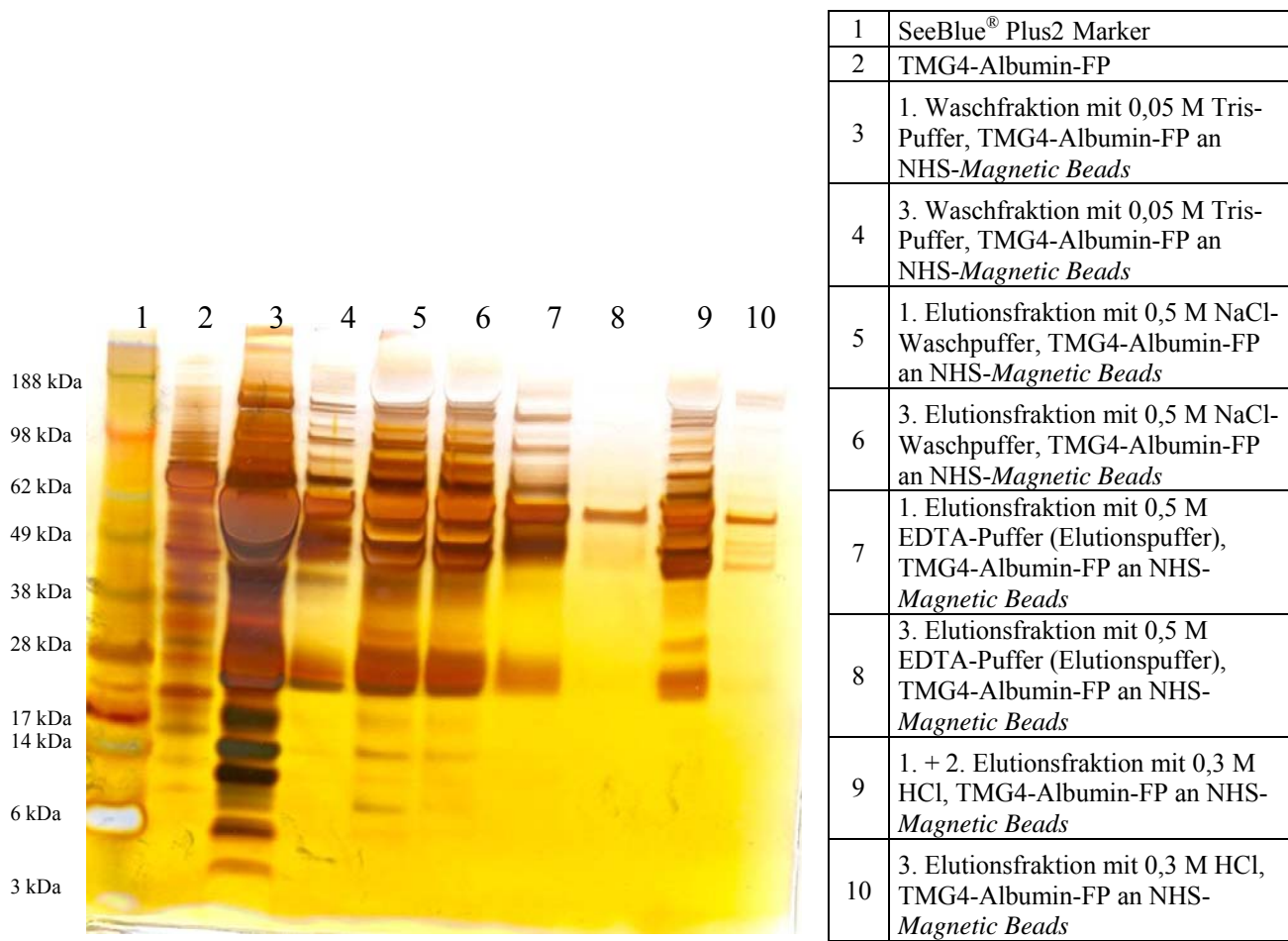


Abb. 3.27 Silverstain: Durch verschiedene Wasch- und Elutionspuffer gewonnene potentielle Liganden-Fractionen (Auftragsvolumen: 13 µl/Spur der Elutionsfraktionen und 5 µl/Spur bzw. 390 µg/ml des TMG4-Albumin-FP); Nupage® 4-12 % (reduziert) mit MES-Puffer

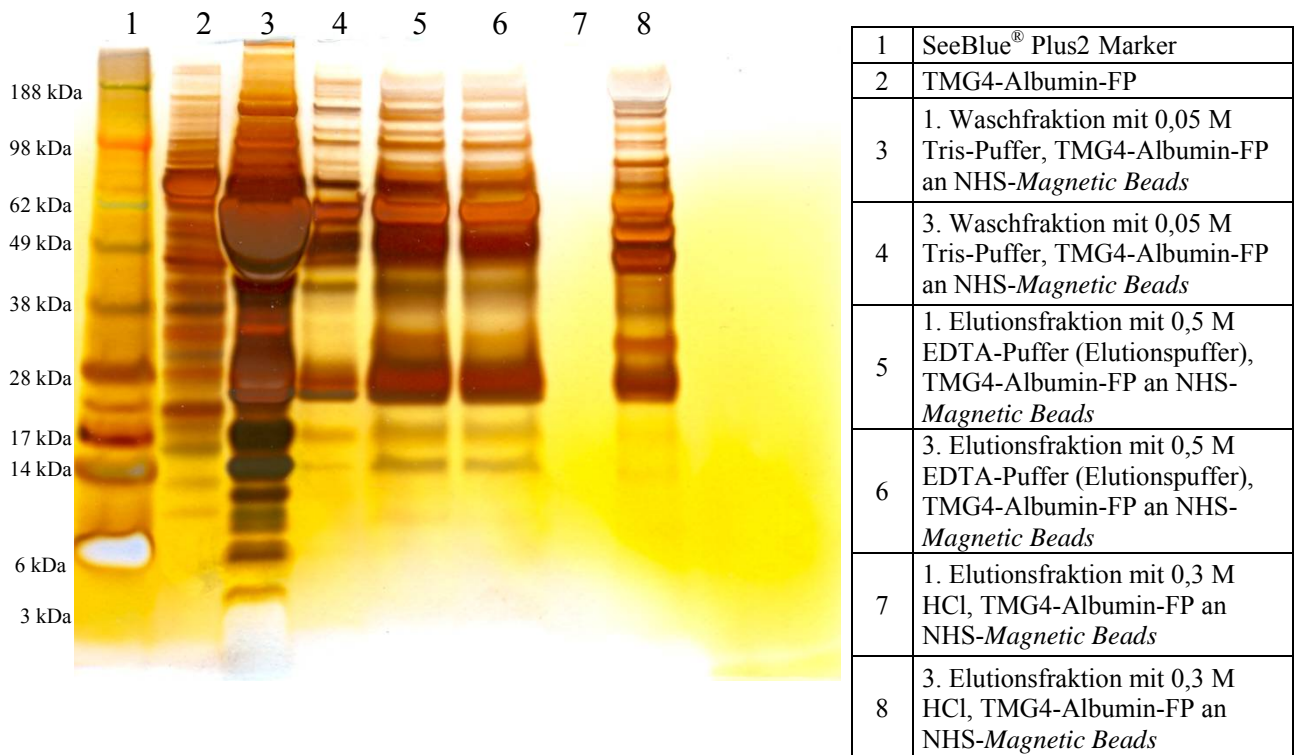


Abb. 3.28 Silverstain: Durch verschiedene Wasch- und Elutionspuffer gewonnene potentielle Ligandenfraktionen (Auftragsvolumen: 13 μ l/Spur der Elutionsfraktionen und 5 μ l/Spur bzw. 390 μ g/ml des TMG4-Albumin-FP); auf 4 h verkürzte Inkubationsdauer bei der Ligandensuche im Plasma; Nupage® 4-12 % (reduziert) mit MES-Puffer

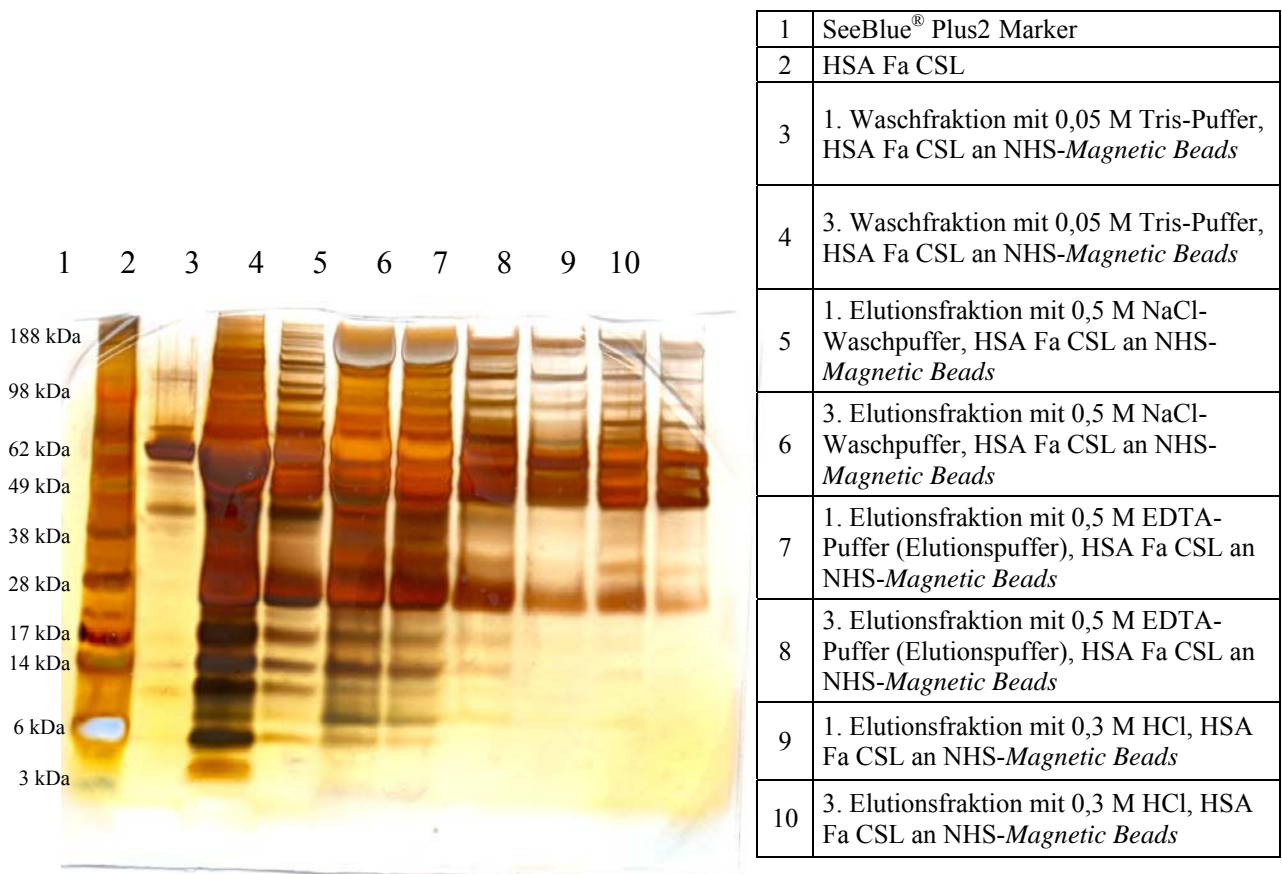


Abb. 3.29 Silverstain: Ausgewählte, durch verschiedene Wasch- und Elutionspuffer gewonnene potentielle Liganden-Fractionen (13 µl/Spur) im Vergleich mit der HSA-Kontrolle; Nupage[®] 4-12 % (reduziert) mit MES-Puffer

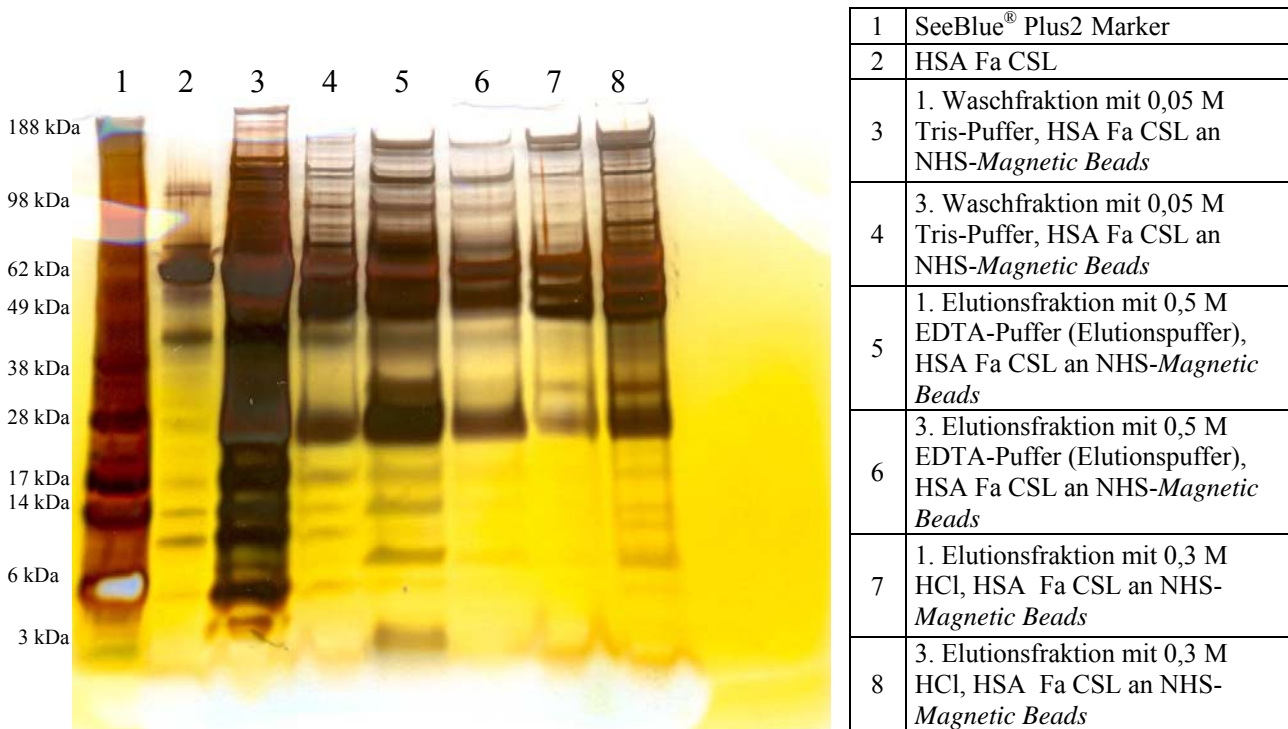


Abb. 3.30 Silverstain: Ausgewählte, durch verschiedene Wasch- und Elutionspuffer gewonnene potentielle Liganden-Fractionen (13 µl/Spur) im Vergleich mit der HSA-Kontrolle; auf 4 h verkürzte Inkubationsdauer bei der Ligandensuche im Plasma; Nupage® 4-12 % (reduziert) mit MES-Puffer

Die Gelanalytik zeigte eine Vielzahl an eluierten Proteinbanden und es konnte kein spezifischer Bindungspartner identifiziert werden (vgl. Abb. 3.25-3.30). Die eluierten Fraktionen wurden deshalb nachfolgend mittels MassSpek analysiert und die erhaltenen Daten ausgewertet, um die darin enthaltenen potentiellen Bindungspartner genauer untersuchen zu können und eine Überlagerung von Proteinbanden auszuschließen (vgl. 3.2.3 Massenspektrometrie).

3.2.3 Massenspektrometrie

Die eluierten Fraktionen des *Magnetic-Beads-Fishing*versuches wurden mittels MassSpek ausgewertet (Tab. 3.1-3.2). Die Existenz spezifischer Bindungspartner sollte durch einen Vergleich mit geeigneten Kontrollen ermöglicht werden. Als möglicher Bindungskandidat stellte sich das A1BG-Protein heraus, ein Glykoprotein, welches hauptsächlich in der Leber exprimiert und ins Plasma sezerniert wird. Es wurden noch weitere Proteine identifiziert, welche aber als spezifischer Bindungspartner ausgeschlossen werden konnten. Die Begründung ist unter den Tabellen aufgeführt, die die Ergebnisse der MassSpek enthalten. Die verwendeten Rohdaten sind in Tabelle 8.10 und 8.11 aufgeführt.

	TMG3-Alumin-FP an Magnetic Beads	TMG4-Alumin-FP an Magnetic Beads
1	A1BG Alpha-1B-glycoprotein	A1BG Alpha-1B-glycoprotein + A1BG Alpha-1B-glycoprotein precursor
2		AFM Afamin
3	ALB	
4	ALB 56 kDa protein	
5		Amyloid lambda 6 light chain variable region SAR (fragment)
6		Anti-mucin1 light chain variable region (fragment)
7	APOA4 apolipoprotein A-IV precursor	
8	APOE Apolipoprotein E	
9	APOE mRNA for Apolipoprotein E	
10		C1QB complement component 1, q subcomponent, B chain precursor + C1QB complement component 1, q subcomponent, B chain precursor Mass 24592
11	C5 complement C5	C5 complement C5
12		C5 complement component C5 variant (fragment)
13	cDNA FLJ 78387	cDNA FLJ78387
14	CFB Isoform 1 of complement factor B (fragment)	
15		CFD Complement factor D preproprotein
16	FGA Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain	FGA Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain
17	FN1 Isoform 5 of Fibronectin	FN1 Isoform 5 of Fibronectin
18		FN1 Isoform 12 of Fibronectin
19		FN1 Isoform 2 of Fibronectin
20		HPR cDNA FLJ31310 fis, clone LIVER1000165, highly similar to Haptoglobin
21	HPR Isoform 1 of Haptoglobin-related protein + HPR Isoform 2 of Haptoglobin-related protein	
22	Ig kappa chain V-II region MIL	
23		Ig kappa chain V-III region B6
24		IGF2 insulin-like growth factor 2 isoform 2
25	IGH@ IGH@ protein	
26	IGHA2 putative uncharacterized protein DKFZp686C02218 (fragment)	
27		IGHG2 IGHG2 protein
28		IGHG3 IGHG3 protein
29	IGHG4 Uncharacterized protein IGHG4 (fragment) Mass 43856	IGHG4 Uncharacterized protein IGHG4 (fragment) Mass 43856
30		IGHM IGHM protein Mass 66998
31		IGHM IGHM protein Mass 68052
32		IGHM FLJ00385 protein (fragment)
33	IGHM IGHM protein Mass 53180	
34	IGHM IGHM protein Mass 53317 + IGHG1 IGHG1 protein Mass 52367	
35	IGHM putative uncharacterized protein DKFZp686I15196	
36	IGHM putative uncharacterized protein DKFZp686I15212	IGHM putative uncharacterized protein DKFZp686I15212
37	IGHV3OR16-13; IGHA1 IGHA1 protein	IGHV3OR16-13; IGHA1 IGHA1 protein Mass 54150
38		IGHV3OR16-13; IGHA1 IGHA1 protein Mass
39		IGHV3OR16-13; IGHA1 IGHA1 protein Mass

40		IGHV3OR16-13; IGHA1 CDNA FLJ25298 fis, clone STM07683
41		IGHV3OR16-13; IGHA1 putative uncharacterized protein DKFZp686G21220 (fragment)
42		IGHV3OR16-13; IGHA1 cDNA FLJ14473 fis, clone MAMMA1001080
43		IGHG2 uncharacterized protein IGHG2 (fragment)
44	IGHV4-31 putative uncharacterized protein DKFZp686G11190 + IGHG1 putative uncharacterized protein DKFZp686O01196	
45	IGKC IGKC protein Mass 26033 + IGKC IGKC protein Mass 26077	
46	IGKC Immunoglobulin light chain (fragment) + putative uncharacterized protein	
47	IGKV3-20 IGK@ protein	
48	IGL@ IGL@ protein Mass 25027	
49	IGL@ IGL@ protein Mass 25093	
50		IGL@; IGLC1; IGLV2-14; IGLC2; IGLC3; IGLV2-14 protein
51		IGLV4-3 IGLV4-3 protein
52		KIAA1632 Isoform 2 of UPF0493 protein KIAA1632 + KIAA1632 Isoform 1 of UPF0493 protein KIAA1632
53		KNG1 Isoform LMW of Kininogen-1 + KNG1 Kininogen 1 Mass 48954
54		LOC100133511 hypothetical protein, partial
55		LOC440419 LOC440419 protein
56	LOC100126583 putative uncharacterized protein DKFZp686M08189	
57	LOC100126583 putative uncharacterized protein Mass 52736	
58	LOC100133739 putative uncharacterized protein DKFZp686C15213	LOC100133739 putative uncharacterized protein DKFZp686C15213
59	LOC440786 Ig kappa chain V-II region TEW	
60		PPBP Platelet basic protein
61	putative uncharacterized protein DKFZp686K04218 (fragment)	
62	putative uncharacterized protein Mass 20883	
63	putative uncharacterized protein Mass 25016	
64	SERPINC SERPINC protein	SERPINC SERPINC protein
65	SERPINC1 Antithrombin III variant	SERPINC1 Antithrombin III variant
66	TF 12kDa protein	
67	TF 13 kDa protein	TF 13 kDa protein
68	TF 14 kDa protein	
69	TF 7 kDa protein	
70	Uncharacterized protein ENSP00000374799 (fragment)	Uncharacterized protein ENSP00000374799 (fragment)
71		ZNF750

Tab. 3.1 Auswertung der Massenspektrometrie Daten des I. *Magnetic Beads* Versuchs

TMG4-Alumin-FP an Magnetic Beads	
1	- Ig heavy chain V-III region BRO; - Ig heavy chain V-III region TEI; - Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region (Fragment); IGHV3-48 Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region (Fragment); -Immunoglobulin heavy chain variable
2	- Ig kappa chain V-III region GOL; -Ig kappa chain V-III region SIE; IGKV3D-20 Ig kappa chain V-III region Ti; -Ig kappa chain V-III region WOL; -Cold agglutinin FS-2 L-chain (Fragment); IGKV3-20 Myosin-reactive immunoglobulin light chain variable region
3	ANKS1A Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 1A
4	CDNA: FLJ23558 fis, clone LNG09703; SPAG4L Sperm-associated antigen 4-like protein; SPAG4L Uncharacterized protein SPAG4L; SPAG4L Sperm associated antigen 4-like
5	CFHR1 Complement factor H-related protein 1; CFHR1 complement factor H-related 1; CFHR1 Complement factor H-related 1
6	CFP Properdin
7	DEFA1;LOC728358 Neutrophil defensin 1; DEFA3 Neutrophil defensin 3
8	EFCAB5 Isoform 3 of EF-hand calcium-binding domain-containing protein 5; EFCAB5 Isoform 1 of EF-hand calcium-binding domain-containing protein 5; EFCAB5 Uncharacterized protein EFCAB5; EFCAB5 Isoform 4 of EF-hand calcium-binding domain-containing protein
9	HISPPD2A Isoform 7 of Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-penta; HISPPD1 Isoform 2 of Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentak; HISPPD2A Isoform 5 of Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-penta; HISPPD2A Isoform 3 of Inositol
10	HSP90AA1 heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1 isofo; HSP90AB1 Heat shock protein HSP 90-beta; HSP90AB1 Heat shock protein 90kDa alpha (Cytosolic), class B member 1; HSP90AA1 Hsp89-alpha-delta-N; HSP90AB1 Heat shock protein 90kDa al
11	LSMD1 Isoform 2 of LSM domain-containing protein 1
12	NCL cDNA FLJ10452 fis, clone NT2RP1000966, highly similar to NUCLEOLIN; NCL NCL protein; NCL Nucleolin
13	NUCKS1 Isoform 1 of Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases; NUCKS1 24 kDa protein; NUCKS1 Isoform 2 of Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases; NUCKS1 34 kDa protein
14	NUP50 Nucleoporin 50 kDa; NUP50 nucleoporin 50kDa isoform a
15	PPIE Isoform A of Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E; PPIE Isoform B of Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E; PPIE peptidylprolyl isomerase E isoform 3; PPIE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase; PPIE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
16	TEX2 Isoform 2 of Testis-expressed sequence 2 protein; TEX2 Isoform 1 of Testis-expressed sequence 2 protein
17	TIAM2 Isoform 2 of T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 2; TIAM2 Isoform 1 of T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 2; TIAM2 Isoform 5 of T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 2; TIAM2 Isoform 4 of T-lymphoma inv
18	ZSCAN21 Zinc finger and SCAN domain-containing protein 21; ZSCAN21 Uncharacterized protein ZSCAN21 (Fragment); ZSCAN21 Putative uncharacterized protein DKFZp686H10254

Tab. 3.2 Auswertung der Massenspektrometrie Daten des II. *Magnetic Beads* Versuchs

Alle Proteine (vgl. Tab. 3.1-3.2), die an die Kontrolle(n) gebunden hatten, wurden als Bindungspartner aus der Betrachtung entfernt. Nicht berücksichtigt als spezifische Bindungspartner wurden *High-Abundant*-Proteine und Proteine mit Homologie zu Plasmamassenproteinen (grün), wie zum Beispiel Peptide mit einer Homologie zu Immunglobulinen. Die verbleibenden Bindungspartner sind farblich rot dargestellt. Bezüglich einer spezifischen Bindung wurden für diese folgende Überlegungen durchgeführt:

Die Kandidaten lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe beschreibt Proteine, welche in physiologisch intakten Systemen nur intrazellulär (KIAA1632, ZNF750: Zn-finger Protein 750, ANKS1A: Ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing

1A, DEFA1: Defensin, alpha 1, EFCAB5: EF-hand calcium binding domain 5, HISPPD2A: Histidine acid phosphatase domain containing 2A, HSP90AA1: Heat shock protein 90 kDa alpha – class A member, LSMD1: LSM domain-containing protein 1, NCL: Nucleolin, NUCKS: Nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1, NUP50: Nucleoporine 50 kDa, PPIE: Peptidylprolyl isomerase E – cyclophilin E, TEX2: Testis expressed 2, TIAM: T-cell lymphoma invasion and metastasis 2, ZSCAN21: Zinc finger and SCAN domain containing 21) vorkommen oder es liegt ein alternatives Transkript bzw. Fragment vor, dessen Sekretionsmechanismus nicht bekannt ist (IGF2 insulin-like growth factor 2, LOC440419 möglicherweise ein Pseudogen der Ubiquitin-Hydrolase USP6). In eine zweiten Gruppe werden die Proteine und ihre Fragmente eingeordnet, welche grundsätzlich sezerniert werden können (A1BG: Alpha-1B-Glykoprotein, Amyloid lambda 6 light chain, KNG1 LMW-Kininogen, LOC100133511: Teilsequenz des Komplement Faktors C3, Mass 20883: Immunglobulin leichte Kette, Mass 25016: Immunglobulin leichte Kette). Die Zuordnung erfolgte durch Analyse der Proteine mittels verschiedener im Internet zugänglicher Datenbanken (vgl. 2.5 PCR-Konstrukte: www.cbs.dtu.dk/services/X; X = SecretomeP, TargetP, SignalP, www.hprd.org) und deren Kombination, basierend auf den von der Fa Toplab zur Verfügung gestellten Daten.

Für keine der gefundenen extrazellulären Proteine ist eine spezifische Interaktion mit den TMG-Albumin-FP bekannt. Unter den sezernierten Plasmaproteinen befindet sich A1BG, welches interessanter Weise im erstem Versuch (vgl. Tab. 3.1) eine Wechselwirkung mit beiden FP aufzuweisen schien und dessen Funktion unbekannt ist, weshalb es nicht von vornherein als potentieller Bindungspartner ausgeschlossen werden konnte. Im zweiten Versuch (Tab. 3.2) wurde es nicht als Ligand gefunden. Zwei weitere auch in den Kontrollen des zweiten Versuches identifizierte Proteine (PPBP, MGP) wurden aufgrund ihrer biologischen Relevanz in die Bewertung einbezogen (vgl. 4.2 Potentielle Liganden im humanen Plasma).

A1BG war kommerziell nur in Form einer *E.coli* Expression erhältlich, deshalb nicht glykosyliert und konnte darüber hinaus als eine aus menschlichem Plasma isolierte Präparation, die Mitte der 80er Jahre lyophilisiert worden ist, von der Fa Dade Behring bezogen werden.

Weitere Versuche, wie Bindungsstudien mit den genannten A1BG Präparationen und die analytische Charakterisierung des humanen A1BG, werden in Kapitel 3.2.4.5 (vgl. 3.2.4.5 A1BG: Ein potentieller Ligand?) ausgeführt.

3.2.4 SPR-Kinetiken

Die SPR-Technologie stellt ebenfalls eine empfindliche Analysetechnik dar, um Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen. Daher bot sich diese Methode an, mögliche Wechselwirkungen zwischen potentiellen, aus menschlichem Plasma, bzw. Blut stammenden Liganden und den FP nachzuweisen.

3.2.4.1 Plasmaverdünnungen und Elutionsbedingungen

Zuerst wurden die FP kovalent über FP-ständige Aminogruppen auf dem Chip immobilisiert. Es folgte eine Inaktivierung der verbleibenden reaktiven Chip-ständigen Gruppen mit Ethanolamin und - wie den einzelnen Abbildungen zu entnehmen ist (vgl. Modellsensogramm Abb. 3.31) - vor der Injektion verschiedener Plasmalösungen mit den potentiellen Liganden eine Spülung mit einer Kalziumchloridlösung (2,5 mM). So war sichergestellt, dass eine ausreichende Menge Ca^{2+} für die Gla-Domänen Bindung zur Verfügung stand. In einem Kontrollansatz wird die aktivierte Chipoberfläche vor Injektion der Plasma- und Kalziumchloridlösung ausschließlich mit Ethanolamin behandelt. Dargestellt sind die Messkanal ($F_c = \text{Flow Cell} = \text{Kanal}$; hier: Kanal Nummer 2)-spezifischen Signaldifferenzen (relative Response Werte = RelResp), die aus den verschiedenen Ansätzen nach Subtraktion des oben beschriebenen Kontrollansatzes (hier: Kanal Nummer 1) resultieren. Abschließend wurde sequentiell mit unterschiedlichsten Lösungen eluiert, um die postulierte Ca^{2+} -abhängige Bindung an den Liganden wieder aufzuheben (vgl. Modellsensogramm Abb. 3.31).

Die getesteten Plasmaverdünnungen (vgl. Tab. 3.4) wiesen kaum Unterschiede in der unspezifischen Proteinbindung von Plasmaproteinen an den Chip auf. Die LowCross Buffer[®]-Verdünnung (Rohdaten vgl. Abb. 3.42) zeigte sogar die höchste unspezifische Bindung und die mit HEPES-Puffer (Rohdaten vgl. Abb. 8.4, 8.7) verdünnte Probe und unverdünnte Plasmaprobe (Sensogramm der Rohdaten Vollplasma; vgl. Abb. 8.5, 8.8) zeigten die geringsten Effekte. Für weitere Tests wurde unverdünntes Plasma verwendet. Durch den Einsatz von Recombumin[®] wurde untersucht, ob die unspezifischen Interaktionen Albumin- oder Matrix-vermittelt waren. Weil kein signifikanter Unterschied in zwischen den Differenzkurven der FP mit ausschließlich Ethanolamin- oder Albumin-behandeltem Referenzkanal gab, konnte davon ausgegangen werden, dass die Veränderung des Messsignals ein Matrix-abhängiger Effekt war. Von den getesteten Elutionsmedien wiesen die EDTA- und NaSCN-enthaltenden Lösungen die effektivste Elution auf. Die Verwendung

von EDTA ist aber der Verwendung von Thiocyanat vorzuziehen, da dieses denaturierende Eigenschaften aufweist [Lodish, Berk 2001].

Messkanal	1	2	3	4
Immobilisiertes Protein	Ethanolamin	TMG3-Albumin-FP	Recombumin®	TMG4-Albumin-FP

Tab. 3.3 Belegung der Messkanäle 1-4; das Messergebnis wird durch Differenzieren der einzelnen Messwerte (Messsignal von Kanal 2-1 bzw. 4-3) erhalten

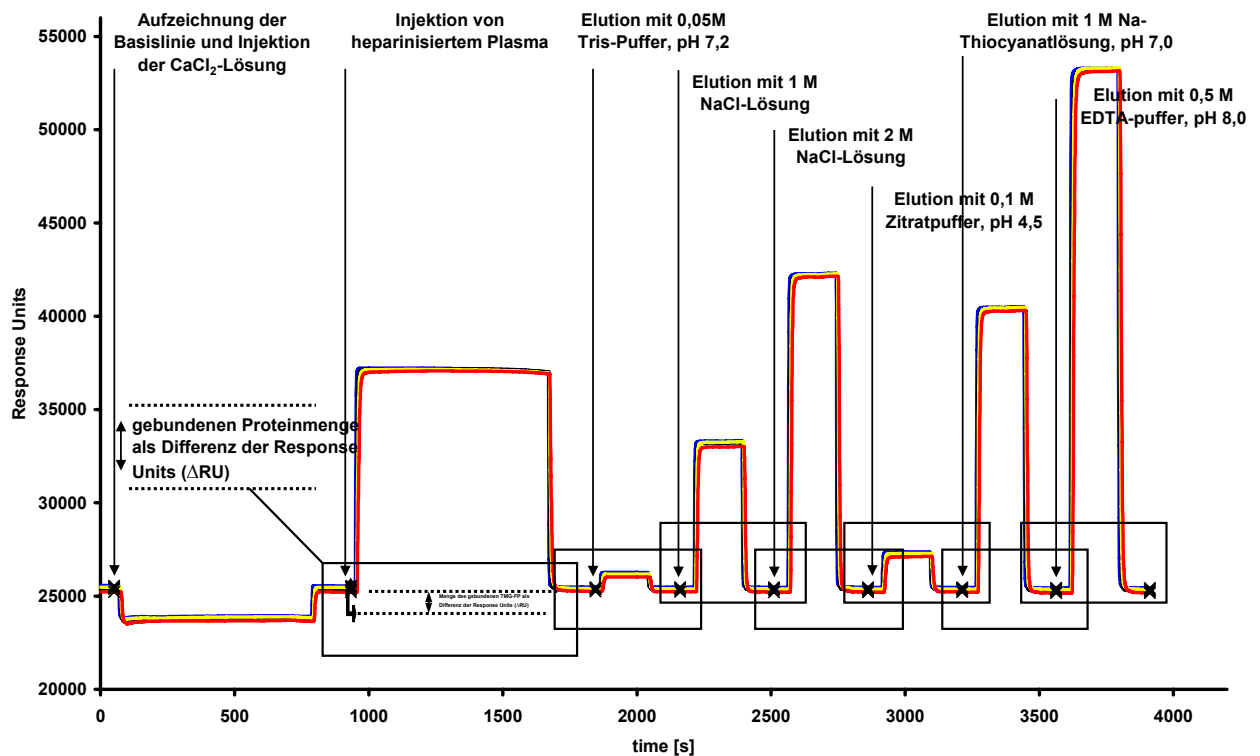


Abb. 3.31 Modellsensogramm der getesteten Elutionsbedingungen für verschiedene Plasmaverdünnungen

	Lösung	ΔFc^a	RelResp ^b ΔRU^c	ΔFc^a	RelResp ^b ΔRU^c
1	HEPES / Plasma (1 / 1)	2-1	100,2	4-3	106,4
2	0,05 M Tris-Puffer, pH 7,2	2-1	91,0	4-3	98,2
3	1 M NaCl, pH 7,0	2-1	70,5	4-3	79,1
4	2 M NaCl, pH 7,0	2-1	66,1	4-3	76,0
5	0,1 M Zitratpuffer, pH 4,5	2-1	79,3	4-3	92,8
6	1 M NaSCN, pH 7,0	2-1	36,4	4-3	59,4
7	0,5 M EDTA, pH 8,0	2-1	46,0	4-3	69,8

8	LowCross Buffer [®] (LCB) / Plasma (1 / 1)	2-1	140,5	4-3	167,8
9	0,05 M Tris-Puffer, pH 7,2	2-1	144,2	4-3	172,6
10	1 M NaCl, pH 7,0	2-1	141,3	4-3	181,5
11	2 M NaCl, pH 7,0	2-1	147,1	4-3	188,8
12	0,1 M Zitratpuffer, pH 4,5	2-1	187,8	4-3	244,3
13	1 M NaSCN, pH 7,0	2-1	35,4	4-3	121,7
14	0,5 M EDTA, pH 8,0	2-1	38,5	4-3	119,0
15	Plasma	2-1	79,6	4-3	96,9
16	0,05 M Tris-Puffer, pH 7,2	2-1	65,3	4-3	77,6
17	1 M NaCl, pH 7,0	2-1	38,4	4-3	49,3
18	2 M NaCl, pH 7,0	2-1	32,9	4-3	44,5
19	0,1 M Zitratpuffer, pH 4,5	2-1	39,6	4-3	51,7
20	1 M NaSCN, pH 7,0	2-1	7,7	4-3	25,8
21	0,5 M EDTA, pH 8,0	2-1	21,2	4-3	36,5

Tab. 3.4 Auswertung und Untersuchung verschiedener Plasmaansätze auf ihre unspezifischen Interaktionen mit den untersuchten Proteinen - Zusammenfassung der Rohdaten (vgl. Abb. 8.3-8.8); a: ΔF_c = Differenz der Messsignale zwischen den aufgeführten Messkanälen; b: RelResp = relative Response; c: ΔRU = Differenz der Response Units

Die eluierten Proben wurden in einem nächsten Versuch, durch spezielle Fraktionierungsprogrammierung des SPR-Geräts (vgl. 3.2.4.2 Microrecovery), gesammelt und analysiert.

3.2.4.2 Microrecovery

Der folgende Versuch sollte eine Möglichkeit bieten, möglicherweise spezifisch an die FP gebundene Plasmaproteine zu eluieren und diese zu sammeln. Plasma-Probenaliquots wurden zyklisch aufgetragen und die jeweils anfallenden Eluate gesammelt. Der Aufbau des Versuches entsprach dem vorherigen (vgl. 3.2.4.1 Plasmaverdünnungen und Elutionsbedingungen). Die Kontrolle bildete immobilisiertes HSA (Fa CSL Behring). In diesem Fall wurde jedoch keine Analyse der Messsignale vorgenommen, sondern ausschließlich eine Sammlung der an das immobilisierte TMG3-Albumin-FP oder HSA gebundenen Proteine durchgeführt. Die per Schleifen-Programmierung (*Microrecovery*) gesammelten Proben wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, analysiert und mit Eluaten des *Magnetic Bead*-Versuches verglichen (vgl. Abb. 3.32-3.33). Das TMG4-Albumin-FP wurde nicht in einer weiteren Analyse untersucht; der bisherige Vergleich der eluierten Proteine mit Eluaten des M-PVA Ak 13 *Magnetic Bead*-Versuches zeigte, dass die unspezifischen Bindungseffekte auch in diesem Versuch stark ausgeprägt waren und ein spezifischer Bindungspartner nicht identifiziert werden konnte. Die gezeigten Elutionen wurden nur mit 1 M NaCl-Lösung und 0,5 M NaSCN-Puffer durchgeführt. Im Falle einer Anreicherung einer Proteinbande wären die Pufferbedingungen weiter optimiert worden, da NaSCN für eine funktionelle Elution von Proteinen ungeeignet ist (vgl. 3.2.4.1 Plasmaverdünnungen und Elutionsbedingungen). Die bereits in Versuch (vgl. 3.2.4.1 Plasmaverdünnungen und Elutionsbedingungen) beschriebene NaSCN-Lösung wurde benutzt, weil sie die effizienteste Elution vermittelt hat, bezogen auf ein Erreichen der Basislinie des Sensogramms. Die mit dieser Elution erhaltenen Proteinbanden zeigten im SDS-Gel keine signifikanten Unterschiede zur HSA-Kontrolle. Ebenso brachte der Vergleich mit den *Magnetic Bead*-Eluaten keine neuen Resultate (vgl. Abb. 3.33).

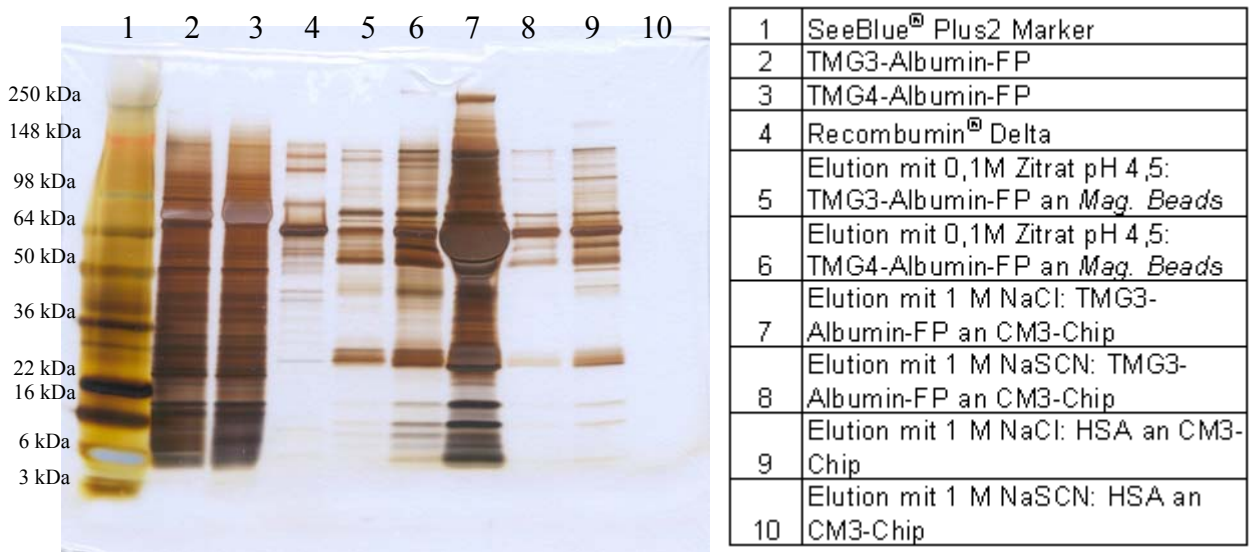


Abb. 3.32 Silverstain: SDS-gelelektrophoretischer Vergleich der SPR-Chip-Eluate mit denen des M-PVA Ak 13 *Magnetic Bead*-Versuches; Novex[®] Tris-Glycin Gel 4-20% (reduziert), Tris-Glycin SDS Puffer

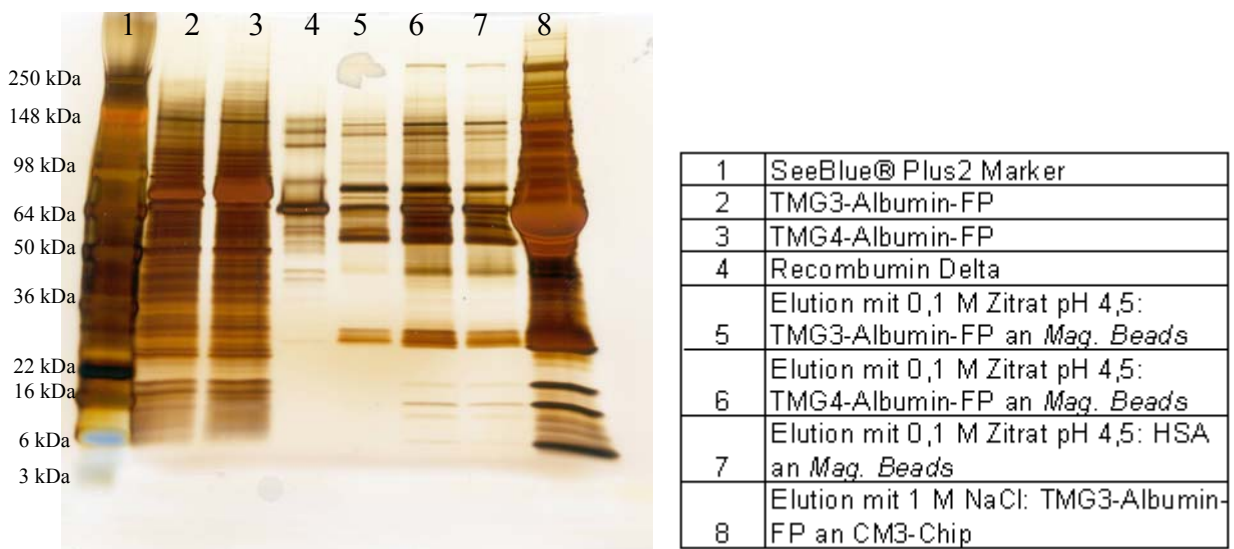


Abb. 3.33 Silverstain: SDS-gelelektrophoretischer Vergleich der NaCl-Elution vom SPR-Chip mit dem HSA-Kontrollexperiment des *Magnetic Bead*-Versuches; Novex[®] Tris-Glycin Gel 4-20% (reduziert), Tris-Glycin SDS Puffer

3.2.4.3 Untersuchung verschiedener Plasmafraktionen

Mittels SPR wurden ebenfalls routinemäßig anfallende Proben von Intermediaten der Plasmafraktionierung bezüglich ihrer Bindungseigenschaften an die auf dem SPR-Chip immobilisierten TMG-Albumin-FP untersucht. Diese Proben enthalten naturgemäß eine geringere Anzahl von Proteinen, die gegebenenfalls wechselseitig ihre potentielle Interaktion mit den FP hätten inhibieren können. Das TMG3-Albumin-FP wurde in Flusszelle 2 und das TMG4-Albumin-FP in Flusszelle 4 untersucht. HSA wurde in Flusszelle 1 und 3 als Kontrolle eingesetzt und die aufgezeichneten Messsignale von denen der Proben-Messzellen (2 und 4) (vgl. Tab. 3.5; Modellsensogramm Abb. 3.34; Tab. 3.6; Rohdaten vgl. Abb. 8.13-8.20) abgezogen.

Die Ergebnisse der Plasmafraktionen waren mit denen, die mit unfraktioniertem Plasma erhalten wurden, vergleichbar (vgl. Tab. 3.6). Das gelöste Kryopräzipitat bildete jedoch vor dem Einleiten in das SPR-Gerät eine zähe, milchige Lösung bei der Dialyse gegen den HEPES-Systempuffer (HBS-P) aus. Diese wurde nach Abzentrifugieren und Filtrieren verwendet. Zur Elution der verschiedenen Fraktionen wurden ein 0,1 M Zitrat- (pH 4,0) oder EDTA-Puffer (pH 8,0) und eine 1,0 M NaSCN-Lösung (pH 7,0) verwendet. Die getesteten Überstände der DEAE (Ansatz 3)- und Heparin (Ansatz 1)-Behandlung, bzw. der 8 % (V/V)-igen EtOH (Ansatz 5)-Fällung hatten das beste Verhältnis von Mess- zu Kontrollsignal, die Basislinie konnte aber nach der Elution nicht mehr erreicht werden. Der Versuch mit dem DEAE-Überstand und dem der 8 % (V/V)-igen EtOH-Fällung wurde wiederholt, um die Elutions- bzw. Regenerationsbedingungen zu verbessern. Es wurden EDTA- und SCN-Lösungen eingesetzt, um die Basislinie zu erreichen. Dies ist prinzipiell auch gelungen, allerdings zeigten die Kontrollkanäle teilweise eine höhere *Response Unit* als der eigentliche Messkanal. Aufgrund dieses Ergebnisses und aufgrund der möglichen Proteinabtrennung mit dem Lipid Removal Agent[®] (LRA-Reagenz; vgl. 3.2.4.4 Lipid Removal Agent), die zu Fehlinterpretationen führen könnte, wurde der Versuchsansatz nicht weiter verfolgt (vgl. Abb. 8.9-8.12).

Messkanal	1	2	3	4
immobilisiertes Protein	HSA, Fa CSL Behring	TMG3-Albumin-FP	HSA, Fa CSL Behring	TMG4-Albumin-FP

Tab. 3.5 Belegung der Messkanäle 1-4; das Messergebnis wird durch Differenzieren der einzelnen Messwerte (Messsignal von Kanal 2-1 bzw. 4-3) erhalten

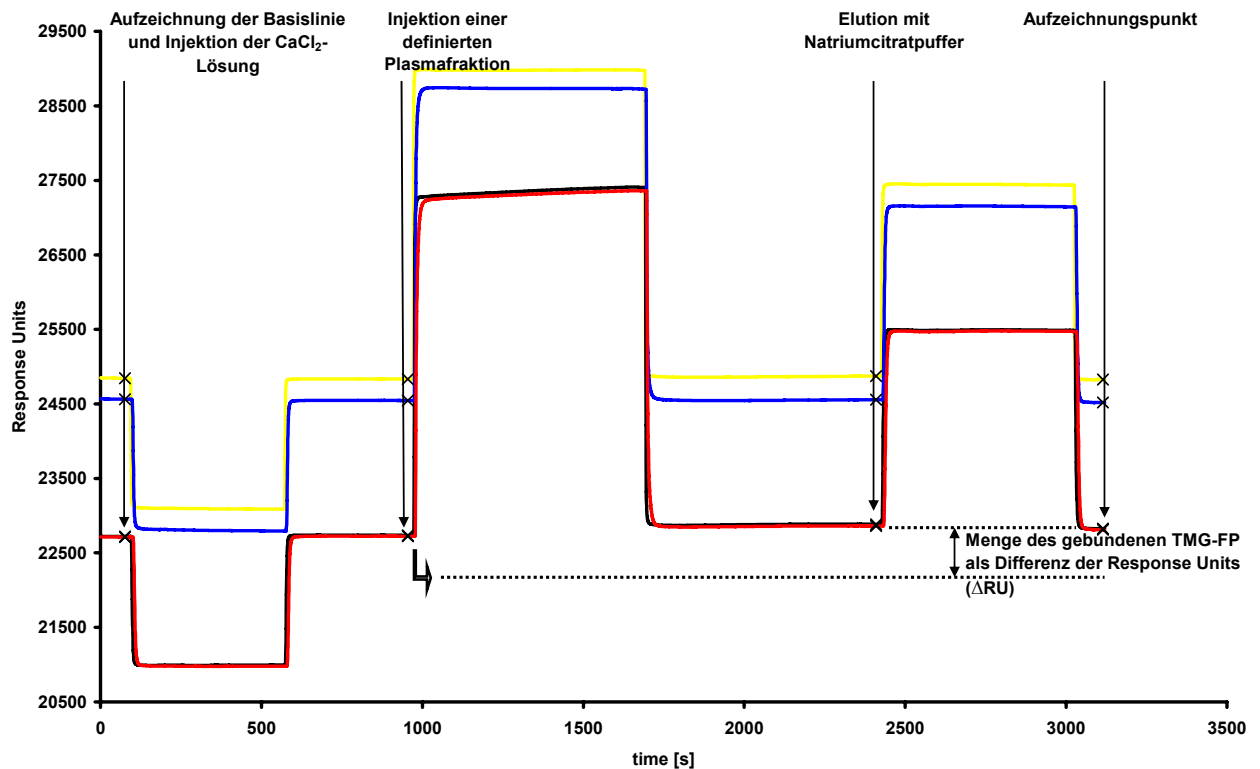


Abb. 3.34 Modellsensogramm der Bindungskinetiken verschiedener Plasmafraktionen; hier exemplarische anhand der Rohdaten von Abb. 8.14

	Lösung	ΔFc^a	RelResp ^b $\Delta [RU]^c$	ΔFc^a	RelResp ^b $\Delta [RU]^c$
1	Überstand nach Heparin-Behandlung	2-1	135,0	4-3	155,2
2	0,1 M Zitratpuffer pH 4,5	2-1	120,5	4-3	141,3
3	Überstand nach DEAE-Behandlung	2-1	162,4	4-3	163,8
4	0,1 M Zitratpuffer pH 4,5	2-1	134,9	4-3	138,9
5	Überstand nach 8 % (V / V) EtOH-Fällung	2-1	113,9	4-3	100,6
6	0,1 M Zitratpuffer pH 4,5	2-1	90,7	4-3	79,6
7	Überstand nach 25 % (V / V) EtOH-Fällung	2-1	29,9	4-3	33,9
8	0,1 M Zitratpuffer pH 4,5	2-1	28,2	4-3	33,4
9	Überstand nach QAE-Behandlung	2-1	73,7	4-3	80,6
10	0,1 M Zitratpuffer pH 4,5	2-1	31,9	4-3	40,7
11	gelöste Paste II / III	2-1	-540,8	4-3	-572,1
12	0,1 M Zitratpuffer pH 4,5	2-1	-639,1	4-3	-653,8
13	gelöstes Kryopräzipitat	2-1	20,2	4-3	42,8
14	0,1 M Zitratpuffer pH 4,5	2-1	-45,8	4-3	-12,3
15	Überstand nach DEAE-Behandlung	2-1	-214,5	4-3	240,8

16	0,5 M EDTA-Puffer pH 8,0	2-1	-85,6	4-3	61,1
17	1 M NaSCN-Lösung pH 7,0	2-1	-28,0	4-3	35,1
18	Überstand nach 8 % (V / V) EtOH- Fällung	2-1	0,4	4-3	186,7
19	0,5 M EDTA-Puffer pH 8,0	2-1	24,2	4-3	63,3
20	1 M NaSCN-Lösung pH 7,0	2-1	11,8	4-3	28,8

Tab. 3.6 Tabellarische Zusammenfassung der Rohdaten (vgl. Abb. 8.13-8.20) der untersuchten Plasmafraktionen; a: ΔF_c = Differenz der Messsignale zwischen den aufgeführten Messkanälen; b: RelResp = relative Response; c: ΔRU = Differenz der Response Units

3.2.4.4 Lipid Removal Agent

Die in den bisher beschriebenen Versuchen immer wieder auftretenden unspezifischen Bindungen sollten durch Zugabe eines Fettbinders LRA reduzierbar sein. Das LRA bindet Lipide, welche zusammen mit den gebundenen Fetten entfernt werden. Die Versuche mit dem LRA ermöglichten eine bessere Annäherung an die Basislinie nach Elution (vgl. Abb. 3.35; Tab. 3.8; Rohdaten: vgl. Abb. 8.9-8.12). Heparinisiertes Plasma, gelöste Paste II / III und gelöstes Kryopräzipitat wurden mit LRA versetzt. Unbehandeltes heparinisiertes Plasma wurde als Kontrollansatz behandelt. Die Kanalzuordnung bei der Proteinimmobilisierung ist in Tab. 3.7 dargestellt. Das mit LRA-Reagenz inkubierte gelöste Kryopräzipitat konnte nicht ins SPR-Gerät überführt werden, weil sich während der Inkubationszeit eine dickflüssige, milchige Lösung entwickelte, welche sich nicht abzentrifugieren oder filtrieren ließ. Im Vergleich mit den bisher gezeigten Versuchen (vgl. 3.2.4.1 Plasmaverdünnungen und Elutionsbedingungen; 3.2.4.2 Microrecovery; 3.2.4.3 Untersuchung verschiedener Plasmafraktionen) konnte, abgesehen vom Basislinieneffekt, kein Unterschied dargestellt werden. Dieser, wenn auch geringe positive Effekt, wurde in den folgenden Versuchen nicht weiter genutzt, weil die Silikamatrix nach Angaben des Reagenz-Herstellers in der Lage ist in gewissem Umfang auch Plasmaproteine zu binden und diese Bindung zu einem potentiellen Verlust des gesuchten Interaktionspartners hätte führen können.

Messkanal	1	2
immobilisiertes Protein	HSA, Fa CSL Behring	TMG3-Albumin-FP

Tab. 3.7 Belegung der Messkanäle 1-2; das Messergebnis wird durch Differenzieren der einzelnen Messwerte (Messsignal von Kanal 2-1) erhalten

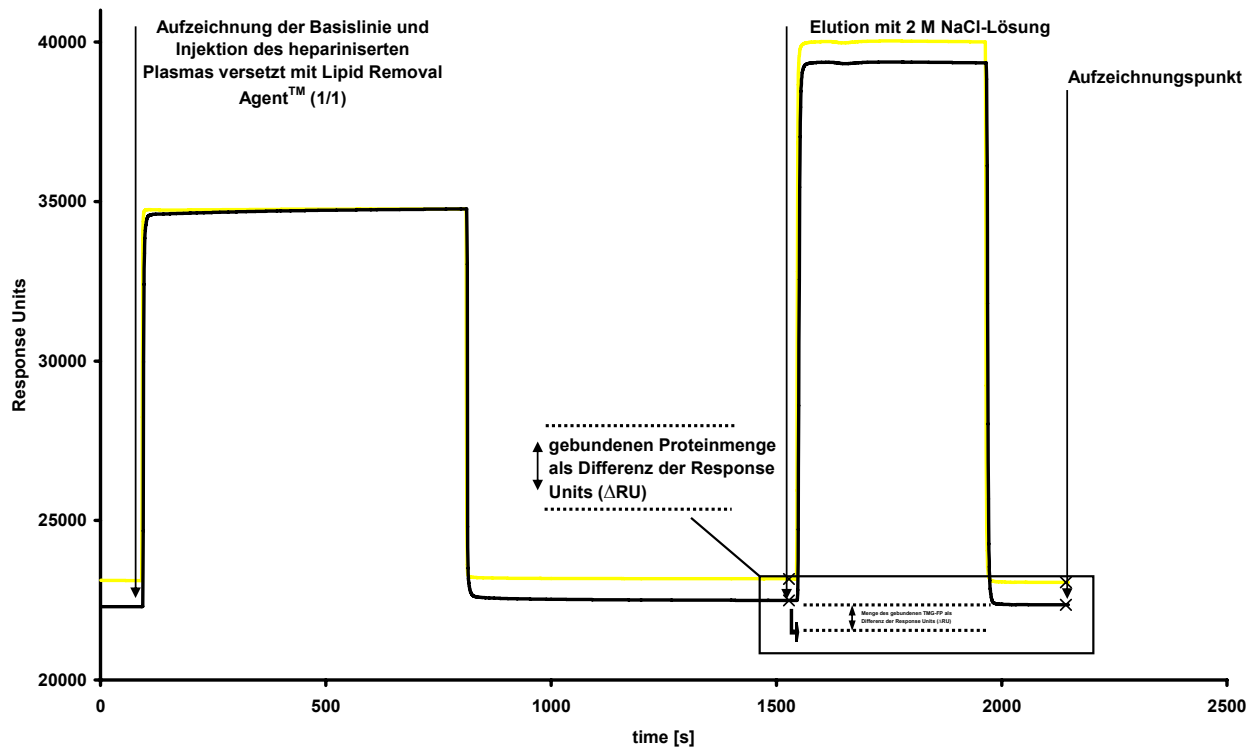


Abb. 3.35 Modellsensogramm für Plasma-Bindungskinetiken unter Einsatz des Lipid Removal Agent™

	Lösung	ΔFc^a	RelResp ^b ΔRU^c
1	heparinisiertes Plasma	2-1	144,6
2	2 M NaCl, pH 7,0	2-1	114,1
3	heparinisiertes Plasma + Lipid Removal Agent [®] (15 g / l)	2-1	167,4
4	2 M NaCl, pH 7,0	2-1	127,9
5	gelöste Paste II / III	2-1	-669,7
6	2 M NaCl, pH 7,0	2-1	-324,5
7	gelöste Paste II / III + Lipid Removal Agent [®] (15 g / l)	2-1	-1027,9
8	2 M NaCl, pH 7,0	2-1	-930,9
9	gelöstes Kryopräzipitat	2-1	44,4
10	2 M NaCl, pH 7,0	2-1	-110,3

Tab. 3.8 Tabellarische Zusammenfassung der Rohdaten (vgl. Abb. 8.9-8.12) des Microrecovery Versuches; a: ΔFc = Differenz der Messsignale zwischen den aufgeführten Messkanälen; b: RelResp = relative Response; c: ΔRU = Differenz der Response Units

3.2.4.5 A1BG: Ein potentieller Ligand ?

Der in einem Experiment bei MassSpek-Experiment identifizierte potentielle Bindungspartner der TMG-FP - A1BG (vgl. 3.2.3 Massenspektrometrie) - wurde mit SPR-Analytik untersucht.

3.2.4.5.1 Analytische Charakterisierung von A1BG aus Humanplasma

Um eine mögliche enzymatische Spaltung oder einen Verlust der Glykostruktur zu erkennen, wurde das Protein gelanalytisch mittels *Silverstain* und Western-Blot untersucht. Die Verdünnungsreihe im *Silverstain*-Gel (vgl. Abb. 3.36) zeigte eine Hauptbande und nur wenige höher-, bzw. niedermolekulare Banden. Glykosyliertes A1BG hat eine Masse 54253 Da (www.hprd.org). Das abschätzbare Molekulargewicht (*molecular weight*, MW) der Banden ist etwas größer (62000 Da) als erwartet, da Glykoproteine bedingt durch den Zuckeranteil, der SDS nur schlecht bindet [Westermeier 1990], in SDS-Gelen langsamer laufen als SDS-abgesättigte Proteine und somit ein scheinbar größeres MW aufweisen.

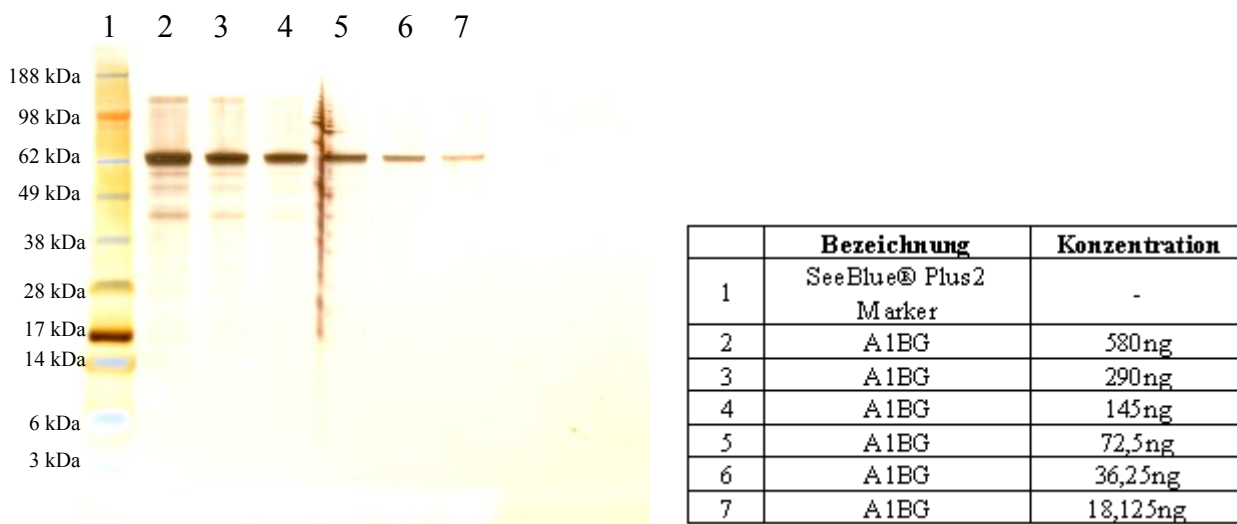


Abb. 3.36 Silverstain der Verdünnungsreihe von A1BG aus menschlichem Plasma; Nupage® Bis-Tris 4-12 % Gel (reduziert) mit MES-Puffer (SDS)

Die Glykostruktur des A1BG wurde durch einen Western-Blot und anschließendem immunologischen Nachweis unter Verwendung verschiedener Lektine und spezifischer Antikörper gegen diese Lektine sichergestellt. Alle Analysevarianten wiesen mit dieser Technologie eine deutliche Hauptbande auf (vgl. Abb. 3.37).

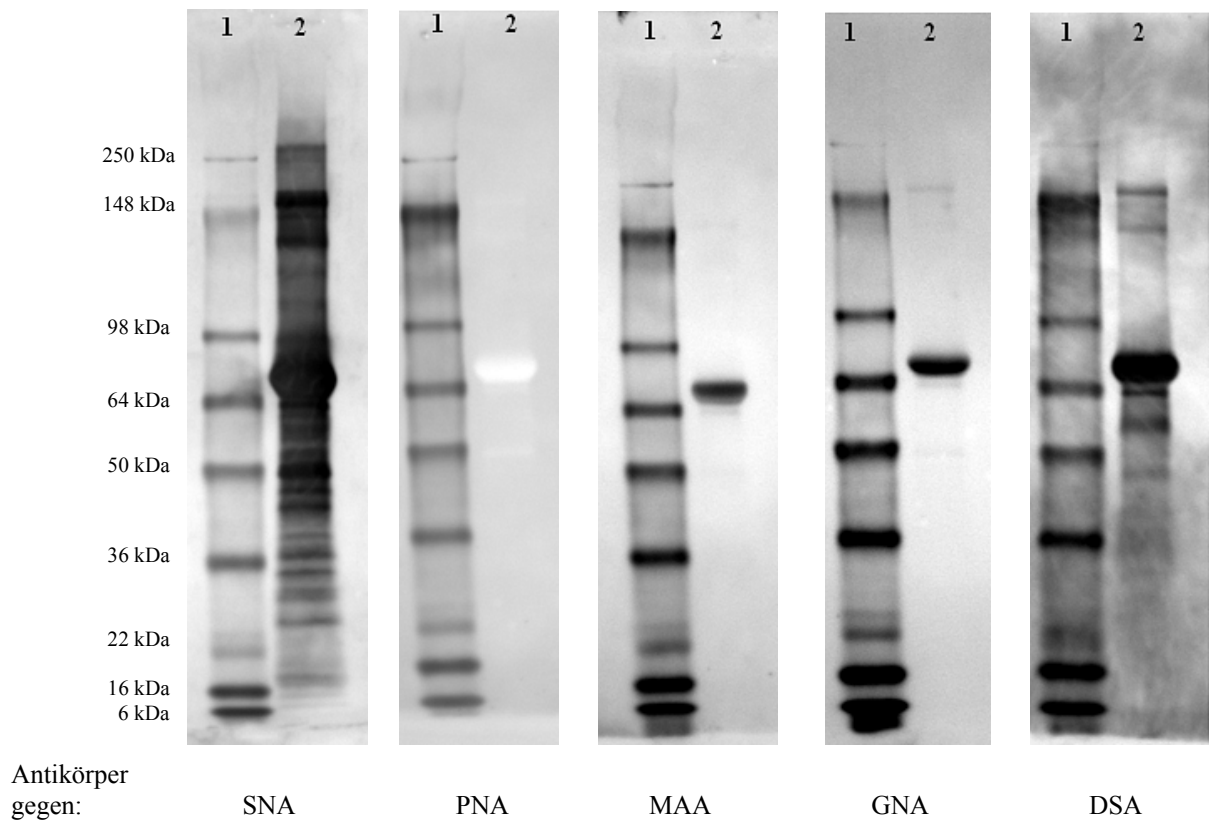


Abb. 3.37 Western-Blots (Spur 1: SeeBlue® Plus2 Marker Molekulargewichtsstandard; Spur 2: 5,6 mg A1BG) mit unterschiedlichen anti-Lektin-Antikörpern (SNA: *Sambucus nigra* agglutinin; PNA: Peanut agglutinin; MAA: *Maackia amurensis* agglutinin; GNA: *Galanthus nivalis* agglutinin; DSA: *Datura stramonium* agglutinin); Tris-Glycin Gele 8-16 % mit SDS-Puffer

Die Verfügbarkeit der glykosylierten und nicht-glykosylierten Form des A1BG-Proteins erlaubt somit den Einfluss der Glykosylierung auf eine mögliche Bindung an die FP zu untersuchen (vgl. 3.2.4.5.2 A1BG-Bindungskinetik).

3.2.4.5.2 A1BG-Bindungskinetik

Auf dem SPR-Chip wurde das TMG3- und TMG4-Albumin-FP als potentieller Bindungspartner immobilisiert (vgl. Tab. 3.9). Sowohl das getestete humane, aus menschlichem Plasma stammende A1BG, als auch das rekombinant exprimierte Protein zeigten keine Bindung (vgl. Tab. 3.10). Zwei unterschiedliche Konzentrationen (40 $\mu\text{g/ml}$ und 580 $\mu\text{g/ml}$) wurden untersucht (exemplarisch wird das Sensogramm des Plasma-stämmigen A1BG mit einer Konzentration von 580 $\mu\text{g/ml}$ gezeigt vgl. Abb. 3.38; Rohdaten: vgl. Abb. 8.2), obwohl das Protein schon bei der niedrigen Konzentration, bezogen auf das MW, selbst bei geringer Affinität zu den Gla-Proteinen, eine typische Bindungskurve hätte zeigen müssen. Das Protein wurde nach den SPR-Versuchen nicht mehr als Bindungspartner in Betracht gezogen, da es sich analytisch als gering fragmentiert und mit noch intakter Glykostruktur versehen erwiesen hat. Bei erneuter Durchführung eines *Magnetic Beads*- und *Masspek*-Versuches wurde es nicht detektiert.

Messkanal	1	2	3	4
immobilisiertes Protein	Ethanolamin	TMG3-Albumin-FP	HSA, Fa CSL Behring	TMG4-Albumin-FP

Tab. 3.9 Belegung der Messkanäle 1-4; das Messergebnis wird durch Differenzieren der einzelnen Messwerte (Messsignal von Kanal 2-1 bzw. 4-3) erhalten

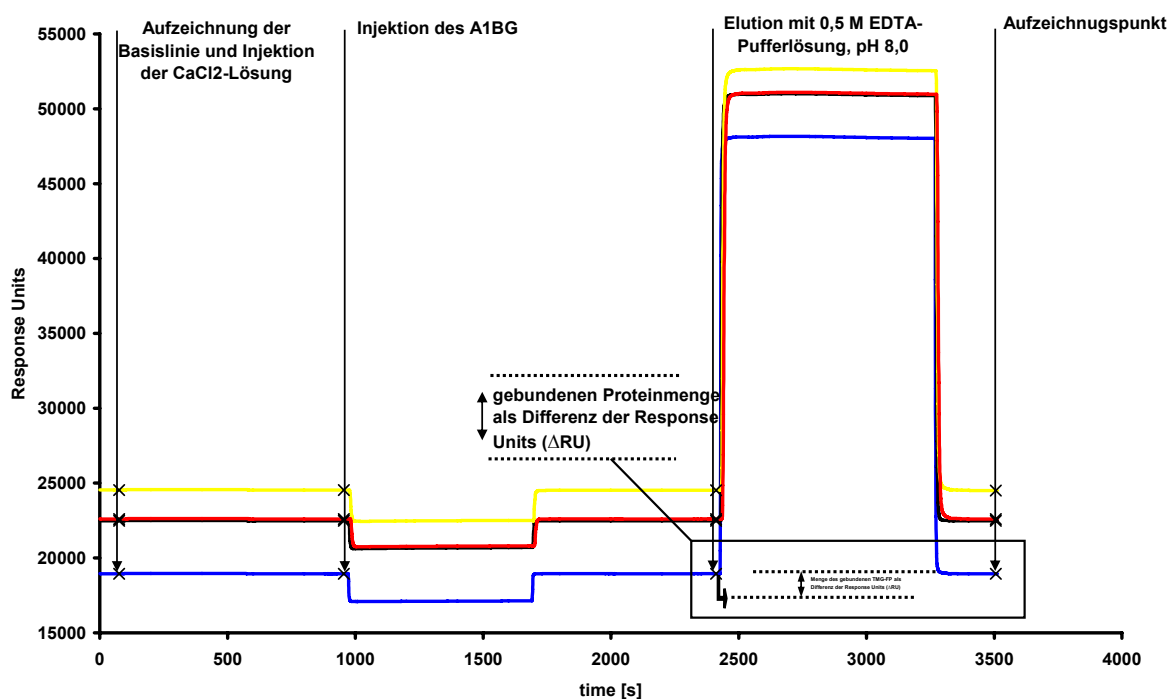


Abb. 3.38 Modellsensogramm des A1BG-Versuches; Rohdaten vgl. Abb. 8.2

	Lösung	ΔFc^a	RelResp ^b $\Delta [RU]^c$	ΔFc^a	RelResp ^b $\Delta [RU]^c$
1	2,5 mM CaCl ₂ Injektion pH 7,2	2-1	-2,7	4-3	-2,7
2	A1BG Injektion 580 µg/ml	2-1	-1,6	4-3	-18,2
3	0,5 M EDTA Injektion pH 8,0	2-1	-3,6	4-3	-29,0

Tab. 3.10 Tabellarische Zusammenfassung der Rohdaten (vgl. Abb. 8.2) des untersuchten nativen A1BG; a: ΔFc = Differenz der Messsignale zwischen den aufgeführten Messkanälen; b: RelResp = relative Response; c: ΔRU = Differenz der Response Units

3.2.5 Plasma-FP-Spikeversuch

In einem *Spikeversuch* wurde eine Matrix-unabhängige Protein-Protein-Bindung getestet. Das heparinisiertem Plasma wurde zu diesem Zweck mit TMG3-Albumin-FP versetzt und nach einer Inkubationszeit von 12 h wurde der potentiell entstandene FP-Ligand-Komplex aus dem Ansatz mittels Co^{2+} -Chelat-Komplexbildung separiert. Im Kontrollexperiment wurde das Co^{2+} -Adsorbens zum heparinisierten Plasma gegeben ohne vorherige Inkubation mit dem FP. In der folgenden *Silverstain*-Gelanalytik wurde keine Bande identifiziert, die einer spezifischen Komplexbildung des Liganden mit dem TMG3-Albumin-FP zuzuordnen wäre (vgl. Abb. 3.39 und 3.40, Spuren 4-10). Alle gefundenen Proteinbanden der Kontrolle konnten in der Probe wiedergefunden werden. Um Unterschiede im Laufverhalten der Proteinbanden in beiden Gelen (vgl. Abb. 3.39 und 3.40) zu eliminieren, wurde jeweils eine Einfeldfraktion (vgl. jeweils Spur 6 aus den Gelen Abb. 3.39 und 3.40) nochmals in einem separaten Experiment (vgl. Abb. 3.41) untersucht. Die Ergebnisse des ersten Experiments (s.o.) wurden bestätigt.

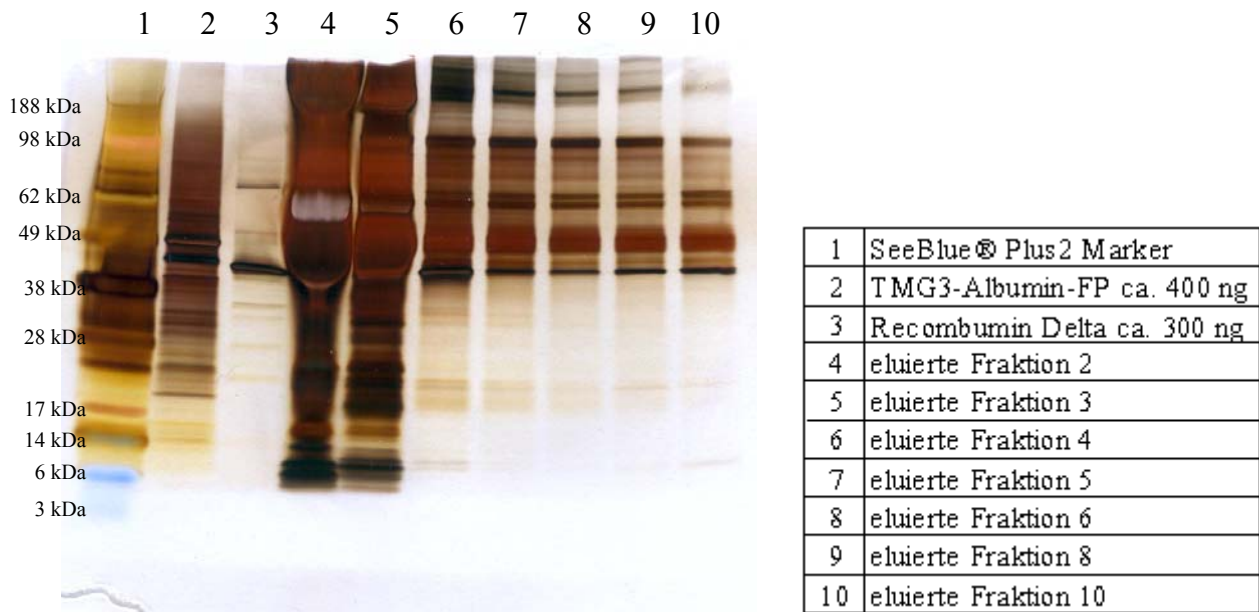


Abb. 3.39 Heparinisertes Plasma mit TMG3-Albumin-FP *gespikt*, an Co^{2+} -NTA-Matrix gebunden und fraktionierend eluiert; Nupage® Bis-Tris 4-12 % Gele (reduziert) mit MES-Puffer (SDS)

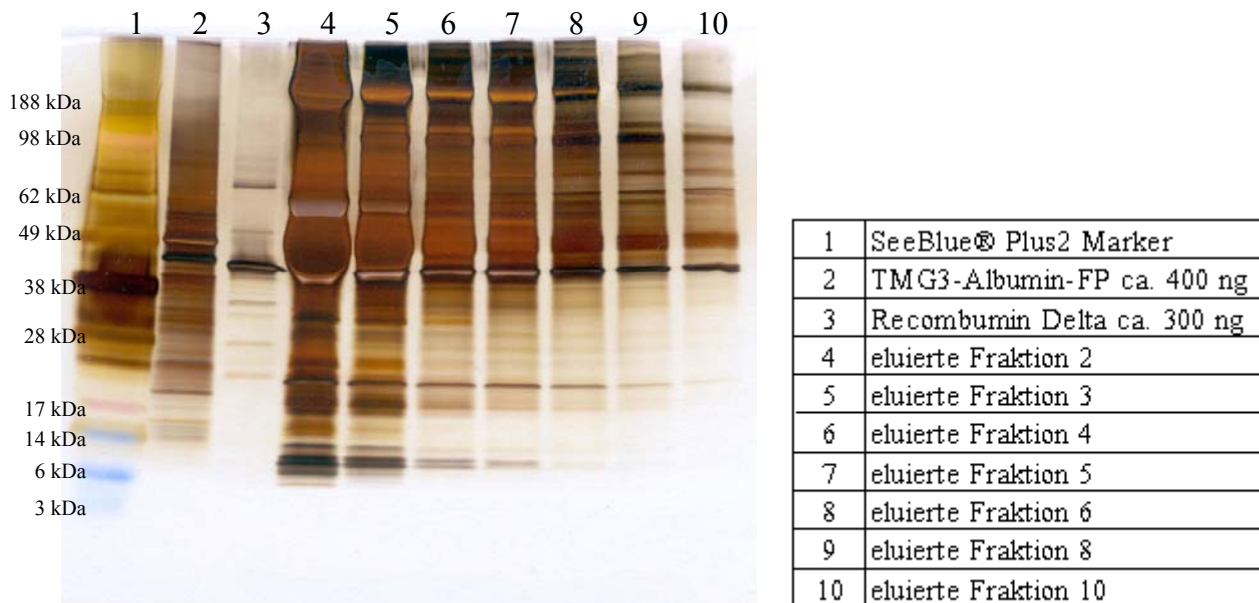


Abb. 3.40 Kontrolle: heparinisertes Plasma an Co^{2+} -NTA-Matrix gebunden und fraktionierend eluiert; Nupage® Bis-Tris 4-12 % Gele (reduziert) mit MES-Puffer (SDS)

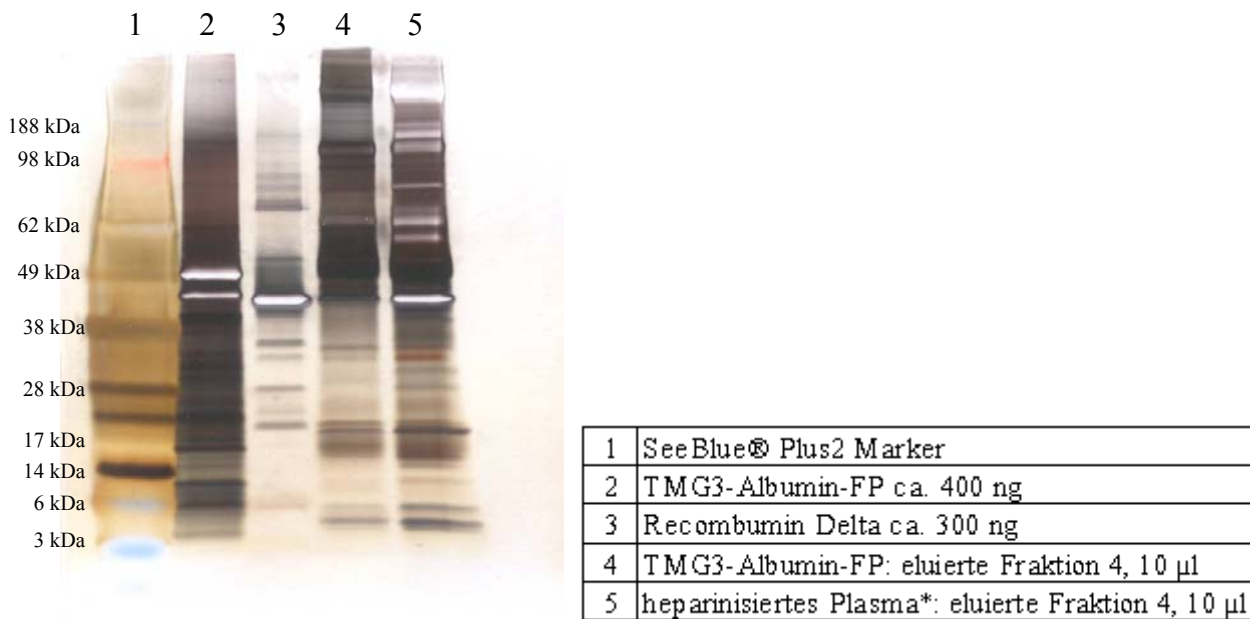


Abb. 3.41 Vergleich von der untersuchten Probe* mit der Kontrolle des Proteinspike-Versuches; Nupage® Bis-Tris 4-12 % Gele (reduziert) mit MES-Puffer (SDS)

3.2.6 Elektrophoretische Plasmatrennung

Bisherige Versuche zur Charakterisierung eines möglichen Liganden wurden mit unsepariertem Plasma, welches mit Matrix-gebundenem FP wechselwirken konnte, bzw. Intermediaten der Plasmafraktionierung im großen Maßstab unternommen. Eine elektrophoretische Trennung des Plasmas stellt eine Methode dar, Plasma ohne Verlust bestimmter Proteine zu separieren. Zur Separation wurde deshalb eine elektrophoretische Trennung mittels Nativ-Gel eingesetzt. Die im folgenden Western-Blot verwendete Membran wurde in Streifen geschnitten und mit verschiedenen Lösungen, nach Blockierung der freien Bindungsstellen auf der verwendeten PVDF-Membran mit Magermilchlösung, inkubiert. Die Inkubation mit den beiden TMG-Albumin-FP sollte einen Bindungspartner in den so erhaltenen Proteinfractionen identifizieren. Spezielle Kontrollen (*Coomassie*-Färbung der geblottete Albumin- und Plasmakontrolle) stellten sicher, dass ausreichend Protein auf die Blotmembran übertragen worden war. Die mitgeführte His-ladder-Kontrolle diente der Nachweisbarkeit des vom anti-Penta-His-Ak detektierten Epitops, welches auch auf den FP mit diesem Ak nachweisbar war. Jedoch zeigten die 4 h-Inkubationen mit TMG3 / TMG4-Albumin-FP und der anschließenden Detektion mit dem anti-Penta-His-Ak keinen Erfolg. TMG3- und TMG4-Albumin-FP binden also an keine der aufgetrennten Plasmabanden.

3.3 Interaktionsanalyse mit zellulären Blutkomponenten

3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen

In ersten orientierenden, durchflusszytometrischen Experimenten verhielten sich die TMG-GFP-FP exprimierenden HEK293-Zellen auffällig, sobald sie mit Thrombozyten inkubiert wurden: es bildete sich eine Gel/Agglutinat-ähnliche Struktur mit homogen verteilten zellulären Komponenten aus. Dieser Effekt trat spätestens nach 20 min und unabhängig von der γ -Carboxylierung der FP auf, jedoch nicht bei der Inkubation mit Erythrozyten oder Leukozyten. Diese Art der Gelbildung, wie oben beschrieben, trat bei bestimmten Kombinationen der inkubierten Komponenten (vgl. 2.28.1 Zell-Zell Interaktionen, Ansätze: 11,15,19, 23 und 27-30) auf: in diesen Versuchsansätzen handelt es sich um Thrombozyten und TMG-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen, welche mit und ohne Vitamin K kultiviert worden sind und jeweils mit und ohne spezifische Antikörper gegen Thrombozytenoberflächenproteine (anti-GPIIb/IIIa) inkubiert wurden. Unter dem Lichtmikroskop war deutlich eine Vernetzung der Zelltypen erkennbar. Die Durchflusszytometrieanalytik konnte aufgrund dieser Gelbildung nicht durchgeführt werden, da diese das Leitungssystem des Gerätes verstopft hätte. Deshalb wurde jeweils der partikelfreie Überstand der Versuchsansätze untersucht, der eine geringere Zelldichte als die Kontrollen aufwies (vgl. Abb.8.29-8.61 Zellinteraktion HEK-Blut).

3.3.2 Thrombozytenversuche

Alle Untersuchungen mit fraktioniertem oder unfraktioniertem Plasma lieferten keine Hinweise auf einen spezifischen Liganden für die untersuchten TMG-Albumin-FP. Im Plasma sind jedoch neben gelösten Proteinen auch zelluläre Komponenten enthalten, welche eine FP-Bindung mit einer Komponente einer Blutzellmembran eingehen könnten.

3.3.2.1 Erste orientierende Experimente

In weiteren Experimenten wurde die Abhängigkeit der Gelbildung/Agglutination von der TMG-Domäne durch Hemmung dieses Effektes mit gelöstem Liganden untersucht. In einem Vorversuch wurde die Anlagerung von gelöstem TMG-Albumin-FP an Thrombozyten durchflusszytometrisch unter Verwendung von FITC-markiertem anti-HSA-Ak untersucht (vgl. Tab. 3.11; Abb. 8.62-8.64). Es zeigte sich ein nur geringer Unterschied zwischen Kontrolle (ohne Anlagerung von gelöstem TMG-Albumin-FP) und Probe. Die Messwerte könnten somit durch Anlagerung von Albumin an Thrombozyten im menschlichen Blut verursacht worden sein (vgl. 2.28.2.1 Vorversuch – Anlagerung von TMG-GFP-Fusionsproteinen an Thrombozyten; Rohdaten: 8.62-8.64). Eine Bindung des FP in geringem Umfang an die Thrombozyten kann bei dem hier gewählten Versuchsdesign nicht ausgeschlossen werden.

Versuchsnummer:	Messwert (<i>Mean</i>)
1	5.09
2	3568,83
3	80,26
4	172,11
5	132,53

Tab. 3.11 Zusammenfassung der Rohdaten (vgl. Abb. 8.62-8.64) zur Anlagerung von TMG-Albumin-FP an Thrombozyten

Beim eigentlichen Hemmversuch der Interaktion von Thrombozyten und TMG-GFP-FP exprimierenden HEK293-Zellen mit gelöstem TMG-Albumin-FP (vgl. 2.28.2.2 Inhibition der Interaktion zwischen Thrombozyten und TMG-Albumin-FP exprimierenden HEK293-Zellen) bildete sich bei allen Proben eine gelartige Struktur aus. Die Kontrollversuche belegten (Ansätze ohne gelöstes FP), dass dieses Phänomen alleine durch eine Wechselwirkung der Thrombozyten mit HEK293-Zellen verursacht wurde. Auch der Verzicht auf eine γ -Carboxylierung der membranständigen Gla-GFP-FP hatte keinen Einfluss auf die Gelbildung. Eine Kontrollzelle (HEK293-MOCK-Zelle ohne FP-Expression) verursachte keine Gel-, sondern lediglich eine Sedimentbildung. Die zuvor erwähnten Gele waren stabil und auch nach 24 h noch ausgebildet. Um puffervermittelte und proteinspezifische Effekte unterscheiden zu können, wurde der anfängliche Versuch (vgl. 3.3.2.2.1 Volumen- und Puffereffekte) modifiziert wiederholt.

3.3.2.2 Gelbildung

Besonders häufig fiel wiederum eine Trübung und Verklumpung im Folgenden bei reproduzierten und neuen Versuchsansätzen mit Kalziumionen enthaltenden Puffern auf. Bei der Zellagglutination (vgl. Abb. 3.42) waren immer HEK293-Zellen beteiligt, welche diesmal die membranständigen TMG-Proteine nicht zwangsläufig exprimieren mussten. Auch bei Zellmischungen aus HEK293-Zellen und Thrombozyten trat eine solche Gelbildung auf. Thrombozytenansätze ohne Fremdzellen zeigten diesen Effekt nicht (vgl. Tab. 2.53 - 2.56).



Abb. 3.42 Beispiel einer ausgeprägten Gelbildung: Optische Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen (vgl. Tab 2.56; Proben Nr. 3, 4) Inkubation von HEK293 *MOCK*-Zellen in HEK293-Medium mit sterilfiltriertem (2.1) oder hitzeinaktiviertem (2.2) TK-Zellüberstand. 2.1 bildete nach Zugabe einer CaCl_2 -Lösung eine gelartige Substanz aus

3.3.2.2.1 Volumen- und Puffereffekte

Diese Versuchsserie (vgl. Tab. 2.53, vgl. 2.29 Optische Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen: Versuch I) stellte eine Wiederholung des Orientierungsexperiments (vgl. 3.3.2.1 Erste orientierende Experimente) dar in einem größeren Reaktionsvolumen, ohne die für die Durchflusszytometrie notwendige Verwendung eines Fluoreszenzantikörpers. Bis auf die nicht γ -carboxyliertes TMG4-GFP-FP exprimierenden HEK293-Zellen (vgl. Proben Nr. 22) zeigten alle Inkubationen mit unterschiedlichen Zellen bzw. mit gleichen Zellen in unterschiedlichem Reaktionspuffer, eine der Gelbildung ähnliche Verklumpung. Eine Gla-Protein-abhängige, Kalziumionen-vermittelte Interaktion wurde in Frage gestellt, da auch zellmembranständige nicht γ -carboxylierte TMG-GFP-FP diesen Effekt zeigten.

3.3.2.2 Bedeutung von Mediatorproteinen

Ergänzende Versuche (vgl. Tab. 2.54, vgl. 2.29 Optische Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen: Versuch II) gaben Hinweise auf eine Mediatorprotein-vermittelte Zell-Zellinteraktion. Ob Proteinmediatoren ausgeschüttet wurden und ob dies ursächlich durch die Gla-Proteine verursacht wurde, war nicht erkenntlich. Für diese Versuche wurde das Puffersystem (TK-Puffer, vgl. Tab. 2.49) gewählt, welches die Thrombozyten am besten stabilisieren konnte. Thrombozyten stellten den empfindlichsten Teil der Versuchsreihe dar und bildeten somit die den Versuchsaufbau bestimmende Komponente. Es zeigte sich, dass die Thrombozyten wie in vorangegangenen Versuchen (vgl. Tab. 2.53) sedimentierende Agglutinate bildeten, aber kein Gel. Nach nachfolgender Zugabe von 0,5 ml 1 M Zitratpuffer stellte sich ebenfalls keine Gelbildung ein, was ausschloss, dass der TK-Zellüberstand einen intrinsischen Effekt aufwies. Nach Zugabe von 0,4 ml des durch Zentrifugation gewonnenen TK-Zellüberstandes - nach 20 minütiger Sedimentation der Thrombozyten - war die bekannte Gelbildung zu beobachten.

In einer weiteren Versuchsserie wurden nur Medien zugesetzt, die keine oder komplexierte Kalziumionen enthalten. Bei keiner der Inkubationen bildete sich ein Gel aus. Die Zellen aggregierten nicht, sondern sedimentierten unabhängig von der jeweiligen Pufferlösung. Sie ließen sich wieder aufschütteln und erzeugten eine kaum wahrnehmbare Trübung. Durch eine nachfolgende Inkubation mit TK-Zellüberstand wurde untersucht, ob eine Protein-vermittelte Gelbildung in Frage kommt. In einem ersten Ansatz (vgl. Tab. 2.55, vgl. 2.29 Optische Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen: Versuch III) wurde sterilfiltrierter TK-Zellüberstand hinzugegeben. In einem zweiten Ansatz (vgl. Tab. 2.56, vgl. 2.29 Optische Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen: Versuch IV) wurde ein sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter [Soltis, Hasz 1979] und nochmals sterilfiltrierter TK-Zellüberstand hinzugegeben. Die Sterilfiltration diente der Entfernung von Schwebepartikeln und sollte gewährleisten, dass ein ausgelöster Effekt nicht durch Zellen oder Zellreste verursacht wird. Die Hitzebehandlung diente zur Proteindenaturierung. Erst nach Zugabe einer Kalziumchlorid-Lösung bildeten sowohl die einzelnen Zelltypen, als auch deren Mischungen ein Gel aus. Die Zellen und Mischungen, welche mit dem nicht hitzeinaktivierten TK-Zellüberstand inkubiert wurden, bildeten die Gelstruktur schneller aus. Eine Kalziumionen-vermittelte Agglutination ist von HEK293-Zellen bekannt [Gallicano, Kouklis 2004; Jongen, Fitzgerald 1991; Meyer, Laird 1992] und wird durch den Einsatz spezieller Medien weitestgehend unterdrückt. Im eingesetzten Freestyle[®]293-Medium lagen die Kalziumionen vorwiegend in komplexierter Form vor und unterdrückten weitestgehend die Agglutination der Zellen während der Kultivierung. Die HEK293-MOCK-Zelle im

Kulturmedium und TMG3-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen (γ -carboxyliert) bildeten nach Zugabe von hitzeinaktivierten TK-Zellüberstand und Kalziumchloridlösung kein Gel aus. Es entstand ein Zellklumpen, der sich nicht aufschütteln ließ und eine gewebeartige Struktur hatte. Proben, die mit Kalziumchloridlösung inkubiert worden sind, wurden photographiert und im Anhang abgebildet (vgl. Abb. 8.65-8.71).

3.3.2.3 Thrombozyten- und Thrombozytenmembranprotein-Kinetik

Die folgenden Versuche wurden durchgeführt, da die oben beschriebenen Zellexperimente (vgl. 3.3.2 Thrombozytenversuche) auf mögliche Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und TMG-GFP-FP exprimierenden HEK293-Zellen hinwiesen. Die Wechselwirkung bei der Inkubation von TMG-GFP-FP exprimierenden HEK293-Zellen mit Thrombozyten (vgl. Tab. 2.53-2.56), wurde auch mit SPR-Analytik untersucht. Es wurde eine Bindungsstudie mit Thrombozyten und mit einer Membranpräparation der Thrombozyten durchgeführt. Das TMG3-Albumin-FP wurde als Testprotein auf dem Chip immobilisiert und in der Flusszelle 2 und 4 untersucht (vgl. Tab. 3.12). Als Kontrolle wurde rekombinantes Albumin und das vor dem eigentlichen Test mit einem anti-Gla-Ak inkubierte TMG3-Albumin-FP verwendet. Bei einer Gla-Domänen-vermittelten Ligandenbindung an das FP sollte der Antikörper diese funktionell blockieren. Der Versuch zeigte keine Anlagerungskinetik (vgl. Tab. 3.13) mit den injizierten Thrombozyten und auch nicht mit der entsprechenden Membranpräparation. Auch die Membranpräparation der Thrombozyten zeigte keine Bindungsaffinität.

Messkanal	1	2	3	4
immobilisiertes Protein	rek. Albumin, Fa CSL Behring	TMG3/4-Albumin-FP	TMG3/4-Albumin-FP + Zugabe von anti-Gla-Ak	TMG3/4-Albumin-FP

Tab. 3.12 Belegung der Messkanäle 1-4; das Messergebnis wird durch Differenzieren der einzelnen Messwerte (Messsignal von Kanal 2-1 bzw. 4-3) erhalten

	Suspension / Lösung	immob.-FP* (X)	ΔFc^a	RelResp ^b $\Delta [RU]^c$	ΔFc^a	RelResp ^b $\Delta [RU]^c$
1	Thrombozyten 1×10^5 /ml	3	2-1	96,5	4-3	-11,6
2	0,5 M EDTA-Puffer pH 8,0	3	2-1	19,4	4-3	-2,3
3	Thrombozytenlysate	4	2-1	39,7	4-3	10,4
4	0,5 M EDTA-Puffer pH 8,0	4	2-1	42,2	4-3	-1,2

Tab. 3.13 Tabellarische Zusammenfassung der Rohdaten (vgl. 8.23-8.26) des Thrombozyten und Thrombozytenmembranprotein-Versuches; a: ΔFc = Differenz der Messsignale zwischen den aufgeführten Messkanälen; b: RelResp = relative *Response*; c: ΔRU = Differenz der *Response Units*; immob.-FP*: immobilisiertes TMGX-Albumin-FP

IV. Diskussion

4.1 Proteindesign und Expression

Die Studiengrundlage – die Erforschung eines Plasma-stämmigen Liganden für die Gla-Proteine – bildete die Expression der für die Studien benötigten Gla-Protein-Ektodomänen. Die Expression der relativ kurzen Gla-Protein-Ektodomänen (vgl. Tab. 2.7 z. B. Klon pIRES-1537) mit HEK293-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. Es stellte sich die Frage, ob die Proteine intrazellulär vorlagen, was mit Hilfe der GFP-FP (vgl. Klon 1689, 1690) und mikroskopischer Auswertung bei Beginn der Studien noch nicht publiziert worden war. Es konnte durch Farbstoffmarkierung verschiedener Zellkompartimente gezeigt werden, dass die Proteine eindeutig in der Zellmembran lokalisiert sind [vgl. Abb. 3.3-3.5]. Die verwendete, verkürzte Proteinsequenz der Gla-Proteine [vgl. Tab. 2.7 Klon pIRES-1689-1690] könnte aber zum proteolytischen Abbau der Proteine geführt haben, da diese nicht wie die nativen Gla-Proteine vorlagen und vielleicht auch eine Änderung der Faltung erfahren haben. Strukturell fehlerhafte oder falsch verknüpfte Peptide werden durch das Proteasom der Zelle, im Cytoplasma und im Zellkern, abgebaut und dem Kreislauf der Zelle zugeführt [Sayeed, Davis 2005; Hershko, Ciechanover 1992]. Zuerst wird durch Ubiquitinierung eine Polyubiquitinkette in einem mehrstufigen enzymatischen Prozess an degradierte Proteine gekoppelt, die dann in einem zweiten Schritt von der 19S-Untereinheit des Proteasoms (auch: Macropain) erkannt wird. Die 20S-Untereinheit ist proteolytisch aktiv. Bei dieser Protease handelt es sich um eine Threoninprotease.

Erst der Einsatz einer Albuminfusion konnte die Expressionsleistung der Proteine steigern und die Modifikation des Signalpeptids wirkte sich auch vorteilhaft auf die Carboxylierung der FP (vgl. 3.1.1 Design der DNA-Sequenz) aus. Der Einsatz von Warfarin und Vitamin K hatte keinen optisch auswertbaren oder die Zellvitalität bestimmenden Einfluss (vgl. 3.1.2 Proteinexpression und Lokalisation der nativen Proteine). Eine Auswirkung auf die Expressionsleistung durch unzureichende Kultivierungsbedingungen wurde daher nicht in Frage gestellt. Die Abspaltung des Signal- und Propeptids verlief erfolgreich und konnte durch die Proteinsequenzierung der gereinigten Fraktionen belegt werden (vgl. 3.1.4 Proteinsequenzierung). Die Albuminfusion der Gla-Proteine erklärt nur bedingt den Schutz vor einem Abbau durch das Proteasom. Die eingesetzten Proteine sollten funktionsfähig sein und es gibt keinen Anlass anzunehmen, dass eine veränderte Faltung des Proteins durch die Verkürzung der Gla-Proteine verursacht worden wäre, da auch die nativen Proteine in ihrer Konformation nicht durch den transmembranären oder den intrazellulären Anteil beeinflusst

werden. Es ist jedoch möglich, dass die Albuminfusion, durch den bekannten *Recycling-Mechanismus* [Andersen, Sandie 2009] des sogenannten Neonatalen Fc-Rezeptors den Abbau durch das Proteasom umgehen, aber vielleicht auch den Zugang eines Bindungspartners zur Gla-Domäne in den im physiologischen Milieu durchgeführten Versuchen versperrt. Grundsätzlich befinden sich aber bereits therapeutische Albumin-FP (Albuferon[®]) in der klinischen Phase, die einen ähnlichen Aufbau haben, wie die für diese Arbeit verwendeten FP. Deshalb kann von einer derartigen Proteinfaltung im FP ausgegangen werden, die die Funktion weitgehend erhalten sollte. Im Anschluss an die Expression folgte die Isolierung der FP aus dem Zellkulturüberstand. Die bei der Proteinisolierung (vgl. 3.1.3 Proteinreinigung) erzielte Reinheit und Quantität war für die Ligandensuche ausreichend (vgl. Abb. 3.12).

4.2 Potentielle Liganden im humanen Plasma

4.2.1 Separation von potentiellen Liganden aus heparinisiertem Plasma

Erste Versuche mit Bromcyan-aktivierter Sepharose und Epoxid-aktivierten-Keramik-Beads waren nicht erfolgreich wegen einer ungeeigneten Handhabbarkeit der Matrix bei der Elution. Der Einsatz von *Magnetic Beads* (vgl. 3.2.2 Ligandensuche mit Magnetic Beads) erwies sich als gangbare Verfahrenvariante. Nicht nur die Möglichkeit Spurenproteine zu finden war durch diese Versuche gegeben, sondern auch eine direkte Detektion im heparinisierten Plasma. Eine mögliche Ankonzentrierung von Spurenproteinen konnte durch kleine Elutionsvolumina vorgenommen werden. Es bot sich auch an einen Ligandenkomplex aus dem Plasma zu binden, der mit einzelnen, vorgereinigten Plasmafraktionen nur bedingt gefunden worden wäre. Die Verwendung vorgereinigter, separierter Proteinfractionen trägt das Risiko des Verlustes einzelner Plasmakomponenten durch die Reinigungs-/Separationsschritte (vgl. 3.2.4.3 Untersuchung verschiedener Plasmafraktionen).

Zum Einsatz kamen zwei verschiedene Typen von *Magnetic Beads*. Von den zuerst eingesetzten Kupfer-Iminodiessigsäure derivatisierten *Beads* (M-PVA IDA Cu) wurden die über eine Metallchelatbindung immobilisierten FP mit durch eine EDTA/Zitrat-Elution, die den Ca²⁺-abhängigen Liganden-FP-Komplex dissoziiert, koeluiert (vgl. XXX). Aus diesem Grund wurden in einem zweiten Versuch NHS-aktivierte *Magnetic Beads* (M-PVA Ak 13) benutzt, an welche die FP kovalent immobilisiert wurden. Durch die Verwendung von Plasmapools aus mindestens 8 Einzelspenden sollten Einzelspendereffekte reduziert werden

und eine gewisse Streuung der genetischen Proteinmodifikationen war gegeben. Die umfangreiche Gelanalytik (vgl. 3.2.2.1 Versuche mit M-PVA-IDA-Cu-Magnetic Beads, 3.2.2.2 Versuche mit M-PVA-Ak-13-Magnetic Beads) der von beiden verwendeten Typen der *Magnetic Beads* eluierten Fraktionen zeigte aufgrund des *Protein-Backgrounds* eine große Anzahl von Proteinbanden, die für eine Differenzbewertung visuell nicht ausreichend aufgelöst werden konnten. Zur Differenzierung der eluierten potentiellen Liganden wurde eine elektrophoretische Trennung mit folgendem Western-Blot angefertigt (3.2.2.1 Versuche mit M-PVA-IDA-Cu-Magnetic Beads). Der Western-Blot wurde mit den löslichen TMG-Albumin-FP inkubiert und ein ausgebildeter Komplex aus Ligand und FP sollte mittels Antikörperdetektion nachgewiesen werden. Es zeigte sich auch in diesem Versuch, dass in den Proben kein Bindungspartner gefunden werden konnte.

4.2.2 Identifikation der potentiellen Plasma-stämmigen Liganden

Die massenspektrometrische Auswertung der Fraktionen, welche mittels *Magnetic Beads* (M-PVA Ak 13) gewonnenen wurden, bot nicht nur eine höhere Auflösung bei der Suche nach dem Bindungspartner sondern auch eine wesentlich höhere Sensitivität. So konnte es zu keiner Störung der Ergebnisse durch eine Überlagerung von Proteinbanden führen wie sie in den verwendeten Gelen auftrat (vgl. z. B. Abb. 3.26-3-30). Dies gilt für Proteine > 3 kDa, weil die für die Probenankonzentrierung verwendete Filtermembran diese Ausschlussgröße aufweist. Die aussichtsreichsten Kandidaten wurden ausgewertet.

Die erste Auswertung aller Bindungspartner (vgl. 3.2.3 Massenspektrometrie; 3.2.4.5.2 A1BG-Bindungskinetik) ergab, dass es sich in den meisten Fällen um unspezifische Liganden handelte, abgesehen von A1BG. Dieses Protein stellte sich (vgl. Tab. 3.1) als möglicher Bindungskandidat heraus, ein Glykoprotein, welches hauptsächlich in der Leber exprimiert und ins Plasma sezerniert wird. Außerdem findet man es noch im Speichel, Liquor, Eierstöcken und Thrombozyten (www.hprd.org). Eine Literaturrecherche zeigte, dass die Funktion von A1BG weitgehend unbekannt ist, A1BG aber an das *cysteine-rich secretory protein 3* (CRISP-3, SGP28) bindet [Udby et al. 2004] und mit diesem einen Komplex bildet. Die CRISP-Proteine sind möglicherweise Proteasen und kommen in Bakterien und Eukaryoten vor, oft als Komponente von Toxinen. Interessant ist ebenfalls, dass DM43 und DM64, die Opossum-Homologen von A1BG, als Inhibitoren von Metalloproteasen aus Schlangengiften charakterisiert wurden. Hier stellt sich eine Verbindung zum Gerinnungssystem durch Sequenzvergleich heraus, die mit der Ektodomänensequenz der Gla-

Proteine einen logischen Ansatzpunkt der Proteinfunktion geboten hätte. Denkbar wäre ein A1BG-abhängiger regulatorischer Prozess. Im humanen Organismus könnte A1BG an die Gla-Proteine gebunden vorliegen und bei Bedarf, vom Rezeptor gelöst, Metalloproteasen inhibieren, um eine Thrombenbildung zu unterbinden. A1BG hätte die Funktion eines Blutgerinnungsinhibitors und die Gla-Proteine könnten eine schnelle Freisetzung des A1BG gewährleisten. Ein Problem ist, dass im ersten massenspektrometrischen Experiment eine Bindung sowohl mit TMG3- als auch mit TMG4-Albumin-FP besetzten *Magnetic Beads* eingegangen wurde. Warum sollte das gleiche Protein an zwei verschiedene Proteine einer Familie binden, wenn es nicht innerhalb der Familie einen strukturell ähnlicheren Interaktionspartner gibt? Für TMG3 wäre es PRGP1 und für TMG4 das Protein PRGP2. PRGP1 und 2 wurden zwar nicht mituntersucht, dennoch blieb die Bindung von A1BG an die TMG3- und gleichzeitig an die TMG4-Domäne fraglich. Die übrigen mittels MassSpek-Analytik identifizierten Proteine sind entweder Kandidaten für unspezifische Bindungen (Antikörper, Komplement-Faktoren, Albumin-Familie) oder intrazellulär lokalisiert (KIAA1632, Znf750, Usp6). Beispielsweise (bsp.) enthalten die Isoformen von IGF2 und von KNG1 noch Sequenzen des Signalpeptids, so dass der Sekretionsmechanismus fraglich ist.

Im zweiten Versuch (vgl. Tab. 3.2) hatten die Kandidaten hauptsächlich einen cytoplasmatischen oder intranukleären Ursprung. Zwei Proteine von biologischer Relevanz, das Pro Platelet Basic Protein (PPBP) und das Matrix Gla Protein (MGP), wurden trotz ihres Vorkommen in den mitgeführten Kontrollen bewertet. Die biologische Relevanz ist im Falle des MGP durch die Gla-Domäne und für das PPBP durch die Thrombozytenversuche (vgl. 3.3.2 Thrombozytenversuche) gegeben. Die MassSpek gibt keine quantitative Aussage über die gefundenen Bindungskandidaten. So können Bindungspartner unterbewertet oder ausgeschlossen werden, weil sie auch in den Kontrollen zu finden waren, obwohl sie eigentlich, bezogen auf die Quantität, bevorzugt gebunden werden. Das PPBP konnte durch das Vorkommen in den Kontrollen und die durchgeführten Thrombozytenversuche (PPBP) ausgeschlossen werden. Theoretisch könnte aber eine Bindung, zwischen MGP und TMG-Albumin-FP - über die beiden Gla-Domänen der Proteine vermittelt - stattfinden. Beide Gla-Domänen, die des MGPs und des TMG-Albumin-FP, binden Kalzium, welches als Vermittler einer Bindung dienen könnte [Aktimur, Gabriel 2003]. Die Inhibition der Kalzifizierung durch das sekretorische MGP wurde bereits in der Literatur beschrieben [Schurgers, Cranenburg 2008]. Der Funktionsmechanismus ist noch nicht eindeutig geklärt. Postuliert wird eine Bindung des MGP an Kalzium-Kristallisationskeime und des weiteren eine Inhibition der Zelldifferenzierung von vaskulären glatten Muskelzellen zu chondrozyten- und osteoblastenartigen Zellen. Die Bindung des MGP an Kristallisationskeime verhindert das weitere Kristallwachstum und die Zelldifferenzierung wird inhibiert durch die Bindung von

MGP an das *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2), ein Mitglied der Wachstumsfaktorenfamilie (TFG-beta) und ein knochenbildender Faktor [Price, Faus 1998]. Die Verhinderung des Kristallisationskeimwachstums kann am besten mit den verfügbaren Daten erklärt werden [Price, Faus 1998]. Es wird postuliert, dass eine Internalisierung der Kristalle und ein Abbau innerhalb der Zelle möglich sind. Die Internalisierung und der Mechanismus wurden bisher noch nicht aufgeklärt. Denkbar wäre aber eine Bindung des Kristallisationskeims, welcher durch die PRGP/TMG-Familie internalisiert werden könnte und dem Abbau zugeführt würde. Diese Interaktion könnte mit einem Zellversuch nachgestellt werden. Zellen, welche die Gla-Proteine (PRGP1-2; TMG3-4) exprimieren, könnten mit *gelabeltem* MGP in einer physiologischen Pufferlösung mit Kalzium inkubiert werden. Eine Internalisierung des MGP wäre durch das fluoreszierende Cytosol der Zellen detektierbar. Eine einfache Kalziumionen-vermittelte Anlagerung des MGP an die Gla-Proteinfamilie der Zellen wäre ein Hinweis auf eine Interaktion, aber nicht als Nachweis einer spezifischen Interaktion geeignet. Diese bekannte Art der Bindung wäre nur ein grundsätzlicher Nachweis für eine Kalziumionen-vermittelte Gla-Protein–Gla-Protein Interaktion [Aktimur, Gabriel 2003]. Die spezifische Bindung unter Einbeziehung weiterer Aminosäuren der Proteine könnte durch Röntgenstrukturaufklärung des Protein-Kalzium-Protein Komplexes nachgewiesen werden. Aufgrund des MGP-Vorkommens in den Kontrollen und der identifizierten Peptidsequenz, welche sich innerhalb der Prä-Gla-Domäne des MGP befindet, jedoch nicht selbst modifiziert (γ -carboxyliert) wird, wurde das MGP als potentieller Ligand der TMG-Albumin-FP ausgeschlossen.

Sowohl das MGP, als auch das PPBP konnten bisher noch nicht bindungskinetisch untersucht werden.

4.2.3 Bindungskinetische Untersuchungen potentieller Plasma-stämmiger Liganden

Die nachfolgenden SPR-Tests wurden unternommen, um sowohl eine andere Matrix neben den *Magnetic Beads* für die Ligandensuche im Plasma zu testen, als auch, um eine generelle Detektionsmethode für Proteinbindungen zu etablieren und qualifizieren.

In einer durchgeführten Bindungskinetikstudie zeigte sich, dass sowohl das rekombinant exprimierte, kommerziell erhältliche A1BG, als auch das lyophilisierte humane A1BG keine Affinität zu den Gla-Proteinen aufweisen (vgl. 3.2.4.5.2 A1BG-Bindungskinetik). Die Analyse der Glykostruktur (vgl. 3.2.4.5.1 Analytische Charakterisierung von A1BG aus Humanplasma) des humanen A1BG zeigte keine Auffälligkeiten und auch die Gelanalytik (vgl. Abb. 3.33) zeigt keine Fragmentierung des humanen und rekombinanten Proteins. Die genaue Glykostruktur des humanen A1BG war nicht bekannt. Nur die Positionen in der Peptidsequenz und der Glykosylierungstyp, *N-type* oder *O-type*, waren in den zur Verfügung stehenden Datenbanken angegeben. Die endständigen Zuckerreste konnten deshalb detektiert, aber nicht mit den nativen verglichen werden. Die meisten Glykoproteine im Menschen weisen eine endständige Sialylsäure (N-Acetylneuraminsäure) auf. Sialylsäure bindet an endständige Mannosemoleküle von Glykoproteinen. Die Halbwertszeit vieler Glykoproteine wird durch den Sialylierungsgrad bestimmt. In vivo wird Sialylsäure von den Mannosemolekülen abgespalten und die frei zugänglichen Mannosebausteine der Glykoproteine können durch Lektine in der Leber erkannt und anschließend in der Leber metabolisiert werden. Durch die Detektion der Sialylsäure durch SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) und MAA (*Maackia amurensis* agglutinin), konnte davon ausgegangen werden, dass das getestete, humane A1BG Protein keine Einschränkungen in einem Bindungsassay aufweisen sollte. Aufgrund der durchgeführten Bindungskinetik (s.o.) und trotz der vorhandenen Glykostruktur wurde A1BG nicht weiter als Kandidat untersucht.

Der experimentelle Ansatz birgt die Gefahr, dass gefundene Interaktoren auf einer Bindung an Albumin beruhen [Quinlan, Martin 2005]. Es erschien daher ratsam, die Selektion ohne fusioniertes Albumin durch Verwendung einer enzymatischen Spaltstelle im FP zu wiederholen (vgl. Abb. 3.1 Spaltstelle markiert durch: ✂), was leider nicht erfolgreich war. Es kann nicht mit Sicherheit erklärt werden, warum A1BG als Bindungspartner im *Magnetic Beads* Versuch aufgetreten ist. Eine Albuminbindung hätte im entsprechenden SPR Versuch detektiert werden müssen (vgl. 2.24.1.2 Untersuchung auf unspezifische Proteinbindungen). Dieser Fall ist ebenfalls nicht eingetreten und eine Gla-Domänen-spezifische Interaktion konnte hiermit auch ausgeschlossen werden. Vermutlich konnte Fibrin für eine Verklebung

von Proteinen und *Magnetic Beads* (vgl. 3.2.2.1 Versuche mit M-PVA-IDA-Cu-Magnetic Beads; 3.2.2.2 Versuche mit M-PVA-Ak-13-Magnetic Beads: Versuch I) sorgen, die mit den normalen Waschschrritten nicht oder relativ langsam gelöst werden konnte. So wurden auch mit stringenten Elutionsschritten Proteine eluiert, die aber nicht unbedingt spezifisch an die FP gebunden hatten, die an den *Beads* immobilisiert worden waren. In einem zweiten *Magnetic Bead*-Versuch (vgl. 3.2.2.2 Versuche mit M-PVA-Ak-13-Magnetic Beads: Versuch II) wurde die Inkubationsdauer auf vier Stunden bei RT verkürzt, um die Gesamtmenge an unspezifisch gebundenen Liganden zu verringern; dies führte zu einem fehlenden Nachweis von A1BG. Auch eine automatisierte Sammlung eines gesuchten Liganden, welcher potentiell an das auf dem SPR-Chip immobilisierte FP gebunden hatte, wurde mit Eluat der *Magnetic Bead*-Experimente verglichen, führte zu keinen neuen Erkenntnissen (vgl. Abb. 3.31).

Abgesehen vom A1BG wurden verschiedene Plasmaverdünnungen (vgl. 3.2.4.1 Plasmaverdünnungen und Elutionsbedingungen) mit verschiedenen Wasch- und Elutionspuffern getestet. Diese Verdünnungen zeigten keinen Einfluss auf die unspezifischen Bindungen. Auch die Verwendung eines anderen Reaktionsmediums (vgl. 3.2.4.1 Plasmaverdünnungen und Elutionsbedingungen), des LowCross[®]-Puffers, konnte die unspezifischen Wechselwirkungen nur geringfügig reduzieren. Dieser Puffer wurde aber nicht eingesetzt, weil seine Komponenten, auch auf Anfrage beim Hersteller, nicht verfügbar waren und eine Fehlinterpretation der Ergebnisse ausgeschlossen werden sollte. Beispielsweise könnte die leicht reduzierte unspezifische Bindung durch eine Ca²⁺-Komplexierung oder durch Wechselwirkung mit dem potentiellen Plasma-stämmigen Liganden verursacht worden sein.

Des Weiteren wurden Intermediate der Plasmafraktionierung (vgl. 3.2.4.3 Untersuchung verschiedener Plasmafraktionen) auf eine Bindungskinetik hin untersucht; ihre Verwendung hatte den Vorteil die Anzahl unspezifischer Bindungspartner zu reduzieren. Das LRA-Reagenz, welches die Entfernung von Lipiden ermöglicht hätte, die für unspezifische Bindungen verantwortlich sein können, wurde zwar getestet (vgl. 3.2.4.4 Lipid Removal Agent) aber letztlich nicht eingesetzt, da nicht bekannt war, in welchem Umfang Proteine eine Bindung mit der Silikamatrix des LRA eingehen und es zu keiner nennenswerten Verbesserung der unspezifischen Bindungen führte. Die Fraktionen mussten erst dialysiert werden, um Reagenzien der Proteinreinigung, die für die Versuche störend waren, zu beseitigen. Nach der Dialyse befanden sich die Proteine in einem Protein schonenden HEPES-Puffer, aber es traten teilweise Ausfällungen auf, welche abgetrennt werden mussten. Die Plasmafraktionierung nach Cohn [Cohn, Strong 1946] ist sehr komplex. Durch verschiedenste

Verfahrensschritte werden Proteine separiert und es ist schwierig sie im experimentell verwendeten physiologischen Puffermilieu in Lösung zu halten.

Die SPR-Versuche mit den einzelnen Plasmafraktionen (s.o.) wurden, auch bedingt durch die Ergebnisse der *Magnetic Bead*-Versuche (vgl. 3.2.2 Ligandensuche mit Magnetic Beads), nicht weiter ausgebaut. Der Einsatz einer anderen an der Reaktion beteiligten Matrix, im Vergleich zu den *Magnetic Bead*-Versuchen, zeigte keine Verringerung der unspezifisch gebundenen Proteine. Wäre ein Bindungspartner mittels *Magnetic Beads*-Versuch identifiziert worden, hätte man gegebenenfalls gezielt in den Einzelfraktionen der Plasmafraktionierung nach diesem Protein suchen können. Eine erneute Suche nach einem Bindungspartner könnte in weiteren Plasmafraktionen und in den bereits analysierten unter modifizierten Versuchsbedingungen durchaus erfolgreich sein. Es müsste beispielsweise ein optimaler Dialysepuffer für die zu testenden Einzelfraktionen gefunden werden, der auch fraktionsspezifisch sein kann. Vielleicht hatten die in der Fraktionierung verwendeten Pufferbestandteile, welche durch die Dialyse nicht vollständig entfernt werden konnten, einen Effekt auf den gemessenen Brechungsindex und sorgten in der Kurvendifferenzbildung für die negativen RU-Werte (vgl. 3.2.4.3 Untersuchung verschiedener Plasmafraktionen). Wäre eine Fraktion identifiziert worden, könnte man einen Reinigungsprozess für den Liganden entwickeln, sofern dieser noch nicht rekombinant oder als gereinigtes Plasmaprotein verfügbar wäre.

4.2.4 Ligandenkomplexbildung mit den gelösten Fusionsproteinen

Bei allen Experimenten stellt die Immobilisierung des Proteins an eine Matrix ein prinzipielles Problem dar. Es wurde meistens über eine Peptidbindung kovalent an einen Chip oder an die *Magnetic Beads* gebunden. Die freien Aminogruppen, die benötigt wurden, um die Peptidbindung einzugehen, waren freie Aminogruppen der Aminosäureseitenketten oder der N-Terminus der Proteine. Die statistische Verteilung sollte ein ausgewogenes Verhältnis von verknüpftem N-Terminus zur Aminogruppe einer Aminosäureseitenkette bedingen. Die Verknüpfung über freie Aminogruppen, z.B. mit Lysin oder Arginin, des Albuminanteils sollte sogar bevorzugt eingegangen werden, da der Albuminanteil viele Lysine aufweist und es den wesentlich größeren Proteinanteil darstellt. Die jeweils vier Lysine der TMGs sind aber durch die Proteinfaltung nicht zwangsläufig zugänglich, beziehungsweise durch die stark negative Ladung der Domäne gut abgeschirmt (TMG3). Bei TMG4 liegen sie sehr nahe am

Transmembranteil, der im FP nicht vorhanden ist und durch die sterisch abgeschirmt sein dürfte. Dennoch sollte die Blockade der Domäne durch eine Immobilisierung ausgeschlossen werden. Durch Inkubation der TMG-Albumin-FP mit heparinisierendem Plasma konnte davon ausgegangen werden, dass keinerlei Immobilisierung der FP die Interaktion mit einem Bindungspartner inhibieren sollte. Erst durch nachträgliche Zugabe des Talonmaterials (vgl. 3.2.5 Plasma-FP-Spikeversuch) wurde TMG3-Albumin-FP und ein hypothetisch gebundener Ligand aus dem Plasma gereinigt. Eine Elution zeigte auf einem Silbergel keine Verbesserung der Bindungsspezifität. Die unspezifisch gebundenen Proteine sind daher unter anderem als Matrixproblem einzustufen. Außerdem stellen die Elektronegativität der Gla-Domäne und der Albuminanteil [Quinlan, Martin 2005] der FP eine Bindungsstelle für schwach affine Bindungen dar.

4.2.5 Ligandensuche im Gel-separierten Plasma

Der Spikeversuch (vgl. 3.2.5 Plasma-FP-Spikeversuch) zeigte trotz der anfangs Matrix-unabhängigen Durchführung nach Isolierung des gewünschten Komplexes aus TMG-Albumin-FP und potentiellen Liganden über ein Kupfer-NTA Material eine Vielzahl an Proteinen, welche auch in der Kontrolle gefunden wurden (vgl. Abb. 3.35-3.37). Durch einen Folgeversuch sollte die Detektion unspezifisch gebundener Proteine eliminiert werden. Es bot sich deshalb eine elektrophoretische Trennung der Plasmabestandteile an (vgl. 3.2.6 Elektrophoretische Plasmatrengung), durch die nach einem Western-Blot und der darauf folgenden Inkubation mit den löslichen TMG-Albumin-FP ein potentieller Ligand detektiert werden sollte. Die Detektion der löslichen FP mit verschiedenen Antikörpern war erfolgreich, leider ließ sich keine Anlagerung an eine Proteinbande des Western-Blots nachweisen. Möglicherweise stört eine Änderung der Konformation der Plasmaproteine durch Anlagerung an die Blotmembran eine Bindung der FP.

4.3 Hinweise auf einen zellulären Liganden?

4.3.1 Erklärungsversuche beobachteter Agglutinationseffekte

Einen bisher noch nicht untersuchten Bindungspartner stellten die zellulären Bestandteile dar, die neben den Plasmakomponenten essentielle Bestandteile des Blutes sind. In Frage kamen Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten. Der Einsatz der von HEK293-Zellen exprimierten, nativen TMG-Proteine als GFP-Fusion sollte eine native Konformation und Umgebung in der Zellmembran bieten. Falls zelluläre Membrankomponenten von Bedeutung gewesen wären, hätte dieser Versuchsaufbau diese eingeschlossen. Eine Zell-Zell oder Zell-Protein Interaktion hätte die durchflusszytometrische Analytik nicht gestört, bzw. die Fluidik des Systems zugesetzt.

Erste Versuche (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen) deuteten auf einen Effekt hin, wie man ihn von Gerinnungsassays kennt. Es bildete sich eine Gel-ähnliche Matrix/Agglutination zwischen TMG-GFP-FP exprimierenden HEK293-Zellen und Thrombozyten aus. Erythrozyten und Leukozyten wiesen keine optischen oder mit Durchflusszytometrie messbaren Effekte auf. In dieser Versuchsreihe lösten weder der TK-Puffer noch die modifizierte physiologische Natriumchlorid-Lösung die Gelbildung aus. Die Gelbildung entstand nur wenn Thrombozyten selbst oder Komponenten des TK-Zellüberstandes einen Bestandteil der Zellinkubationen darstellten und Kalziumionen in den Inkubationslösungen enthalten war (vgl. 3.3.2 Thrombozytenversuche). Die durchgeführten Versuche (vgl. Tab. 2.53-2.56) erklären, dass der ausgelöste Effekt durch Kalziumionen verursacht wurde, welche entweder den Zellinkubationen zugegeben wurden oder bereits in den Puffern, wie zum Beispiel im TK-Puffer, enthalten waren.

Da die Thrombozyten im Kalziumionen enthaltenden TK-Puffer kein Gel ausbilden (vgl. Tab. 2.53, vgl. 2.29 Optische Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen: Versuch I), ist zu vermuten, dass eine exogene Aktivierung der Thrombozyten stattgefunden hat. Eine Thrombozytenaktivierung kann durch lösliche (z.B. Adenosindiphosphat (ADP), Thromboxan A₂ (TXA₂, Thrombin), strukturelle (z.B. Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Kollagen etc.) sowie mechanische Faktoren (Scherstress) ausgelöst werden. Eine physiologische Aktivierung tritt nach einer Endothelverletzung auf. Zunächst binden die Thrombozyten an Kollagen gebundenen von-Willebrand-Faktor (vWF) über Glykoprotein Ib (GPIb) oder GPVI an Kollagen und dann an bereits adhärenzte Thrombozyten. Die Anheftung der Thrombozyten an Kollagen ist

unabhängig von einer Aktivierung, jedoch bedarf es einer ausreichenden Aktivierung, um eine stabile Adhäsion zu verursachen. Durch die Thrombozytenaktivierung (siehe oben) verändert sich die Konformation des GPIIb/IIIa. Diese Konformationsänderung ermöglicht eine Bindung an vWF beziehungsweise Fibrinogen und somit eine stabile Aggregatbildung. Falls die initiale Thrombozytenaktivierung nicht ausreicht, verfügen die Thrombozyten über zwei unabhängige Verstärkungsmechanismen. Einerseits wird ADP bei einer Aktivierung freigesetzt, welches in den elektronendichten Vesikeln der Thrombozyten gespeichert ist, und purinerge Rezeptoren (P2Y₁ und P2Y₁₂) erregt, andererseits wird Cyclooxygenase 1 (COX1)-abhängiges TXA₂ gebildet, welches Thromboxan-Rezeptoren aktiviert. Außer den sekretorischen elektronendichten Vesikeln, welche Kalziumionen und ADP enthalten, gibt es noch die vWF, *platelet-derived-growth-factor* (PDGF), Plättchenfaktor 4 und weitere Proteine enthaltende, ebenfalls sekretorischen, α -Vesikel [Jastrow, Weber 2009]. Welche Aktivierung stattgefunden hat, ist nicht Aufgabe der vorliegenden Arbeit gewesen, stellt aber dennoch interessante Aspekte dar, die näher untersucht werden könnten. Eine Beschleunigung der Gelbildung durch im TK-Zellüberstand enthaltene Mediatoren ist nicht von der Hand zu weisen und wurde anhand von Thrombozytenversuchen (vgl. Tab. 2.55, vgl. 2.29 Optische Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen: Versuch II) belegt. Es stellte sich eine langsam voranschreitende Gelbildung, bei Inkubationen von Thrombozyten im TK-Puffer und membranständiges Gla-Protein exprimierenden HEK293-Zellen in modifizierter physiologischer Natriumchlorid-Lösung, ein. Diese konnte beschleunigt werden durch Zusatz von TK-Zellüberstand, der im Vergleich zur Kontrolle, die aus einem äquimolaren Zitratpuffer bestand, Glukose und alle, von Thrombozyten freigesetzten, Proteine enthielt. Die Zellinkubationen mit hitzeinaktiviertem (vgl. Tab. 2.56, vgl. 2.29 Optische Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen: Versuch IV) Thrombozytenkonzentrat zeigten eine langsamere Ausbildung der Gelstruktur, als die Zellinkubationen mit nicht hitzeinaktiviertem Thrombozytenkonzentrat. Vermutlich spielen Mediatoren in Form von thrombozyteneigenen Proteinen eine Rolle bei der Gelbildung, indem sie einen der beiden Verstärkungsmechanismen aktivieren. Die Gelbildung der Zellmischungen, HEK293-Zellen inkubiert mit Thrombozyten, war somit Kalziumionen abhängig und wahrscheinlich eine Mischung zusammengelagerter HEK293-Zellen und gerinnungsaktivierter Thrombozyten.

Eine Anlagerungsuntersuchung der löslichen TMG-Albumin-FP an Thrombozyten wurde durchgeführt, um diese, bzw. die bereits verwendeten zellständigen TMG-GFP-FP, als auslösenden Gelbildungseffekt durchflusszytometrisch nachzuweisen (vgl. 3.3.2.1 Erste orientierende Experimente). Der im Vergleich zur Probe hohe Referenzwert ist zurückzuführen auf die Plasma-stämmigen Thrombozyten, welche noch nicht vollständig

durch die Waschschritte vom Albumin befreit werden konnten. Diese Analytik wurde deshalb modifiziert im Sinne einer Anlagerungsinhibition. Die Inhibition der Anlagerung von Thrombozyten an TMG-GFP-FP exprimierende HEK293-Zellen durch Vorinkubation mit löslichem TMG-Albumin-FP zeigte die bereits in vorangegangenen Versuchen aufgetretene Gelbildung, welche deshalb als zellabhängiger und nicht Gla-Protein-spezifischer Effekt ausgewertet wird (vgl. auch 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen). Es ist aber möglich, dass die eingesetzte Proteinmenge des löslichen TMG-Albumin-FP nicht ausreichend war, um die Bindungsstellen auf den Thrombozyten abzusättigen.

4.3.2 Bindungskinetische Studien zur Thrombozyten-Agglutination

Die Interaktion wurde zusätzlich mit der SPR analysiert (vgl. 3.3.3 Thrombozyten- und Thrombozytenmembranprotein-Kinetik).

Die experimentellen Ergebnisse, die eine andere Arbeitsgruppe mit dem Biacoregerät erzielt hat, zeigen, dass Thrombozyten-Ligandeninteraktionen [Ravant, Wurtz 2008] mit dieser Technologie analysiert werden können; trotzdem erscheint die grundsätzliche Verwendung von zellulären Interaktionspartnern aufgrund der Größenverhältnisse fraglich. Dennoch wurden Thrombozyten (vgl. 3.3.3 Thrombozyten- und Thrombozytenmembranprotein-Kinetik) aber auch eine Thrombozyten-Membranpräparation (vgl. 3.3.3 Thrombozyten- und Thrombozytenmembranprotein-Kinetik) unter Anwendung der SPR-Analytik untersucht. Die Analytik der nativen Thrombozyten in TK-Puffer kann kontrovers diskutiert werden. Das Messsignal kann nur mit einem maximalen Abstand von 200 nm von Goldoberfläche zum Analyten (inkl. Goldschicht und der immobilisierten Schicht) im evaneszenten Feld aufgenommen werden. Somit stellt sich die Frage, ob die durchschnittlich 1,5 – 3,0 µm großen Thrombozyten entsprechend tief in die Dextranfädenmatrix eindringen konnten, um ein Messsignal, durch Bindung an das am Goldchip immobilisierte Protein, auszulösen. Die gewählte Fließgeschwindigkeit des Systempuffers betrug 3 µl/min und entsprach den empfohlenen Vorgaben für Zellversuche. Es wurden bereits Bindungsstudien zwischen Proteinen und Thrombozyten durchgeführt, die einen ähnlichen Versuchsaufbau mit der entsprechenden Fließgeschwindigkeit benutzten. Wäre eine hohe Affinität bei dem durchgeführten Versuch vorhanden gewesen, sollte diese durch Messsignaländerung detektierbar gewesen sein. Eine schwache Affinität könnte durch die Scherkräfte an den Thrombozyten, verursacht durch die Fließgeschwindigkeit des Systempuffers, unterbewertet worden sein, bzw. ist unter Umständen erst gar nicht detektiert worden, da die Thrombozyten

zu groß waren, um in die Dextranfädenmatrix eindringen zu können. Die untersuchte Membranpräparation der Thrombozyten sollte diese Problematik umgehen. Aber auch hier konnte keine Veränderung des Messsignals abgelesen werden. Es stellt sich die Frage, in wie weit alle Membranproteine extrahiert werden konnten und ob sie nicht durch die relativ unphysiologischen Extraktionsbedingungen geschädigt worden sind. Jede der beiden Methoden hatte sich ergänzende Vor- und Nachteile. Letztlich wurde kein Membranprotein der Thrombozyten für eine spezifische Interaktion mit einer TMG-Domäne nachgewiesen.

Abschließend bleibt zu erwähnen, dass kein Bindungspartner identifiziert werden konnte, aber die stabile Expression der Ektodomäne von TMG3 und TMG4 als Albuminfusion, verbunden mit einer deutlichen Steigerung der Gesamtproteinmenge. Außerdem wurde die Lokalisation der nativen TMGs in der Zellmembran nachgewiesen. Die Bindung einer Plasmakomponente an die Ektodomäne sollte Bestandteil weiterer Untersuchungen bleiben, da die Ektodomäne stark konserviert ist und das Allel über Generationen hinweg aus dem Genom verschwunden wäre, wenn es keine Funktion für den jeweiligen Organismus besäße. Die Natur, bzw. deren Organismen passen sich durch Selektion den Gegebenheiten ihrer Umgebung und Umwelt an – Survival of the fittest [Darwin 1859].

V. Schlussfolgerung

Mit den durchgeführten Versuchen konnte kein im Plasma befindlicher Proteinbindungspartner der TMG-Proteine aus der Gla-Protein-Familie nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, dass nur wenige Informationen über die Proteinfamilie der Gla-Rezeptoren vorliegen, sollte man für weitere Studien Grundlagenforschung betreiben. Diese könnten sich sowohl näher mit der Gesamtstruktur der Proteine befassen, speziell der Domänenstruktur, als auch mit weiteren Sequenzmotiven. Die eigentliche Ektodomäne ist im Vergleich zu anderen Membranproteinen mit Ektodomänen verhältnismäßig kurz. Der membranständige, γ -carboxylierte Tissue Factor hat zum Beispiel eine Ektodomäne, die aus 219 Aminosäuren besteht und als Rezeptordomäne fungiert (www.hprd.org). TMG3 hat eine, nach Abspaltung von Signal- und Propeptid, postulierte Ektodomäne mit 59 Aminosäuren und TMG4 mit 62 (www.hprd.org). Beide sind im Verhältnis relativ klein und es ist nicht sichergestellt, dass eine Bindung mit einer solch kurzen Domäne eingegangen werden kann. Es bietet sich an eine Röntgenstrukturaufklärung durchzuführen und mittels der gewonnenen Ergebnisse eine Interaktionsanalyse, basierend auf *Computermodellierung*, zu testen. Die Plasmaproteine sind umfassend kristallisiert und als 3D Moleküle zugänglich (www.ncbi.gov.org). Eine Bindungstaschensuche für die bekannten Plasmaproteine sollte machbar sein, weil die Bindungsstelle relativ eng auf die Ektodomäne eingrenzt ist; vorausgesetzt eine solche Bindung findet extrazellulär statt. Die Frage der Funktion bleibt bisher noch ungeklärt und ohne Bindungspartner können kaum Vermutungen angestellt werden. Wahrscheinlich ist jedoch, dass die Proteinfamilie eine essentielle Funktion aufweist, weil sie artenübergreifend konserviert ist (vgl. Abb. 1.5) und in der Natur nicht verwendete Gene im Laufe der Evolution abgeschaltet oder angepasst worden wären. Es ist auch bekannt, dass einzelne Gene komplett aus dem jeweiligen Genom verschwinden. Diese Möglichkeiten sind in der Evolutionsbiologie der Rezeptorfamilie alle nicht in Betracht gezogen worden und somit sollte man die Möglichkeit einer intrazellulären Funktion der Proteine näher berücksichtigen.

Zu den weiteren auffälligen Strukturmerkmalen der Familie gehört eine Cystein-reiche Region im cytoplasmatischen Bereich direkt hinter der Transmembran-Domäne, die wahrscheinlich palmitoyliert ist, und eine ebenfalls relativ kurze cytoplasmatische Region, in der sich die PPXY-Motive (auch PX-Boxen) befinden. Die vorhandenen PPXY-Motive werden von WW-Domänen [Einbond, Sudol 1996] des Typs I erkannt. Diese Domänen sind meistens Bestandteil von Ubiquitin-Ligasen. Zu diesen Vertretern gehören NEDD4, NEDD4L, WWP1, WWP2, ICTH, SMURF1, SMURF2, HECW1 und HECW2. Das Yes-

associated protein YAP1 / YAP65 wurde schon als WW-Bindungspartner des PPXY-Motivs von PRGP2 beschrieben [Kulman, Harris 2007]. Die mit der Bindung verknüpfte Funktion bleibt aber weiterhin ungeklärt. Grundsätzlich spielen die Ubiquitin-Ligasen der NEDD4 Familie eine Rolle bei der Ubiquitinierung von Transmembranproteinen. Wahrscheinlich ist das PPXY-Motiv auch Ubiquitin-Ligasen zugänglich und die vier Mitglieder der Gla-Familie werden durch diese ubiquitiniert. Meistens dient die Ubiquitinierung nicht dem Abbau durch das Proteasom (auch: Macropain) im Zytoplasma und Zellkern der Eukaryoten, sondern der Internalisierung der Membranproteine in Vesikel und dem späteren Abbau durch die *multivesicular bodies* (MVBs) im Endosom und Lysosom. Die vorliegenden Versuche und die bisher erschienen Literaturstellen legen eine Ubiquitinierung durch Ligasen und anschließende Internalisierung mit möglichem Abbau nahe.

Das paarweise Auftreten der PRGPs und TMGs könnte auch ein Hinweis auf eine Dimerisierung oder Multimerisierung der Proteine sein. Vielleicht bildet sich ein funktionsfähiger Proteinkomplex aus mehreren Untereinheiten aus. Aus der Proteinsequenz lassen sich solche Rückschlüsse nicht ziehen. Eine Art Kanalprotein ist eher unwahrscheinlich, weil Proteine mit PPXY-Motiven [Einbond, Sudol 1996] in der Literatur nicht im Zusammenhang mit Kanalproteinen oder als selbstständiges Kanalprotein geführt werden und auch keine Proteinsequenzhomologie mit diesen aufweisen. Es bleibt spekulativ welcher Mechanismus ausgelöst werden könnte, wenn ein Ligand an die Proteine bindet. Es bestände aber die Option einer Internalisierung eines Liganden nach Bindung durch die beschriebene Ubiquitinierung. Da der Ligand nicht bekannt ist, bleibt die Deutung einer unter Umständen ausgelösten Signaltransduktion oder Ligandeninternalisierung spekulativ.

Die Proteinfunktion könnte durch Einsatz von *knock out*-Mäusen besser untersucht werden. Alleine eine Veränderung des Phänotyps und somit eine morphologische, physiologische oder verhaltenstypische Veränderung könnte Rückschlüsse auf die Funktion der neuen Gla-Proteine geben. Unter der Annahme, dass ein extrazellulärer Bindungspartner internalisiert würde, könnte man, ausgehend von der physiologischen Zusammensetzung des Mäuseplasmas, quantitative Unterschiede mit geeigneten *Assays* auswerten. Die *Assayentwicklung* würde sich an den Leitstrukturen der postulierten Bindung orientieren, die sich aus den Veränderungen des Phänotyps ergeben würden. Falls eine Kalzifizierung der Gefäße [Schurgers, Cranenburg 2008] eintreten würde, ähnlich den Matrix-Gla Protein-*knock out*-Mäusen, läge sowohl eine Funktion des Proteins vor, als auch eine diagnostische Möglichkeit die Veränderung der Kalziumionenkonzentration im Mäuseplasma zu bestimmen. Tiermodelle bieten sich grundsätzlich an um eine Idee bezüglich der Gla-Protein Funktion zu erhalten. Es läge nahe Gerinnungs*assays* in Gerinnungsfaktor-*knock out*-Mäusen

[Renné, Pozgajová 2005] oder nicht-genveränderten Mäusen durchzuführen, um eine Beeinflussung der Blutgerinnung durch die Gla-Proteine zu erkennen. Die Verbreitung von γ -carboxylierten Proteinen in der Gerinnungskaskade ist von den Prothrombinfaktoren bekannt (vgl. Abb. 1.4) und es ist wahrscheinlich, dass die in der Arbeit untersuchten Gla-Proteine ebenfalls eine Funktion in diesem System ausüben. Der Einsatz von löslichen Gla(TMGP/PRGP)-GFP-FP in Tiermodellen (s.o.) könnte zeigen, ob bei Auslösung einer Verletzung eine Anreicherung der fluoreszierenden FP im Bereich der Zellwandschädigung oder des gebildeten Thrombus stattfinden würde. Falls keine Anreicherung an oder in Zellkompartimenten stattfinden würde, wäre es trotzdem möglich eine Beeinflussung der Gerinnung zu detektieren, falls durch Kontrollvergleich ein Effekt auf den zeitlichen Verlauf der Koagulation gemessen würde. Außerdem würden durch in vivo Experimente auch komplexe Vorgänge mit berücksichtigt, welche nicht auf einen Einzeleffekt, bzw. Liganden, zurückzuführen sind.

Es ist auch möglich, dass der physiologisch relevante Interaktor gar nicht gefunden werden konnte, weil es sich z. B. um ein zellgebundenes Oberflächenprotein handelt, das nicht im Plasma vorkommt. Ebenso ist es möglich, dass dieser nur in pathologischen Situationen oder durch grundsätzlich nicht konsistente pathologische Veränderungen bedingt ist.

Die postulierte Kalziumionen-vermittelte Bindung sorgt vielleicht auch nur für eine Konformationsänderung [Furie, Furie 1988] der Gla-Domäne. In diesem Fall müsste man den Fokus bei der Bindungspartnerauswertung verändern. So wird der Gerinnungsfaktor FVIII, ein Zweikettenmolekül, durch Kalziumionen zusammengehalten [Fav 2006]. Die Funktion ist also nicht in der Proteinbindung, sondern im intrazellulären Zusammenhalt der beiden Ketten zu suchen. Das könnte wiederum ein Hinweis für eine funktionelle Einheit der PRGP und TMG Proteine sein. Durch eine Koexpression der vier Proteine könnte man sicherstellen, dass sich Komplexe aus den Einzelproteinen formen, die dann gemeinsam als funktionelle Einheit auftreten. Diese Art der Expression und die daraus entstehenden Versuche sollte aber mit einem Zellverbund durchgeführt werden, weil eine Membranproteinpräparation oder eine Koexpression der vier Ektodomänen vermutlich keine funktionelle Einheit aus den Einzelproteinen entstehen ließe. Durch eine Röntgenstrukturanalyse der vier Proteindomänen, die jeweils mit und ohne Kalziumionen exprimiert werden, könnte man eine Konformationsänderung erkennen. So ließen sich erste Beweise herausstellen, dass Kalziumionen nicht direkt für eine Proteinbindung zuständig sind, sondern für die Proteinfaltung, die wiederum erst eine Proteinbindung ermöglicht.

Abschließend bleibt zu erwähnen, dass für neue Forschungsansätze zwingend ein spezifischer monoklonaler Antikörper für die jeweiligen Gla-Proteine entwickelt werden sollte. Nicht nur die Reinigung der Proteine sondern auch der Nachweis wäre essentiell verbessert worden. Die Antikörper sind außerdem der erste Schritt vor der Entwicklung eines spezifischen Aktivitäts- oder Bindungsassays. Die Problematik der Antikörperentwicklung besteht nicht nur in der sehr ähnlichen Proteinsequenz der vier Proteine, speziell bei den zwei Proteinen der Untergruppen, deren Homologie noch stärker ausgeprägt ist, sondern auch in der Unterscheidung zwischen der γ -carboxylierten und nicht- γ -carboxylierten Form. Die Verwendung kreuzreaktiver Antikörper könnte durch *Screening*methoden ausgeschlossen werden, wie bsp. der SPR-Technik. Eine Unterscheidung der γ -carboxylierten und nicht γ -carboxylierten Form, durch Immunisierung mit dem jeweiligen Antigen, sollte ebenfalls Ziel der Entwicklung sein.

VI. Zusammenfassung

Das Thema der Arbeit, die Identifikation eines möglichen Interaktionspartners für eine neue Familie γ -carboxylierter Proteine, wurde umfangreich untersucht. Für die erforderliche Ligandensuche wurden zuerst verschiedene Proteinkonstrukte erfolgreich in humanen Nierenzellen (HEK293-Zellen) exprimiert. Die Proteinexpression erforderte obligatorische Modifikationen der Proteinsequenz, um stabile und potentiell funktionsfähige Moleküle zu erhalten. Die Expression der Ektodomäne als Albuminfusion war ein Novum. Es wurden sowohl modifizierte Fusionsproteine exprimiert, als auch nicht modifizierte, native, membranständige Gla-Proteine.

Die Reinigungsentwicklung orientierte sich an etablierten Reinigungsverfahren γ -carboxylierter Proteine. Das Reinigungsverfahren erzielte eine ausreichende Reinheit der gewünschten Proteinsequenz und die enthaltene Fraktion der Gla-FP war zu 95% γ -carboxyliert. Die γ -Carboxylierung war das wichtigste Kriterium für die potentielle Funktionsfähigkeit der Ektodomänen.

Die Familie der membranständigen Gla-Proteine besitzt eine Ektodomäne, welche mit dem Gefäßsystem des Menschen in Kontakt steht. Die Ligandensuche erfolgte deshalb im humanen Plasma. Mit vielfältigen Methoden wurde versucht Liganden für die Gla-Proteine zu finden. Die Suche nach diesem erfolgte durch Bindungsassays auf zellulärer und plasmatischer Ebene. Es wurden Bindungsassays mit SPR-Methoden als auch Identifizierungsversuche mit *Magnetic Beads* in Kombination mit Massenspektrometrie durchgeführt. Die zellulären Assays basierten auf der Annahme, dass kein Bindungspartner im Plasma identifiziert werden konnte. Die Hauptzellarten des Blutes, Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten, wurden untersucht. Mit Thrombozyten zeigten sich gerinnungsähnliche Vorgänge, welche einer Gelbildung von aktivierten Thrombozyten entsprachen. Zusätzlich zur Ligandensuche fand erstmals überhaupt der fluoreszenzmikroskopische Nachweis der Lokalisation der nativen, nicht modifizierten Gla-Proteine in der Zellmembran statt.

Ein Ligand für die Gla-Proteine wurde auf molekularer Ebene nicht gefunden; auch führten zelluläre Bindungspartner nicht zum gewünschten Bindungsergebnis mit einem in der Zellmembran der untersuchten Zellen lokalisierten Protein. Dennoch gibt es Überlegungen für weiterführende Ansätze. Denkbar sind Interaktionen mit *small molecules* oder ionischen Verbindungen, welche mit den eingesetzten Methoden nicht detektiert werden konnten.

Möglicherweise muss auch ein Rezeptorverbund als Bindungsschnittstelle vorhanden sein, welcher ebenfalls nicht mit den vorhandenen Methoden getestet werden konnte. Auch mehrstufige zelluläre Prozesse konnten nicht abgebildet werden. Die offenen Fragen bieten Ansätze für weitere Forschungsprojekte, welche in der Schlussfolgerung näher ausgeführt werden.

VII. Literaturverzeichnis

Aktimur, A., Gabriel, M. A., Gailani, D., Toomey, J. R. (2003) The Factor IX γ -Carboxyglutamic Acid (Gla) Domain Is Involved in Interactions between Factor IX and Factor XIa *The Journal of Biological Chemistry* 278 (10), 7981-7987

Amersham Biosciences, Affinity chromatography handbook: Principles and methods 1, (2001), www.amershambiosciences.com

Andersen, J. T., Sandie, I. (2009) The versatile MHC class I-related FcRn protects IgG and albumin from degradation: implications for development of new diagnostics and therapeutics

Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., Pedersen, J. (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins *Protein Expression and Purification* 48, 1-13

Atoda, H., Kaneko, H., Mizuno, H., Morita, (2002) T. Calcium-binding analysis and molecular modeling reveal echis coagulation factor IX/factor X-binding protein has the Ca-binding properties and Ca ion-independent folding of other C-type lectin-like proteins *FEBS Letters* 531, 229-234

Baekkeskov, S., Kanaani, J. (2009) Palmitoylation cycles and regulation of protein function *Molecular Membrane Biology* 26 (1), 42-54

Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F. (1998) Handbook of Proteolytic Enzymes *Academic Press*, London, 1st edition

Barthels, M., von Depka, Mario (2003) Das Gerinnungskompodium *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart

Benzakour, O. (2008) Vitamin K-dependent proteins: Functions in blood coagulation and beyond *Thrombosis and Haemostasis* 100 (4), 527-529

Birnboim, H. C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA *Nucleic Acids Research* 7 (6), 1513-1523

Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer H. W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles *Gene* 2 (2), 95-113

Booth, P. J., Templer, R. H., Meijberg, W., Allen, S. J., Curran, A. R., Lorch, M. (2001) In Vitro Studies of Membrane Protein Folding *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 36 (6), 501-603

Bork, P., Sudol, M. (1994) The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends in Biochemical Sciences* 19 (12), 531-533

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Analytical Biochemistry* 72, 248-254

Bristol, J. A., Furie, B. C., Furie, B. (1993) Propeptide Processing during Factor IX Biosynthesis – Effect of Point Mutations Adjacent to the Propeptide Cleavage Site *The Journal of Biological Chemistry* 266 (10), 7577-7584

Brown, M. A., Stenberg, L. M., Persson, U., Stenflo, J. (2000) Identification and Purification of Vitamin K-dependent Proteins and Peptides with Monoclonal Antibodies Specific for γ -Carboxyglutamyl (Gla) Residues *The Journal of Biological Chemistry* 275, (26), 19795-19802

Chen, Z-H., Brown, R. L., Lax, A. R., Cleveland, T. E., Russin, J. S. (1999) Inhibition of Plant-Pathogenetic Fungi by a Corn Trypsin Inhibitor Overexpressed in *Escherichia coli* *Applied and Environmental Microbiology* 65 (3), 1320-1324

Chevalier, F., Lucas, R., Angulo, J., Martin-Lomas, M., Nieto, P. M. (2004) The heparin-Ca(2+) interaction: the influence of the O-sulfation pattern on binding *Carbohydrate Research* 339 (5), 975-983

Cohn, E. J., Hughes, L. E., Hughes, W. L., Mulford, D. J., Asworth, J. N., Melin, M. Taylor, H. C. (1946) Preparation and properties of serum and proteins. A system for separation of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids *Journal of the American Chemical Society* 68, 459-475

Colman, R. W., Hirsh, J., Marder, V. J., Salzman, E. W. (1994) Hemostasis and Thrombosis *J. B. Lippincott Company*, Philadelphia, 3rd edition

Darwin, Charles (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life* John Murray, London, 1st edition

Deutscher, M. P. (1990) Guide to Protein Purification – Methods in Enzymology *Academic Press*, SanDiego, 182

Einbond, A., Sudol, M. (1996) Towards prediction of cognate complexes between the WW domain and proline rich ligands *FEBS Letters* 384, 1-8

Emanuelsson, O., Brunak, S., Heijne, G., Nielsen, (2007) H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools *Nature Protocols* 2, 953-971

Erb, E.-M., Stenflo, J., Drakenberg, T. (2002) Interaction of bovine coagulation factor X and its glutamic-acid-containing fragments with phospholipid membranes – A surface plasmon resonance study *European Journal of Biochemistry* 269, 3041-3046

Fan, X., White, I. M., Shopova, S. I., Zhu, H., Suter, J. D., Sun, Y. (2008) Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review *Analytica Chimica Acta* 620, 8-26

Fav, P. J. (2006) Factor VIII structure and function *International Journal of Hematology* 82 (2), 103-108

Furie B., Bouchard, B. A., Furie, B. C. (1999) Vitamin K-Dependent Biosynthesis of gamma - Carboxyglutamic Acid *Blood* 93, 1798-1808

Furie, B., Furie, B. C. (1988) The molecular basis of blood coagulation *Blood* 53, 505-518

Furie, B. C., Ratcliffe, J. V., Tward, J., Jorgensen, M. J., Blaszkowsky, L. S., DiMichele, D., Furie, B. (1997) The γ -Carboxylation Recognition Site Is Sufficient to Direct Vitamin K-dependent Carboxylation on an Adjacent Glutamate-rich Region of Thrombin in a Propeptide-Thrombin Chimera *The Journal of Biological Chemistry* 272 (45), 28258-28262

Gallicano, G. I., Kouklis, P., Bauer, C., Yin, M., Vasioukhin, V., Degenstein, L. (2004) Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage *Journal of Cell Biology* 143 (7), 2009-2022

Grant, D., Long, W. F., Williamson, F. B. (1991) N.m.r. spectroscopy of Ca(2+)-heparin suggests delocalized binding of the cation *Biochemical Society Transactions* 19 (4), 390

Gresele, P., Page, C., Fuster, V., Vermynen, J. (2002) Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders – Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics *Cambridge University Press*, Cambridge

Grobunoff, M. J. (1990) Methods in Enzymology: Chromatography on Hydroxyapatite Columns *Academic Press*, San Diego, 182, 329-339

Gu, H., Ho, P-L., Tsang, K. W. T., Wang, L., Xu, B. (2003) Using Biofunctional Magnetic Nanoparticles to Capture Vancomycin-Resistant Enterococci and Other Gram-Positive Bacteria at Ultralow Concentration *Journal of the American Chemical Society* 125, 15702-15703

Haeberli, A. (1992-1995) Human Protein Data, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, Weinheim

Hallgren, K. W., Qian, W., Yakubenko, A. V., Runge, K. W., Berkner, K. L. (2006) r-VKORC1 Expression in Factor IX BHK Cells Increases the Extent of Factor IX Carboxylation but Is Limited by Saturation of Another Carboxylation Component or by a Shift in the Rate-Limiting Step *Biochemistry* 45, 5587-5598

Hansson, K., Stenflo, J. (2005) Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (3), 2633-2648

Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Smith, P. K. (1992) Immobilized Affinity Ligand Techniques *Academic Press* 1st edition

Hershko, A., Ciechanover, A. (1992) The Ubiquitin system for protein degradation *Annual Review of Biochemistry* 61, 761-807

Hoa, X. D., Kirk, A.G., Tabrizian, M. (2007) Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: a review of recent progress *Biosensors and Bioelectronics* 23 (2), 151-160

Homola, J. (2003) Present and future of surface plasmon resonance biosensors *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377 (3), 528-539

Homola, J. (2008) Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species *Chemical Reviews* 108 (2), 462-493

Homola, J., Yee, S.S., Gauglitz, G. (1999) Surface Plasmon Resonance *Sensors Sensors and Actuators B* 54, 3-15

Iovanna, J. L., Dagorn, J.-C. (2005) The multifunctional family of secreted proteins containing a C-type lectin-like domain linked to a short N-terminal peptide *Biochimica et Biophysica Acta* 1723 (1-3), 8-18

IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1968) A One-Letter Notation for Amino Acid Sequences Tentative Rules the journal of Biological Chemistry 243 (13), 3557-3559

Jason-Moller, L., Murphy, M., Bruno, J. (2006) Overview of Biacore Systems and Their Applications *Current Protocols in Protein Science* (45), 19.13.1-19.13.14

Jastrow, H., Weber, A. A. (2009) Grundlagen der Thrombozytenpharmakologie *Pharmazie in unserer Zeit* (4) 38, 302-304

Jeppsson, J. O., Laurell, C. B., Franzén, B. (1979) Agarose Gel Electrophoresis *Clinical Chemistry* 25 (4), 629-638

Jongen, W. M., Fitzgerald, D. J., Asamoto, M., Piccoli, C., Slaga, T. J., Gros, D., Takeichi, M., Yamasaki, H. (1991) Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communications by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-Cadherin *Journal of Cell Biology* 114, 545-555

Kawasaki, T. (1991) Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing *Journal of Chromatography* 544, 147-184

Kulman, J. D., Harris, J. E., Hademan, B. A., Davie, E. W. (1997) Primary structure and tissue distribution of two novel proline-rich γ -carboxyglutamic acid proteins *Proceedings of the National Academy of Science* 94, 9058-9062

Kulman, J. D., Harris, J. E., Nakazawa, N., Ogasawara, M., Satake, M., Davie, E. W. (2006) Vitamin K-dependent proteins in *Ciona intestinalis*, a basal chordate lacking a blood coagulation cascade *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 15794-15799

Kulman, J. D., Harris, J. E., Xie, L., Davie, E. W. (2001) Identification of two novel transmembrane γ -carboxyglutamic acid proteins expressed broadly in fetal and adult tissues *Proceedings of the National Academy of Science* 98 (4), 1370-1375

Kulman, J. D., Harris, J. E., Xie, L., Davie, E. W. (2007) Proline-rich Gla protein 2 is a cell-surface vitamin K-dependent protein that binds to the transcriptional coactivator YES-associated protein *Proceedings of the National Academy of Science* 104 (21), 8767-8772

Kulman, J. D., Satake, M., Harris, J. E. (2007) A versatile system for site-specific enzymatic biotinylation and regulated expression of proteins in cultured mammalian cells *Protein Expression and Purification* 52, 320-328

Lalonde, S., Ehrhardt, D. W., Loque', D., Chen, J., Rhee, S. Y., Frommer, W. B. (2008) Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: latest techniques and current limitations *The Plant Journal* 53, 610-635

Lentner, Cornelius (Redaktion) (1985) Wissenschaftliche Tabellen Geigy – Teilband Hämatologie und Humangenetik *CIBA-GEIGY AG*, Basel, 8. Auflage 4. Nachdruck

Lentner, Cornelius (Redaktion) (1985) Wissenschaftliche Tabellen Geigy – Teilband Statistik *CIBA-GEIGY AG*, Basel, 8. Auflage 2. Nachdruck

Lentner, Cornelius (Redaktion) (1982) Wissenschaftliche Tabellen Geigy – Teilband Somatometrie, Biochemie *CIBA-GEIGY AG*, Basel, 8. Auflage

Lentner, Cornelius (Redaktion) (1985) Wissenschaftliche Tabellen Geigy – Teilband Körperflüssigkeiten *CIBA-GEIGY AG*, Basel, 8. Auflage 4. Nachdruck

Lodish, H., Berk, a., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. E. (2001) Molekulare Zellbiologie *Spektrum Akademischer Verlag Co-Publikation*, 4. Auflage

Mandel, M., Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection *Journal of Molecular Biology* 53, 159-162

Meyer, R. A., Laird, D. W., Revel, J. P., Johnson R. G. (1992) Inhibition of gap junctions and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies *Journal of Cell Biology* 119, 179-189

Meyer, V. R. (2006) Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, Weinheim, 9. Auflage 1. Nachdruck

Michal, G. (1999) Biochemical Pathway: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology *John Wiley & Sons, Inc. and Spektrum Akademischer Verlag Co-Publikation*

Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Schäfer-Korting, M. (2001) Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart*, 8. Auflage

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites *Protein Engineering* 10, 1-6

Ohkubo, Y. Z., Tajkhorshid, E. (2008) Distinct Structural and Adhesive Roles of Ca²⁺ in Membrane Binding of Blood Coagulation Factors *Structure* 16, 72-81

Orth, D. S., Anderson, A. W., Montgomery, M. W. (1969) Activation of Coagulase Clotting by Trypsin Inhibitor *Microbiology* 18 (5), 906-910

Price, P. A., Faus, S. A., Williamson, M. K. (1998) Warfarin Causes Rapid Calcification of the Elastic Lamellae in Rat Arteries and Heart Valves *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 18, 1400-1407

Price, P. A., Williamson, M. K. (1985) Primary Structure of Bovine Matrix Gla Protein, a New Vitamin K-dependent Bone Protein *The Journal of Biological Chemistry* 260 (28), 14971-14975

Quinlan, G. J., Martin, G. S., Evans, T. W. (2005) Albumin: Biochemical Properties and Therapeutic Potential *Hepatology* 41 (6), 1211-1219

Rabilloud, T., Carpentier, G., Tarroux, P. (1988) Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite *Electrophoresis* 9 (6), 288-291

Ravanat, C., Wurtz, V., Ohlmann, P., Fichter, M., Cazenave, J.-P., VanDorsseleer, A., Lanza, F., Gachet, C. (2009) Use of tandem Biacore-mass spectrometry to identify platelet membrane targets of novel monoclonal antibodies *Analytical Biochemistry* 386, 237-243

Renné, T., Pozgajová, M., Grüner, S., Schuh, K., Pauer, H. U., Burfeind, P., Gailani, D., Nieswandt, B. (2005) Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII *The Journal of Experimental Medicine* 203 (3), 493-495

Rezaie, A. R. (1998) Calcium enhances heparin catalysis of the antithrombin-factor Xa reaction by a template mechanism. Evidence that calcium alleviates Gla domain antagonism of heparin binding to factor Xa *The Journal of Biological Chemistry* 273 (27), 16824-16827

Safarik, I. Safarikova, M. (2004) Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides *BioMagnetic Research and Technology* 2, 1-17

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase *Science* 239 (4839), 487-491

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2nd edition

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12), 5463-5467

Sayeed, A., Davis, T. W. (2005) Search and Destroy: ER Quality Control and ER-Associated Protein Degradation *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 40, 75-91

Schneider, H.-J. (2008) Ligand binding to nucleic acids and proteins: Does selectivity increase with strength *European Journal of Medicinal Chemistry* 43 (11), 2307-2315

Schultze, H. E., Heremans, J. F. (1966) *Molecular Biology of Human Proteins* Elsevier, Amsterdam, Vol I, S. 182

Schurgers, L. J., Cranenburg, E. C. M., Vermeer, C. (2008) Matrix Gla-protein: The calcification inhibitor in need of vitamin K *Thrombosis and Haemostasis* 100 (4), 593-603

Seppänen-Laakso, T., Laakso, I., Vanhanen, H., Kiviranta, K., Lehtimäki, T., Hiltunen, R. (2001) Major human plasma lipid classes determined by quantitative high-performance liquid chromatography, their variation and associations with phospholipids fatty acids *Journal of Chromatography B* 754, 437-445

Shearer, M. J., Newman, P. (2008) Metabolism and cell biology of vitamin K *Thrombosis and Haemostasis* 100 (4), 530-547

Shiau, A. K., Massari, M. E., Ozbal, C. C., (2008) Back to Basics: Label-Free Technologies for Small Molecule Screening *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 11, 231-237

Singer, M., Berg, P. (1992) *Gene und Genome* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Skerra, A. (2003) Das Strep-tag als molekulares Werkzeug zur Hochdurchsatz-Proteinreinigung in der Proteomforschung *Biospektrum* 9 (2), 189-193

Soltis, R. D., Hasz, Diane, Morris, M. J., Wilson, I. D. (1979) The effect of heat inactivation of serum on aggregation of Immunoglobulins *Immunology* 36, 37-45

Stafford, D. W. The vitamin K cycle *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3, 1873-1878 (2005)

Sudol, M., Bork, P., Einbond, A., Kastury, K., Druck, T., Negrini, M., Huebner, K., Lehman, D. (1995) Characterization of the Mammalian YAP (YES-associated Protein) Gene and Its Role in Defining a Novel Protein Module, the WW Domain *The Journal of Biological Chemistry* 270 (24), 14733-14741

Thomas, L. (1981) Eiweiß-Elektrophorese – Grundlagen, Technik, Fehlermöglichkeiten und Bewertung der Eiweißtrennung auf Celluloseacetatfolie *Urban & Schwarzenberg München*

Tsai, C.-J., Buyong, K., Sandeep, son, H. W. I., Nussinov, R. (2001) Protein Folding: Binding of Conformationally Fluctuating Building Blocks Via Population Selection *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 36 (5), 399-433

Uchino, T., Sakurai, Y., Nishigai, M., Takahashi, T., Atsushi, H., Takahashi, K. (1993) Isolation and Characterization of a Novel Serine Proteinase Complexed with α_2 -Macroglobulin from Porcine Gastric Mucosa *The Journal of Biological Chemistry* 266 (1), 527-533

Udby, L., Sørensen, O. E., Pass, J., Johnsen, A. H., Behrendt, N., Borregaard, N., Kjeldsen, L. (2004) Cysteine-rich secretory protein 3 is a ligand of alpha1B-glycoprotein in human plasma *Biochemistry* 43(40), 12877-86

van Anken, E., Braakman, I. (2005) Versatility of the Endoplasmic Reticulum Protein Folding Factory *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 40 (4), 191-228

Wallin, R., Cain, D., Sane, D. C. (1999) Matrix Gla Protein Synthesis and Gamma-carboxylation in the Aortic Vessel Wall and Proliferating Vascular Smooth Muscle Cells – A Cell System which Resembles the System in Bone Cells *Thrombosis and Haemostasis* 82, 1764-1767

Wang, J.-C., Derynck, M. K., Nonaka, D. F., Khodabakhsh, D. B., Haqq, C., Yamamoto, K. R. (2004) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (44), 15603-15608

Weimer, T., Wormsbäcker, W., Kronthaler, U., Lang, W., Liebing, U., Schulze, S., (2008) Prolonged in-vivo half-life of factor VIIa by fusion to albumin *Thrombosis and Haemostasis* 59, 659-667

Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T. R., Fareed, G. C., Richardson, C. C. (1968) Enzymatic breakage and joining of desoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4 *Journal of Biological Chemistry* 243 (17), 4543-4555

Westermeier, R. (1990) *Elektrophorese-Praktikum Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*

Wu, S.-M., Soute, B. A. M., Vermeer, C., Stafford, D. W. (1990) In Vitro γ -Carboxylation of a 59-Residue Recombinant Peptide Including the Propeptide and the γ -Carboxyglutamic Acid Domain of Coagulation Factor IX *The Journal of Biological Chemistry* 265 (22), 13124-13129

Xie, H. (2008) Activity assay of membrane transport proteins *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 40 (4), 269-277

Zhang, J. P., Wang, Q., Smith, T. R., Hurst, W. E., Sulpizio, T. (2005) Endotoxin Removal Using a Synthetic Adsorbent of Crystalline Calcium Silicate Hydrate *Biotechnology Progress* 21, 1220-1225

VIII. Anhang

8.1 Exprimierte Proteinsequenzen, basierend auf Plasmidkonstrukten

1533*:

MRGHPSLLLLYMALTTCLDTSPSEETDQEVFLGPPEAQSFLSSHTRIPRANHWDLELL
TPGNLERECLEERCSWEEAREYFEDNTLTERFWESYIYNGKGGRGRVDVASHHHHH
H

1534*:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCAVFLEAKDAHSVLKRFPRANEFLEELRQGTIERECMEEI
CSYEEVKEVFENKEKTMEFWKGYPNNAVYSVRDPSQSSDHHHHHH

1535*:

MFTLLVLLSQLPTVTLGFPHCARGPKASKHAGEEVFTSKEEANFFIHRRLLYNRFDLE
LFTPGNLERECNEELCNYEEAREIFVDEDKTIAFWQEYSAKGPTTKSDGNREKIDHHH
HHH

1536*:

MRGHPSLLLLYMALTTCLDTSPSEETDQEVFLGPPEAQSFLSSHTRIPRANHWDLELL
TPGNLERECLEERCSWEEAREYFEDNTLTERFWESYIYNGKGGRGRVDVASHHHHH
H

1537*:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCAVFLEAKDAHSVLKRFPRANEFLEELRQGTIERECMEEI
CSYEEVKEVFENKEKTMEFWKGYPNNAVYSVRDPSQSSDHHHHHH

1538*:

MFTLLVLLSQLPTVTLGFPHCARGPKASKHAGEEVFTSKEEANFFIHRRLLYNRFDLE
LFTPGNLERECNEELCNYEEAREIFVDEDKTIAFWQEYSAKGPTTKSDGNREKIDHHH
HHH

1539*:

MRGHPSLLLLYMALTTCLDTSPSEETDQEVFLGPPEAQSFLSSHTRIPRANHWDLELL
TPGNLERECLEERCSWEEAREYFEDNTLTERFWESYIYNGKGGRGRVDVASKK

1540*:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCAVFLEAKDAHSVLKRFPRANEFLEELRQGTIERECMEEI
CSYEEVKEVFENKEKTMEFWKGYPNNAVYSVRDPSQSSDKK

1541*:

MFTLLVLLSQLPTVTLGFPHCARGPKASKHAGEEVFTSKEEANFFIHRRLLYNRFDLE
LFTPGNLERECNEELCNYEEAREIFVDEDKTIAFWQEYSAKGPTTKSDGNREKIDKK

1542*:

MRGHPSLLLLYMALTTCLDTSPSEETDQEVFLGPPEAQSFLSSHTRIPRANHWDLELL
TPGNLERECLEERCSWEEAREYFEDNTLTERFWESYIYNGKGGRGRVDVASKK

1543*:

MFTLLVLLSQLPTVTLGFPHCARGPKASKHAGEEVFTSKEEANFFIHRRLLYNRFDLE
LFTPGNLERECNEELCNYEEAREIFVDEDKTIAFWQEYSAKGPTTKSDGNREKIDKK

1544*:

MRGHPSLLLLYMALTTCLDTSPSEETDQEVFLGPPEAQSFLSSHTRIPRANHWDLELL
TPGNLERECLEERCSWEEAREYFEDNTLTERFWESYIYNGKGGRGRVDVASHHHHH
HKK

1545*:

MFTLLVLLSQLPTVTLGFPHCARGPKASKHAGEEVFTSKEEANFFIHRRLLYNRFDLE
LFTPGNLERECNEELCNYEEAREIFVDEDKTIAFWQEYSAKGPTTKSDGNREKIDHHH
HHHKK

1546*:

MRGHPSLLLLYMALTTCLDTSPSEETDQEVFLGPPEAQSFLSSHTRIPRANHWDLELL
TPGNLERECLEERCSWEEAREYFEDNTLTERFWESYIYNGKGGRGRVDVASQWSHP
QFEK

1547*:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCAVFLEAKDAHSVLKRFPRANEFLEELRQGTIERECMEEI
CSYEEVKEVFENKEKTMEFWKGYPNVYSVRDPSQSSDQWSHPQFEK

1548*:

MFTLLVLLSQLPTVTLGFPHCARGPKASKHAGEEVFTSKEEANFFIHRRLLYNRFDLE
LFTPGNLERECNEELCNYEEAREIFVDEDKTIAFWQEYSAKGPTTKSDGNREKIDQWS
HPQFE

1549*:

MRGHPSLLLLYMALTTCLDTSPSEETDQEVFLGPPEAQSFLSSHTRIPRANHWDLELL
TPGNLERECLEERCSWEEAREYFEDNTLTERFWESYIYNGKGGRGRVDVASQWSHP
QFEK

1550*:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCAVFLEAKDAHSVLKRFPRANEFLEELRQGTIERECMEEI
CSYEEVKEVFENKEKTMEFWKGYPNVYSVRDPSQSSDQWSHPQFEK

1551*:

MRGHPSLLLLYMALTTCLDTSPSEETDQEVFLGPPEAQSFLSSHTRIPRANHWDLELL
TPGNLERECLEERCSWEEAREYFEDNTLTERFWESYIYNGKGGRGRVDVASLAVGLT
GGILLIVLAGLGAFWYLRWRQHRGQQPCPQEAGLISPLSPLNPLGPPTPLPPPPPPPG
PTYEQALAASGVHDAPPPPYTSLRRPHEFHKGEFV

1552*:

MFTLLVLLSQLPTVTLGFPHCARGPKASKHAGEEVFTSKEEANFFIHRRLLYNRFDLE
LFTPGNLERECNEELCNYEEAREIFVDEDKTIAFWQEYSAKGPTTKSDGNREKIDVMG
LLTGLIAAGVFLVIFGLLGYLCLITKCNRLQHPSSAVYERGRHTPSIIFRRPEEAALSP
LPPSVEDAGLPSYEQAVLTKHSVSPPPYPGHTKGFRVFKKSMSPSHEFHKGEFV

1553*:

MRGHPSLLLLYMALTTCLDTSPSEETDQEVFLGPPEAQSFSSHTRIPRANHWDLELL
TPGNLERECLEERCSWEEAREYFEDNTLTERFWESYIYNGKGRGRVDVAS

1554*:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCAVFLEAKDAHSVLKRFPRANEFLEELRQGTIERECMEEI
CSYEEVKEVFENKEKTMEFWKGYPNNAVYSVRDPSQSSD

1555*:

MFTLLVLLSQLPTVTLGFPHCARGPKASKHAGEEVFTSKEEANFFIHRRLLYNRFDL
LFTPGNLERECNEELCNYYEAREIFVDEDKTIAFWQEYSAKGPTTKSDGNREKIDVMG
LLTGLIAAGVFLVIFGLLGYLCLITKCNRLQHPCCSAVYERGRHTPSIIFRRPEEAALSP
LPPSVEDAGLPSYEQAVALTRKHSVSPPPYPGHTKGFRVFKKSMPLPSH

1558*:

MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR**DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI**AFAQYLQ
QCP**FEDHV**KL**VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE**
MADCCAKQEPERNE**CFLQHKDDNP**NL**PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL**
YEIARRHPYFYAPELL**FFAKRYKAA**FT**ECQAADKAA**CL**PKLDEL**RDEGKASS
AKQRLK**CASLQK**FG**ERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLV**TDLTKVHTECC
HGD**LLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPAD**
LPSLAAD**FVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV**VLLLR**LAKTYET**
TLEK**CCAAADPH**ECYAK**VDEFKPLVEEPQNL**IK**QNC**ELFEQLGEYK**FQNALLV**
RYTKK**VPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMP**CAEDYLS**VVLNQLCV**
LHEK**TPVSDRVT**K**CTESLVNRRPCFSALE**VDETYVPKEF**NAETFTFHADICTLS**
EKERQIK**KQ**TALVELVK**HKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK**ADDKET**CFA**
EEG**KKLVAASQAALGL**GGSAVFVTQEEAHGVL**HRRRRY**NRFDLELFTPGNLEREC
NEELCNYYEAREIFVDEDKTIAFWQEYSAKGPTTKSDGNREKID**HHHHHH**

1559*:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAV**FVTQEEAHGVLHRRRRY**NRFDLELFTPGN**LE**
RECNEELCNYYEAREIFVDEDKTIAFWQEYSAKGPTTKSDGNREKID**HHHHHH**

1560*:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAV**FVTQEEAHGVLHRRRRY**NRFDLELFTPGN**LE**
RECNEELCNYYEAREIFVDEDKTIAFWQEYSAKGPTTKSDGNREKID**HHHHHH**LEV
LFQGP**TGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI**AFAQYLQ**QCP**FEDHV**KL**VNEV**T**
E**FAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE**
C**FLQHKDDNP**NL**PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL**YEIARRHPYFYA**PEL**
L**FFAKRYKAA**FT**ECQAADKAA**CL**PKLDEL**RDEGKASSAKQRLK**CASLQK**FG
E**RAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLV**TDLTKVHTECC**HGD**LLECADDRADL
A**KYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAAD**FVESKDV
C**KNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV**VLLLR**LAKTYETTLEKCCAAADPH**
E**CYAKVDEFKPLVEEPQNL**IK**QNC**ELFEQLGEYK**FQNALLVRYTKKVPQVSTP**
T**LVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMP**CAEDYLS**VVLNQLCVLHEKTPVSDRVT**
K**CTESLVNRRPCFSALE**VDETYVPKEF**NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ**TAL
V**ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK**ADDKET**CFAEEGKKLVAASQA**
AL**GL**

1575*:

MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR**DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI**AFAQYLQ
QCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE
MADCCA**KQEPERNECFLQHKDDNP**NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL
YEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA**CLLPKLDEL**RDEGKASS
AKQRLKCASLQK**FGERA**FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECC
HGD**LLECADDRADLAKYICENQDS**ISSKLKECCEK**P**LEKSHCIAEVENDEMPAD
LPSLAAD**FVESKDVCKNYAEAKDV**FLGMFLY**EYARRHPDYSV**VLLLRLAKTYET
TLEK**CCAAADPHECYAKV**DEFKPLVEEPQ**NLIKQNC**ELFEQLGEYKFQ**NALLV**
RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKH**PEAKRMP**CAEDYLSVVLNQLCV
LHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD**E**TYVPKEFNAETFTFHADICTLS
EKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEK**CCKADDKETCFA**
EKGKLVAASQAALGL

1592*:

MVSQALRLLCLLLGLQGC**LA**AV**FVTQEEAHGVLHRRRR**RANEFLEELRQGTIERE
CMEEICSYEEVKEVFENKEKTMEFWKGYPN**AVYSVRDPSQSSD**HHHHHH

1595*:

MVSQALRLLCLLLGLQGC**LA**AV**FVTQEEAHGVLHRRRR**RANEFLEELRQGTIERE
CMEEICSYEEVKEVFENKEKTMEFWKGYPN**AVYSVRDPSQSSD**HHHHHHLEVL**FQ**
PTG**DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI**AFAQYLQ**QCPFEDHV**KL VNEVTEFAK
TCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA**KQEPERNECFLQ**
HKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL**YEIARRHPYFYAPELLFFA**
KRYKAAFTECCQAADKAA**CLLPKLDEL**RDEGKASSAKQRLK**CASLQK**FGERA**F**
KAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECC**HGD**LLECADDRADLAKYI
CENQDSISSKLKECCEK**P**LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAAD**FVESKDVCKNY**
AEAKDVFLGMFLY**EYARRHPDYSV**VLLLRLAKTYETTLEK**CCAAADPHECYAK**
VDEFKPLVEEPQNLIKQNC**ELFEQLGEYKFQ**NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEV
SRNLGKVGSKCCKH**PEAKRMP**CAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTE
SLVNRRPCFSALEVD**E**TYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVK
HKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFA**EKGKLV**AASQAALGL

1686*:

MASKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT**LKFICTTGKLPVP**
WPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGNYKTRA**EV**
KFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN**SHNVYITADKQKNGIKANFKIRHN**
IEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS**KDPNEKRDHMLLEFVTA**
GITHGMD...

1689*:

MAVFLEAKDAHSVLKRFPRANEFLEELRQGTIERECMEEICSYEEVKEVFENKEKT**M**
EFWKGYPN**AVYSVRDPSQSSD**AMYVVVPLLGVALLIVIALFIIWRCQLQKATRH**HP**
YAQNRYLASRAGHTLPRVMVYRGT**VHSQGEPSGH**REAASSPQVVLG**PSRGGRTTVR**
LESTLYLPELSLSRLSSTTPPPSYEEVTAPQESS**SEEASVSYS**DP**PPKYEEI**VAANPGAD
KGGSGSGSGSGSGS**ASKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGK**
LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISF
KDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN**SHNVYITADKQ**
KNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEK**R**
DHMLLEFVTAAGITHGMD...

1690*:

MFTLLVLLSQLPTVTLGFPHCARGPKASKHAGEEVFTSKEEANFFIHRRLLYNRFDLE
 LFTPGNLERECNEELCNYYEEAREIFVDEDKTIAFWQEYSAKGPTTKSDGNREKIDVMG
 LLTGLIAAGVFLVIFGLLGYLCLITKCNRLQHPCSSAVYERGRHTPSIIFRRPEEAALSP
 LPPSVEDAGLPSYEQAVALTRKHSVSPPPYPGHTKGFRVFKKSMPLSHGGSGGSGS
 GSGSGSASKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTG
 KLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGNYKT
 RAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYITADKQKNGIKANF
 KIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLVLE
 FVTAAGITHGMD...

1928*:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRRANEFLEELRQGTIERE
 CMEEICSYEEVKEVFENKEKTMEFWKGYPNNAVYSVRDPSQSSDHHHHHSSSSKKK
 KKK

1929*:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRRYNRFDLELFTPGNLER
 ECNEELCNYYEEAREIFVDEDKTIAFWQEYSAKGPTTKSDGNREKIDHHHHHSSSSK
 KKKKK

2122*:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRRANEFLEELRQGTIERE
 CMEEICSYEEVKEVFENKEKTMEFWKGYPNNAVYSVRDPSQSSDHHHHHSSSSKKK
 KKK..MESDEGLPAMEIECRITGTLNGVEFELVGGGEGTPEQGRMTNKMSTKGAL
 TFSPYLLSHVMGYGFYHFGTYPSGYENPFLHAINNGGYTNTRIEKYEDGGVLHVSFS
 YRYEAGRVIKDFKVMGTGFPEDSVIFTDKIIRS NATVEHLHPMGDNDLDGSFTRTFSL
 RDGGYYSSVVD SHMHFKSAIHPSILQNGGPMFAFRRVEEDHSNTELGIVEYQHAFKT
 PDADAGEE

2123*:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRRYNRFDLELFTPGNLEREC
 NEELCNYYEEAREIFVDEDKTIAFWQEYSAKGPTTKSDGNREKIDHHHHHSSSSKKK
 KKK..MESDEGLPAMEIECRITGTLNGVEFELVGGGEGTPEQGRMTNKMSTKGAL
 TFSPYLLSHVMGYGFYHFGTYPSGYENPFLHAINNGGYTNTRIEKYEDGGVLHVSFS
 YRYEAGRVIKDFKVMGTGFPEDSVIFTDKIIRS NATVEHLHPMGDNDLDGSFTRTFSL
 RDGGYYSSVVD SHMHFKSAIHPSILQNGGPMFAFRRVEEDHSNTELGIVEYQHAFKT
 PDADAGEE

Tab. 8.1 Proteinsequenzen, dargestellt als One-Letter Amino Acid Code [IUPAC-IUB 1968]; farbliche Markierungen entsprechend Abb. 2.1; Klonnummer*: Bezeichnung des exprimierten Konstruktes entsprechend dem verwendeten Plasmid (vgl. Tab. 2.7)

8.2 Verwendete Primer / Oligonukleotidliste

NAME_SYN	Beschreibung	Sequenz	Strang	Verw.-zweck ¹	TM
We2744	1.PCR_PRGP1 forw.	Caggacgtgccagaaacc	+	PCR	62
We2745	1.PCR_PRGP1 rev.	GCTTCATTTGATGGTGGTGAC	-	PCR	64
We2746	2.PCR_PRGP1 forw.	CATGGGGAGGGTTTTCTC	+	PCR	60
We2747	2.PCR_PRGP1 rev.	Gtgtagaaagtcttccattag	-	PCR	62
We2748	1.PCR_PRGP2 forw.	CTGAAAAATATGAGGGGCCAC	+	PCR	64
We2749	1.PCR_PRGP2 rev.	GCACGGTTCGGAGAGCCG	-	PCR	62
We2750	2.PCR_PRGP2 forw.	TATGAGGGGCCACCCCTC	+	PCR	60
We2751	2.PCR_PRGP2 rev.	GGTCTCGAAAAGCAGCTCTC	-	PCR	62
We2762	1.PCR_TMG4 forw.	GGGGGCTGCTGGAACATG	+	PCR	60
We2763	1.PCR_TMG4 rev.	CACCATGCCCGCCTATC	-	PCR	60
We2764	2.PCR_TMG4 forw.	GACACAGTTTGTGACAGTTG	+	PCR	62
We2765	2.PCR_TMG4 rev.	GACAAGGTAGTCAGTGAGATG	-	PCR	62
We2779	del EcoRI in PRGP1	GCGTGAGTGCAAAGAAGgTTCTGTACATTTGAAGAAGC	+	Mutagenese	78,5
We2780	del EcoRI in PRGP1	GCTTCTCAAATGTACAGAAcTCTTCTTGCACTCACGC	-	Mutagenese	78,5
We2798	PRGP1 endgültiges Gen ohne TM forw.	GTG GAATTC ATG GGGAGGGTTTTCTCAC	+	PCR	62
We2799	PRGP2 endgültiges Gen ohne TM forw.	GTG GAATTC ATG AGGGGCCACCCCTC	+	PCR	58
We2800	TMG3 endgültiges Gen ohne TM forw.	GTG GAATTC ATG GCAGTGTCTGGAGGC	+	PCR	62
We2801	TMG4 endgültiges Gen ohne TM forw.	GTG GAATTC ATG TTTACGCTCTGGTTCTAC	+	PCR	62
We2802	PRGP1 endgültiges Gen GFP rev.	GTG GAATTC TTTGATGGTGGTGACCACAG	-	PCR	60
We2803	PRGP2 endgültiges Gen GFP rev.	GTG GAATTC GTGAGGCCTCCTGAGGCTG	-	PCR	62
We2804	TMG3 endgültiges Gen GFP rev.	GTG GAATTC CTGTGACGCCAGGGTTG	-	PCR	62
We2805	TMG4 endgültiges Gen GFP rev.	GTG GAATTC GTGAGATGGGAGAGACATAG	-	PCR	62
We2807	PRGP2 endgültiges Gen 6His-tag rev.	GTG GCGGCCG CTA ATG GTG GTG ATG ATG GTG GCTGGCCAC ATCCACTCG	-	PCR	60
We2808	TMG3 endgültiges Gen 6His-tag rev.	GTG GCGGCCG CTA ATG GTG GTG ATG ATG GTG ATCTGAGCTGCGAGGGG	-	PCR	62
We2809	TMG4 endgültiges Gen 6His-tag rev.	GTG GCGGCCG CTA ATG GTG GTG ATG ATG GTG ATCTATTTCTCTCTGTTGCC	-	PCR	58
We2810	PRGP1 endgültiges Gen 6His-2Lys-tag rev.	GTG GCGGCCG CTA CTT CTT ATGGTGGTGATGATGGTG AAG	-	PCR	62
We2811	PRGP2 endgültiges Gen 6His-2Lys-tag rev.	GTG GCGGCCG CTA CTT CTT ATGGTGGTGATGATGGTG GC	-	PCR	62
We2812	TMG3 endgültiges Gen 6His-2Lys-tag rev.	GTG GCGGCCG CTA CTT CTT ATGGTGGTGATGATGGTG ATC	-	PCR	62
We2813	TMG4 endgültiges Gen 6His-2Lys-tag rev.	GTG GCGGCCG CTA CTT CTT ATGGTGGTGATGATGGTG ATC	-	PCR	62
We2814	PRGP1 endgültiges Gen 2Lys rev.	GTG GCGGCCG CTA CTCTT AAGGTA AAACTGAAACCAGTCAC	-	PCR	64
We2815	PRGP2 endgültiges Gen 2Lys rev.	GTG GCGGCCG CTA CTCTT GCTGGCCAC ATCCACTCG	-	PCR	60
We2816	TMG3 endgültiges Gen 2Lys rev.	GTG GCGGCCG CTA CTCTT ATCTGAGCTCTGCGAGGGG	-	PCR	62
We2817	TMG4 endgültiges Gen 2Lys rev.	GTG GCGGCCG CTA CTCTT ATCTATTTCTCTCTGTTGCC	-	PCR	58
We2820	PRGP1 rev mit Strep-tag und NotI Cut.	GTGGCGCCGCTCATTCTCGAACTGAGGGTGGCTCCActgAAGGTA AAACTGAAACCAGTCAC	-	PCR	64
We2822	TMG3 rev mit Strep-tag und NotI Cut.	GTGGCGCCGCTCATTCTCGAACTGAGGGTGGCTCCActgATCTGAGCTCTGCGAGGGG	-	PCR	62
We2823	TMG4 rev mit Strep-tag und NotI Cut.	GTGGCGCCGCTCATTCTCGAACTGAGGGTGGCTCCActgATCTATTTCTCTCTGTTGCC	-	PCR	58
We2824	PRGP1 forw mit SmaI Cut.site	GTGCC GGGAGGGTTTTCTCACGG	+	PCR	62
We2825	PRGP1 rev mit SmaI Cut.site	GTGCC GGGetaaagtaaaactgaaaccagtc	-	PCR	62
We2826	forw Primer für PRGP1 und TMG3 jeweils mit EcoRI + leader	GTGGAATTCATGGAGTTTGGGCTGAGCTG	+	PCR	62
We2844	PRGP1 endgültiges Gen 6His-tag rev. NEU	GTG GCGGCCG CTA ATG GTG GTG ATG ATG GTG GAAGCATCTCCAGATTAGG	-	PCR	58
We2859	PRGP2 rev mit Strep-tag und NotI Cut. NEU	GTGGCGCCGCTCATTCTCGAACTGAGGGTGGCTCCActgGCTGGCCACATCCACTCG	-	PCR	60
We2902	TMG3 endgültiges Gen GFP rev.	GTG GAATTC CTGTGACGCCAGGGTTGG	-	PCR	62

We2903	TMG3 endgültiges Gen 6His-2Lys-tag rev.	GTG GCGGCCG CTA CTT CTT ATGGTGGTGATGATGGTG ATC	-	PCR	62
We2904	TMG3 endgültiges Gen 2Lys rev.	GTG GCGGCCG CTA CTTCTT ATCTGAGCTCTGCGAGGGG	-	PCR	62
We2905	TMG4 endgültiges Gen 6His-2Lys-tag rev.	GTG GCGGCCG CTA CTT CTT ATGGTGGTGATGATGGTG ATC	-	PCR	62
We2907	Faktor7 (Propeptid+Signalpeptid) forw.	GTGgaatc ATGGTCTCCAGGCCCTC	+	PCR	60
We2908	Faktor7 (Propeptid+Signalpeptid) mit TMG4 YNRFD + Xhol rev.	GTGCTC GAG ATCAAATCTATTATA GCGCCGGCGCCGGTGC	-	PCR	62
We2909	TMG4 Xhol forw. ohne Signalpeptid ab (LE)LFTPGN	GTG CTCGAG CTCTTCACTCCCGCAACC	+	PCR	72
We2910	TMG4 His + NotI rev. = TMG3 His + NotI rev.	GTG GCGGCCG CTA ATG GT	-	PCR	50
We2911	Faktor7 (Propeptid+Signalpeptid) mit TMG3 ANEF + Xhol rev.	GTG CTCGAGGAACTCATTGGC GCGCCGGCGCCGGTGC	-	PCR	62
We2912	TMG3 Xhol forw. ohne Signalpeptid ab (LE)ELRQ	GTG CTCGAG GAGCTGCGCCAGGGCAC	+	PCR	70
We2919	Albumin hinten: EcoRV-Signalpeptid+Propeptid v. FaktorVII	GTG gatatac ATG GTC TCC CAGGCCCTC	+	PCR	60
We2920	Albumin hinten: TMG3 / TMG4-6His-PreScission-AgeI-Albumin hinten	GTG accggtggcccctggaacagaactccagATGGTGGTGATGATGGTG ATC	-	PCR	62
We2921	Albumin vorne: Signalpeptid Albumin + Albumin vorne BamHI+(Propeptid v. FaktorVII)	GTG GGATCC GCAGTCTTCGTAACCCAGG	+	PCR	60
We2922	Albumin vorne: 6His-Stop-NotI rev.	GTG GCGGCCGctATGGTGGT	-	PCR	60
We2963	TMG3 nativ rev ab STOP + NotI /remark: forw. Primer sind vorhanden	GTGGCGGCCCTACTTGTGACGCCAGGG	-	PCR	62
We2964	TMG4 nativ rev ab STOP + NotI /remark: forw. Primer sind vorhanden	GTGGCGGCCCTCAGTGAGATGGGAGAGACAT	-	PCR	62
We2997	TMG3 endgültiges Gen ohne TM forw.	GTG GAATTC ATG GCAGTGTCTTCTGGAGGC	+	PCR	62
We2998	TMG4 endgültiges Gen ohne TM forw.	GTG GAATTC ATG TTTACGCTTCTGGTTCTAC	+	PCR	62
We3045	TMG3/4Ah + EcoRI forw. für Umklonierung in MARES Vektor	GTG GAATTC ATGGTCTCCAGGCCCTCA	+	PCR	62
We3046	TMG3/4Ah + BamHI rev. für Umklonierung in MARES Vektor	GTG GGATCC CTATAAGCCTAAGGCAGCTTG	-	PCR	62
We3085	Mutagenese BamHI Pos 3520 in pTracer SV40 forw.	CAACATTGAAGATGGcTCCGTTCAACTAGCA	+	Mutagenese	78
We3086	Mutagenese BamHI Pos 3520 in pTracer SV40 rev.	TGCTAGTTGAACGGAgCCATCTTCAATGTTG	-	Mutagenese	78
We3093	Mutagenese BamHI Pos 3520 in pTracer SV40 forw. Neu	GCCACAACATTGAAGATGGcTCCGTTCAACTAGCAGACC	+	Mutagenese	
We3094	Mutagenese BamHI Pos 3520 in pTracer SV40 rev. Neu	GGTCTGCTAGTTGAACGGAgCCATCTTCAATGTTGTGGC	-	Mutagenese	

Tab. 8.2 Primer/Oligonukleotidliste zur Amplifikation und Modifikation von DNA ; Verw. zweck¹: Verwendungszweck

8.4 Proteinsequenzierung der exprimierten und gereinigten Gla-Proteine

Ergebnis der Sequenzanalyse

Durchführung gemäß SOP: **RES-54**

N-terminale Proteinsequenzierung (Edman-Abbau im Protein-Sequenator Procise 492 der Fa. ABI)

Material:	TMG4-C terminale Albumin Fusion Waschpeak A05	OpNr.: TMG4Ah-
Proben-Nr.: A 070296	WA05	

Auftraggeber: Daniel Schürmann, Labor Dr. Weimer

		Sequenzschritt (Abbauzyklus)																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Sequenz (1)	Ist	(V) ¹	N	D	G	D	M	X ²	L	A	D	G	G								
ca. pmol-Zunahme	--->	(64)	15	5,9	31	6,2	32	-	32	30	2,9	15	10								
	*Soll	V	N	D	G	D	M	R	L	A	D	G	G								
Sequenz (2)	Ist	(X) ¹	X ³	F	V	T	Q	E	E	X ³	X ²	X ³	V								
ca. pmol-Zunahme	--->	-	-	11	9,3	7,3	4,1	3,0	1,3	-	-	-	4,2								
	*Soll	R	V	F	V	T	Q	E	E	A	H	G	V								
weitere Aminosäuren	Ist			G		Y			I	V		P	L								
ca. pmol-Zunahme	--->			3,2		0,6			1,0	1,9		1,7	1,3								
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist			I					K												
ca. pmol-Zunahme	--->			4,2					1,0												
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist																				
ca. pmol-Zunahme	--->																				
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist																				
ca. pmol-Zunahme	--->																				
	Soll																				

Bemerkungen: () Angabe nicht mit letzter Sicherheit zu machen

- 1: Die einwandfreie Bestimmung einer Aminosäure ist im 1. Abbauzyklus nicht bzw. nur bedingt möglich
- 2: Die Aminosäuren H + R ergeben generell sehr niedrige Ausbeuten und sind hier nicht nachweisbar.
- 3: Wegen des vorhandenseins im selben bzw. im vorherigen Zyklus einer anderen Sequenz nicht bestimmbar

* siehe Suchergebnis in "MS-Pattern", Anhang 1, Seite 1 und 2

Tab. 8.3 Exemplarisches Ergebnis der TMG3-Albumin-FP Proteinsequenzierung ausgehend von verschiedenen Reinigungsfractionen

Ergebnis der Sequenzanalyse

Durchführung gemäß SOP: **RES-54**

N-terminale Proteinsequenzierung (Edman-Abbau im Protein-Sequenator Procise 492 der Fa. ABI)

Material:	TMG4-C terminale Albumin Fusion Waschpeak B08	OpNr.: TMG4Ah-
Proben-Nr.: A 070297	<u>WB08</u>	

Auftraggeber: Daniel Schürmann, Labor Dr. Weimer

		Sequenzschritt (Abbauzyklus)																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Sequenz (1)	Ist	(X) ¹	S	X ²	Q	E	L	F	P	F	G	P	G								
ca. pmol-Zunahme	--->	-	4,3	-	5,6	9,7	7,9	6,1	6,5	5,8	4,3	5,7	6,3								
		L	S	R	Q	E	L	F	P	F	G	P	G								
weitere Aminosäuren	Ist		V	L	L		A	N	A		D										
ca. pmol-Zunahme	--->		16	15	2,5		10		2,5	5,0		4,2									
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist		N						Y	S	A	E									
ca. pmol-Zunahme	--->		0,9						3,0	0,8	0,1	2,8									
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist								E	E		V									
ca. pmol-Zunahme	--->								2,7	0,5		1,7									
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist											G									
ca. pmol-Zunahme	--->											1,3									
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist																				
ca. pmol-Zunahme	--->																				
	Soll																				

Bemerkungen: () Angabe nicht mit letzter Sicherheit zu machen

1: Die einwandfreie Bestimmung einer Aminosäure ist im 1. Abbauzyklus nicht bzw. nur bedingt möglich

2: Die Aminosäure R ergibt generell sehr niedrige Ausbeuten und ist hier nicht nachweisbar.

* siehe Suchergebnis in "MS-Pattern", Seiten 27 bis 31

Tab. 8.4 Exemplarisches Ergebnis der TMG3-Albumin-FP Proteinsequenzierung ausgehend von verschiedenen Reinigungsfraktionen

Durchführung gemäß SOP: RES-55
N-terminale Proteinsequenzierung (Edman-Abbau im Protein-Sequenator Procise 492 der Fa. ABI)

Material:	TMG4-C terminale Albumin Fusion Waschpeak C03 OpNr.: TMG4Ah-WC03
Charge:	TMG4Ah-WC03
Proben-Nr.: A	070298

Auftraggeber: Daniel Schürmann (Lab. Dr. Weimer)

		Sequenzschritt (Abbauzyklus)																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Sequenz 1	Ist	Y ¹	N	R	F	D	L	E	L	F	T	P	G	N	L	E	R	E	X ⁴	N	E
ca. pmol-Zunahme	--->	403	249	331	266	224	363	282	300	306	51	240	173	193	243	161	225	122	-	109	92
	Soll	Y	N	R	F	D	L	E	L	F	T	P	G	N	L	E	R	E	C	N	E
Sequenz 2	Ist	A ¹	V	F	V	T	Q	X ³	X ³	A	H	G	V	L	H	R	X ^{2,3}	X ^{2,3}	X ^{2,3}	Y	X ³
ca. pmol-Zunahme	--->	146	68	108	85	(13)	77	?	-	166	29	38	49	56	24	51	-	-	-	125	-
	Soll *	A	V	F	V	T	Q	E	E	A	H	G	V	L	H	R	R	R	R	Y	N
Sequenz 3	Ist	V ¹	T	Q	(E)	(E)	A	H	G	V	L	X ³	R	R	R	X ^{2,3}	Y	N	X ²	(F)	(D)
ca. pmol-Zunahme	--->	44	9	37	14	11	46	9	19	16	15	-	(18)	(5)	(7)	-	22	7	-	7	1
	Soll *	V	T	Q	E	E	A	H	G	V	L	H	R	R	R	R	Y	N	R	F	D
weitere Aminosäuren	Ist																				
ca. pmol-Zunahme	--->																				
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist																				
ca. pmol-Zunahme	--->																				
	Soll																				

Bemerkungen: () Angabe aus den verschiedensten Gründen nicht mit letzter Sicherheit zu machen

- 1: Die einwandfreie Bestimmung einer Aminosäure ist im 1. Abbauzyklus nicht bzw. nur bedingt möglich - hier aber über die ermittelbaren pmol-Werte relativ sicher vorhanden und zuzuordnen
- 2: Aufgrund der ermittelten pmol-Werte in den Zyklen 10 bis 23 und unter Berücksichtigung des besonderen Sequenzverhaltens der Aminosäure R ist diese mit größter Wahrscheinlichkeit vorhanden
- 3: Wegen des Vorhandenseins im selben bzw. eines vorherigen Zyklus einer anderen Sequenz nicht bestimmbar
- 4: C ist generell nur nach vorheriger Modifizierung (z.B. als Carboximethylcystein) nachweisbar
- 5: Aminosäure ist nicht über den pmol-Anstieg bestimmbar

* Die Zuordnung zu diesen Sequenzen ist teilweise, vor allem in den späteren Abbauzyklen, nur über die Kenntnis der Gesamtsequenz möglich

Weitere Aminosäuren wurden nicht in das Ergebnisprotokoll eingetragen und es wurden auch keine weiteren Sequenzsuchen durchgeführt.

Aufgrund der pmol-Wiederfindungen der Aminosäure E, die mit den pmol- Wiederfindungen der übrigen Aminosäuren der jeweiligen Sequenz korrelieren, kann davon ausgegangen werden, dass diese Aminosäure in den drei angegebenen Sequenzen in nicht modifizierter Form vorliegt

Durchführung gemäß SOP: RES-55
N-terminale Proteinsequenzierung (Edman-Abbau im Protein-Sequenator Procise 492 der Fa. ABI)

Material: TMG4-C terminale Albumin Fusion Waschpeak C03 OpNr.: TMG4Ah-WC03

Charge: TMG4Ah-WC03

Proben-Nr.: A 070298

Auftraggeber: Daniel Schürmann (Lab. Dr. Weimer)

		Sequenzschritt (Abbauzyklus)																			
		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Sequenz (1)	Ist	E	L	X ⁴	N	Y	E	E	A	R	E	I	F	V	D	E					
ca. pmol-Zunahme	--->	16	137	-	73	109	61	2	82	71	41	69	61	59	38	17					
	Soll	E	L	C	N	Y	E	E	A	R	E	I	F	V	D	E					
Sequenz (2)	Ist	R	F	D	X ³	(E)	L	F	T	P	G	N	L	E	R	X ³					
ca. pmol-Zunahme	--->	29	22	18	-	9	15	18	3	14	11	12	15	6	6	?					
	Soll *	R	F	D	L	E	L	F	T	P	G	N	L	E	R	E					
Sequenz (3)	Ist	(L)	X ³	X ³	X ³	T	P	X ⁵	((N))	(L)	X ³	X ³	X ³	X ⁴	(N)	X ³					
ca. pmol-Zunahme	--->	10	-	-	-	7	4	-	0	1	?	-	-	-	2	?					
	Soll *	L	E	L	F	T	P	G	N	L	E	R	E	C	N	E					
weitere Aminosäuren	Ist																				
ca. pmol-Zunahme	--->																				
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist																				
ca. pmol-Zunahme	--->																				
	Soll																				

Bemerkungen: () Angabe aus den verschiedensten Gründen nicht mit letzter Sicherheit zu machen

- 1: Die einwandfreie Bestimmung einer Aminosäure ist im 1. Abbauzyklus nicht bzw. nur bedingt möglich - hier aber über die ermittelbaren pmol-Werte relativ sicher vorhanden und zuzuordnen
 - 2: Aufgrund der ermittelten pmol-Werte in den Zyklen 10 bis 23 und unter Berücksichtigung des besonderen Sequenzverhaltens der Aminosäure R ist diese mit größter Wahrscheinlichkeit vorhanden
 - 3: Wegen des Vorhandenseins im selben bzw. eines vorherigen Zyklus einer anderen Sequenz nicht bestimmbar
 - 4: C ist generell nur nach vorheriger Modifizierung (z.B. als Carboximethylcystein) nachweisbar
 - 5: Aminosäure ist nicht über den pmol-Anstieg bestimmbar
- * Die Zuordnung zu diesen Sequenzen ist teilweise, vor allem in den späteren Abbauzyklen, nur über die Kenntnis der Gesamtsequenz möglich

Weitere Aminosäuren wurden nicht in das Ergebnisprotokoll eingetragen und es wurden auch keine weiteren Sequenzsuchen durchgeführt.

Aufgrund der pmol-Wiederfindungen der Aminosäure E, die mit den pmol- Wiederfindungen der übrigen Aminosäuren der jeweiligen Sequenz korrelieren, kann davon ausgegangen werden, dass diese Aminosäure in den drei angegebenen Sequenzen nicht modifiziert

Tab. 8.5 Exemplarisches Ergebnis der TMG3-Albumin-FP Proteinsequenzierung ausgehend von verschiedenen Reinigungsfractionen

Ergebnis der Sequenzanalyse

Durchführung gemäß SOP: **RES-54**

N-terminale Proteinsequenzierung (Edman-Abbau im Protein-Sequenator Procise 492 der Fa. ABI)

Material:	TMG4-C terminale Albumin Fusion Waschpeak D11	OpNr.: TMG4Ah-
Proben-Nr.: A 070299	WD11	

Auftraggeber: *Daniel Schürmann, Labor Dr. Weimer*

		Sequenzschritt (Abbauzyklus)																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Sequenz (1)	Ist	(M) ¹	Q	L	K	P	M	E	I	N	P	E	M								
	ca. pmol-Zunahme --->	(12)	10	7,4	8,3	5,2	6,1	4,2	7,7	3,5	2,3	2,0	3,3								
	*Soll	M	Q	L	K	P	M	E	I	N	P	E	M								
weitere Aminosäuren	Ist		G	Y	F	V	L	Y	L	A	G	Q	G								
	ca. pmol-Zunahme --->		5,3	4,1	3,4	6,1	6,2	4,0	4,0	2,7	3,2	2,2	2,9								
	*Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist		N	E	T	D	Q	T	K	T	P	T									
	ca. pmol-Zunahme --->		4,3	2,0	6,2	2,1	0,6	2,9	3,3	1,8	1,0	1,6									
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist		K	A	I	G	I	G	F	V											
	ca. pmol-Zunahme --->		5,7	1,9	2,9	1,5	1,6	1,9	3,5	2,0											
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist		V			A		A	D	K											
	ca. pmol-Zunahme --->		1,1			1,6		1,4	1,3	1,3											
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist									L											
	ca. pmol-Zunahme --->									1,0											
	Soll																				

Bemerkungen: () Angabe nicht mit letzter Sicherheit zu machen

1: Die einwandfreie Bestimmung einer Aminosäure ist im 1. Abbauzyklus nicht bzw. nur bedingt möglich

* siehe Suchergebnis in "MS-Pattern", Seiten 28 bis 30

Tab. 8.6 Exemplarisches Ergebnis der TMG3-Albumin-FP Proteinsequenzierung ausgehend von verschiedenen Reinigungsfractionen

Durchführung gemäß SOP: RES-55
 N-terminale Proteinsequenzierung (Edman-Abbau im Protein-Sequenator Procise 492 der Fa. ABI)

Material:	TMG4-C terminale Albumin Fusion Elutionspeak A10 OpNr.: TMG4Ah-EA10
Charge:	TMG4Ah-EA10
Proben-Nr.:	A 070300

Auftraggeber: Daniel Schürmann (Lab. Dr. Weimer)

		Sequenzschritt (Abbauzyklus)																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Sequenz (1)*	Ist	(A) ¹	V	F	V	T	Q	E	E	A	H	G	V	L	H	R	R	R	R	Y	N
ca. pmol-Zunahme	--->	(92)	60	63	52	41	47	37	8	40	18	21	27	29	11	18	5	9	5	13	8
	*Soll	A	V	F	V	T	Q	E	E	A	H	G	V	L	H	R	R	R	R	Y	N
weitere Aminosäuren	Ist																				
ca. pmol-Zunahme	--->																				
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist																				
ca. pmol-Zunahme	--->																				
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist																				
ca. pmol-Zunahme	--->																				
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist																				
ca. pmol-Zunahme	--->																				
	Soll																				

Bemerkungen: () Angabe nicht mit letzter Sicherheit zu machen

- 1:** Die einwandfreie Bestimmung einer Aminosäure ist im 1. Abbauzyklus nicht bzw. nur bedingt möglich
- 2:** Keine über die pmol-Wiederfindung zuzuordnende Aminosäure identifizierbar

***Die Zusammenstellung der Sequenz 1 ist nur über die Kenntnis der Gesamtsequenz möglich**

Weitere Aminosäuren wurden nicht in das Ergebnisprotokoll eingetragen und keine weitere Sequenzsuche durchgeführt. Wahrscheinlich ist die Sequenz beginnend mit Y,N,R,F,D... als Nebensequenz vorhanden.

Durchführung gemäß SOP: RES-55
N-terminale Proteinsequenzierung (Edman-Abbau im Protein-Sequenator Procise 492 der Fa. ABI)

Material:	TMG4-C terminale Albumin Fusion Elutionspeak A10 OpNr.: TMG4Ah-EA10
Charge:	TMG4Ah-EA10
Proben-Nr.: A	070300

Auftraggeber: Daniel Schürmann (Lab. Dr. Weimer)

		Sequenzschritt (Abbauzyklus)																			
		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Sequenz (1)	Ist	R	F	(D)	(L)	E	(L)	(F)	T	(P)	G	N	L	X ²	R	X ²					
ca. pmol-Zunahme	--->	13	14	(8)	(9)	5	(9)	(4)	5	(5)	9	5	3	-	10	-					
	*Soll	R	F	D	L	E	L	F	T	P	G	N	L	E	R	E					
weitere Aminosäuren	Ist																				
ca. pmol-Zunahme	--->																				
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist																				
ca. pmol-Zunahme	--->																				
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist																				
ca. pmol-Zunahme	--->																				
	Soll																				
weitere Aminosäuren	Ist																				
ca. pmol-Zunahme	--->																				
	Soll																				

Bemerkungen: () Angabe nicht mit letzter Sicherheit zu machen

1: Die einwandfreie Bestimmung einer Aminosäure ist im 1. Abbauzyklus nicht bzw. nur bedingt möglich

2: Keine über die pmol-Wiederfindung zuzuordnende Aminosäure identifizierbar

*Die Zusammenstellung der Sequenz 1 ist nur über die Kenntnis der Gesamtsequenz möglich

Weitere Aminosäuren wurden nicht in das Ergebnisprotokoll eingetragen und keine weitere Sequenzsuche durchgeführt. Wahrscheinlich ist die Sequenz beginnend mit Y,N,R,F,D... als Nebensequenz vorhanden.

Tab. 8.7 Exemplarisches Ergebnis der TMG3-Albumin-FP Proteinsequenzierung ausgehend von verschiedenen Reinigungsfractionen

Durchführung gemäß SOP: RES-55
N-terminale Proteinsequenzierung (Edman-Abbau im Protein-Sequenator Procise 492 der Fa. ABI)

Material:	TMG4-C terminale Albumin Fusion Elutionspeak C03 OpNr.: TMG4Ah-EC03
Charge:	TMG4Ah-EC03
Proben-Nr.: A	070302

Auftraggeber: Daniel Schürmann (Lab. Dr. Weimer)

		Sequenzschritt (Abbauzyklus)																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Sequenz 1	Ist	Y ¹	N	R	F	D	L	X ^{3,5}	L	F	T	P	G	N	L	E ⁵	R	E ⁵	X ⁴	N	E ⁵
ca. pmol-Zunahme	--->	400	275	381	299	280	346	?	300	288	242	230	170	198	138	19	198	21	-	123	9
	Soll	Y	N	R	F	D	L	E	L	F	T	P	G	N	L	E	R	E	C	N	E
Sequenz 2	Ist	A ¹	X ³	F	V	T	Q	E ⁵	E ⁵	A	H	(G)	V	L	H	R ²	X ^{2,3}	X ^{2,3}	X ^{2,3}	Y	X ³
ca. pmol-Zunahme	--->	63	-	55	52	16	39	42	11	39	15	21	27	30	15	27	-	-	-	22	-
	Soll *	A	V	F	V	T	Q	E	E	A	H	G	V	L	H	R	R	R	R	Y	N
Sequenz 3	Ist	V ¹	T	Q	E ⁵	E ⁵	A	H	G	V	L	H	R	R	R	X ^{2,3}	Y	N	X ^{2,3}	F	D
ca. pmol-Zunahme	--->	78	61	58	55	10	54	25	37	44	36	14	44	28	14	?	29	18	-	25	11
	Soll *	V	T	Q	E	E	A	H	G	V	L	H	R	R	R	R	Y	N	R	F	D
weitere Aminosäuren	Ist																				
ca. pmol-Zunahme	--->																				
	Soll																				

Bemerkungen: () Angabe aus den verschiedensten Gründen nicht mit letzter Sicherheit zu machen

- 1: Die einwandfreie Bestimmung einer Aminosäure ist im 1. Abbauzyklus nicht bzw. nur bedingt möglich - hier keine eindeutige Zuordnung wegen relativ identischer Wiederfindungen
- 2: Aufgrund der ermittelten pmol-Werte in den Zyklen 10 bis 23 und unter Berücksichtigung des besonderen Sequenzverhaltens der Aminosäure R ist diese mit größter Wahrscheinlichkeit vorhanden
- 3: Wegen des Vorhandenseins im selben bzw. eines vorherigen Zyklus einer anderen Sequenz nicht bestimmbar
- 4: C ist generell nur nach vorheriger Modifizierung (z.B. als Carboximethylcystein) nachweisbar

* Die Zuordnung zu diesen Sequenzen ist aufgrund der nahezu identischen Wiederfindungen nur über die Kenntnis der Gesamtsequenz möglich

Weitere Aminosäuren wurden nicht in das Ergebnisprotokoll eingetragen und es wurden auch keine weiteren Sequenzsuchen durchgeführt.

- 5: Aufgrund der pmol-Wiederfindungen der Aminosäure E, die in den Sequenzen 2 und 3 mit den pmol- Wiederfindungen der übrigen Aminosäuren korrelieren, während dieses bei der Sequenz 1 nicht der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass diese Aminosäure in **Sequenz 1 modifiziert *** und in den **Sequenzen 2 und 3 nicht modifiziert** vorliegt.

* Durch die Ermittlung von geringen Mengen an E in den jeweils entsprechenden Abbauzyklen der Sequenz 1 muss aber zusätzlich davon ausgegangen werden, dass die E's dieser Sequenz sehr wahrscheinlich zu einem gewissen Prozentsatz (ca. 5 %) nicht modifiziert vorliegen !

Durchführung gemäß SOP: RES-55
N-terminale Proteinsequenzierung (Edman-Abbau im Protein-Sequenator Procise 492 der Fa. ABI)

Material:	TMG4-C terminale Albumin Fusion Elutionspeak C03 OpNr.: TMG4Ah-EC03
Charge:	TMG4Ah-EC03
Proben-Nr.: A	070302

Auftraggeber: Daniel Schürmann (Lab. Dr. Weimer)

		Sequenzschritt (Abbauzyklus)																			
		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Sequenz 1	Ist	E ⁵	L	X ⁴	N	Y	E	E	A	R	X ^{3,5}	I	F	V	D	X ^{3,5}					
	ca. pmol-Zunahme --->	7	143	-	93	121	4	6	98	119	?	94	94	77	50	?					
	Soll	E	L	C	N	Y	E	E	A	R	E	I	F	V	D	E					
Sequenz 2	Ist	R	F	D	X ³	X ^{3,5}	L	F	T	P	G	N	L	X ⁵	R	X ^{3,5}					
	ca. pmol-Zunahme --->	9	18	16	-	-	6	12	10	11	4	7	11	-	15	?					
	Soll *	R	F	D	L	E	L	F	T	P	G	N	L	E	R	E					
Sequenz 3	Ist	L	X ^{3,5}	X ³	F	T	P	G	N	L	E ⁵	X ³	X ^{3,5}	X ⁴	N	E ⁵					
	ca. pmol-Zunahme --->	30	-	-	16	14	17	11	11	16	2	-	-	-	8	8					
	Soll *	L	E	L	F	T	P	G	N	L	E	R	E	C	N	E					
weitere Aminosäuren	Ist																				
	ca. pmol-Zunahme --->																				
	Soll																				

Bemerkungen: () Angabe aus den verschiedensten Gründen nicht mit letzter Sicherheit zu machen

- 1: Die einwandfreie Bestimmung einer Aminosäure ist im 1. Abbauzyklus nicht bzw. nur bedingt möglich - hier keine eindeutige Zuordnung wegen relativ identischer Wiederfindungen
- 2: Aufgrund der ermittelten pmol-Werte in den Zyklen 10 bis 23 und unter Berücksichtigung des besonderen Sequenzverhaltens der Aminosäure R ist diese mit größter Wahrscheinlichkeit vorhanden
- 3: Wegen des Vorhandenseins im selben bzw. eines vorherigen Zyklus einer anderen Sequenz nicht bestimmbar
- 4: C ist generell nur nach vorheriger Modifizierung (z.B. als Carboximethylcystein) nachweisbar

* Die Zuordnung zu diesen Sequenzen ist aufgrund der nahezu identischen Wiederfindungen nur über die Kenntnis der Gesamtsequenz möglich

Weitere Aminosäuren wurden nicht in das Ergebnisprotokoll eingetragen und es wurden auch keine weiteren Sequenzsuchen durchgeführt.

- 5: Aufgrund der pmol-Wiederfindungen der Aminosäure E, die in den Sequenzen 2 und 3 mit den pmol- Wiederfindungen der übrigen Aminosäuren korrelieren, während dieses bei der Sequenz 1 nicht der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass diese Aminosäure in **Sequenz 1 modifiziert *** und in den **Sequenzen 2 und 3 nicht modifiziert** vorliegt.

* Durch die Ermittlung von geringen Mengen an E in den jeweils entsprechenden Abbauzyklen der Sequenz 1 muss aber zusätzlich davon ausgegangen werden, dass die E's dieser Sequenz sehr wahrscheinlich zu einem gewissen Prozentsatz (ca. 5 %) nicht modifiziert vorliegen !

Tab. 8.8 Exemplarisches Ergebnis der TMG3-Albumin-FP Proteinsequenzierung ausgehend von verschiedenen Reinigungsfractionen

8.5 Bestimmung der Warfarin Konzentration

Proben Nr. Transfektionsnummer alle Klulturen mit 4µg/ml Puromycin	Datum	Uhr- zeit	Dauer (d)	Zellzählung				Glutamin	Glutamat	Glucose	Lactat
				lebend	tot	Gesamt	Vitalität	Gln	Glu	Gluc.	Lac.
				[x1E5/ml]	[x1E5/ml]	[x1E5/ml]	%	[mmol/L]	[mmol/L]	[g/l]	[g/l]
1348 vor Zugabe von Vitamin K oder Warfarin	26.1.09 9:26	9:26	0,0	3,63	0,29	3,915	92,6	1,85	0,43	3,75	1,08
1350 vor Zugabe von Vitamin K oder Warfarin	26.1.09 9:18	9:18	0,0	0,37	0,11	0,475	77,0	1,14	0,00	4,80	0,04
1348 +Vitamin K -Warfarin	27.1.09 10:56	10:56	1,1	4,21	0,49	4,70	89,5	1,99	0,73	3,96	0,93
1348 -Vitamin K +Warfarin	27.1.09 11:04	11:04	1,1	3,99	0,41	4,40	90,8	1,97	0,52	3,87	0,89
1350 +Vitamin K -Warfarin	27.1.09 11:12	11:12	1,1	0,29	0,13	0,42	69,2	1,08	0,05	4,82	0,03
1350 -Vitamin K +Warfarin	27.1.09 11:20	11:20	1,1	0,42	0,08	0,50	83,3	1,01	0,01	4,82	0,03
1348 +Vitamin K -Warfarin	28.1.09 7:54	7:54	1,9	7,07	0,48	7,55	93,7	2,11	1,04	3,25	1,46
1348 -Vitamin K +Warfarin	28.1.09 8:02	8:02	1,9	5,89	0,43	6,32	93,2	2,13	0,80	3,36	1,41
1350 +Vitamin K -Warfarin	28.1.09 8:10	8:10	1,9	0,35	0,11	0,46	75,0	1,23	0,00	4,88	0,12
1350 -Vitamin K +Warfarin	28.1.09 8:17	8:17	2,0	0,38	0,08	0,46	81,9	1,25	0,00	4,94	0,12
1348 +Vitamin K -Warfarin	29.1.09 9:45	9:45	3,0	13,00	0,82	13,82	94,1	1,78	1,38	2,56	2,04
1348 -Vitamin K +Warfarin	29.1.09 9:53	9:53	3,0	12,09	0,70	12,79	94,5	1,90	1,13	2,63	1,97
1350 +Vitamin K -Warfarin	29.1.09 10:01	10:01	3,0	0,63	0,22	0,85	73,7	1,46	0,03	4,85	0,20
1350 -Vitamin K +Warfarin	29.1.09 10:09	10:09	3,0	0,49	0,26	0,75	65,8	1,50	0,00	4,92	0,19
1348 +Vitamin K -Warfarin	30.1.09 8:35	8:35	4,0	16,95	1,56	18,51	91,6	1,49	1,19	2,10	2,27
1348 -Vitamin K +Warfarin	30.1.09 8:43	8:43	4,0	15,17	1,31	16,48	92,1	1,49	1,23	2,18	2,25
1350 +Vitamin K -Warfarin	30.1.09 8:52	8:52	4,0	0,58	0,29	0,87	66,9	1,69	0,03	4,82	0,27
1350 -Vitamin K +Warfarin	30.1.09 9:00	9:00	4,0	0,49	0,33	0,82	60,2	1,70	0,02	4,86	0,26

Tab. 8.9 Zell-Vitalitätsbeurteilung unter Einfluss von Warfarin und Vitamin K

8.6 Rohdaten der Massenspektrometrie

	Schürmann_5080-1_2_100.htm TMG3-Albumin-FP an <i>Magnetic Beads</i>	Schürmann_5080-2_2_100.htm TMG4-Albumin-FP an <i>Magnetic Beads</i>	Schürmann_5080-3_1.htm HSA an <i>Magnetic Beads</i>
1	A1BG Alpha-1B-glycoprotein	A1BG Alpha-1B-glycoprotein + A1BG Alpha-1B-glycoprotein precursor	
2		AFM Afamin	
3	AHSG Alpha-2-HS-glycoprotein		AHSG Alpha-2-HS-glycoprotein
4		AMBP AMBP protein	AMBP AMBP protein
5	ALB		
6	ALB 56 kDa protein		
7	ALB Isoform 1 of Serum Albumin	ALB Isoform 1 of Serum Albumin	ALB Isoform 1 of Serum albumin
8	ALB Uncharacterized protein ALB	ALB Uncharacterized protein ALB	ALB Uncharacterized protein ALB
9		Amyloid lambda 6 light chain variable region SAR (fragment)	
10		Anti-mucin1 light chain variable region (fragment)	
11	APOA1 Apolipoprotein A-I	APOA1 Apolipoprotein A-I	APOA1 Apolipoprotein A-I
12	APOA2 Apolipoprotein A-II		APOA2 Apolipoprotein A-II
13	APOA4 apolipoprotein A-IV precursor		
14			APOA4 Apolipoprotein A-IV
15	APOE Apolipoprotein E		
16	APOE mRNA for Apolipoprotein E		
17	APOH Beta-2-glycoprotein 1		APOH Beta-2-glycoprotein 1
18	Apolipoprotein C-III variant 1	APOC3 Apolipoprotein C-III + Apolipoprotein C-III variant 1	Apolipoprotein C-III variant 1
19			ATXN1L Conserved hypothetical protein
20			C15orf33 Isoform 1 of Uncharacterized protein C15orf33 + C15orf33 Isoform 2 of Uncharacterized protein C15orf33
21	C1S complement C1s subcomponent + C1S uncharacterized protein C1S		C1S complement C1s subcomponent + C1S uncharacterized protein C1S
22		C1QB complement component 1, q subcomponent, B chain precursor + C1QB complement component 1, q subcomponent, B chain precursor Mass 24592	
23	C3 Complement C3 (fragment)	C3 complement C3 (fragment)	C3 complement C3 (fragment)
24		C4A complement component 4A + DADB-112B14.11 complement component 4B + C4A complement component 4A preproprotein + C4A complement component 4A	C4A Complement C4-A + C4B complement component 4B preproprotein + C4A Complement component 4A + C4B Complement C4-B + C4A Complement component 4A + DADB-112B14.11 Complement component 4B + C4A complement component 4A preproprotein + C4A Complement compo
25	C4B complement component 4B preproprotein + C4B complement component C4B		
26	C5 complement C5	C5 complement C5	
27		C5 complement component C5 variant (fragment)	
28			C6 Complement component 6 precursor
29	C7 protein	C7 protein	C7 protein
30	C8A complement component C8 alpha chain	C8A complement component C8 alpha chain	C8A complement component C8 alpha chain
31	CD5L CD5 antigen-like		CD5L CD5 antigen-like
32	cDNA FLJ 78387	cDNA FLJ78387	
33	CFB Isoform 1 of complement factor B (fragment)		
34		CFD Complement factor D preproprotein	
35	CFH Isoform 1 of Complement factor H	CFH Isoform 1 of Complement factor H	CFH Isoform 1 of Complement factor H
36			CFHR1 17 kDa protein

37	CFHR1 complement factor H-related 1	CFHR1 complement factor H-related 1 + CFHR complement factor H-related 1 Mass 38766 + CFHR1 complement factor H-related 1 Mass 31750	CFHR1 complement factor H-related 1
38	CFHR2 Isoform long of complement factor H-related protein 2		CFHR2 Isoform long of complement factor H-related protein 2 + CFHR2 Isoform Short of Complement factor H-related protein 2
39	CFHR5 complement factor H-related 5 Mass 69411 + CFHR5 complement factor H-related protein 5 Mass 66430	CFHR5 complement factor H-related 5 Mass 69411 + CFHR5 complement factor H-related protein 5 Mass 66430	CFHR5 complement factor H-related 5 Mass 69411 + CFHR5 complement factor H-related protein 5 Mass 66430
40		ECM1 Extracellular matrix protein 1 + ECM1 Extracellular matrix protein 1 Mass 65176	ECM1 Extracellular matrix protein 1 + ECM1 Extracellular matrix protein 1 Mass 65176
41	ELK2P1 ELK2, member of ETS oncogene family, pseudogene 1		ELK2P1 ELK2, member of ETS oncogene family, pseudogene 1
42	F2 Prothrombin (fragment)	F2 Prothrombin (fragment)	F2 Prothrombin (fragment)
43	F7 Factor VII active site mutant immunoconjugate	F7 Factor VII active site mutant immunoconjugate	F7 Factor VII active site mutant immunoconjugate
44			FAM132B hypothetical protein LOC151176
45	FGA Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain	FGA Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain	
46		FGA Isoform 2 of Fibrinogen alpha chain	FGA Isoform 2 of Fibrinogen alpha chain
47			FGB Fibrinogen beta chain
48	FN1 263 kDa	FN1 263 kDa	FN1 263 kDa
49	FN1 Fibronectin 1 Isoform 4 preproprotein + FN1 Fibronectin 1 Isoform 2 preproprotein	FN1 Isoform 1 of Fibronectin + FN1 Isoform 3 of Fibronectin + FN1 Isoform 7 of Fibronectin + FN1 Isoform 8 of Fibronectin + FN1 Fibronectin 1 isoform 4 preproprotein + FN1 Fibronectin 1 isoform 2 preproprotein + FN1 Isoform 14 of Fibronectin + FN1 Isoform	FN1 Isoform 1 of Fibronectin + FN1 Isoform 3 of Fibronectin + FN1 Isoform 7 of Fibronectin + FN1 Isoform 8 of Fibronectin + FN1 Isoform 8 of Fibronectin + FN1 Isoform 8 of Fibronectin + FN1 Fibronectin 1 isoform 4 preproprotein + FN1 Fibronectin 1 isoform 4 preproprotein + FN1 Fibronectin 1 isoform 2 preproprotein + FN1 Isoform 14 of Fibronectin + FN1 Isoform
50	FN1 Isoform 5 of Fibronectin	FN1 Isoform 5 of Fibronectin	
51		FN1 Isoform 12 of Fibronectin	
52		FN1 Isoform 2 of Fibronectin	
53	GC Vitamin D-binding protein ??		GC Vitamin D-binding protein + GC vitamin D-binding protein precursor
54		GSN cDNA FLJ35478 fis, clone SMINT2007796, highly similar to Gelsolin	GSN cDNA FLJ35478 fis, clone SMINT2007796, highly similar to Gelsolin
55		GSN Gelsolin	GSN Gelsolin
56	GSN Gelsolin Mass 20827 + GSN Gelsolin Mass 22991		
57	GSN Isoform 1 of Gelsolin	GSN Isoform 1 of Gelsolin + GSN Isoform 2 of Gelsolin + GSN gelsolin isoform c	GSN Isoform 1 of Gelsolin + GSN Isoform 2 of Gelsolin + GSN gelsolin isoform c
58			HBA2; HBA1 Hemoglobin subunit alpha
59			HBB Beta-globin gene from a thalassemia patient
60			HP HP protein + HPR cDNA FLJ31310 fis, clone LIVER1000165, highly similar to Haptoglobin
61	HP; HPR haptoglobin isoform 2 preproprotein + HPR 47 kDa protein + HP Haptoglobin	HP; HPR haptoglobin isoform 2 preproprotein + HPR 47 kDa protein + HP Haptoglobin	HP; HPR haptoglobin isoform 2 preproprotein + HPR 47 kDa protein + HP Haptoglobin
62		HPR cDNA FLJ31310 fis, clone LIVER1000165, highly similar to Haptoglobin	
63	HPR Isoform 1 of Haptoglobin-related protein + HPR Isoform 2 of Haptoglobin-related protein		
64	HRG Histidine-rich glycoprotein	HRG Histidine-rich glycoprotein	HRG Histidine-rich glycoprotein
65	IG heavy chain V-III region BRO + IPI00555872 + IPI00783287	IG heavy chain V-III region BRO + IPI00555872 + IPI00783287	IG heavy chain V-III region BRO
66		IG heavy chain V-III region TEI	Ig heavy chain V-III region TEI
67	Ig kappa chain V-II region MIL		
68		Ig kappa chain V-III region B6	
69			Ig kappa chain V-I region Mev
70	Ig mu heavy chain disease protein	Ig mu heavy chain disease protein	Ig mu heavy chain disease protein
71		IGF2 insulin-like growth factor 2 isoform 2	
72	IGH@ IGH@ protein		
73	IGHA2 putative uncharacterized protein DKFZp686C02218 (fragment)		

74	IGHG1 IGHG1 protein Mass 52809	IGHG1 IGHG1 protein Mass 52809	IGHG1 IGHG1 protein Mass 52809
75		IGHG1 IGHG1 protein Mass 51990	IGHG1 IGHG1 protein Mass 51990
76		IGHG1 IGHG1 protein Mass 60862	IGHG1 IGHG1 protein Mass 60862
77	IGHG1 putative uncharacterized protein DKFZp686K03196		IGHG1 putative uncharacterized protein DKFZp686K03196
78	IGHG1 putative uncharacterized protein DKFZp686N02209	IGHG1 putative uncharacterized protein DKFZp686N02209	IGHG1 putative uncharacterized protein DKFZp686N02209
79	IGHG1 putative uncharacterized protein DKFZp686P15220		IGHG1 putative uncharacterized protein DKFZp686P15220
80		IGHG1 putative uncharacterized protein DKFZp686H20196	IGHG1 putative uncharacterized protein DKFZp686H20196
81		IGHG1 putative uncharacterized protein DKFZp686O01196	IGHG1 putative uncharacterized protein DKFZp686O01196
82		IGHG2 IGHG2 protein	
83	IGHG2 putative uncharacterized protein DKFZp686I04196 (fragment)	IGHG2 putative uncharacterized protein DKFZp686I04196 (fragment)	IGHG2 putative uncharacterized protein DKFZp686I04196 (fragment)
84		IGHG3 IGHG3 protein	
85	IGHG3 uncharacterized protein IGHG3 (fragment) Mass 38769 + IGHG3 uncharacterized protein IGHG3 Mass 48463 + IGHG3 protein Mass 50242	IGHG3 uncharacterized protein IGHG3 (fragment) Mass 38769 + IGHG3 uncharacterized protein IGHG3 Mass 48463 + IGHG3 protein Mass 50242	IGHG3 uncharacterized protein IGHG3 (fragment) Mass 38769 + IGHG3 uncharacterized protein IGHG3 Mass 48463 + IGHG3 protein Mass 50242
86	IGHG4 IGHG4 protein Mass 52637	IGHG4 IGHG4 protein Mass 52637	IGHG4 IGHG4 protein Mass 52637
87	IGHG4 Uncharacterized protein IGHG4 (fragment) Mass 43856	IGHG4 Uncharacterized protein IGHG4 (fragment) Mass 43856	
88			IGHM Isoform 1 of Ig mu chain C region + IGHM Isoform 2 of Ig mu chain C region
89	IGHM IGHM protein Mass ?	IGHM IGHM protein Mass ?	IGHM IGHM protein Mass 53180
90			IGHM IGHM protein Mass 68052
91		IGHM IGHM protein Mass 69309	IGHM IGHM protein Mass 69309
92		IGHM IGHM protein Mass 66998	
93		IGHM IGHM protein Mass 68052	
94		IGHM FLJ00385 protein (fragment)	
95	IGHM IGHM protein Mass 53180		
96	IGHM IGHM protein Mass 53317 + IGHG1 IGHG1 protein Mass 52367		
97	IGHM putative uncharacterized protein DKFZp686I15196		
98	IGHM putative uncharacterized protein DKFZp686I15212	IGHM putative uncharacterized protein DKFZp686I15212	
99	IGHV3OR16-13; IGHA1 IGHA1 protein	IGHV3OR16-13; IGHA1 IGHA1 protein Mass 54150	
100		IGHV3OR16-13; IGHA1 IGHA1 protein Mass 53858	
101		IGHV3OR16-13; IGHA1 IGHA1 protein Mass 55203	
102		IGHV3OR16-13; IGHA1 CDNA FLJ25298 fis, clone STM07683	
103		IGHV3OR16-13; IGHA1 putative uncharacterized protein DKFZp686G21220 (fragment)	
104		IGHV3OR16-13; IGHA1 cDNA FLJ14473 fis, clone MAMMA1001080, highly similar to	
105			IGHV3OR16-13;IGHA1 cDNA FLJ90170 fis, clone MAMMA1000370, highly similar to
106			IGHV3OR16-13;IGHA1 cDNA FLJ41552 fis, clone COLON2004478, highly similar to
107		IGHV3OR16-13; IGHA1 putative uncharacterized protein DKFZp686K18196 (fragment)	IGHV3OR16-13; IGHA1 putative uncharacterized protein DKFZp686K18196 (fragment)
108		IGHG2 uncharacterized protein IGHG2 (fragment)	
109	IGHV3OR16-13; IGHA1 SNC66 protein		IGHV3OR16-13;IGHA1 SNC66 protein
110	IGHV4-31 Anti-RhD monoclonal T125 gamma1 heavy chain		IGHV4-31 Anti-RhD monoclonal T125 gamma1 heavy chain
111			IGHV4-31 CDNA FLJ26266 fis, clone DMC05613 Mass 22383
112	IGHV4-31 IGHV4-31 protein Mass 51856	IGHV4-31 IGHV4-31 protein Mass 51856	IGHV4-31 IGHV4-31 protein Mass 51856
113	IGHV4-31 IGHV4-31 protein Mass 51939		IGHV4-31 IGHV4-31 protein Mass 51939

114	IGHV4-31 putative uncharacterized protein DKFZp686G11190 + IGHG1 putative uncharacterized protein DKFZp686O01196		
115	IGJ immunoglobulin J chain	IGJ immunoglobulin J chain	IGJ immunoglobulin J chain
116	IGKC IGKC protein Mass 25716		IGKC IGKC protein Mass 25716
117	IGKC IGKC protein Mass 26033 + IGKC IGKC protein Mass 26077		
118		IGKC IGKC protein Mass 26067	IGKC IGKC protein Mass 26067
119	IGKC IGKC protein Mass 26262	IGKC IGKC protein Mass 26262	IGKC IGKC protein Mass 26262
120	IGKC IGKC protein Mass 32496	IGKC IGKC protein Mass 32496	IGKC IGKC protein Mass 32496
121	IGKC Immunoglobulin light chain (fragment) + putative uncharacterized protein		
122	IGKV1-5 IGKV1-5 protein	IGV1-5 IGV1-5 protein + IGV1-5 IGV1-5 protein Mass 26293	IGKV1-5 IGKV1-5 protein
123	IGKV2-24 IGKV2-24 protein	IGKV2-24 IGKV2-24 protein	IGKV2-24 IGKV2-24 protein
124	IGKV3-20 IGK@ protein		
125			IGL@ IGL@ protein Mass 24980
126	IGL@ IGL@ protein Mass 25027		
127	IGL@ IGL@ protein Mass 25093		
128	IGL@ IGL@ protein Mass 25121	IGL@ IGL@ protein Mass 25121	IGL@ IGL@ protein Mass 25121
129	IGL@ IGL@ protein Mass 25127	IGL@ IGL@ protein Mass 25127	IGL@ IGL@ protein Mass 25127
130	IGL@ IGL@ protein Mass 25181	IGL@ IGL@ protein Mass 25181	IGL@ IGL@ protein Mass 25181
131	IGL@ IGL@ protein Mass 25271		IGL@ IGL@ protein Mass 25271
132	IGL@ IGL@ protein Mass 25347	IGL@ IGL@ protein Mass 25347	IGL@ IGL@ protein Mass 25347
133			IGLC1;IGLV2-14;IGLC2;IGLC3 IGLV2-14 protein
134		IGL@; IGLC1; IGLV2-14; IGLC2; IGLC3; IGLV2-14 protein	
135		IGLV3-25 IGLV3-25 protein	IGLV3-25 IGLV3-25 protein + IGL@ IGL@ protein
136		IGLV4-3 IGLV4-3 protein	
137			IGLV3-21 IGLV3-21 protein
138		Immunoglobulin G1 Fab heavy chain variable region (fragment)	Immunoglobulin G1 Fab heavy chain variable region (fragment)
139		KIAA1632 Isoform 2 of UPF0493 protein KIAA1632 + KIAA1632 Isoform 1 of UPF0493 protein KIAA1632	
140		KNG1 Isoform LMW of Kininogen-1 + KNG1 Kininogen 1 Mass 48954	
141	Lambda chain		Lambda chain
142		LOC100133511 hypothetical protein, partial	
143		LOC440419 LOC440419 protein	
144	LOC100126583 putative uncharacterized protein DKFZp686M08189		
145	LOC100126583 putative uncharacterized protein Mass 52736		
146	LOC100133739 putative uncharacterized protein DKFZp686C15213	LOC100133739 putative uncharacterized protein DKFZp686C15213	
147	LOC440786 Ig kappa chain V-II region TEW		
148			LOC100131061 similar to golgi autoantigen, golgin subfamily a, 2, partial
149	Myosin reactive immunoglobulin heavy chain variable region (fragment)	Myosin reactive immunoglobulin heavy chain variable region (fragment)	Myosin reactive immunoglobulin heavy chain variable region (fragment)
150			NPNT Isoform 2 of Nephronectin + NPNT Isoform 1 of Nephronectin
151		PLG Plasminogen	PLG Plasminogen
152		PPBP Platelet basic protein	
153	putative uncharacterized protein DKFZp686K04218 (fragment)		
154	putative uncharacterized protein Mass 20883		

155	putative uncharacterized protein Mass 25016		
156	Rheumatoid factor D5 light chain (fragment)		Rheumatoid factor D5 light chain (Fragment)
157	SERPINA1 Isoform 1 of Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1 Isoform 1 of Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1 Isoform 1 of Alpha-1-antitrypsin
158			SERPINA1 Isoform 2 of Alpha-1-antitrypsin
159	SERPINC SERPINC protein	SERPINC SERPINC protein	
160			SERPINC1 SERPINC1 protein
161	SERPINC1 Antithrombin III variant	SERPINC1 Antithrombin III variant	
162	TF 12kDa protein		
163	TF 13 kDa protein	TF 13 kDa protein	
164	TF 14 kDa protein		
165	TF 7 kDa protein		
166	TF Serotransferrin + TF Transferrin variant (fragment)	TF Serotransferrin + TF Transferrin variant (fragment)	TF Serotransferrin + TF Transferrin variant (fragment)
167	Uncharacterized protein ENSP00000374799 (fragment)	Uncharacterized protein ENSP00000374799 (fragment)	
168			uncharacterized protein ENSP00000381660 (fragment)
169		V2-7 protein	V2-7 protein
170	VH1 protein (fragment)	VH1 protein (fragment)	VH1 protein (fragment)
171			VL87-2 protein (Fragment)
172	VTN Vitronectin	VTN Vitronectin	VTN Vitronectin
173		ZNF750	

Tab. 8.10 Rohdaten der Massenspektrometrie der eluierten Fraktionen: 1. Versuch

	TMG4-Albumin-FP an <i>Magnetic Beads</i> Schuermann_5290-2V2_T_5kDa.htm	Glycin an <i>Magnetic Beads</i> Schuermann_5290-3V2_T_5kDa.htm	rHA CSL an <i>Magnetic Beads</i> Schuermann_5290-4V2_T_5kDa.htm
	52	100	46
1			
2		- 54 kDa protein	
3		- CDNA FLJ26465 fis, clone KDN04238	
4		- cDNA FLJ78387	
5			- HERV-F(c)1_Xq21.33 provirus ancestral Gag polyprotein
6		- Ig kappa chain V-III region B6	- Ig kappa chain V-III region B6
7		- Ig kappa chain V-IV region Len	
8	- Ig heavy chain V-III region BRO; - Ig heavy chain V-III region TEI; - Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region (Fragment); IGHV3-48 Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region (Fragment); -Immunoglobulin heavy chain variable		
9	- Ig kappa chain V-III region GOL; -Ig kappa chain V-III region SIE; IGKV3D-20 Ig kappa chain V-III region TI; -Ig kappa chain V-III region WOL; -Cold agglutinin FS-2 L-chain (Fragment); IGKV3-20 Myosin-reactive immunoglobulin light chain variable region		
10			- Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region (Fragment)
11	- Putative uncharacterized protein; IGL@ IGL@ protein	-Putative uncharacterized protein; IGL@ IGL@ protein	- Putative uncharacterized protein; IGL@ IGL@ protein
12			A2M Alpha-2-macroglobulin; A2M 19 kDa protein
13	ALB Isoform 1 of Serum albumin	ALB Isoform 1 of Serum albumin	ALB Isoform 1 of Serum albumin
14			ALB Uncharacterized protein ALB
15		AACS Isoform 1 of Acetoacetyl-CoA synthetase; AACS Isoform 3 of Acetoacetyl-CoA synthetase	
16		AHSG Alpha-2-HS-glycoprotein	
17			ALDH1L1 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase; ALDH1L1 Formyltetrahydrofolate dehydrogenase isoform a variant
18	ANG Angiogenin; RNASE4 ANG protein	ANG Angiogenin; RNASE4 ANG protein	ANG Angiogenin; RNASE4 ANG protein
19	ANKRD29 Isoform 1 of Ankyrin repeat domain-containing protein 29; ANKRD29 Uncharacterized protein ANKRD29; ANKRD29 10 kDa protein; ANKRD29 12 kDa protein		ANKRD29 Isoform 1 of Ankyrin repeat domain-containing protein 29; ANKRD29 Uncharacterized protein ANKRD29; ANKRD29 10 kDa protein; ANKRD29 12 kDa protein
20	ANKS1A Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 1A		
21		APOA2 Apolipoprotein A-II	
22		APOC1 Apolipoprotein C-I	
23		APOE Apolipoprotein E; APOE MRNA for apolipoprotein E; APOE Apolipoprotein E; APOE 25 kDa protein	
24		ATP2C2 Putative uncharacterized protein DKFZp686i0955	
25		BMS1 Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog	
26	C12orf30 Isoform 1 of TPR repeat-containing protein C12orf30; C12orf30 Isoform 2 of TPR repeat-containing protein C12orf30	C12orf30 Isoform 1 of TPR repeat-containing protein C12orf30; C12orf30 Isoform 2 of TPR repeat-containing protein C12orf30	
27	C1QB complement component 1, q subcomponent, B chain precursor; C1QB Complement component 1, q subcomponent, B chain	C1QB complement component 1, q subcomponent, B chain precursor; C1QB Complement component 1, q subcomponent, B chain	C1QB complement component 1, q subcomponent, B chain precursor; C1QB Complement component 1, q subcomponent, B chain

28	C1QC Complement C1q subcomponent subunit C	C1QC Complement C1q subcomponent subunit C	
29	C1S Complement C1s subcomponent; C1S Uncharacterized protein C1S	C1S Complement C1s subcomponent; C1S Uncharacterized protein C1S	
30	C3 Complement C3 (Fragment); LOC100133511 hypothetical protein, partial	C3 Complement C3 (Fragment); LOC100133511 hypothetical protein, partial	C3 Complement C3 (Fragment); LOC100133511 hypothetical protein, partial
31		C4A Complement C4-A; C4B complement component 4B preproprotein; C4A Complement component 4A; C4B Complement C4-B; C4A Complement component 4A; DADB-112B14.11 Complement component 4B; C4A complement component 4A preproprotein; C4A Complement component 4A;	
32	CCDC49 Isoform 1 of Coiled-coil domain-containing protein 49	CCDC49 Isoform 1 of Coiled-coil domain-containing protein 49	CCDC49 Isoform 1 of Coiled-coil domain-containing protein 49
33		CCDC82 Coiled-coil domain-containing protein 82	
34		CD14 Monocyte differentiation antigen CD14	
35		CD5L CD5 antigen-like	CD5L CD5 antigen-like
36	CDNA: FLJ23558 fis, clone LNG09703; SPAG4L Sperm-associated antigen 4-like protein; SPAG4L Uncharacterized protein SPAG4L; SPAG4L Sperm associated antigen 4-like	CEBPZ CCAAT/enhancer-binding protein zeta	
37		CECR6 Cat eye syndrome critical region protein 6	
38	CFHR1 Complement factor H-related protein 1; CFHR1 complement factor H-related 1; CFHR1 Complement factor H-related 1		
39	CFP Properdin		
40		CHCHD2 Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2, mit; LOC645317 similar to 16.7Kd protein; CHCHD9 Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 9, mit; CHCHD2 19 kDa protein	
41			COBL Isoform 5 of Protein cordon-bleu; COBL Isoform 1 of Protein cordon-bleu; COBL Isoform 2 of Protein cordon-bleu; COBL Isoform 3 of Protein cordon-bleu; COBL Isoform 4 of Protein cordon-bleu
42		CRLF1 Cytokine receptor-like factor 1; CRLF1 52 kDa protein	
43		CYFIP1 Isoform 2 of Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1; CYFIP1 Isoform 1 of Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1; CYFIP2 Isoform 2 of Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2; CYFIP2 Isoform 1 of Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2; CYFIP1 Isoform	
44			DCC Netrin receptor DCC
45	DEFA1;LOC728358 Neutrophil defensin 1; DEFA3 Neutrophil defensin 3		
46		DOCK7 Isoform 2 of Dedicator of cytokinesis protein 7	
47	EFCAB5 Isoform 3 of EF-hand calcium-binding domain-containing protein 5; EFCAB5 Isoform 1 of EF-hand calcium-binding domain-containing protein 5; EFCAB5 Uncharacterized protein EFCAB5; EFCAB5 Isoform 4 of EF-hand calcium-binding domain-containing protein		
48		ELK2P1 ELK2, member of ETS oncogene family, pseudogene 1	
49		EPHA10 Isoform 1 of Ephrin type-A receptor 10; EPHA10 Isoform 2 of Ephrin type-A receptor 10; EPHA10 Isoform 3 of Ephrin type-A receptor 10	
50	EXT2 Isoform 1 of Exostosin-2; EXT2 exostosin 2 isoform 1	EXT2 Isoform 1 of Exostosin-2; EXT2 exostosin 2 isoform 1	
51	F10 Coagulation factor X	F10 Coagulation factor X	F10 Coagulation factor X; F10 Coagulation factor X
52	F2 Prothrombin (Fragment)	F2 Prothrombin (Fragment)	
53	F7 Factor VII active site mutant immunoconjugate	F7 Factor VII active site mutant immunoconjugate	
54		FGFR1 Isoform 1 of Basic fibroblast growth factor receptor 1; FGFR1 Isoform 6 of Basic fibroblast growth factor receptor 1; FGFR1 Isoform 18 of Basic fibroblast growth factor receptor 1; FGFR1 Isoform 8 of Basic fibroblast growth factor receptor 1; FGFR1 Isoform 4 of Basic fibroblast growth factor receptor 1; FGFR1 Isoform 17 of Basic fibroblast growth factor receptor 1; FGFR1 Isoform 14 of Basic fibroblast growth factor receptor 1; FGFR1 Isoform 10 of Basic fibroblast growth factor receptor 1; FGFR1 Isoform 2 of Basic fibroblast growth factor receptor 1; FGFR1 Isoform 5 of Basic fibroblast growth factor receptor 1; FGFR1 Isoform 7 of Basic fibroblast growth factor receptor 1; FGFR1 Isoform 9 of Basic fibroblast growth factor receptor 1; FGFR1 Isoform 11 of Basic fibroblast growth factor receptor 1; FGFR1 Isoform 13 of Basic fibroblast growth factor receptor 1; FGFR1 Isoform 15 of Basic fibroblast growth factor receptor 1; FGFR1 Isoform 12 of Basic fibroblast growth factor receptor 1; FGFR1 18 kDa protein; FGFR1 fibroblast growth factor receptor 1 isoform 9 precursor; FGFR1 Fibroblast growth factor receptor 1 THIRD immunoglobulin domain, FG	

55			FLJ25770 Isoform 1 of Coiled-coil domain-containing protein FLJ25770
56	FLJ42289 Isoform 1 of Uncharacterized protein HSD47; FLJ42289 Isoform 2 of Uncharacterized protein HSD47	FLJ42289 Isoform 1 of Uncharacterized protein HSD47; FLJ42289 Isoform 2 of Uncharacterized protein HSD47	FLJ42289 Isoform 1 of Uncharacterized protein HSD47; FLJ42289 Isoform 2 of Uncharacterized protein HSD47
57		FNIP2 Isoform 1 of Folliculin-interacting protein 2; FNIP2 Isoform 2 of Folliculin-interacting protein 2	
58		GUCY2G similar to guanylyl cyclase receptor G; GUCY2G similar to guanylyl cyclase receptor G	
59	HISPPD2A Isoform 7 of Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-penta; HISPPD1 Isoform 2 of Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentak; HISPPD2A Isoform 5 of Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-penta; HISPPD2A Isoform 3 of In		
60	HLA-DPB1 Major histocompatibility complex class II DP beta 1; HLA-DPB1 Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1; HLA-DPB1 Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1; HLA-DPB1 Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1; H	HLA-DPB1 Major histocompatibility complex class II DP beta 1; HLA-DPB1 Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1; HLA-DPB1 Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1; HLA-DPB1 Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1; H	HLA-DPB1 Major histocompatibility complex class II DP beta 1; HLA-DPB1 Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1; HLA-DPB1 Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1; HLA-DPB1 Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1; H
61		HMGB3 High mobility group protein B3; LOC729595 similar to high-mobility group box 3; HMGB3 Non-histone chromosomal protein; HMGB3 22 kDa protein; HMGB3 21 kDa protein; HMGB3 Putative uncharacterized protein DKFZp779G118 (Fragment); LOC729595 similar to h	
62	HSP90AA1 heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1 isofo; HSP90AB1 Heat shock protein HSP 90-beta; HSP90AB1 Heat shock protein 90kDa alpha (Cytosolic), class B member 1; HSP90AA1 Hsp89-alpha-delta-N; HSP90AB1 Heat shock protein 90kDa al		
63	IGF1 Insulin-like growth factor IA; IGF1 Insulin-like growth factor IB; IGF1 insulin-like growth factor 1 isoform 2 preproprotein; IGF1 15 kDa protein; IGF1 Insulin-like growth factor-I; IGF1 insulin-like growth factor 1 isoform 1 preproprotein	IGF1 Insulin-like growth factor IA; IGF1 Insulin-like growth factor IB; IGF1 insulin-like growth factor 1 isoform 2 preproprotein; IGF1 15 kDa protein; IGF1 Insulin-like growth factor-I; IGF1 insulin-like growth factor 1 isoform 1 preproprotein	
64	IGF2 Isoform 1 of Insulin-like growth factor II; IGF2 insulin-like growth factor 2 isoform 2; IGF2 16 kDa protein	IGF2 Isoform 1 of Insulin-like growth factor II; IGF2 insulin-like growth factor 2 isoform 2; IGF2 16 kDa protein	
65	IGHG1 Putative uncharacterized protein DKFZp686N02209; IGHG1 Putative uncharacterized protein DKFZp686O01196; IGHG1 Putative uncharacterized protein DKFZp686K03196; IGHG1 Putative uncharacterized protein DKFZp686H20196; IGHG1 IGHG1 protein; IGHG1 IGHG1 pr		IGHG1 IGHG1 protein
66	IGHG2 Putative uncharacterized protein DKFZp686I04196 (Fragment); IGHG2 IGHG2 protein	IGHG2 IGHG2 protein	IGHG2 IGHG2 protein
67		IGHG3 Uncharacterized protein IGHG3 (Fragment); IGHM Putative uncharacterized protein DKFZp686I15212; IGHG3 Uncharacterized protein IGHG3; IGHM FLJ00385 protein (Fragment); IGHG3 IGHG3 protein; IGHG3 Ig gamma-3 chain C region; IGHG3 Protein	IGHG3 IGHG3 protein
68	IGHM IGHM protein; IGHM IGHM protein; IGHM IGHM protein; IGHM Protein; IGHM Isoform 1 of Ig mu chain C region; IGHM Isoform 2 of Ig mu chain C region	IGHM IGHM protein	IGHM IGHM protein; IGHM IGHM protein
69		IGHM IGHM protein; IGHG1 IGHG1 protein	
70		IGHV3-48 Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region (Fragme; - Immunoglobulin heavy chain variable region (Fragment)	
71	IGHV3OR16-13;IGHA1 cDNA FLJ14473 fis, clone MAMMA1001080, highly similar to; IGHV3OR16-13;IGHA1 Putative uncharacterized protein DKFZp686G21220 (Fragmen; IGHV3OR16-13;IGHA1 Putative uncharacterized protein DKFZp686J11235 (Fragmen; IGHV3OR16-13;IGHA1 IGH A1	IGHV3OR16-13;IGHA1 cDNA FLJ14473 fis, clone MAMMA1001080, highly similar to; IGHV3OR16-13;IGHA1 IGH A1 protein	IGHV3OR16-13;IGHA1 cDNA FLJ14473 fis, clone MAMMA1001080, highly similar to; IGHV3OR16-13;IGHA1 IGH A1 protein
72	IGJ immunoglobulin J chain	IGJ immunoglobulin J chain	
73	IGKV1-5 IGKV1-5 protein; IGKC Immunoblobulin light chain (Fragment); IGKV1-5 IGKV1-5 protein; IGKC IGKC protein; IGKV2-24 IGKV2-24 protein; IGKC IGKC protein; IGKV1-5 IGKV1-5 protein; - Putative uncharacterized protein; IGKC IGKC protein; IGKC IGKC protei	IGKV1-5 IGKV1-5 protein; IGKC Immunoblobulin light chain (Fragment); IGKV1-5 IGKV1-5 protein; IGKC IGKC protein; IGKV2-24 IGKV2-24 protein; IGKC IGKC protein; IGKV1-5 IGKV1-5 protein; - Putative uncharacterized protein; IGKC IGKC protein; IGKC IGKC prote	IGKV1-5 IGKV1-5 protein; IGKC Immunoblobulin light chain (Fragment); IGKV1-5 IGKV1-5 protein; IGKC IGKC protein; IGKV2-24 IGKV2-24 protein; IGKC IGKC protein; IGKV1-5 IGKV1-5 protein; - Putative uncharacterized protein; IGKC IGKC protein; IGKC IGKC protei
74	IGL@ IGL@ protein; IGLV3-25 IGLV3-25 protein; IGL@ IGL@ protein; IGL@;IGLC1;IGLV2-14;IGLC2;IGLC3 IGLV2-14 protein; IGL@ IGL@ protein; IGL@ IGL@ protein; IGLV2-14 IGLV2-14 protein; - Lambda-chain; IGL@ IGL@ protein	IGL@ IGL@ protein	IGL@ IGL@ protein
75		IGLV3-25 IGLV3-25 protein; IGL@ IGL@ protein	

76	IGLV4-3 IGLV4-3 protein; IGL@ IGL@ protein; IGL@ IGL@ protein; IGL@ IGL@ protein; IGLC1;IGLV2-14;IGLC2;IGLC3 IGLV2-14 protein	IGLV4-3 IGLV4-3 protein; IGL@ IGL@ protein; IGL@ IGL@ protein; IGL@ IGL@ protein; IGLC1;IGLV2-14;IGLC2;IGLC3 IGLV2-14 protein	IGLV4-3 IGLV4-3 protein; IGL@ IGL@ protein; IGL@ IGL@ protein; IGL@ IGL@ protein; IGLC1;IGLV2-14;IGLC2;IGLC3 IGLV2-14 protein
77		JAK1 janus kinase 1	
78		KATNAL1 Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 1	
79		KCNV1 Potassium voltage-gated channel subfamily V member 1	
80	KCNJ2 Inward rectifier potassium channel 2		KCNJ2 Inward rectifier potassium channel 2
81	KIAA1543 Uncharacterized protein KIAA1543; KIAA1543 hypothetical protein LOC57662 isoform 1	KIAA1543 Uncharacterized protein KIAA1543; KIAA1543 hypothetical protein LOC57662 isoform 1	
82		KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9	
83			KSR2 Isoform 2 of Kinase suppressor of Ras 2; KSR2 Isoform 1 of Kinase suppressor of Ras 2
84			LAMA5 Laminin subunit alpha-5
85		LOC100127909 CDNA FLJ26912 fis. clone RCT02392	
86		LOC100132828 similar to hCG1993470	
87		LOC100133739 Putative uncharacterized protein DKFZp686C15213	
88		LOC100133944 similar to IgGfC-binding protein precursor; FCGBP IgGfC-binding protein	
89		LOC727877 hypothetical protein isoform 2	
90	LSMD1 Isoform 2 of LSM domain-containing protein 1		
91		LYZ Lysozyme C	
92			MAP3K11 Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11; SPTBN5 Spectrin beta chain, brain 4; AKAP9 Isoform 1 of A-kinase anchor protein 9; AKAP9 A-kinase anchor protein 9 (Protein kinase A-anchoring protein 9) (PRK; AKAP9 Isoform 3 of A-kinase anchor p
93			MBL2 Mannose-binding protein C
94	MGP Matrix Gla protein	MGP Matrix Gla protein	MGP Matrix Gla protein
95			MTSS1 Isoform 1 of Metastasis suppressor protein 1; MTSS1 Isoform 3 of Metastasis suppressor protein 1; ABBA-1 26 kDa protein; ABBA-1 Isoform 1 of MTSS1-like protein; ABBA-1 Isoform 2 of MTSS1-like protein
96		MYO5C Myosin-Vc	MYO5A Isoform 1 of Myosin-Va; MYO5A Isoform 2 of Myosin-Va; MYO5A Isoform 3 of Myosin-Va; MYO5B Myosin-Vb; MYO5B CDNA: FLJ21683 fis. clone COL09335; MYO5A Myosin V; MYO5A Uncharacterized protein MYO5A; MYO5A Myosin Va variant; MYO5A Myosin V (Fragment)
97		N4BP1 NEDD4-binding protein 1	
98	NCL cDNA FLJ10452 fis. clone NT2RP1000966, highly similar to NUCLEOLIN; NCL NCL protein; NCL Nucleolin		
99	NUCKS1 Isoform 1 of Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases; NUCKS1 24 kDa protein; NUCKS1 Isoform 2 of Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases; NUCKS1 34 kDa protein		
100	NUP50 Nucleoporin 50 kDa; NUP50 nucleoporin 50kDa isoform a		
101		NVL Isoform 1 of Nuclear valosin-containing protein-like; NVL Isoform 2 of Nuclear valosin-containing protein-like; NVL Isoform 3 of Nuclear valosin-containing protein-like	
102		OR5J2 Olfactory receptor 5J2	

103		PARD3 Isoform 7 of Partitioning-defective 3 homolog; PARD3 Isoform 1 of Partitioning-defective 3 homolog; PARD3 Isoform 6 of Partitioning-defective 3 homolog; PARD3 Isoform 5 of Partitioning-defective 3 homolog; PARD3 Isoform 8 of Partitioning-defective 3
104	PCNA Proliferating cell nuclear antigen	
105	PDE10A 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 10A2; PDE10A Isoform PDE10A1 of cAMP and cAMP-inhibited cGMP 3',5'-cyclic phospho; PDE10A Phosphodiesterase 10A1	PDE10A 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 10A2; PDE10A Isoform PDE10A1 of cAMP and cAMP-inhibited cGMP 3',5'-cyclic phospho; PDE10A Phosphodiesterase 10A1
106		PKD1 Isoform 3 of Polycystin-1; PKD1 Isoform 1 of Polycystin-1; PKD1 Isoform 2 of Polycystin-1; PKD1 Polycystin 1 variant; PKD1 Polycystic kidney disease-associated protein
107	PPBP Platelet basic protein	PPBP Platelet basic protein
108	PPIE Isoform A of Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E; PPIE Isoform B of Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E; PPIE peptidylprolyl isomerase E isoform 3; PPIE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase; PPIE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	
109		PRKAR2A PRKAR2A protein
110		PRKD1 Uncharacterized protein PRKD1; PRKD1 Uncharacterized protein PRKD1; PRKD1 Protein kinase D1
111		PROC Vitamin K-dependent protein C
112		PROCA1 17 kDa protein
113		PRSS1 Trypsin-1
114		PRSS12 Neurotrypsin
115		RGS13 Regulator of G-protein signaling 13
116		RIMS2 Isoform 6 of Regulating synaptic membrane exocytosis protein 2; RIMS2 Isoform 2 of Regulating synaptic membrane exocytosis protein 2; RIMS2 Isoform 5 of Regulating synaptic membrane exocytosis protein 2; RIMS2 Isoform 4 of Regulating synaptic membra
117	RNASE4 Ribonuclease 4	RNASE4 Ribonuclease 4
118		SLC11A1 SLC11A1 protein
119		SLPI Antileukoproteinase
120		SNTG2 Gamma-2-syntrophin
121		SPATA21 cDNA FLJ46227 fis, clone TEST14014891
122		SPECC1L Cytospin-A
123		SPZ1 Isoform 2 of Spermatogenic leucine zipper protein 1; SPZ1 Isoform 1 of Spermatogenic leucine zipper protein 1
124		TANC2 Isoform 1 of Protein TANC2; 2 Isoform 2 of Protein TANC2
125		TAOK3 Serine/threonine-protein kinase TAO3; TAOK3 53 kDa protein; TAOK3 cDNA FLJ31808 fis, clone NT2RI2009269, highly similar to Serine/threo
126	TEX2 Isoform 2 of Testis-expressed sequence 2 protein; TEX2 Isoform 1 of Testis-expressed sequence 2 protein	
127	TF Serotransferrin; TF Transferrin variant (Fragment)	TF Serotransferrin; TF Transferrin variant (Fragment)
128		
129		THBS4 Thrombospondin-4
130		THSD1 Isoform 1 of Thrombospondin type-1 domain-containing protein 1; THSD1 Isoform 2 of Thrombospondin type-1 domain-containing protein 1
131	TIAM2 Isoform 2 of T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 2; TIAM2 Isoform 1 of T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 2; TIAM2 Isoform 5 of T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 2; TIAM2 Isoform 4 of T-lymphoma inv	

132		TMEM141 27 kDa protein; TMEM141 Protein; KIAA1984;TMEM141 Isoform 3 of Uncharacterized coiled-coil domain-containing; KIAA1984 Isoform 1 of Uncharacterized coiled-coil domain-containing protein; KIAA1984 Isoform 2 of Uncharacterized coiled-coil domain-con	
133		TP53BP1 Protein	
134			TREX2;UCHL5IP Uncharacterized protein UCHL5IP
135		TTLL1 Isoform 3 of Probable tubulin polyglutamylase TTLL1; TTLL1 Isoform A of Probable tubulin polyglutamylase TTLL1; TTLL1 Isoform 4 of Probable tubulin polyglutamylase TTLL1	
136		TTN Isoform 2 of Titin; TTN Isoform 7 of Titin; TTN Isoform 8 of Titin; TTN Isoform 5 of Titin; TTN Isoform 4 of Titin; TTN Isoform 1 of Titin; TTN titin isoform N2-A	
137	VTN Vitronectin	VTN Vitronectin	
138		WDR87 Isoform 2 of WD repeat-containing protein 87; WDR87 Isoform 1 of WD repeat-containing protein 87; WDR87 similar to hCG1785223	
139		WISP2 WNT1-inducible-signaling pathway protein 2	
140	ZSCAN21 Zinc finger and SCAN domain-containing protein 21; ZSCAN21 Uncharacterized protein ZSCAN21 (Fragment); ZSCAN21 Putative uncharacterized protein DKFZp686H10254		

Tab. 8.11 Rohdaten der Massenspektrometrie der eluierten Fraktionen: 2. Versuch

8.7 Kalziumkonzentration im menschlichen Plasma

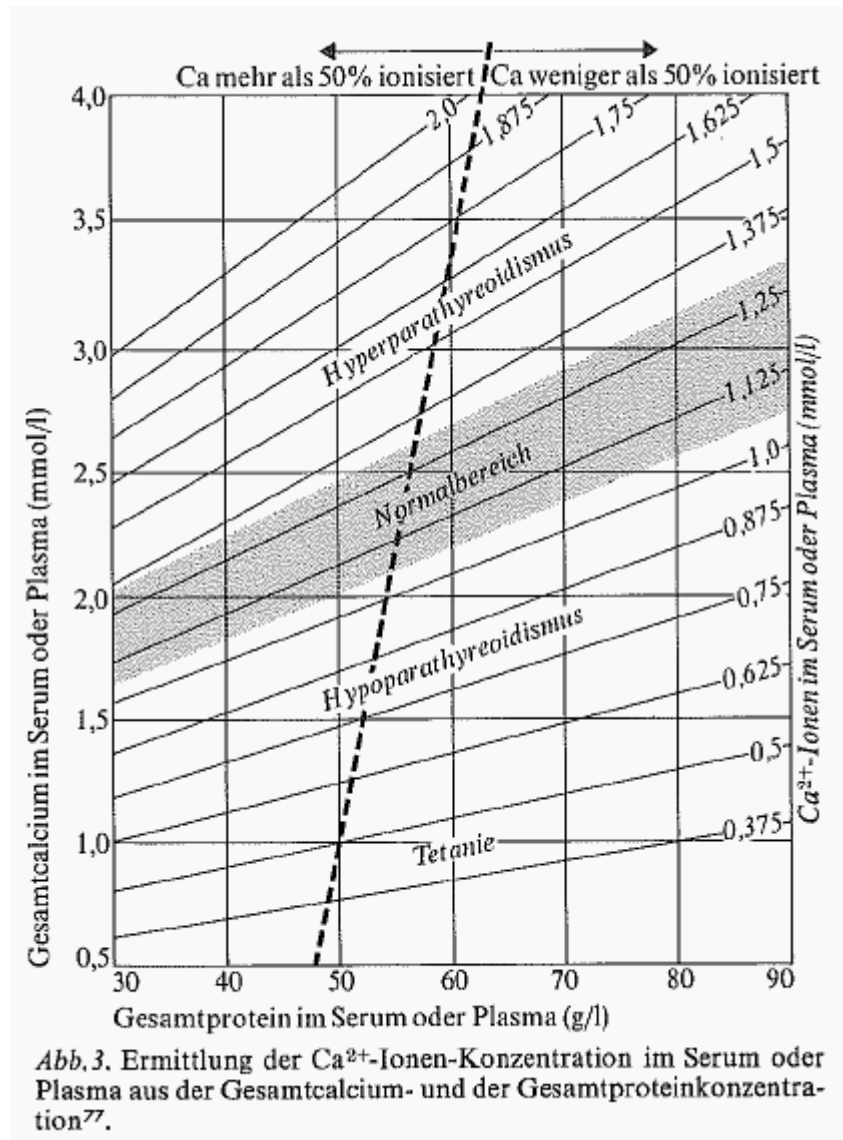
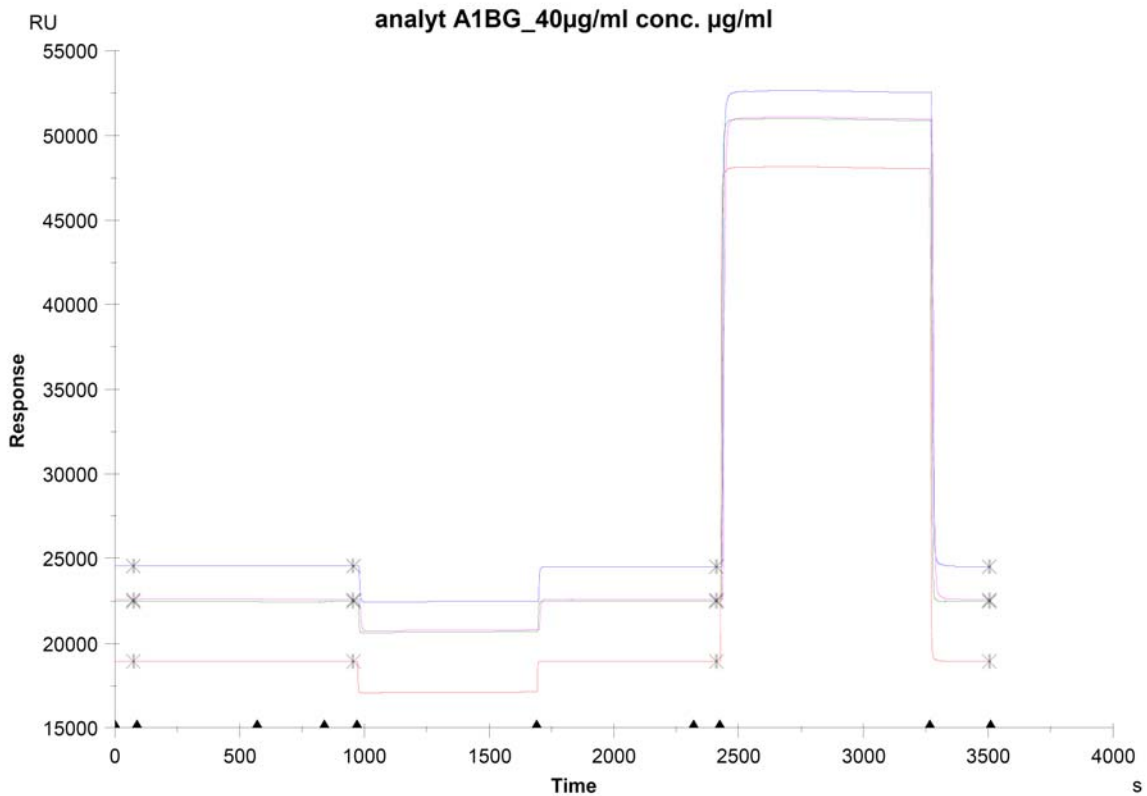


Abb. 8.1 Kalziumkonzentration im menschlichen Plasma aus Wissenschaftliche Tabellen Geigy – Teilband Hämatologie und Humangenetik

8.8 SPR Versuche

037-A1BG

11-Nov-08 08:34:37



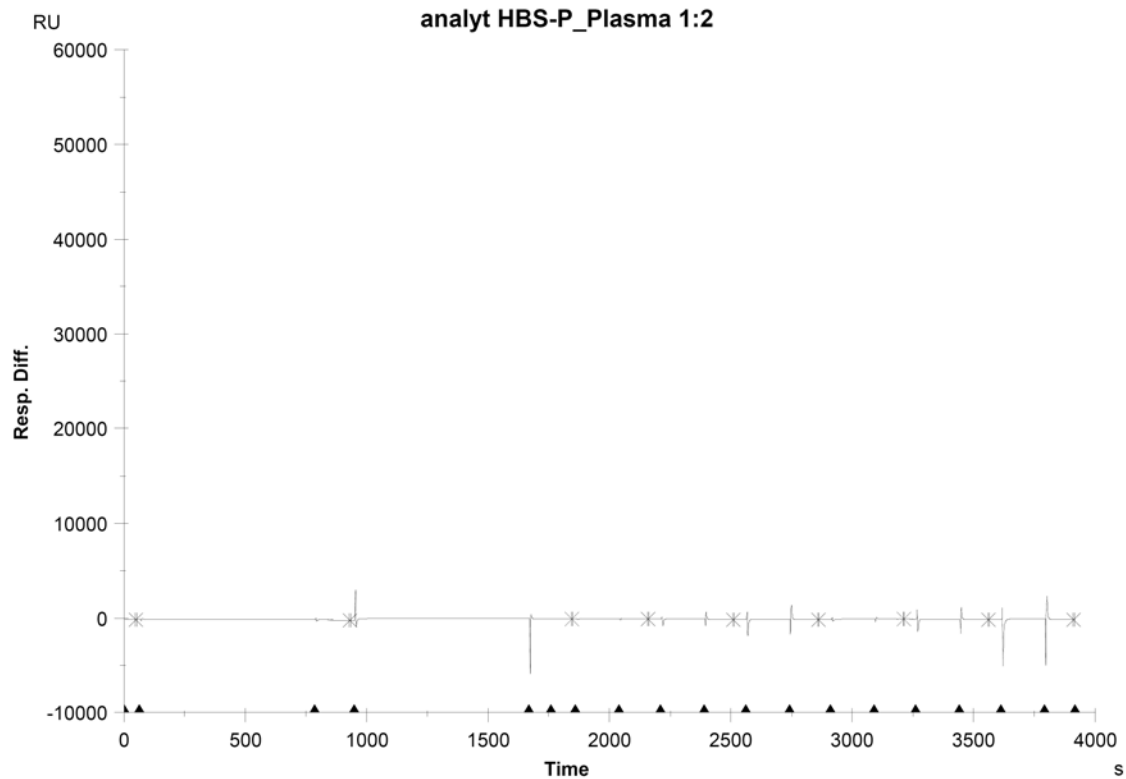
Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
1	kinetik1	75.5	18943.5	Ok	Yes	0	baseline
2	kinetik1	75.5	22481.9	Ok	Yes	0	baseline
3	kinetik1	75.5	24539.7	Ok	Yes	0	baseline
4	kinetik1	75.5	22603.0	Ok	Yes	0	baseline
1	kinetik1	955.5	18946.6	Ok	No	3.1	CaCl2_2.5mM_pH_7.2
2	kinetik1	955.5	22482.3	Ok	No	0.4	CaCl2_2.5mM_pH_7.2
3	kinetik1	955.5	24536.7	Ok	No	-3.0	CaCl2_2.5mM_pH_7.2
4	kinetik1	955.5	22603.3	Ok	No	0.3	CaCl2_2.5mM_pH_7.2
1	kinetik1	2411.5	18946.4	Ok	No	2.8	A1BG_580µg/ml
2	kinetik1	2411.5	22483.1	Ok	No	1.2	A1BG_580µg/ml
3	kinetik1	2411.5	24520.5	Ok	No	-19.2	A1BG_580µg/ml
4	kinetik1	2411.5	22604.0	Ok	No	1.0	A1BG_580µg/ml
1	kinetik1	3506.5	18939.3	Ok	No	-4.2	0,5M_EDTA_pH_8.0
2	kinetik1	3506.5	22482.5	Ok	No	0.6	0,5M_EDTA_pH_8.0
3	kinetik1	3506.5	24500.9	Ok	No	-38.8	0,5M_EDTA_pH_8.0
4	kinetik1	3506.5	22593.2	Ok	No	-9.8	0,5M_EDTA_pH_8.0

Abb. 8.2 Sensogramm des nativen A1BG

006-HEPES+Voll- Plasma - Proteinbindung an TMGs

18-Apr-08 15:26:52

Cycle: 1

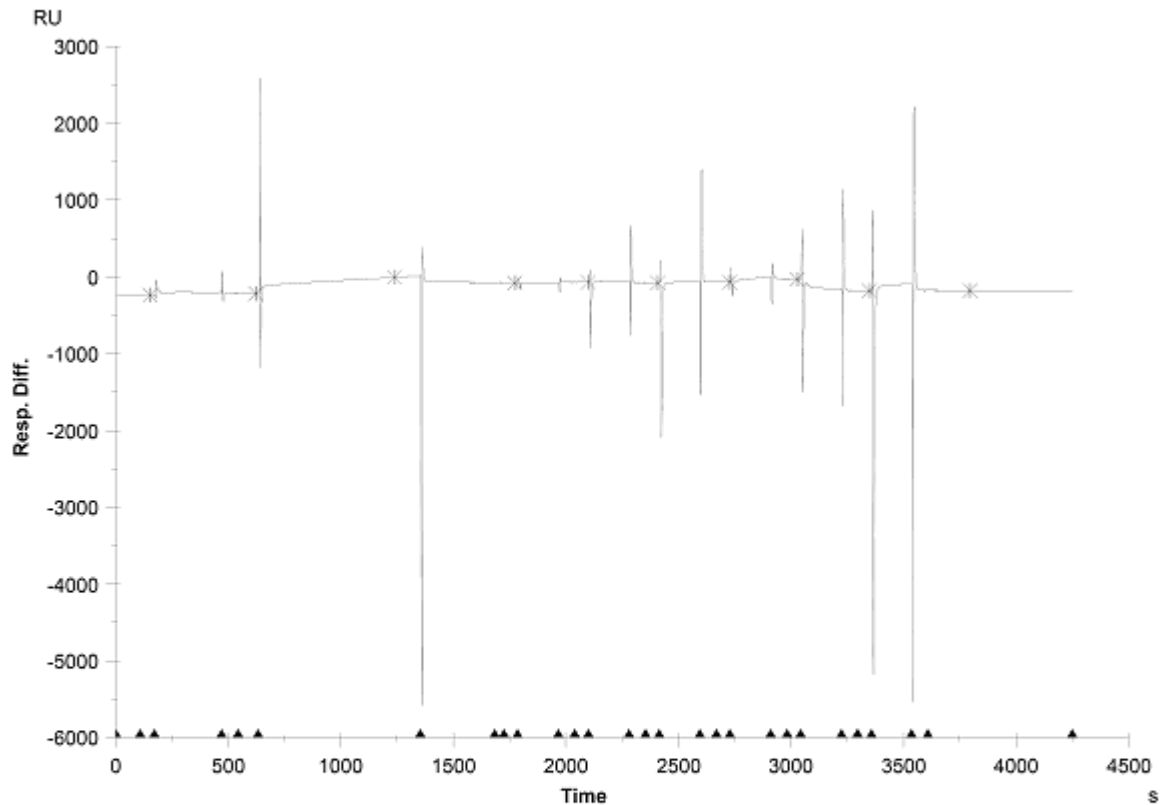


Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
2-1	kinetik1	50.5	-175.5	Ok	Yes	0	baseline
2-1	kinetik1	933.5	-203.5	Ok	Yes	-28.0	CaCl2
2-1	kinetik1	1845.5	-103.4	Ok	No	100.2	HBS-P_Plasma
2-1	kinetik1	2160.5	-112.5	Ok	No	91.0	0.05M_Triss_pH_7,2
2-1	kinetik1	2510.5	-133.0	Ok	No	70.5	1M_NaCl_pH_7,0
2-1	kinetik1	2861.5	-137.5	Ok	No	66.1	2M_NaCl_pH_7,0
2-1	kinetik1	3212.5	-124.3	Ok	No	79.3	0.1M_Citrat_pH=4.5
2-1	kinetik1	3562.5	-167.1	Ok	No	36.4	1M_Na-Thiocyanat_pH=7.0
2-1	kinetik1	3912.5	-157.6	Ok	No	46.0	0.5M_Na-EDTA_pH=8.0

Abb. 8.3 Sensogramm zur Bestimmung des optimalen Elutionspuffers nach Ligandensuche im heparinisierten Plasma versetzt mit HEPES-Puffer (1/2)

005-LCB Plasma - Proteinbindung an TMGs

18-Apr-08 13:53:23



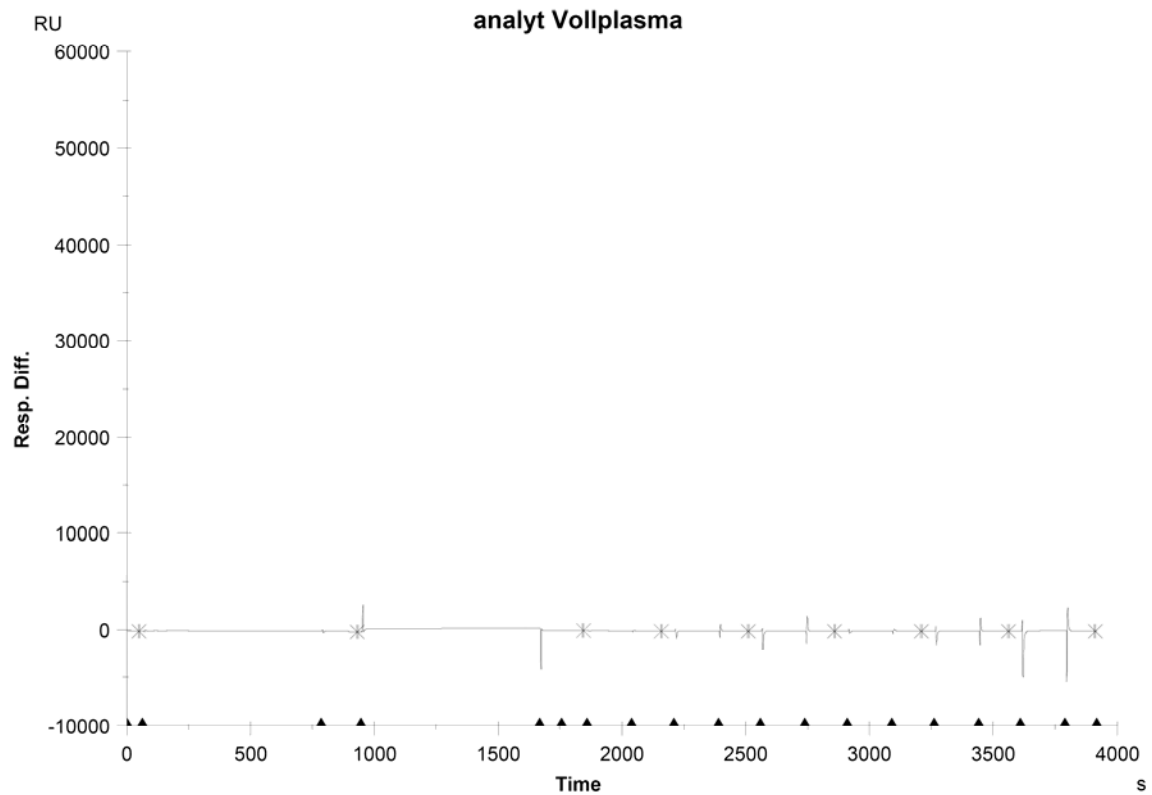
Fc	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
2-1	155.5	-230.3	Ok	Yes	0	
2-1	625.5	-213.8	Ok	Yes	16.5	2,5mM CaCl ₂ pH 7,0
2-1	1774.5	-73.4	Ok	No	140.5	LCB Plasma 1:2
2-1	2099.5	-69.6	Ok	No	144.2	0,05M Tris Puffer pH 7,2
2-1	2409.5	-72.6	Ok	No	141.3	1M NaCl pH 7,0
2-1	2728.5	-66.8	Ok	No	147.1	2M NaCl
2-1	3028.5	-26.1	Ok	No	187.8	0.1M Citrat-Puffer pH 4,5
2-1	3348.5	-178.4	Ok	No	35.4	1M NaSCN pH 7.0
2-1	3796.5	-175.3	Ok	No	38.5	0,5M Na ₂ EDTAx2H ₂ O pH 8,0

Abb. 8.4 Sensogramm zur Bestimmung des optimalen Elutionspuffers nach Ligandensuche im heparinisierten Plasma unter Zusatz von LCB-Reagenz (1/2)

006-HEPES+Voll- Plasma - Proteinbindung an TMGs

18-Apr-08 15:26:52

Cycle: 2



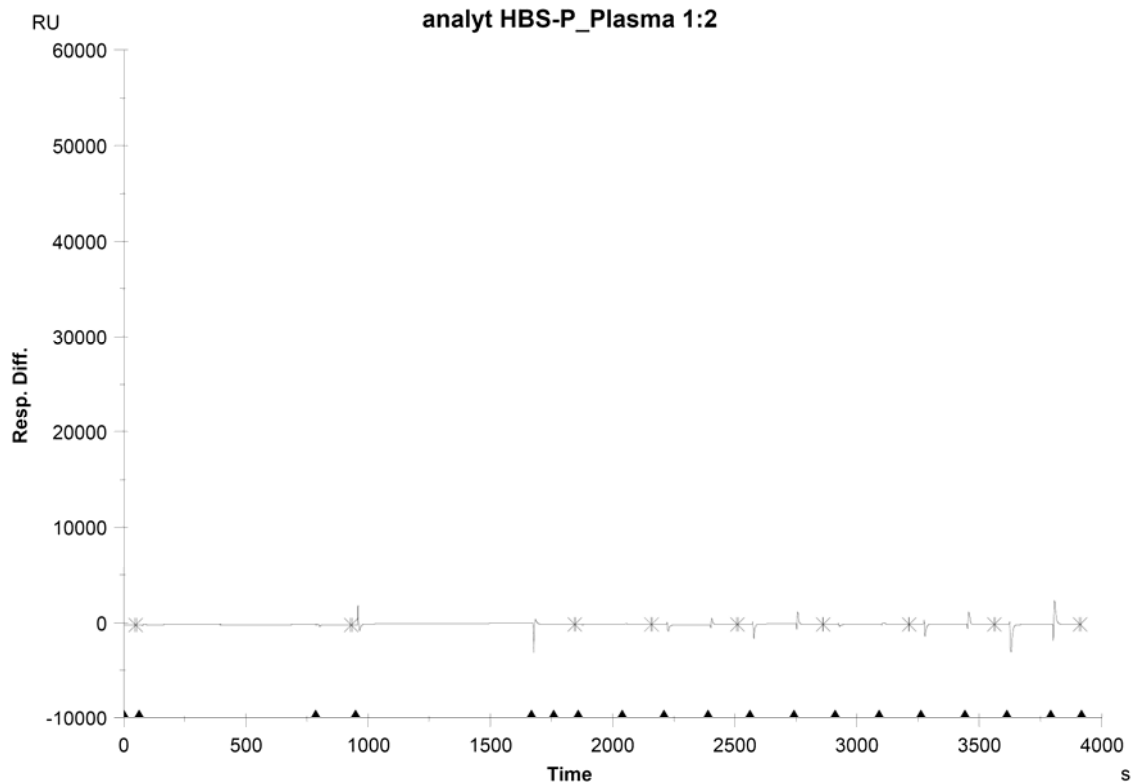
Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
2-1	kinetik1	50.5	-159.5	Ok	Yes	0	baseline
2-1	kinetik1	933.5	-189.5	Ok	Yes	-30.0	CaCl2
2-1	kinetik1	1844.5	-109.9	Ok	No	79.6	Vollplasma
2-1	kinetik1	2159.5	-124.2	Ok	No	65.3	0.05M_Triss_pH_7,2
2-1	kinetik1	2510.5	-151.1	Ok	No	38.4	1M_NaCl_pH_7,0
2-1	kinetik1	2860.5	-156.6	Ok	No	32.9	2M_NaCl_pH_7,0
2-1	kinetik1	3211.5	-149.9	Ok	No	39.6	0.1M_Citrat_pH=4.5
2-1	kinetik1	3561.5	-181.8	Ok	No	7.7	1M_Na-Thiocyanat_pH=7.0
2-1	kinetik1	3911.5	-168.4	Ok	No	21.2	0.5M_Na-EDTA_pH=8.0

Abb. 8.5 Sensogramm zur Bestimmung des optimalen Elutionspuffers nach Ligandensuche im heparinisierten Plasma

006-HEPES+Voll- Plasma - Proteinbindung an TMGs

18-Apr-08 15:26:52

Cycle: 1

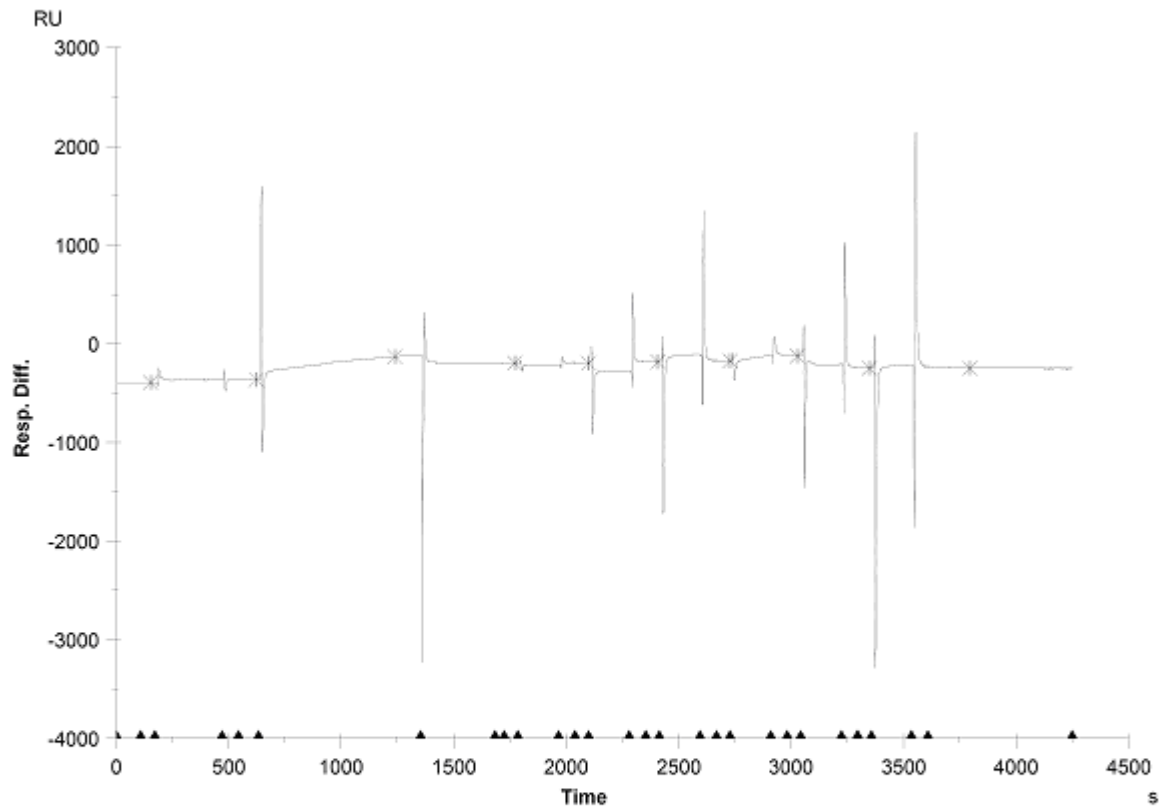


Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
4-3	kinetik1	50.5	-257.8	Ok	Yes	0	baseline
4-3	kinetik1	933.5	-253.5	Ok	Yes	4.2	CaCl2
4-3	kinetik1	1845.5	-147.1	Ok	No	106.4	HBS-P_Plasma
4-3	kinetik1	2160.5	-155.3	Ok	No	98.2	0.05M_Triss_pH_7,2
4-3	kinetik1	2510.5	-174.5	Ok	No	79.1	1M_NaCl_pH_7,0
4-3	kinetik1	2861.5	-177.6	Ok	No	76.0	2M_NaCl_pH_7,0
4-3	kinetik1	3212.5	-160.7	Ok	No	92.8	0.1M_Citrat_pH=4.5
4-3	kinetik1	3562.5	-194.1	Ok	No	59.4	1M_Na-Thiocyanat_pH=7.0
4-3	kinetik1	3912.5	-183.7	Ok	No	69.8	0.5M_Na-EDTA_pH=8.0

Abb. 8.6 Sensogramm zur Bestimmung des optimalen Elutionspuffers nach Ligandensuche im heparinisierten Plasma versetzt mit HEPES-Puffer (1/2)

005-LCB Plasma - Proteinbindung an TMGs

18-Apr-08 13:53:23



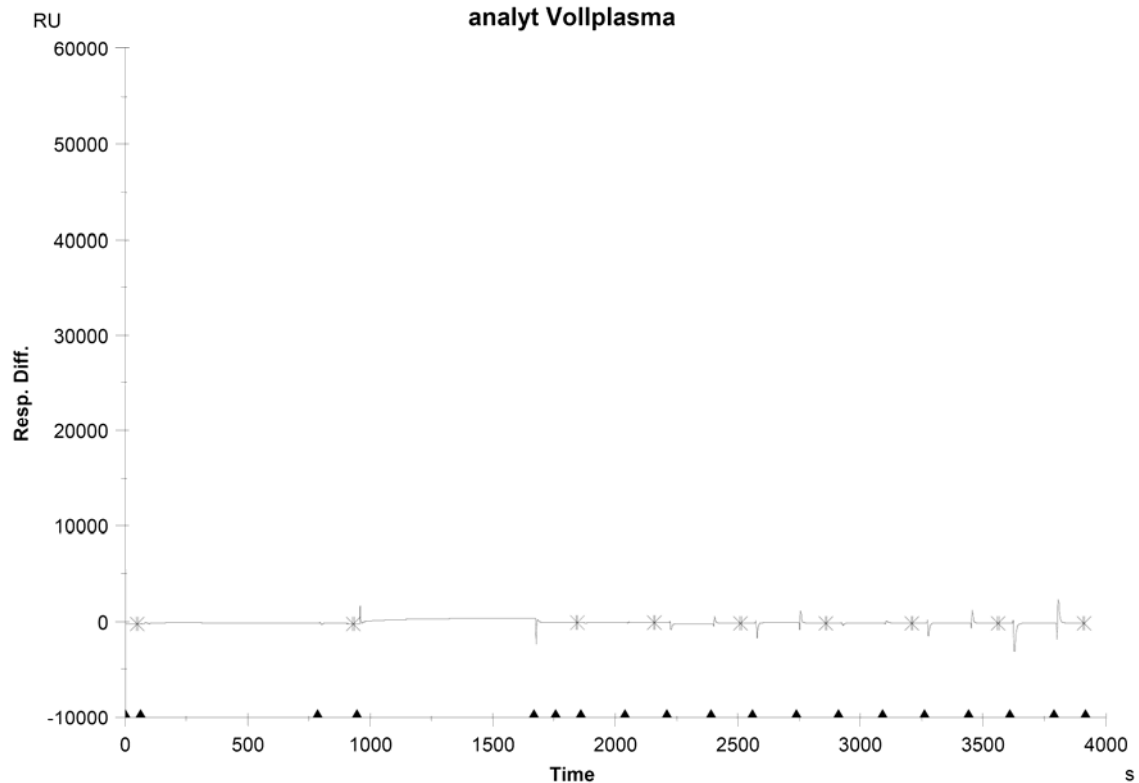
Fc	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
4-3	155.5	-390.9	Ok	Yes	0	
4-3	625.5	-365.5	Ok	Yes	25.4	2,5mM CaCl2 pH 7,0
4-3	1774.5	-197.7	Ok	No	167.8	LCB Plasma 1:2
4-3	2099.5	-192.8	Ok	No	172.6	0,05M Tris Puffer pH 7,2
4-3	2409.5	-184.0	Ok	No	181.5	1M NaCl pH 7,0
4-3	2728.5	-176.7	Ok	No	188.8	2M NaCl
4-3	3028.5	-121.2	Ok	No	244.3	0.1M Citrat-Puffer pH 4,5
4-3	3348.5	-243.7	Ok	No	121.7	1M NaSCN pH 7.0
4-3	3796.5	-246.5	Ok	No	119.0	0,5M Na2EDTAx2H2O pH 8,0

Abb. 8.7 Sensogramm zur Bestimmung des optimalen Elutionspuffers nach Ligandensuche im heparinisierten Plasma unter Zusatz von LCB-Reagenz (1/2)

006-HEPES+Voll- Plasma - Proteinbindung an TMGs

18-Apr-08 15:26:52

Cycle: 2

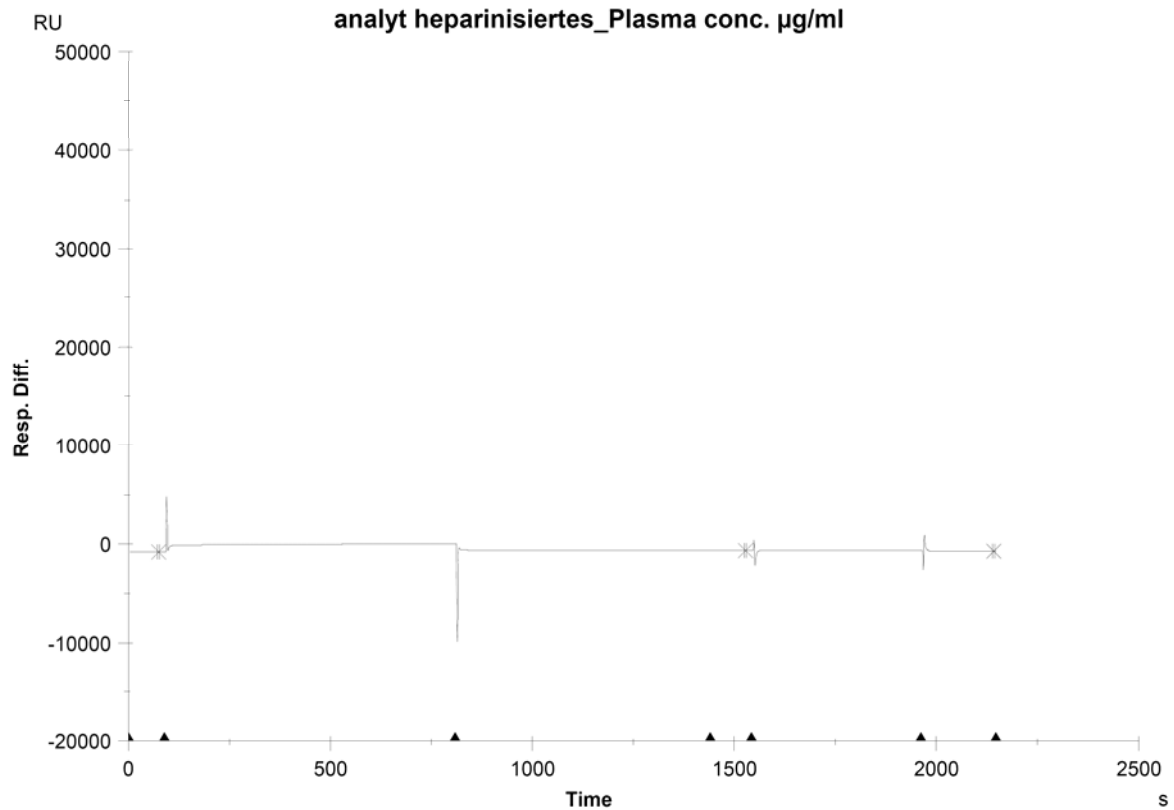


Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
4-3	kinetik1	50.5	-189.4	Ok	Yes	0	baseline
4-3	kinetik1	933.5	-189.7	Ok	Yes	-0.2	CaCl2
4-3	kinetik1	1844.5	-92.7	Ok	No	96.9	Vollplasma
4-3	kinetik1	2159.5	-112.1	Ok	No	77.6	0.05M_Triss_pH_7,2
4-3	kinetik1	2510.5	-140.4	Ok	No	49.3	1M_NaCl_pH_7,0
4-3	kinetik1	2860.5	-145.2	Ok	No	44.5	2M_NaCl_pH_7,0
4-3	kinetik1	3211.5	-138.0	Ok	No	51.7	0.1M_Citrat_pH=4.5
4-3	kinetik1	3561.5	-163.9	Ok	No	25.8	1M_Na-Thiocyanat_pH=7.0
4-3	kinetik1	3911.5	-153.2	Ok	No	36.5	0.5M_Na-EDTA_pH=8.0

Abb. 8.8 Sensogramm zur Bestimmung des optimalen Elutionspuffers nach Ligandensuche im heparinisierten Plasma

019-Plasmaproteinbindung an TMG3 in NaCl 2.5mM CaCl2 - Albumin Refe... 14-Jul-08 14:33:54

Cycle: 1

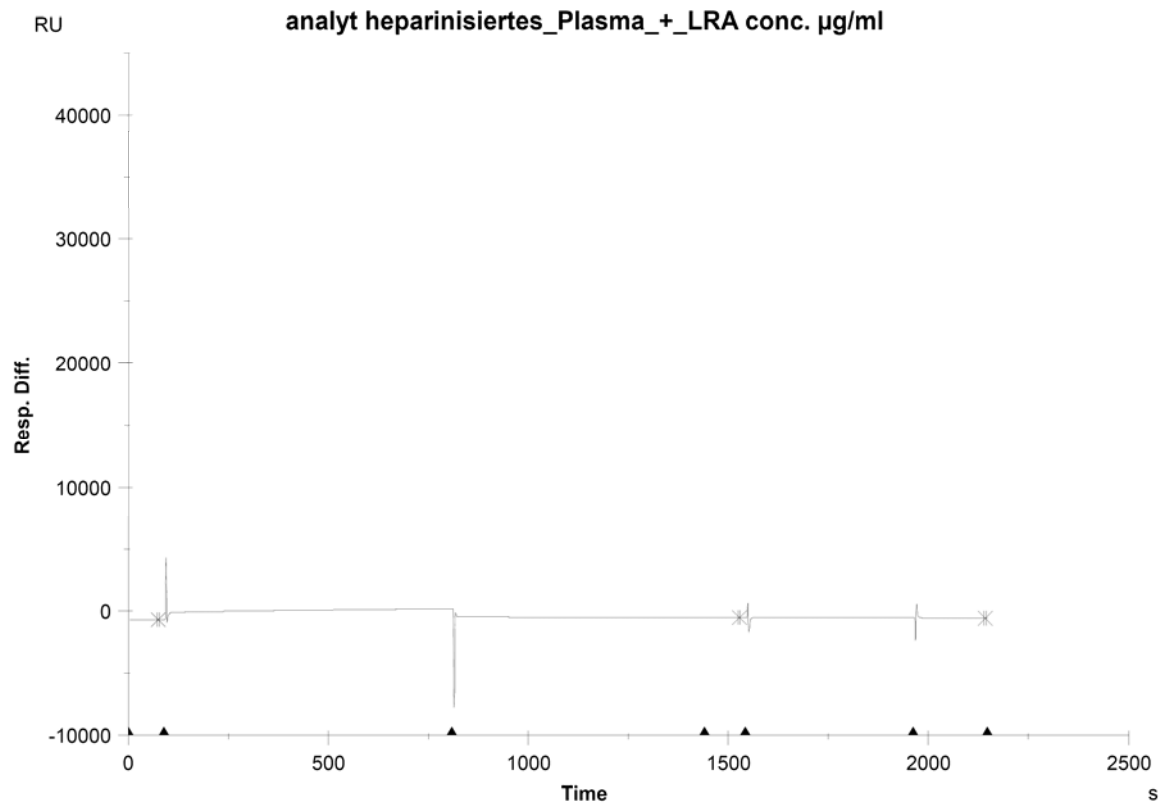


Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
2-1	kinetik1	75.5	-820.4	Ok	Yes	0	baseline
2-1	kinetik1	1527.5	-675.8	Ok	No	144.6	heparinisiertes_Plasma
2-1	kinetik1	2142.5	-706.3	Ok	No	114.1	2M_NaCl_pH7.0

Abb. 8.9 Kontrollsensogramm (ohne Inkubation mit Lipidentferner) zur Bestimmung des Einflusses eines Lipidentfeners auf das Erreichen der Basislinie nach Ligandensuche im heparinisierten Plasma

019-Plasmaproteinbindung an TMG3 in NaCl 2.5mM CaCl2 - Albumin Refe... 14-Jul-08 14:33:54

Cycle: 2

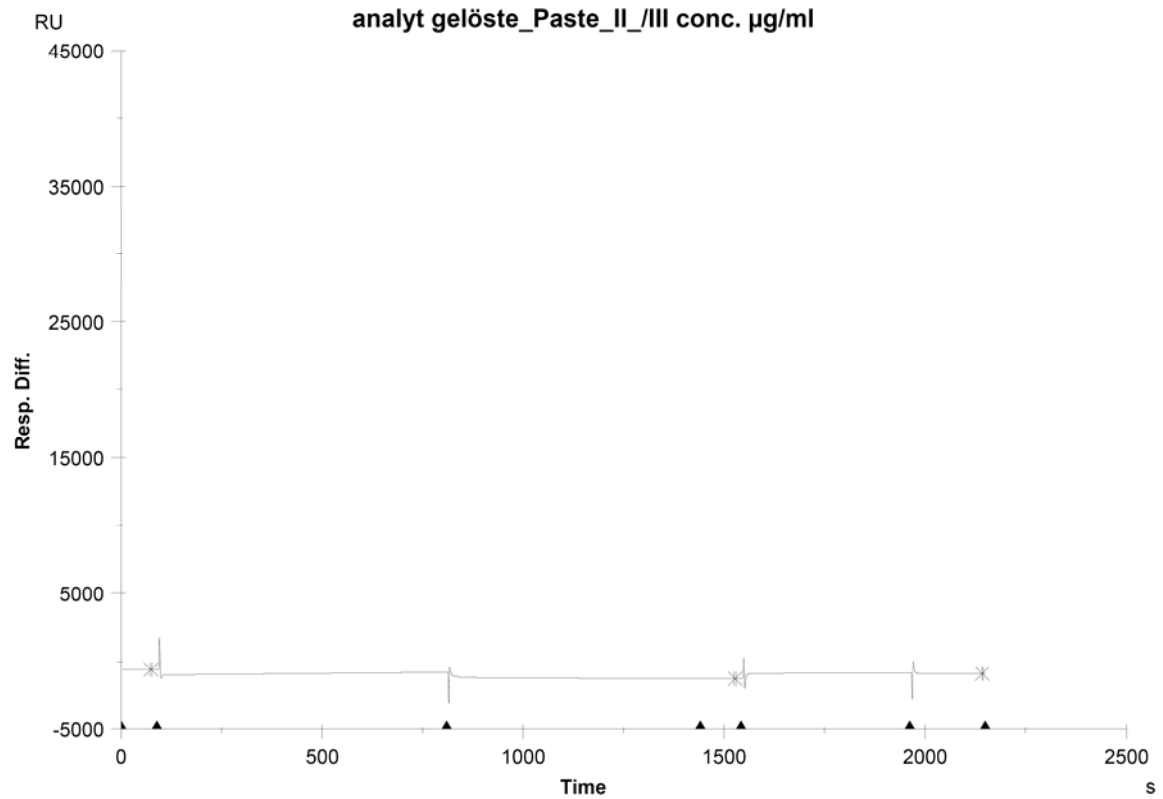


Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
2-1	kinetik1	75.5	-711.9	Ok	Yes	0	baseline
2-1	kinetik1	1527.5	-544.5	Ok	No	167.4	heparinisiertes_Plasma+_LRA
2-1	kinetik1	2142.5	-584.0	Ok	No	127.9	2M_NaCl_pH7.0

Abb. 8.10 Sensogramm zur Bestimmung des Einflusses eines Lipidentferners auf das Erreichen der Basislinie nach Ligandensuche im heparinisierten Plasma

019-Plasmaproteinbindung an TMG3 in NaCl 2.5mM CaCl2 - Albumin Refe... 14-Jul-08 14:33:54

Cycle: 3

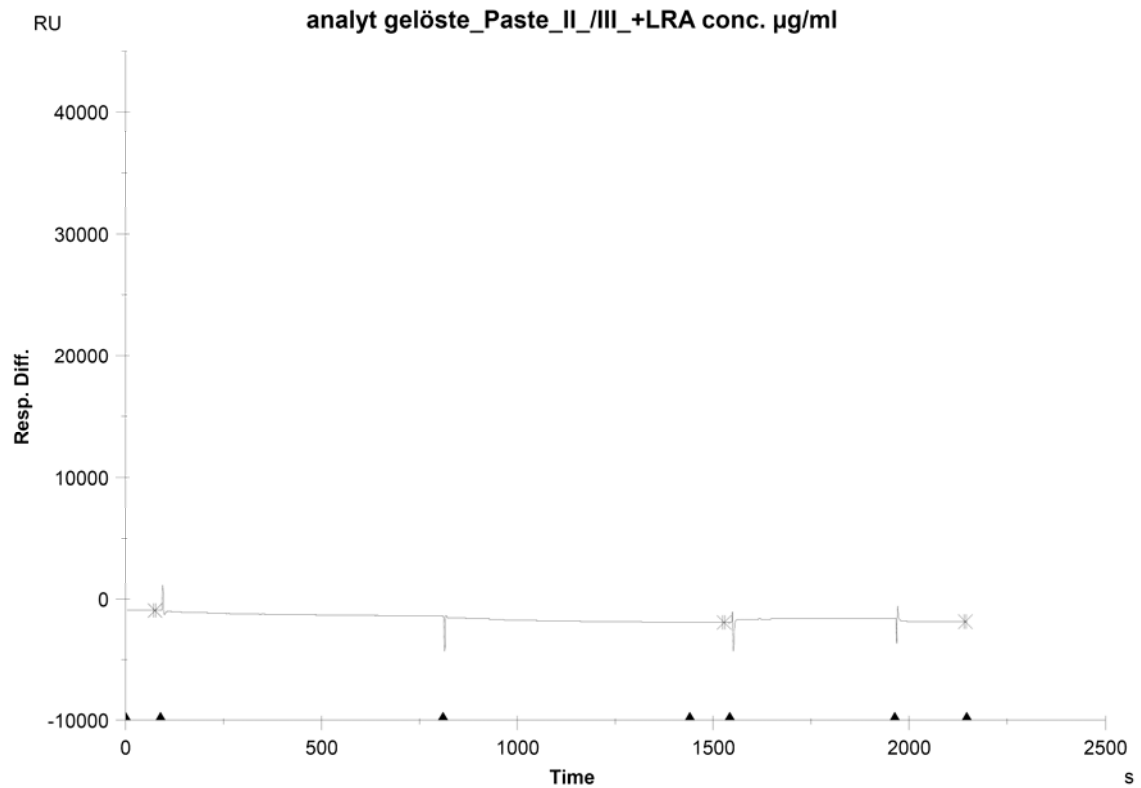


Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
2-1	kinetik1	75.5	-589.2	Ok	Yes	0	baseline
2-1	kinetik1	1528.5	-1258.9	Ok	No	-669.7	gelöste_Paste_II_/III
2-1	kinetik1	2143.5	-913.7	Ok	No	-324.5	2M_NaCl_pH7.0

Abb. 8.11 Kontrollsensogramm (ohne Inkubation mit Lipidentferner) zur Bestimmung des Einflusses eines Lipidentfeners auf das Erreichen der Basislinie nach Ligandensuche in einem Intermediat der Plasmafraktionierung

019-Plasmaproteinbindung an TMG3 in NaCl 2.5mM CaCl2 - Albumin Refe... 14-Jul-08 14:33:54

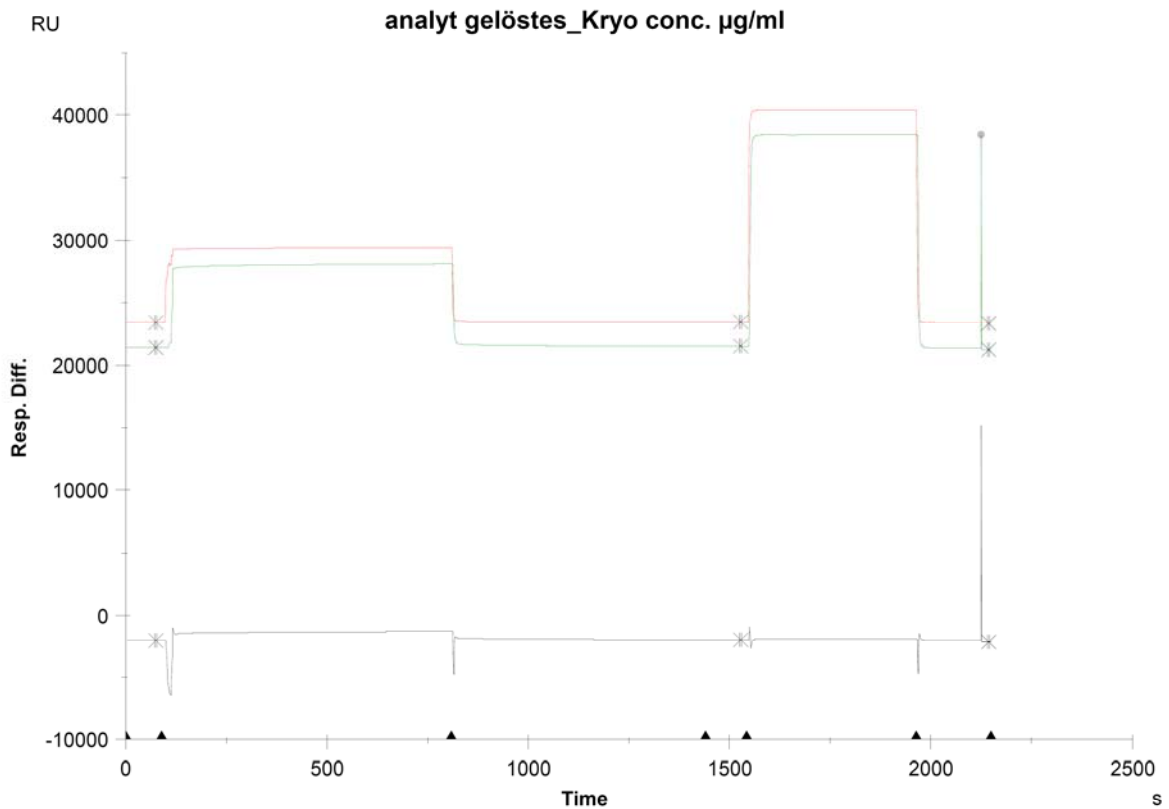
Cycle: 4



Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
2-1	kinetik1	75.5	-915.7	Ok	Yes	0	baseline
2-1	kinetik1	1528.5	-1943.6	Ok	No	-1027.9	gelöste_Paste_II_/III_+LRA
2-1	kinetik1	2143.5	-1846.6	Ok	No	-930.9	2M_NaCl_pH7.0

Abb. 8.12 Sensogramm zur Bestimmung des Einflusses eines Lipidentferners auf das Erreichen der Basislinie nach Ligandensuche in einem Intermediat der Plasmafraktionierung

Cycle: 5



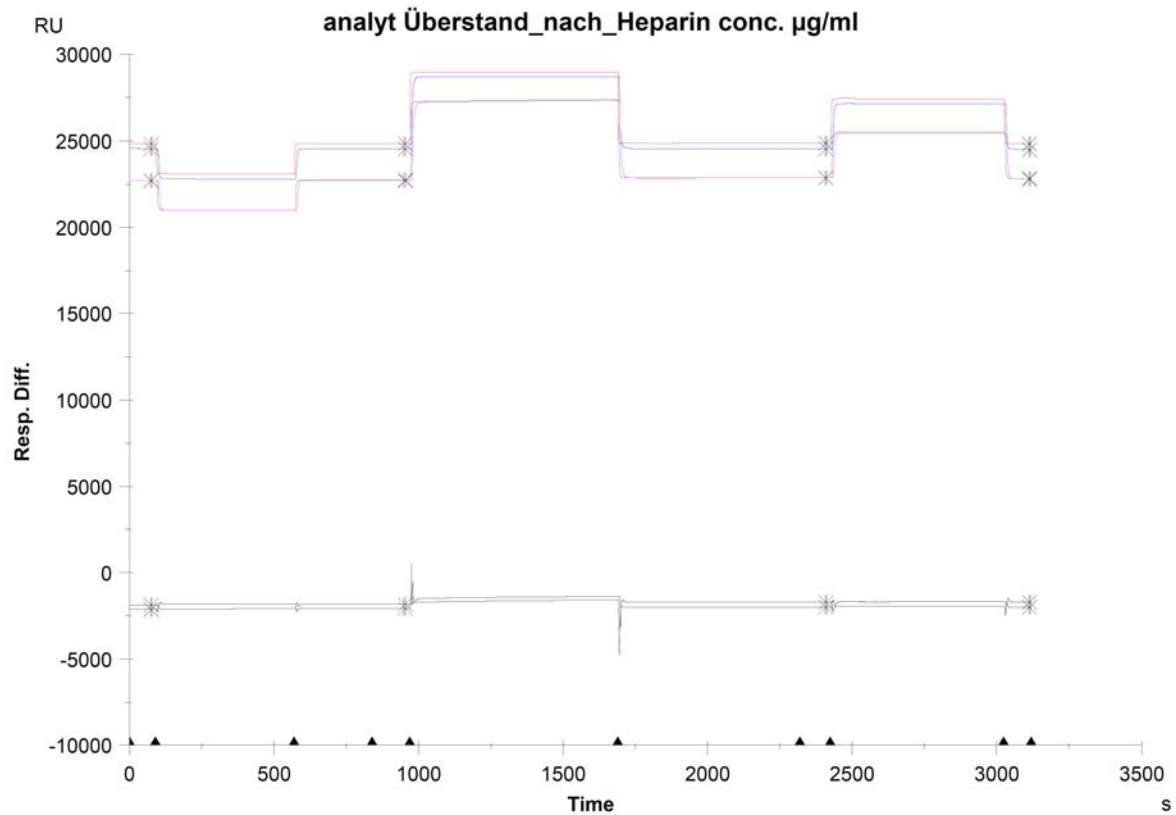
Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
1	kinetik1	75.5	23404.6	Ok	Yes	0	baseline
2	kinetik1	75.5	21381.5	Ok	Yes	0	baseline
2-1	kinetik1	75.5	-2022.9	Ok	Yes	0	baseline
1	kinetik1	1528.5	23448.5	Ok	No	43.8	gelöstes_Kryo
2	kinetik1	1528.5	21470.0	Ok	No	88.5	gelöstes_Kryo
2-1	kinetik1	1528.5	-1978.6	Ok	No	44.4	gelöstes_Kryo
1	kinetik1	2143.5	23361.0	Ok	No	-43.7	2M_NaCl_pH7.0
2	kinetik1	2143.5	21227.8	Ok	No	-153.7	2M_NaCl_pH7.0
2-1	kinetik1	2143.5	-2133.3	Ok	No	-110.3	2M_NaCl_pH7.0

Abb. 8.13 Sensogramm der Ligandensuche in spezifischen Intermediaten der Plasmafraktionierung

030-Test Fraktionen aus Produktion HBS-P

09-Oct-08 14:35:16

Cycle: 1



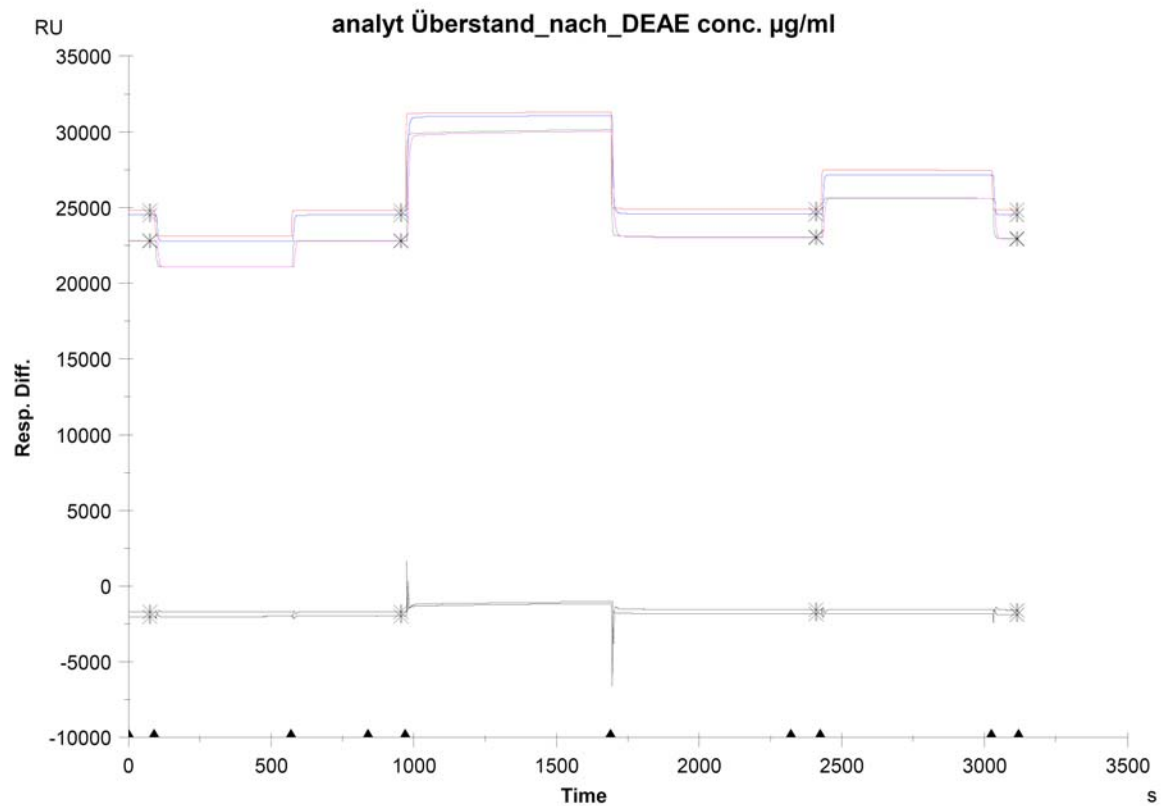
Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
1	kinetik1	75.5	24843.7	Ok	Yes	0	baseline
2	kinetik1	75.5	22720.8	Ok	Yes	0	baseline
3	kinetik1	75.5	24563.6	Ok	Yes	0	baseline
4	kinetik1	75.5	22713.0	Ok	Yes	0	baseline
2-1	kinetik1	75.5	-2123.0	Ok	Yes	0	baseline
4-3	kinetik1	75.5	-1850.7	Ok	Yes	0	baseline
1	kinetik1	954.5	24833.5	Ok	No	-10.2	CaCl2_2.5mM
2	kinetik1	954.5	22736.1	Ok	No	15.3	CaCl2_2.5mM
3	kinetik1	954.5	24544.9	Ok	No	-18.7	CaCl2_2.5mM
4	kinetik1	954.5	22723.1	Ok	No	10.1	CaCl2_2.5mM
2-1	kinetik1	954.5	-2097.5	Ok	No	25.6	CaCl2_2.5mM
4-3	kinetik1	954.5	-1821.8	Ok	No	28.9	CaCl2_2.5mM
1	kinetik1	2409.5	24872.1	Ok	No	28.4	Überstand_nach_Heparin
2	kinetik1	2409.5	22884.1	Ok	No	163.3	Überstand_nach_Heparin
3	kinetik1	2409.5	24555.8	Ok	No	-7.8	Überstand_nach_Heparin
4	kinetik1	2409.5	22860.2	Ok	No	147.2	Überstand_nach_Heparin
2-1	kinetik1	2409.5	-1988.0	Ok	No	135.0	Überstand_nach_Heparin
4-3	kinetik1	2409.5	-1695.5	Ok	No	155.2	Überstand_nach_Heparin
1	kinetik1	3114.5	24828.9	Ok	No	-14.7	100mM_NaCitrat
2	kinetik1	3114.5	22826.5	Ok	No	105.7	100mM_NaCitrat
3	kinetik1	3114.5	24519.9	Ok	No	-43.7	100mM_NaCitrat
4	kinetik1	3114.5	22810.7	Ok	No	97.8	100mM_NaCitrat
2-1	kinetik1	3114.5	-2002.5	Ok	No	120.5	100mM_NaCitrat
4-3	kinetik1	3114.5	-1709.4	Ok	No	141.3	100mM_NaCitrat

Abb. 8.14 Sensogramm der Ligandensuche in spezifischen Intermediaten der Plasmafraktionierung

030-Test Fraktionen aus Produktion HBS-P

09-Oct-08 14:35:16

Cycle: 2



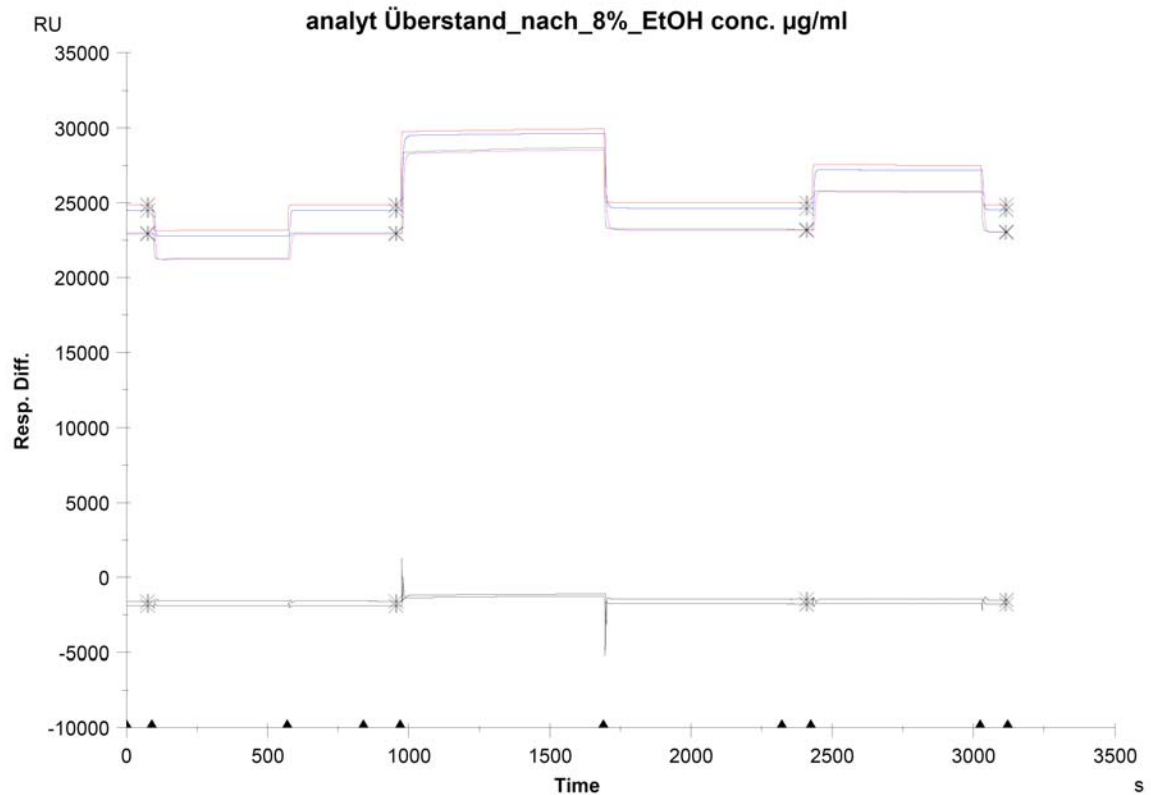
Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
1	kinetik1	76.5	24827.1	Ok	Yes	0	baseline
2	kinetik1	76.5	22819.6	Ok	Yes	0	baseline
3	kinetik1	76.5	24513.3	Ok	Yes	0	baseline
4	kinetik1	76.5	22799.5	Ok	Yes	0	baseline
2-1	kinetik1	76.5	-2007.6	Ok	Yes	0	baseline
4-3	kinetik1	76.5	-1713.8	Ok	Yes	0	baseline
1	kinetik1	955.5	24825.6	Ok	No	-1.5	CaCl2_2.5mM
2	kinetik1	955.5	22828.9	Ok	No	9.3	CaCl2_2.5mM
3	kinetik1	955.5	24509.6	Ok	No	-3.7	CaCl2_2.5mM
4	kinetik1	955.5	22805.3	Ok	No	5.8	CaCl2_2.5mM
2-1	kinetik1	955.5	-1996.7	Ok	No	10.9	CaCl2_2.5mM
4-3	kinetik1	955.5	-1704.2	Ok	No	9.6	CaCl2_2.5mM
1	kinetik1	2409.5	24917.9	Ok	No	90.8	Überstand_nach_DEAE
2	kinetik1	2409.5	23072.6	Ok	No	253.0	Überstand_nach_DEAE
3	kinetik1	2409.5	24571.3	Ok	No	58.0	Überstand_nach_DEAE
4	kinetik1	2409.5	23021.3	Ok	No	221.7	Überstand_nach_DEAE
2-1	kinetik1	2409.5	-1845.2	Ok	No	162.4	Überstand_nach_DEAE
4-3	kinetik1	2409.5	-1550.0	Ok	No	163.8	Überstand_nach_DEAE
1	kinetik1	3114.5	24841.3	Ok	No	14.2	100mM_NaCitrat
2	kinetik1	3114.5	22968.6	Ok	No	149.0	100mM_NaCitrat
3	kinetik1	3114.5	24507.1	Ok	No	-6.2	100mM_NaCitrat
4	kinetik1	3114.5	22932.4	Ok	No	132.9	100mM_NaCitrat
2-1	kinetik1	3114.5	-1872.6	Ok	No	134.9	100mM_NaCitrat
4-3	kinetik1	3114.5	-1574.9	Ok	No	138.9	100mM_NaCitrat

Abb. 8.15 Sensogramm der Ligandensuche in spezifischen Intermediaten der Plasmafraktionierung

030-Test Fraktionen aus Produktion HBS-P

09-Oct-08 14:35:16

Cycle: 3



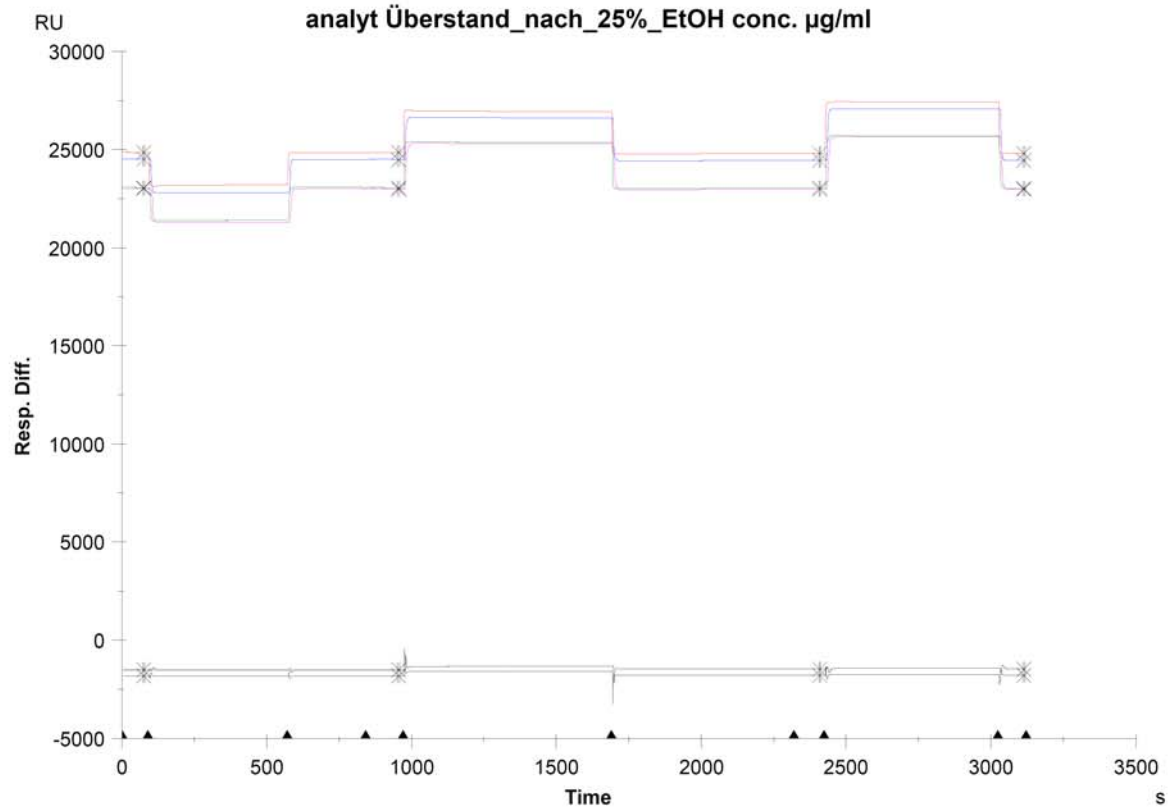
Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
1	kinetik1	76.5	24839.7	Ok	Yes	0	baseline
2	kinetik1	76.5	22961.0	Ok	Yes	0	baseline
3	kinetik1	76.5	24500.1	Ok	Yes	0	baseline
4	kinetik1	76.5	22920.3	Ok	Yes	0	baseline
2-1	kinetik1	76.5	-1878.8	Ok	Yes	0	baseline
4-3	kinetik1	76.5	-1579.7	Ok	Yes	0	baseline
1	kinetik1	955.5	24838.2	Ok	No	-1.5	CaCl2_2.5mM
2	kinetik1	955.5	22967.0	Ok	No	6.0	CaCl2_2.5mM
3	kinetik1	955.5	24498.0	Ok	No	-2.2	CaCl2_2.5mM
4	kinetik1	955.5	22921.8	Ok	No	1.5	CaCl2_2.5mM
2-1	kinetik1	955.5	-1871.1	Ok	No	7.7	CaCl2_2.5mM
4-3	kinetik1	955.5	-1576.1	Ok	No	3.6	CaCl2_2.5mM
1	kinetik1	2410.5	24993.6	Ok	No	153.9	Überstand_nach_8%_EtOH
2	kinetik1	2410.5	23228.7	Ok	No	267.8	Überstand_nach_8%_EtOH
3	kinetik1	2410.5	24623.3	Ok	No	123.1	Überstand_nach_8%_EtOH
4	kinetik1	2410.5	23144.1	Ok	No	223.8	Überstand_nach_8%_EtOH
2-1	kinetik1	2410.5	-1764.9	Ok	No	113.9	Überstand_nach_8%_EtOH
4-3	kinetik1	2410.5	-1479.2	Ok	No	100.6	Überstand_nach_8%_EtOH
1	kinetik1	3115.5	24874.1	Ok	No	34.3	100mM_NaCitrat
2	kinetik1	3115.5	23086.2	Ok	No	125.2	100mM_NaCitrat
3	kinetik1	3115.5	24521.1	Ok	No	21.0	100mM_NaCitrat
4	kinetik1	3115.5	23021.1	Ok	No	100.8	100mM_NaCitrat
2-1	kinetik1	3115.5	-1788.1	Ok	No	90.7	100mM_NaCitrat
4-3	kinetik1	3115.5	-1500.2	Ok	No	79.6	100mM_NaCitrat

Abb. 8.16 Sensogramm der Ligandensuche in spezifischen Intermediaten der Plasmafraktionierung

030-Test Fraktionen aus Produktion HBS-P

09-Oct-08 14:35:16

Cycle: 4



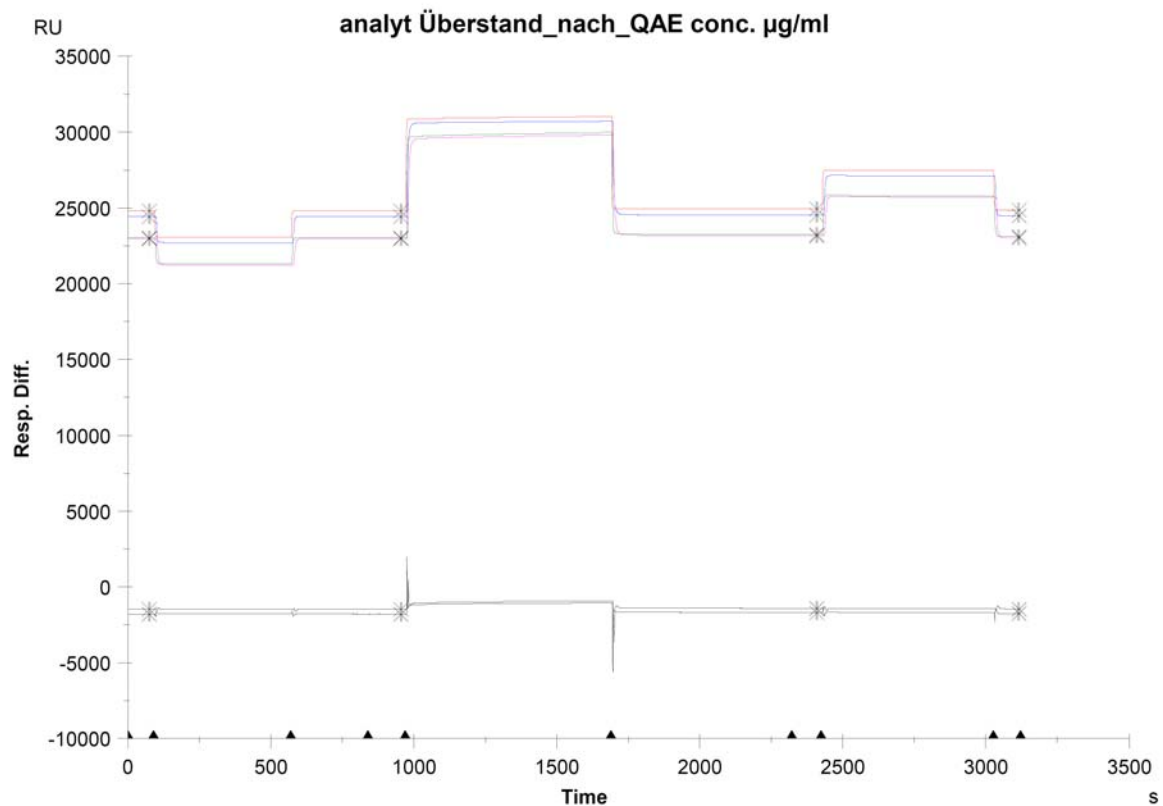
Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
1	kinetik1	76.5	24871.4	Ok	Yes	0	baseline
2	kinetik1	76.5	23078.4	Ok	Yes	0	baseline
3	kinetik1	76.5	24512.7	Ok	Yes	0	baseline
4	kinetik1	76.5	23008.4	Ok	Yes	0	baseline
2-1	kinetik1	76.5	-1793.0	Ok	Yes	0	baseline
4-3	kinetik1	76.5	-1504.2	Ok	Yes	0	baseline
1	kinetik1	955.5	24867.9	Ok	No	-3.5	CaCl2_2.5mM
2	kinetik1	955.5	23077.5	Ok	No	-1.0	CaCl2_2.5mM
3	kinetik1	955.5	24507.8	Ok	No	-4.9	CaCl2_2.5mM
4	kinetik1	955.5	23004.4	Ok	No	-4.0	CaCl2_2.5mM
2-1	kinetik1	955.5	-1790.5	Ok	No	2.5	CaCl2_2.5mM
4-3	kinetik1	955.5	-1503.5	Ok	No	0.7	CaCl2_2.5mM
1	kinetik1	2410.5	24818.9	Ok	No	-52.5	Überstand_nach_25%_EtOH
2	kinetik1	2410.5	23055.9	Ok	No	-22.6	Überstand_nach_25%_EtOH
3	kinetik1	2410.5	24455.5	Ok	No	-57.2	Überstand_nach_25%_EtOH
4	kinetik1	2410.5	22985.1	Ok	No	-23.3	Überstand_nach_25%_EtOH
2-1	kinetik1	2410.5	-1763.1	Ok	No	29.9	Überstand_nach_25%_EtOH
4-3	kinetik1	2410.5	-1470.3	Ok	No	33.9	Überstand_nach_25%_EtOH
1	kinetik1	3115.5	24804.3	Ok	No	-67.1	100mM_NaCitrat
2	kinetik1	3115.5	23039.5	Ok	No	-39.0	100mM_NaCitrat
3	kinetik1	3115.5	24446.0	Ok	No	-66.7	100mM_NaCitrat
4	kinetik1	3115.5	22975.2	Ok	No	-33.2	100mM_NaCitrat
2-1	kinetik1	3115.5	-1764.8	Ok	No	28.2	100mM_NaCitrat
4-3	kinetik1	3115.5	-1470.8	Ok	No	33.4	100mM_NaCitrat

Abb. 8.17 Sensogramm der Ligandensuche in spezifischen Intermediaten der Plasmafraktionierung

030-Test Fraktionen aus Produktion HBS-P

09-Oct-08 14:35:16

Cycle: 5



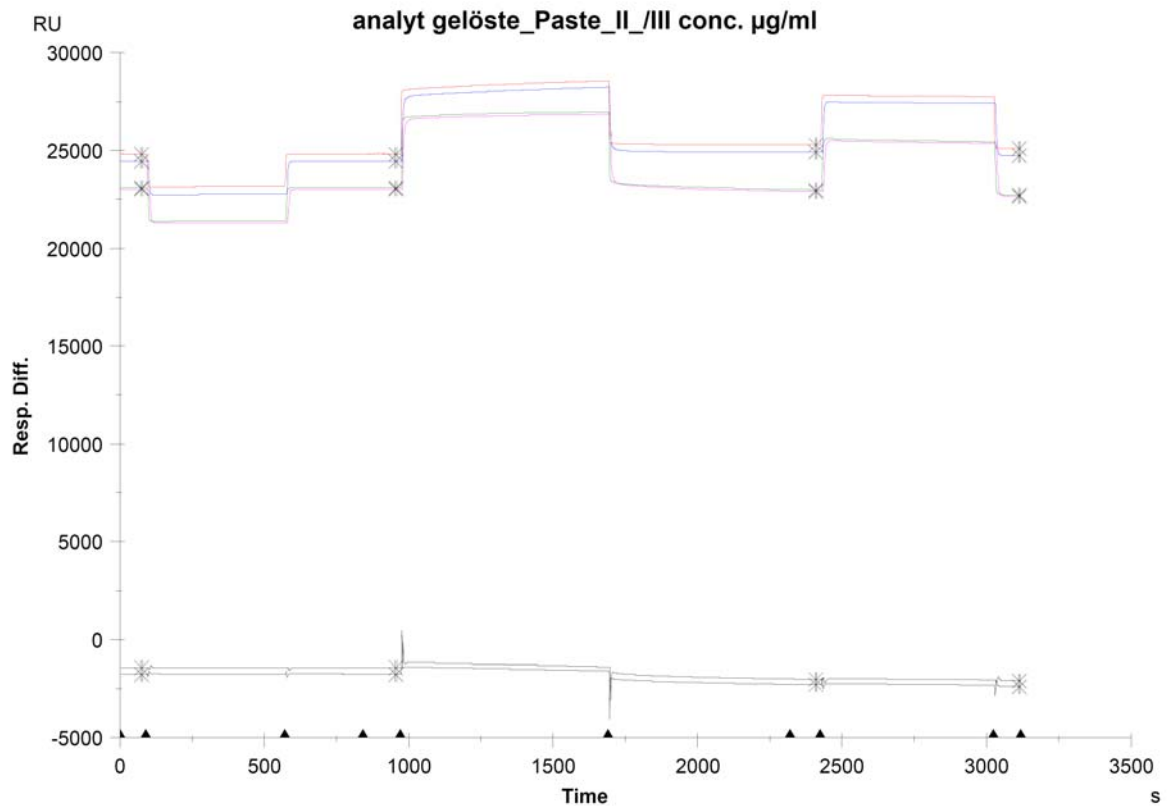
Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
1	kinetik1	75.5	24802.5	Ok	Yes	0	baseline
2	kinetik1	75.5	23032.4	Ok	Yes	0	baseline
3	kinetik1	75.5	24441.2	Ok	Yes	0	baseline
4	kinetik1	75.5	22964.5	Ok	Yes	0	baseline
2-1	kinetik1	75.5	-1770.2	Ok	Yes	0	baseline
4-3	kinetik1	75.5	-1476.7	Ok	Yes	0	baseline
1	kinetik1	955.5	24800.2	Ok	No	-2.3	CaCl2_2.5mM
2	kinetik1	955.5	23034.7	Ok	No	2.3	CaCl2_2.5mM
3	kinetik1	955.5	24436.4	Ok	No	-4.8	CaCl2_2.5mM
4	kinetik1	955.5	22963.4	Ok	No	-1.1	CaCl2_2.5mM
2-1	kinetik1	955.5	-1765.5	Ok	No	4.7	CaCl2_2.5mM
4-3	kinetik1	955.5	-1473.2	Ok	No	3.5	CaCl2_2.5mM
1	kinetik1	2410.5	24941.9	Ok	No	139.4	Überstand_nach_QAE
2	kinetik1	2410.5	23245.3	Ok	No	212.9	Überstand_nach_QAE
3	kinetik1	2410.5	24544.9	Ok	No	103.7	Überstand_nach_QAE
4	kinetik1	2410.5	23148.8	Ok	No	184.3	Überstand_nach_QAE
2-1	kinetik1	2410.5	-1696.5	Ok	No	73.7	Überstand_nach_QAE
4-3	kinetik1	2410.5	-1396.1	Ok	No	80.6	Überstand_nach_QAE
1	kinetik1	3115.5	24836.0	Ok	No	33.6	100mM_NaCitrat
2	kinetik1	3115.5	23097.6	Ok	No	65.2	100mM_NaCitrat
3	kinetik1	3115.5	24462.4	Ok	No	21.2	100mM_NaCitrat
4	kinetik1	3115.5	23026.6	Ok	No	62.1	100mM_NaCitrat
2-1	kinetik1	3115.5	-1738.3	Ok	No	31.9	100mM_NaCitrat
4-3	kinetik1	3115.5	-1436.0	Ok	No	40.7	100mM_NaCitrat

Abb. 8.18 Sensogramm der Ligandensuche in spezifischen Intermediaten der Plasmafraktionierung

030-Test Fraktionen aus Produktion HBS-P

09-Oct-08 14:35:16

Cycle: 6



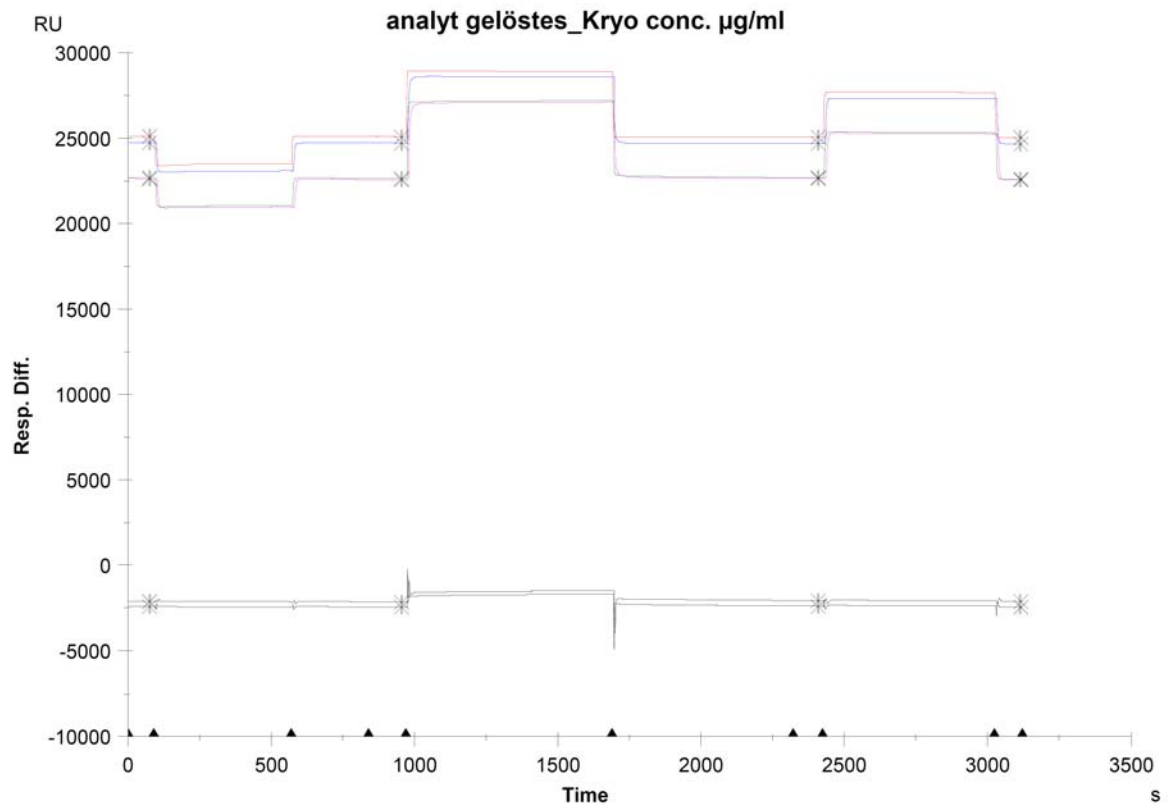
Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
1	kinetik1	76.5	24834.7	Ok	Yes	0	baseline
2	kinetik1	76.5	23089.8	Ok	Yes	0	baseline
3	kinetik1	76.5	24455.8	Ok	Yes	0	baseline
4	kinetik1	76.5	23014.6	Ok	Yes	0	baseline
2-1	kinetik1	76.5	-1744.9	Ok	Yes	0	baseline
4-3	kinetik1	76.5	-1441.4	Ok	Yes	0	baseline
1	kinetik1	955.5	24836.4	Ok	No	1.7	CaCl2_2.5mM
2	kinetik1	955.5	23088.9	Ok	No	-0.9	CaCl2_2.5mM
3	kinetik1	955.5	24457.4	Ok	No	1.5	CaCl2_2.5mM
4	kinetik1	955.5	23011.9	Ok	No	-2.6	CaCl2_2.5mM
2-1	kinetik1	955.5	-1747.5	Ok	No	-2.5	CaCl2_2.5mM
4-3	kinetik1	955.5	-1445.5	Ok	No	-4.1	CaCl2_2.5mM
1	kinetik1	2410.5	25286.1	Ok	No	451.4	gelöste_Paste_II_/III
2	kinetik1	2410.5	23000.6	Ok	No	-89.2	gelöste_Paste_II_/III
3	kinetik1	2410.5	24915.6	Ok	No	459.8	gelöste_Paste_II_/III
4	kinetik1	2410.5	22902.4	Ok	No	-112.2	gelöste_Paste_II_/III
2-1	kinetik1	2410.5	-2285.8	Ok	No	-540.8	gelöste_Paste_II_/III
4-3	kinetik1	2410.5	-2013.4	Ok	No	-572.1	gelöste_Paste_II_/III
1	kinetik1	3115.5	25119.6	Ok	No	284.9	100mM_NaCitrat
2	kinetik1	3115.5	22735.5	Ok	No	-354.3	100mM_NaCitrat
3	kinetik1	3115.5	24751.4	Ok	No	295.5	100mM_NaCitrat
4	kinetik1	3115.5	22656.5	Ok	No	-358.1	100mM_NaCitrat
2-1	kinetik1	3115.5	-2384.1	Ok	No	-639.1	100mM_NaCitrat
4-3	kinetik1	3115.5	-2095.2	Ok	No	-653.8	100mM_NaCitrat

Abb. 8.19 Sensogramm der Ligandensuche in spezifischen Intermediaten der Plasmafraktionierung

030-Test Fraktionen aus Produktion HBS-P

09-Oct-08 14:35:16

Cycle: 7

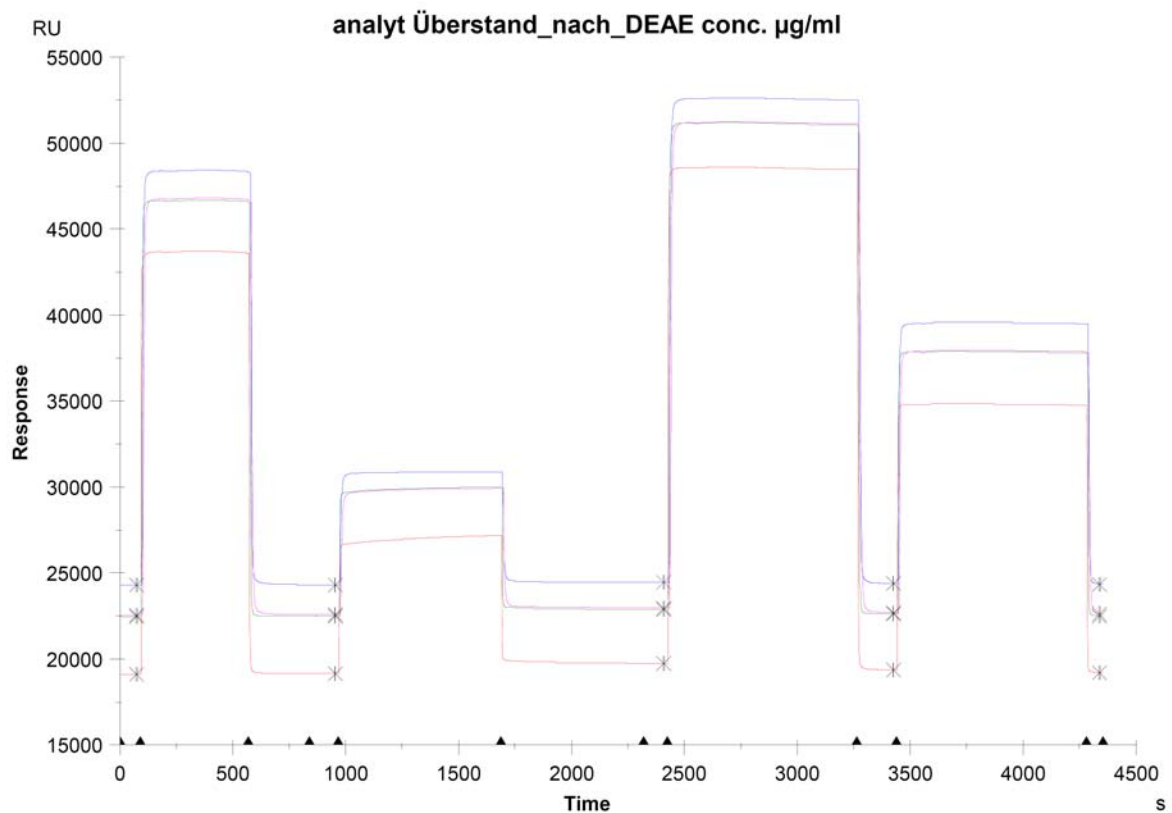


Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
1	kinetik1	75.5	25112.8	Ok	Yes	0	baseline
2	kinetik1	75.5	22707.0	Ok	Yes	0	baseline
3	kinetik1	75.5	24738.8	Ok	Yes	0	baseline
4	kinetik1	75.5	22629.3	Ok	Yes	0	baseline
2-1	kinetik1	75.5	-2406.0	Ok	Yes	0	baseline
4-3	kinetik1	75.5	-2109.7	Ok	Yes	0	baseline
1	kinetik1	955.5	25103.5	Ok	No	-9.3	CaCl2_2.5mM
2	kinetik1	955.5	22652.5	Ok	No	-54.5	CaCl2_2.5mM
3	kinetik1	955.5	24727.4	Ok	No	-11.4	CaCl2_2.5mM
4	kinetik1	955.5	22581.2	Ok	No	-48.1	CaCl2_2.5mM
2-1	kinetik1	955.5	-2451.1	Ok	No	-45.1	CaCl2_2.5mM
4-3	kinetik1	955.5	-2146.3	Ok	No	-36.6	CaCl2_2.5mM
1	kinetik1	2410.5	25086.3	Ok	No	-26.5	gelöstes_Kryo
2	kinetik1	2410.5	22700.6	Ok	No	-6.4	gelöstes_Kryo
3	kinetik1	2410.5	24706.4	Ok	No	-32.4	gelöstes_Kryo
4	kinetik1	2410.5	22639.5	Ok	No	10.2	gelöstes_Kryo
2-1	kinetik1	2410.5	-2385.7	Ok	No	20.2	gelöstes_Kryo
4-3	kinetik1	2410.5	-2066.9	Ok	No	42.8	gelöstes_Kryo
1	kinetik1	3115.5	25049.7	Ok	No	-63.1	100mM_NaCitrat
2	kinetik1	3115.5	22598.0	Ok	No	-109.0	100mM_NaCitrat
3	kinetik1	3115.5	24676.5	Ok	No	-62.3	100mM_NaCitrat
4	kinetik1	3115.5	22554.9	Ok	No	-74.4	100mM_NaCitrat
2-1	kinetik1	3115.5	-2451.8	Ok	No	-45.8	100mM_NaCitrat
4-3	kinetik1	3115.5	-2122.1	Ok	No	-12.3	100mM_NaCitrat

Abb. 8.20 Sensogramm der Ligandensuche in spezifischen Intermediaten der Plasmafraktionierung

033-Test von Fraktionen aus Produktion Wdh Versuch 032 inkl EDTA und ... 04-Nov-08 11:08:57

Cycle: 2

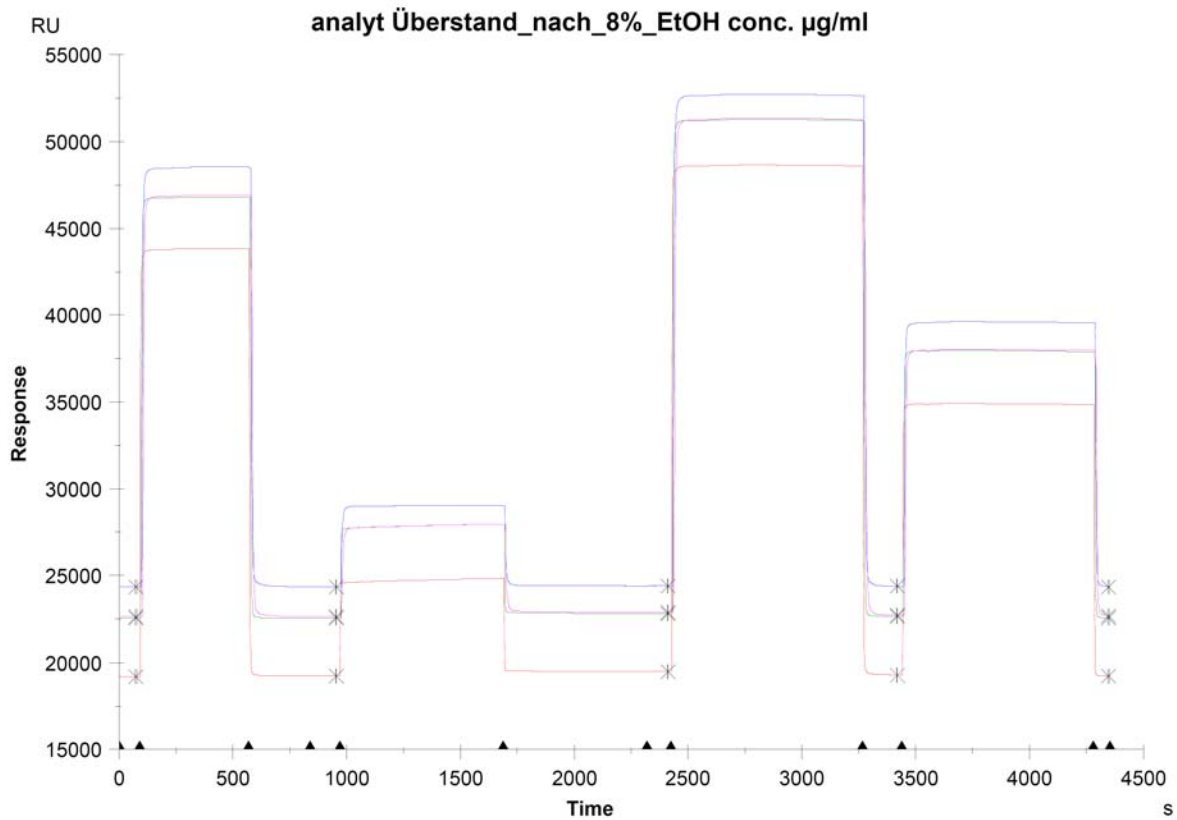


Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
1	kinetik1	75.5	19140.3	Ok	Yes	0	baseline
2	kinetik1	75.5	22480.1	Ok	Yes	0	baseline
3	kinetik1	75.5	24308.7	Ok	Yes	0	baseline
4	kinetik1	75.5	22564.0	Ok	Yes	0	baseline
1	kinetik1	954.5	19160.2	Ok	No	19.9	CaCl2_2.5mM_pH_7.2
2	kinetik1	954.5	22492.8	Ok	No	12.7	CaCl2_2.5mM_pH_7.2
3	kinetik1	954.5	24324.8	Ok	No	16.2	CaCl2_2.5mM_pH_7.2
4	kinetik1	954.5	22580.0	Ok	No	16.0	CaCl2_2.5mM_pH_7.2
1	kinetik1	2410.5	19756.9	Ok	No	616.6	Überstand_nach_DEAE
2	kinetik1	2410.5	22882.2	Ok	No	402.1	Überstand_nach_DEAE
3	kinetik1	2410.5	24467.1	Ok	No	158.4	Überstand_nach_DEAE
4	kinetik1	2410.5	22963.2	Ok	No	399.2	Überstand_nach_DEAE
1	kinetik1	3425.5	19372.3	Ok	No	232.0	0,5M_EDTA_pH_8.0
2	kinetik1	3425.5	22626.5	Ok	No	146.4	0,5M_EDTA_pH_8.0
3	kinetik1	3425.5	24380.0	Ok	No	71.4	0,5M_EDTA_pH_8.0
4	kinetik1	3425.5	22696.5	Ok	No	132.5	0,5M_EDTA_pH_8.0
1	kinetik1	4339.5	19207.0	Ok	No	66.7	1M_SCN_pH_7.0
2	kinetik1	4339.5	22518.8	Ok	No	38.7	1M_SCN_pH_7.0
3	kinetik1	4339.5	24354.2	Ok	No	45.5	1M_SCN_pH_7.0
4	kinetik1	4339.5	22644.6	Ok	No	80.6	1M_SCN_pH_7.0

Abb. 8.21 Sensogramm der Ligandensuche in spezifischen Intermediaten der Plasmafraktionierung unter Verwendung weiterer Lösungen zur Verstärkung der Elution des potentiellen Liganden

034-Test von Fraktionen aus Produktion Wdh Versuch 033 inkl EDTA und ... 04-Nov-08 14:01:53

Cycle: 1

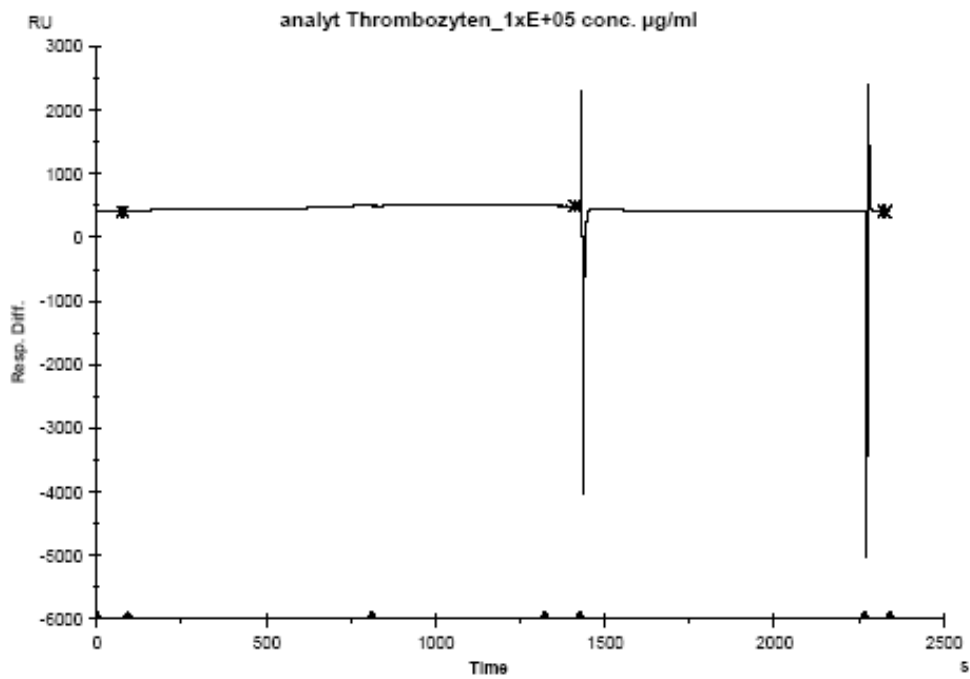


Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
1	kinetik1	75.5	19217.6	Ok	Yes	0	baseline
2	kinetik1	75.5	22526.0	Ok	Yes	0	baseline
3	kinetik1	75.5	24330.0	Ok	Yes	0	baseline
4	kinetik1	75.5	22607.4	Ok	Yes	0	baseline
1	kinetik1	954.5	19224.5	Ok	No	6.8	CaCl2_2.5mM_pH_7.2
2	kinetik1	954.5	22536.9	Ok	No	10.9	CaCl2_2.5mM_pH_7.2
3	kinetik1	954.5	24343.3	Ok	No	13.4	CaCl2_2.5mM_pH_7.2
4	kinetik1	954.5	22621.2	Ok	No	13.8	CaCl2_2.5mM_pH_7.2
1	kinetik1	2411.5	19488.4	Ok	No	270.8	Überstand_nach_8%_EtOH
2	kinetik1	2411.5	22797.2	Ok	No	271.2	Überstand_nach_8%_EtOH
3	kinetik1	2411.5	24402.7	Ok	No	72.7	Überstand_nach_8%_EtOH
4	kinetik1	2411.5	22866.8	Ok	No	259.4	Überstand_nach_8%_EtOH
1	kinetik1	3419.5	19299.1	Ok	No	81.5	0,5M_EDTA_pH_8.0
2	kinetik1	3419.5	22631.7	Ok	No	105.7	0,5M_EDTA_pH_8.0
3	kinetik1	3419.5	24365.3	Ok	No	35.4	0,5M_EDTA_pH_8.0
4	kinetik1	3419.5	22704.2	Ok	No	96.7	0,5M_EDTA_pH_8.0
1	kinetik1	4349.5	19225.5	Ok	No	7.8	1M_SCN_pH_7.0
2	kinetik1	4349.5	22545.6	Ok	No	19.6	1M_SCN_pH_7.0
3	kinetik1	4349.5	24349.9	Ok	No	19.9	1M_SCN_pH_7.0
4	kinetik1	4349.5	22656.1	Ok	No	48.7	1M_SCN_pH_7.0

Abb. 8.22 Sensogramm der Ligandensuche in spezifischen Intermediaten der Plasmafraktionierung unter Verwendung weiterer Lösungen zur Verstärkung der Elution des potentiellen Liganden

039-1-Thrombozytenanalyse

08-Apr-09 13:07:13

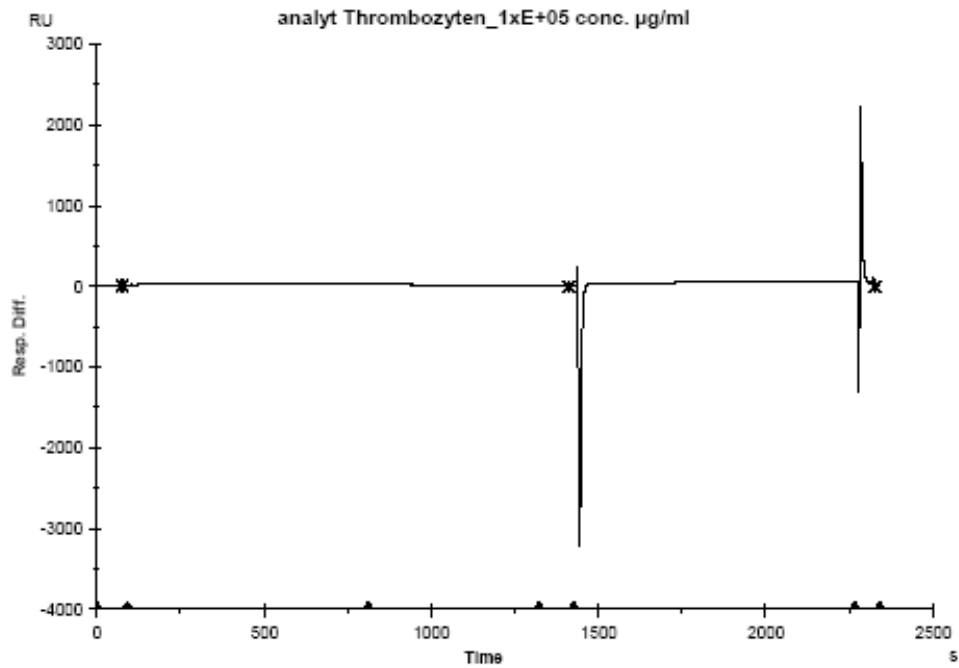


Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
2-1	kinetik1	76.5	397.6	Ok	Yes	0	baseline
2-1	kinetik1	1411.5	494.0	Ok	No	96.5	Thrombozyten_1xE+05
2-1	kinetik1	2326.5	417.0	Ok	No	19.4	0,5M_EDTA_pH_8.0

Abb. 8.23 Studie zur Bindungskinetik zwischen immobilisierten TMG-Albumin-FP, bzw. rekombinantem Albumin und Thrombozyten

039-1-Thrombozytenanalyse

08-Apr-09 13:07:13



Fc	APROG	Time	AbsResp	Quality	Baseline	RelResp	Id
4-3	kinetik1	76.5	10.6	Ok	Yes	0	baseline
4-3	kinetik1	1411.5	-1.0	Ok	No	-11.6	Thrombozyten_1xE+05
4-3	kinetik1	2326.5	8.3	Ok	No	-2.3	0,5M_EDTA_pH_8.0

Abb. 8.24 Studie zur Bindungskinetik zwischen immobilisierten TMG-Albumin-FP, bzw. immobilisiertem mit anti-Gla-Ak abgesättigtem TMG-Albumin-FP und Thrombozyten

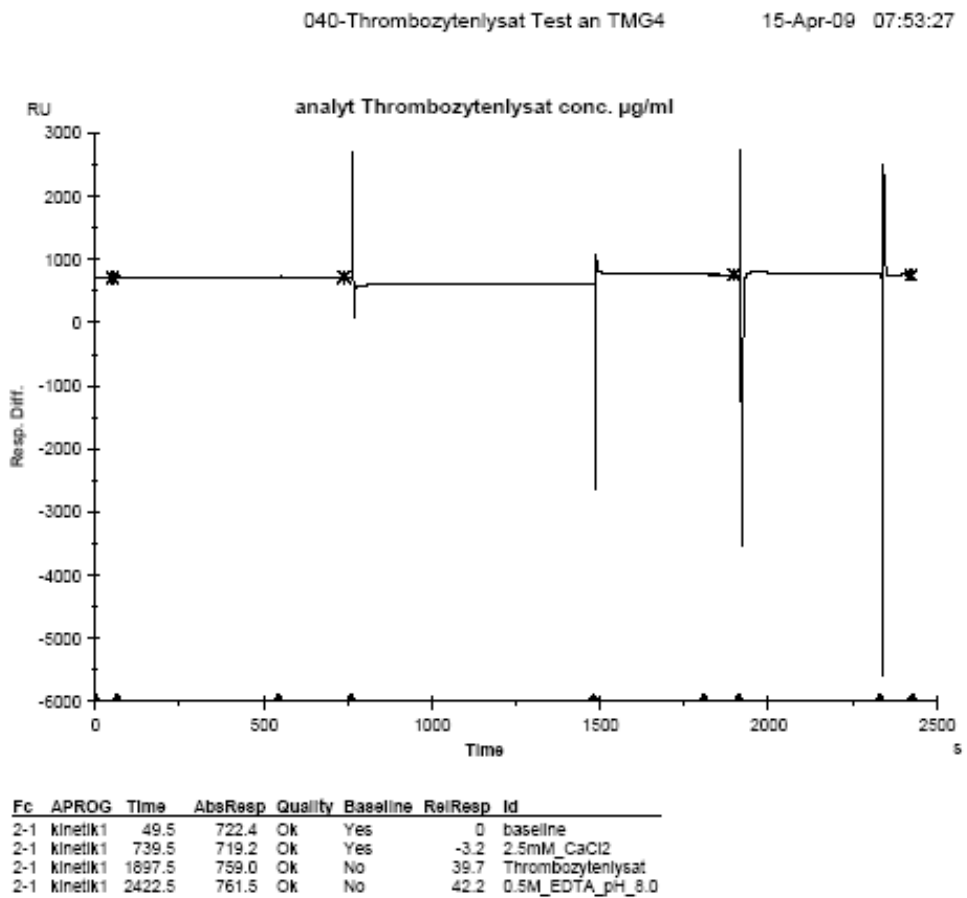


Abb. 8.25 Studie zur Bindungskinetik zwischen immobilisierten TMG-Albumin-FP (hier exemplarisch TMG4), bzw. rekombinatem Albumin und Thrombozytenmembranpräparation

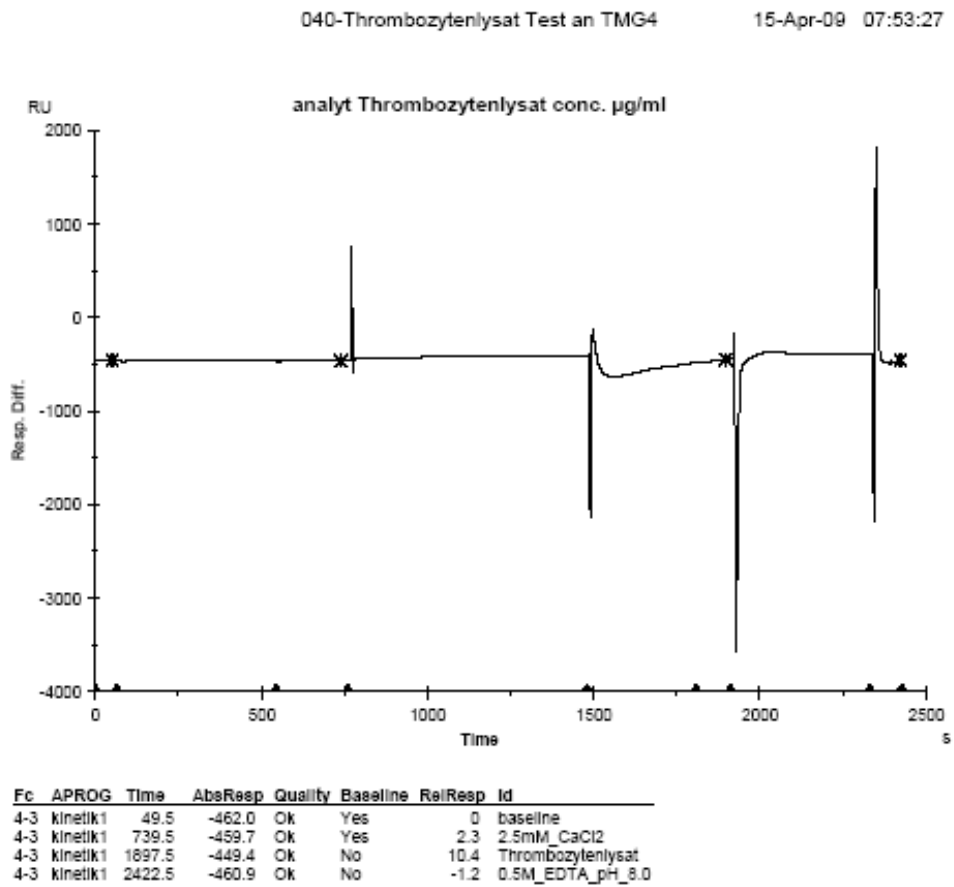


Abb. 8.26 Studie zur Bindungskinetik zwischen immobilisierten TMG-Albumin-FP (hier exemplarisch TMG4), bzw. immobilisiertem mit anti-Gla-Ak abgesättigtem TMG-Albumin-FP und Thrombozytenmembranpräparation

8.9 Zell-Zell Interaktionen

Proben Nr.	Reaktionsvolumen I		Reaktionsvolumen II		Beobachtung (Doppelbestimmung)
	Zelltyp	Puffer	Zelltyp	Puffer	
1	Thrombozyten	TK-Puffer	-	-	-
2	Thrombozyten	mod. ¹ NaCl-Lösung	-	-	-
3	Thrombozyten	mod. NaCl-Lösung	Thrombozyten	TK-Puffer	-
4	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lösung	-	-	homogene Trübung
5	HEK293-MOCK	TK-Puffer	-	-	homogene Trübung
6	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lösung	HEK293-MOCK	TK-Puffer	Verklumpungen
7	TMG3-GFP-FP expr. ² HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lösung	-	-	homogene Trübung
8	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lösung	-	-	homogene Trübung
9	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	-	-	homogene Trübung
10	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	-	-	Verklumpungen
11	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lösung	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	Verklumpungen
12	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lösung	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	Verklumpungen
13	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lösung	-	-	homogene Trübung
14	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lösung	-	-	homogene Trübung
15	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	-	-	homogene Trübung
16	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	-	-	homogene Trübung
17	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lösung	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	Verklumpungen
18	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lösung	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	Verklumpungen
19	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lösung	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lösung	Verklumpungen
20	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lösung	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lösung	Verklumpungen

Proben Nr.	Reaktionsvolumen I		Reaktionsvolumen II		Beobachtung (Doppelbestimmung)
	Zelltyp	Puffer	Zelltyp	Puffer	
21	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lösung	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lösung	homogene Trübung
22	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lösung	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lösung	homogene Trübung
23	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lösung	Thrombozyten	TK-Puffer	Verklumpungen
24	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lösung	Thrombozyten	TK-Puffer	Verklumpungen
25	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lösung	Thrombozyten	TK-Puffer	Verklumpungen
26	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lösung	Thrombozyten	TK-Puffer	Verklumpungen
27	Thrombozyten	TK-Puffer	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lösung	homogene Trübung

Tab. 8.12 Versuch I: Visuelle Beurteilung von Puffereffekten auf Zellinteraktionen; Zellkultivierung mit / ohne Vitamin K: ⁺/⁻; mod. ¹: modifiziert, expr. ²: exprimiert

Proben Nr.	Reaktionsvolumen I		Reaktionsvolumen II		Beobachtung (Doppelbestimmung)	Reaktionsvolumen III (Puffer)	Beobachtung
	Zelltyp	Puffer	Zelltyp	Puffer			
1	Thrombozyten	TK-Puffer	-	-	-	Zitratpuffer	-
2	Thrombozyten	TK-Puffer	-	-	-	TK-Lagerpuffer	-
3	HEK293-MOCK	TK-Puffer	-	-	homogene Trübung	Zitratpuffer	homogene Trübung
4	HEK293-MOCK	TK-Puffer	-	-	homogene Trübung	TK-Lagerpuffer	Gel
5	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	-	-	homogene Trübung	Zitratpuffer	homogene Trübung
6	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	-	-	homogene Trübung	TK-Lagerpuffer	Gel
7	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	-	-	homogene Trübung	Zitratpuffer	homogene Trübung
8	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	-	-	homogene Trübung	TK-Lagerpuffer	Gel
9	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	-	-	homogene Trübung	Zitratpuffer	homogene Trübung
10	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	-	-	homogene Trübung	TK-Lagerpuffer	Gel
11	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	-	-	homogene Trübung	Zitratpuffer	homogene Trübung
12	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	-	-	homogene Trübung	TK-Lagerpuffer	Gel
13	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	homogene Trübung	Zitratpuffer	homogene Trübung
14	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	homogene Trübung	TK-Lagerpuffer	Gel
15	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	homogene Trübung	Zitratpuffer	homogene Trübung

Proben Nr.	Reaktionsvolumen I		Reaktionsvolumen II		Beobachtung (Doppelbestimmung)	Reaktionsvolumen III (Puffer)	Beobachtung
	Zelltyp	Puffer	Zelltyp	Puffer			
16	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	homogene Trübung	TK-Lagerpuffer	Gel
17	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	homogene Trübung	Zitratpuffer	homogene Trübung
18	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	homogene Trübung	TK-Lagerpuffer	Gel
19	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	homogene Trübung	Zitratpuffer	homogene Trübung
20	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	homogene Trübung	TK-Lagerpuffer	Gel
21	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	Thrombozyten	TK-Puffer	homogene Trübung	Zitratpuffer	homogene Trübung
22	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	Thrombozyten	TK-Puffer	homogene Trübung	TK-Lagerpuffer	Gel
23	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	Thrombozyten	TK-Puffer	homogene Trübung	Zitratpuffer	homogene Trübung
24	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	Thrombozyten	TK-Puffer	homogene Trübung	TK-Lagerpuffer	Gel
25	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	Thrombozyten	TK-Puffer	homogene Trübung	Zitratpuffer	homogene Trübung
26	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	TK-Puffer	Thrombozyten	TK-Puffer	homogene Trübung	TK-Lagerpuffer	Gel
27	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	Thrombozyten	TK-Puffer	homogene Trübung	Zitratpuffer	homogene Trübung
28	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	TK-Puffer	Thrombozyten	TK-Puffer	homogene Trübung	TK-Lagerpuffer	Gel
29	Thrombozyten	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	homogene Trübung	Zitratpuffer	homogene Trübung
30	Thrombozyten	TK-Puffer	HEK293-MOCK	TK-Puffer	homogene Trübung	TK-Lagerpuffer	Gel

Tab. 8.13 Visuelle Beobachtung der Interaktionen von Thrombozyten und HEK293-Zellen (inkl. Kontrollen) - Versuch II; Zellkultivierung mit / ohne Vitamin K: ⁺/₋

Proben Nr.	Reaktionsvolumen I		Reaktionsvolumen II		Beobachtung	Reaktionsvolumen III (Puffer)	Beobachtung
	Zelltyp	Puffer	Zelltyp	Puffer			
1	Thrombozyten	TK-Puffer	-	-	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
2	Thrombozyten	mod. NaCl-Lösung	-	-	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
3	Thrombozyten	TK-Puffer	Thrombozyten	mod. NaCl-Lösung	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
4	HEK293-MOCK	TK-Puffer	-	-	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
5	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lösung	-	-	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
6	HEK293-MOCK	TK-Puffer	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lösung	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
7	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lösung	-	-	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
8	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lösung	-	-	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
9	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lösung	-	-	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
10	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lösung	-	-	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	Gel
11	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lösung	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lösung	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	Gel
12	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lösung	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lösung	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	Gel
13	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lösung	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lösung	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	Gel
14	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lösung	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lösung	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	Gel
15	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lösung	Thrombozyten	TK-Puffer	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	Gel
16	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lösung	Thrombozyten	TK-Puffer	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	Gel
17	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	mod. NaCl-Lösung	Thrombozyten	TK-Puffer	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	Gel
18	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	mod. NaCl-Lösung	Thrombozyten	TK-Puffer	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	Gel
19	Thrombozyten	TK-Puffer	HEK293-MOCK	mod. NaCl-Lösung	homogene Trübung	filtrierter TK-Lagerpuffer	Gel

Tab. 8.14 Visuelle Beobachtung der Interaktionen von Thrombozyten und HEK293-Zellen (inkl. Kontrollen) - Versuch III

Proben Nr.	Reaktionsvolumen I		Reaktionsvolumen II		Reaktionsvolumen III (Puffer)	Beobachtung
	Zelltyp	Puffer	Zelltyp	Puffer		
1	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
2	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
3	HEK293-MOCK	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
4	HEK293-MOCK	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
5	HEK293-MOCK	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
6	HEK293-MOCK	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
7	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
8	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
9	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
10	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
11	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
12	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
13	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
14	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
15	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
16	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
17	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
18	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
19	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen

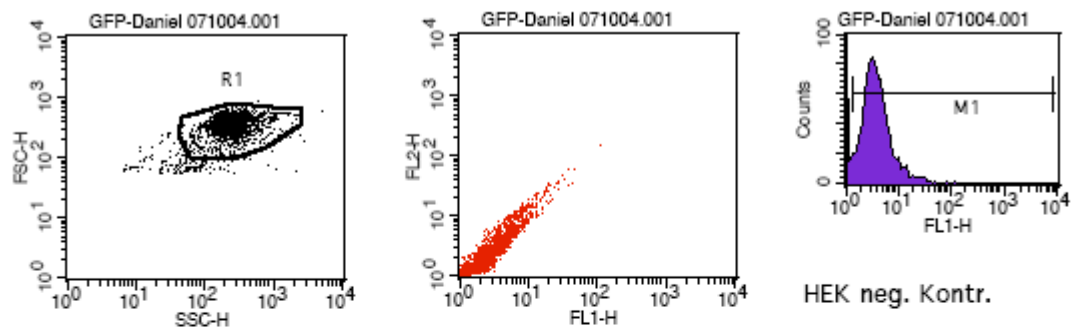
Proben Nr.	Reaktionsvolumen I		Reaktionsvolumen II		Reaktionsvolumen III (Puffer)	Beobachtung
	Zelltyp	Puffer	Zelltyp	Puffer		
20	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
21	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	-	-	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
22	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	-	-	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
23	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	HEK293-MOCK	HEK293 Medium	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
24	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	HEK293-MOCK	HEK293 Medium	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
25	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	HEK293-MOCK	HEK293 Medium	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
26	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	HEK293-MOCK	HEK293 Medium	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
27	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	HEK293-MOCK	HEK293 Medium	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
28	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	HEK293-MOCK	HEK293 Medium	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
29	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	HEK293-MOCK	HEK293 Medium	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
30	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	HEK293-MOCK	HEK293 Medium	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
31	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	HEK293-MOCK	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
32	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	HEK293-MOCK	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
33	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	HEK293-MOCK	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
34	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	HEK293-MOCK	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
35	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	HEK293-MOCK	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
36	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	HEK293-MOCK	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
37	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	HEK293-MOCK	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen

Proben Nr.	Reaktionsvolumen I		Reaktionsvolumen II		Reaktionsvolumen III (Puffer)	Beobachtung
	Zelltyp	Puffer	Zelltyp	Puffer		
38	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	HEK293-MOCK	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	Verklumpungen
39	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
40	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
41	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
42	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
43	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
44	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	HEK293 Medium	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
45	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
46	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	HEK293 Medium	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
47	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	HEK293-MOCK	HEK293 Medium	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
48	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	HEK293-MOCK	HEK293 Medium	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
49	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	HEK293-MOCK	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
50	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	HEK293-MOCK	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
51	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
52	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
53	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
54	TMG3-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
55	TMG4-GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung

Proben Nr.	Reaktionsvolumen I		Reaktionsvolumen II		Reaktionsvolumen III (Puffer)	Beobachtung
	Zelltyp	Puffer				
56	TMG4GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁺	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
57	TMG4GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung
58	TMG4GFP-FP expr. HEK293-Zellen ⁻	Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺	Thrombozyten	TK-Lagerpuffer	sterilfiltrierter, hitzeinaktivierter, sterilfiltrierter TK-Lagerpuffer	homogene Trübung

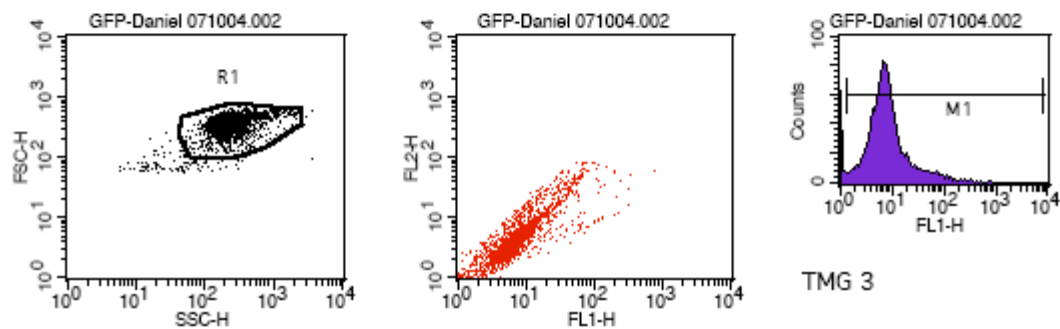
Tab. 8.15 Visuelle Beobachtung der Interaktionen von Thrombozyten und HEK293-Zellen (inkl. Kontrollen) Versuch IV

8.10 Durchflusszytometrische Versuche



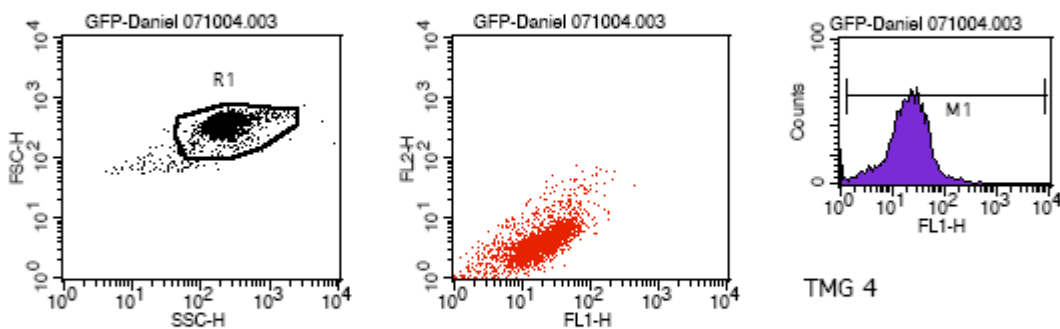
File: GFP-Daniel 071004.001

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	9231	100.00	92.31	3.97
M1	1, 8354	8657	93.78	86.57	4.16



File: GFP-Daniel 071004.002

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	9483	100.00	94.83	11.58
M1	1, 8354	9342	98.51	93.42	11.74



File: GFP-Daniel 071004.003

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	9621	100.00	96.21	24.49
M1	1, 8354	9568	99.45	95.68	24.62

Abb. 8.27 Expressionskontrolle von membranständigem TMG-GFP-FP in HEK293-Zellen

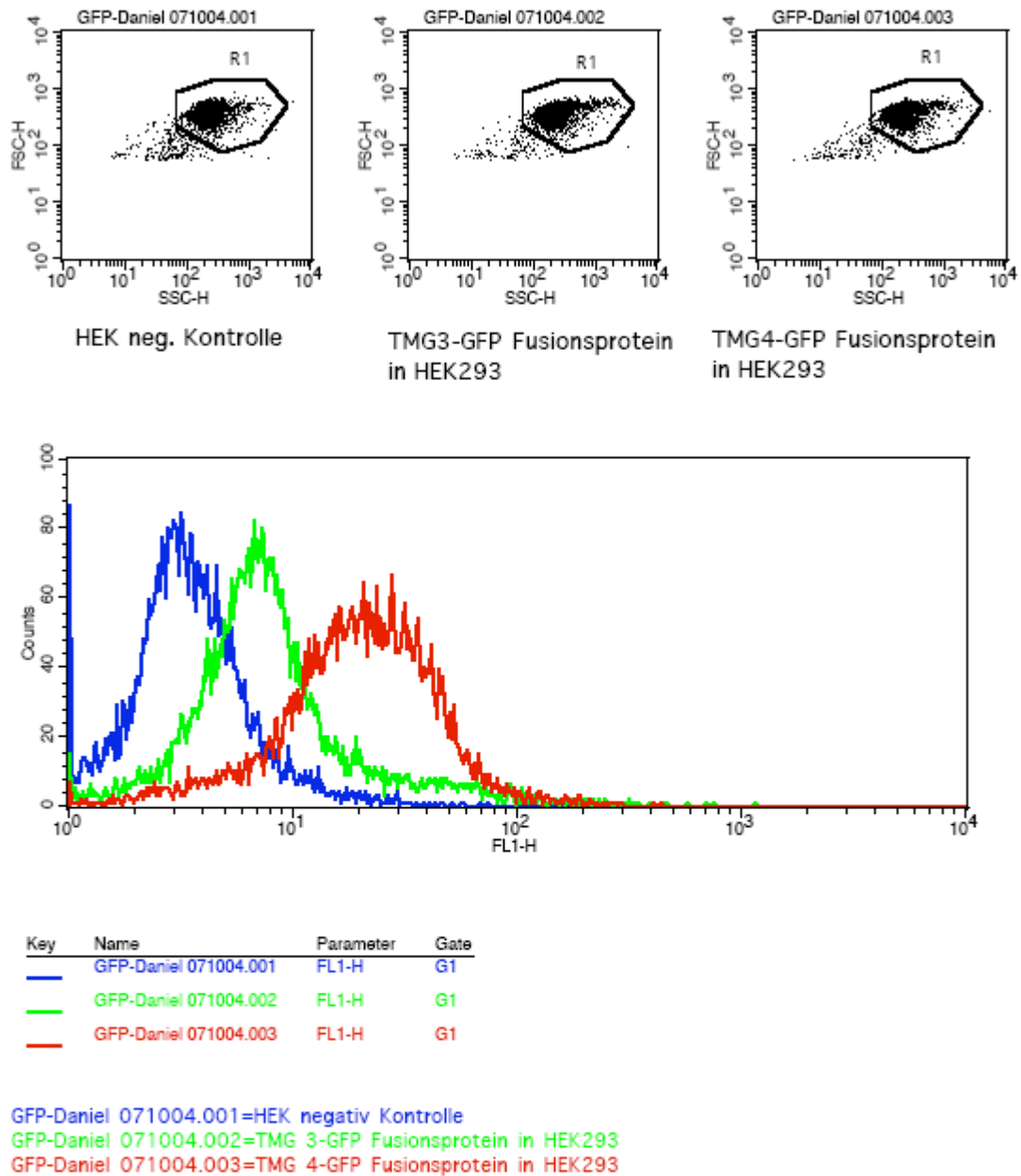


Abb. 8.28 Overlay der Expressionskontrolle von membranständigem TMG-GFP-FP in HEK293-Zellen

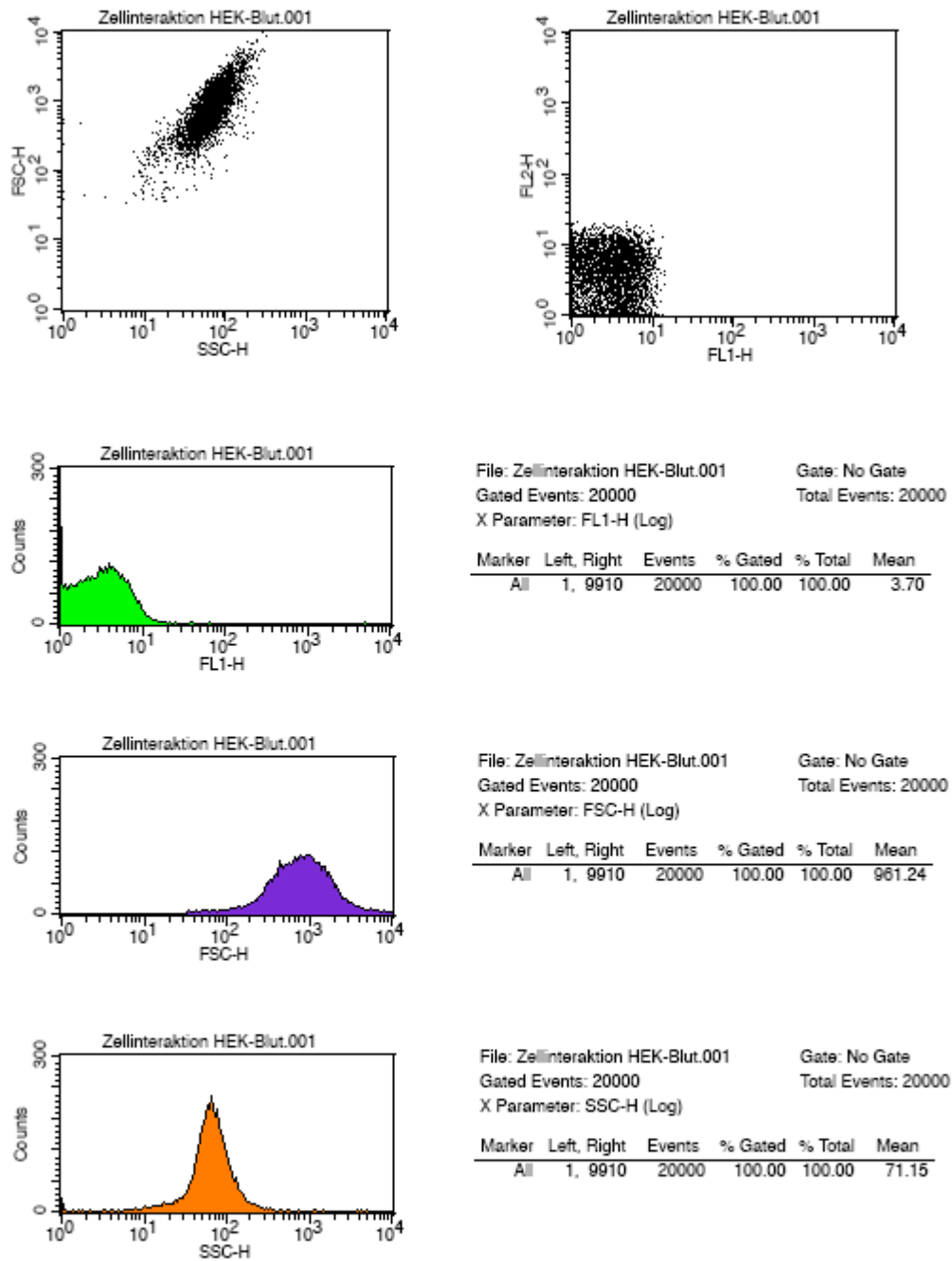


Abb. 8.29 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

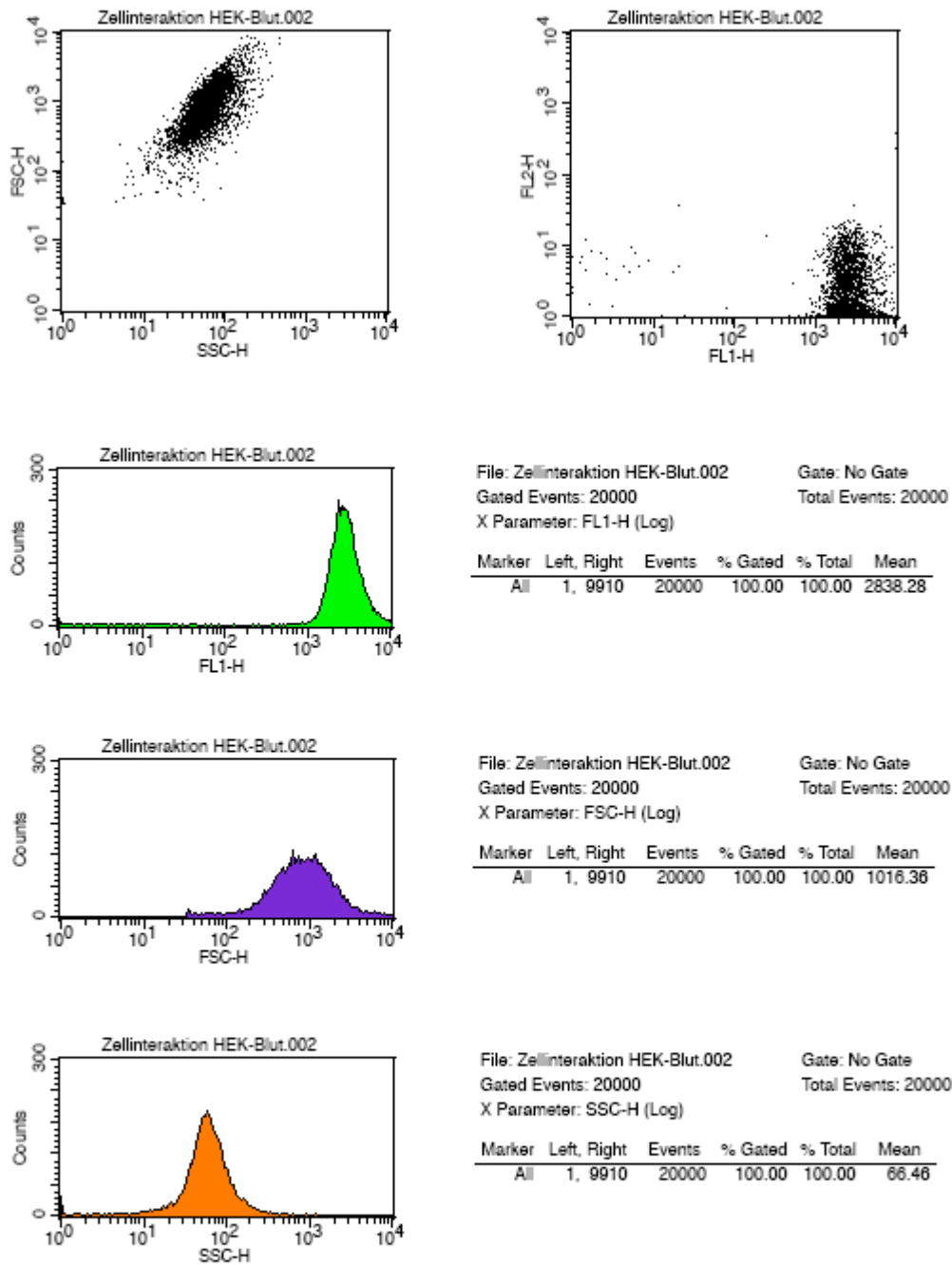


Abb. 8.30 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

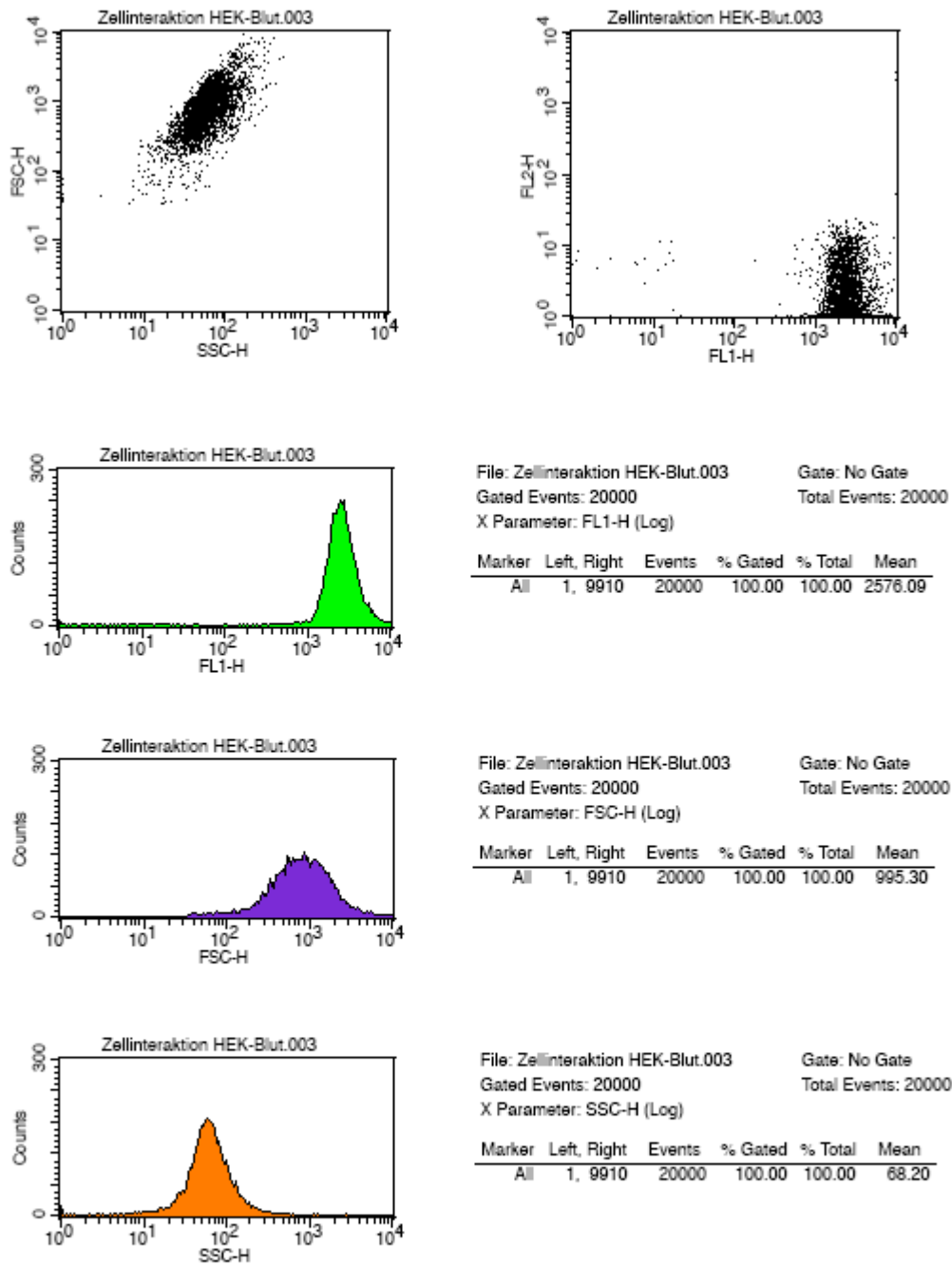


Abb. 8.31 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

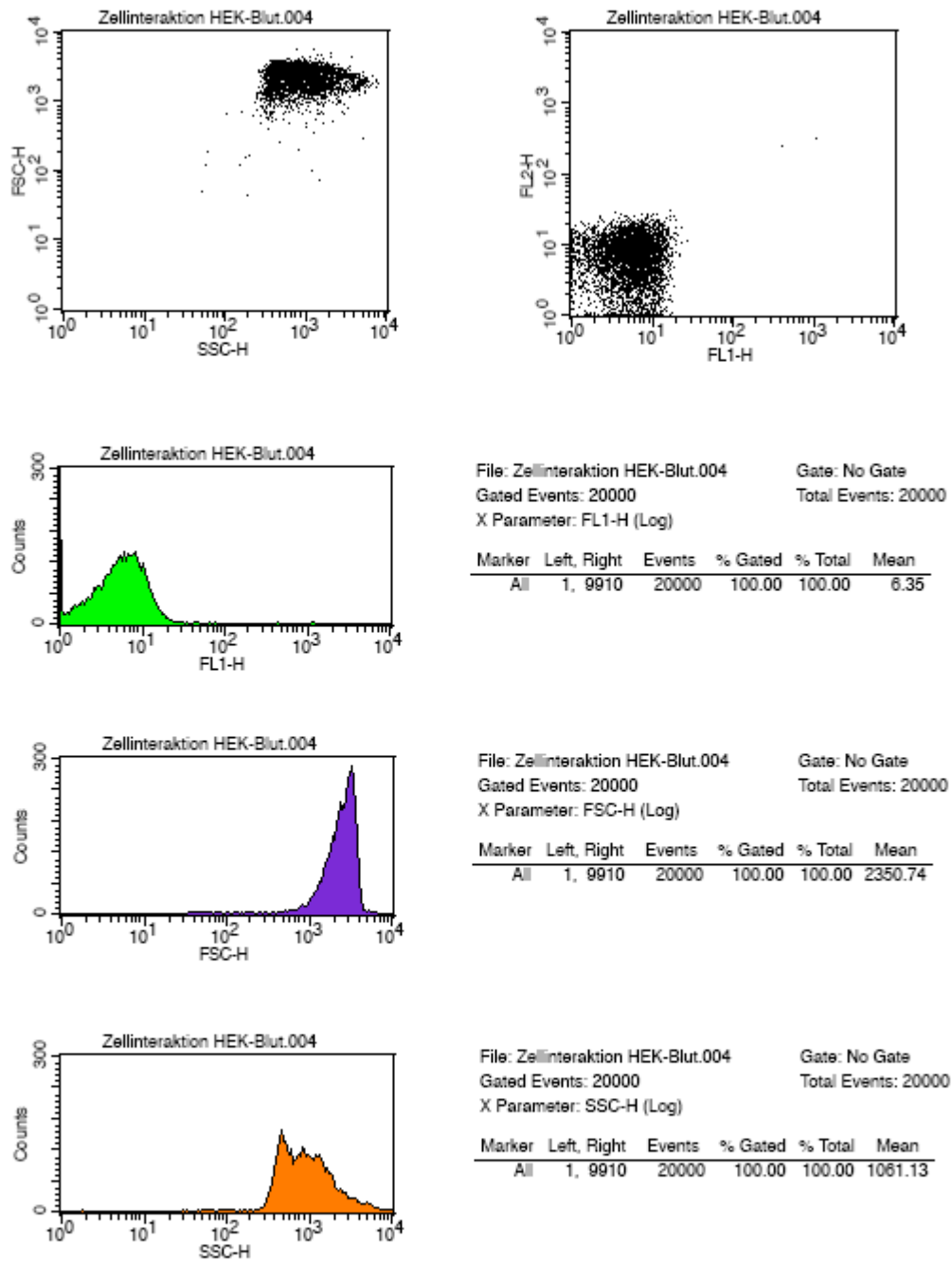


Abb. 8.32 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

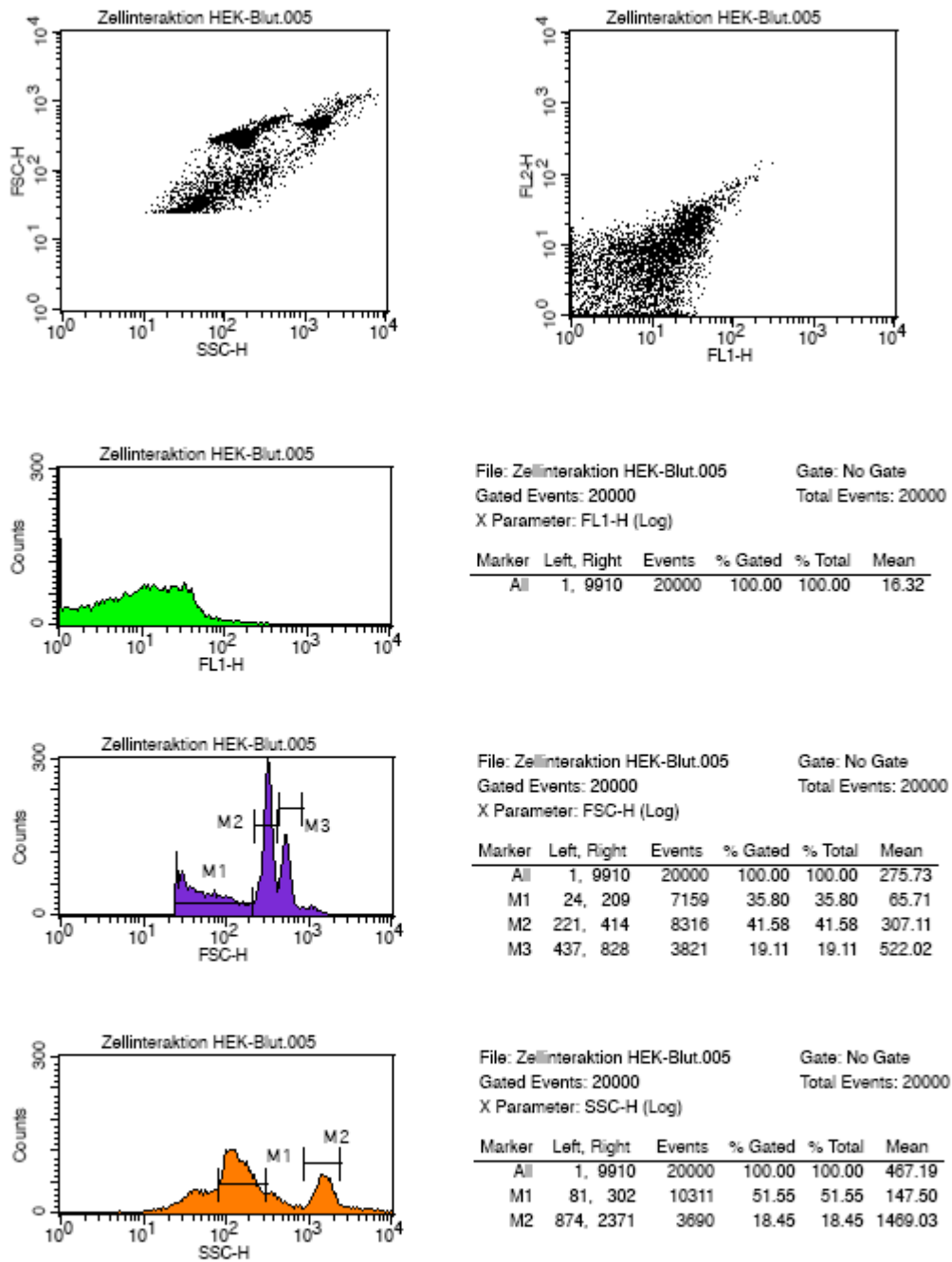


Abb. 8.33 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

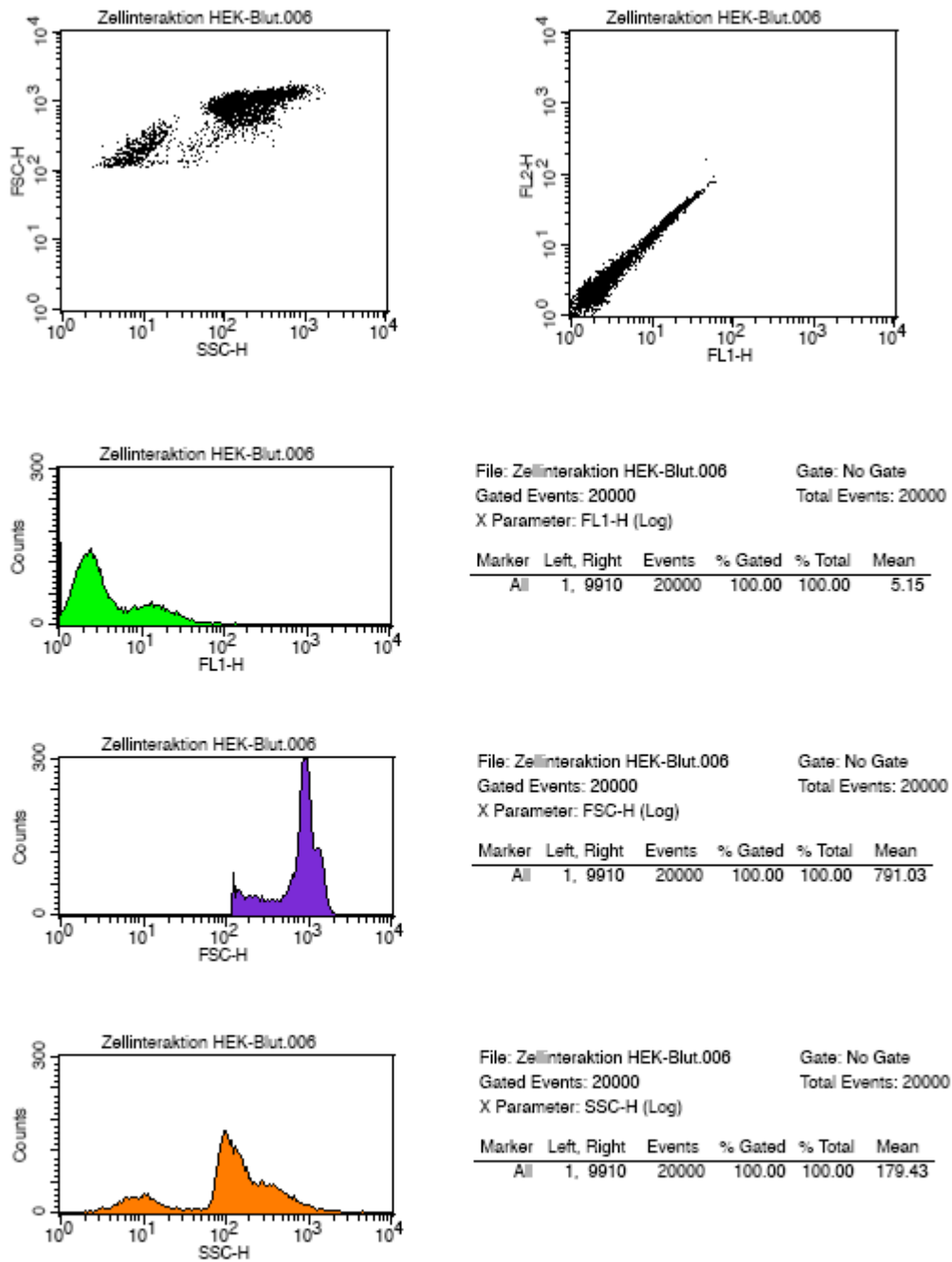


Abb. 8.34 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

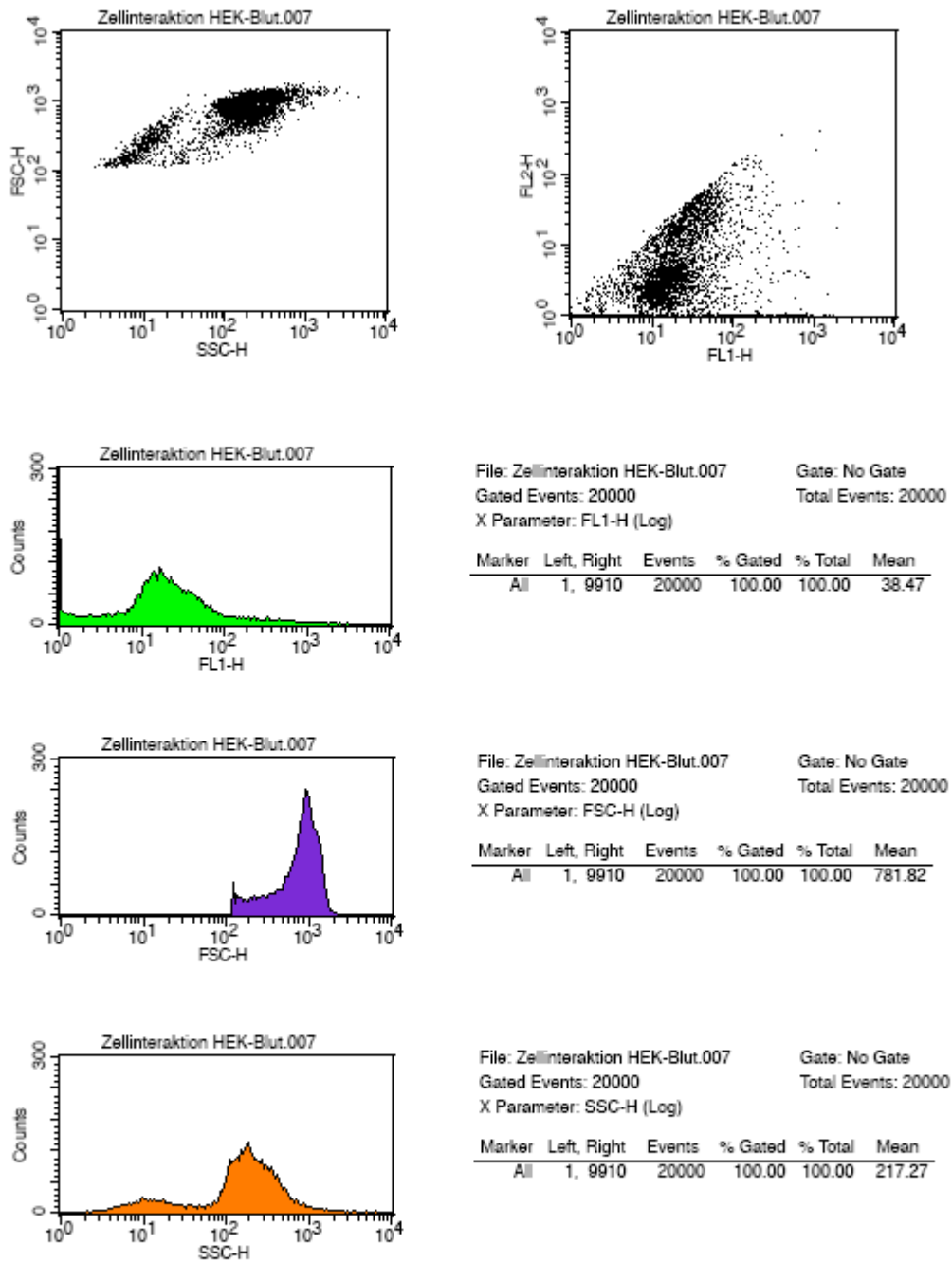


Abb. 8.35 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

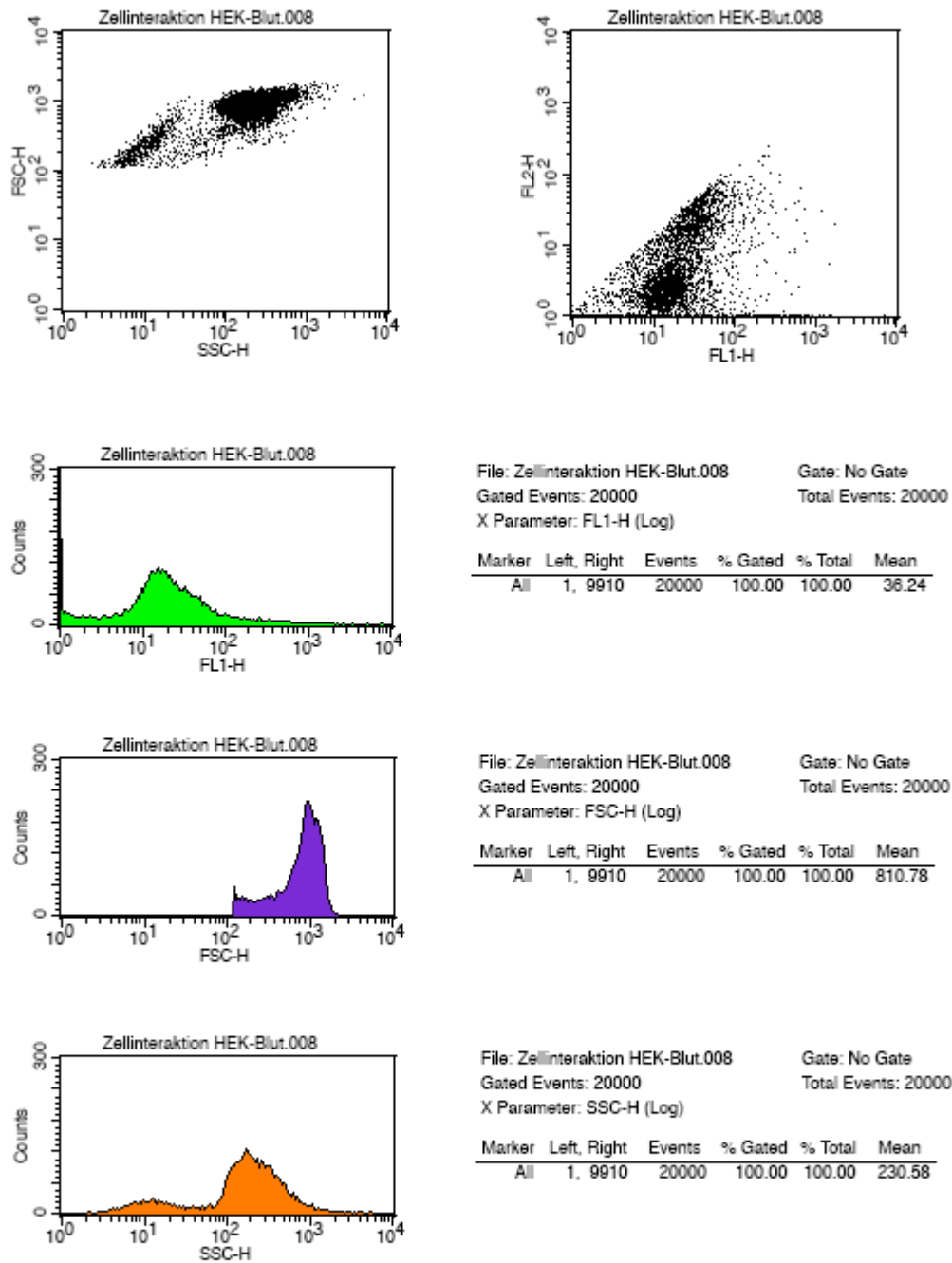


Abb. 8.36 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

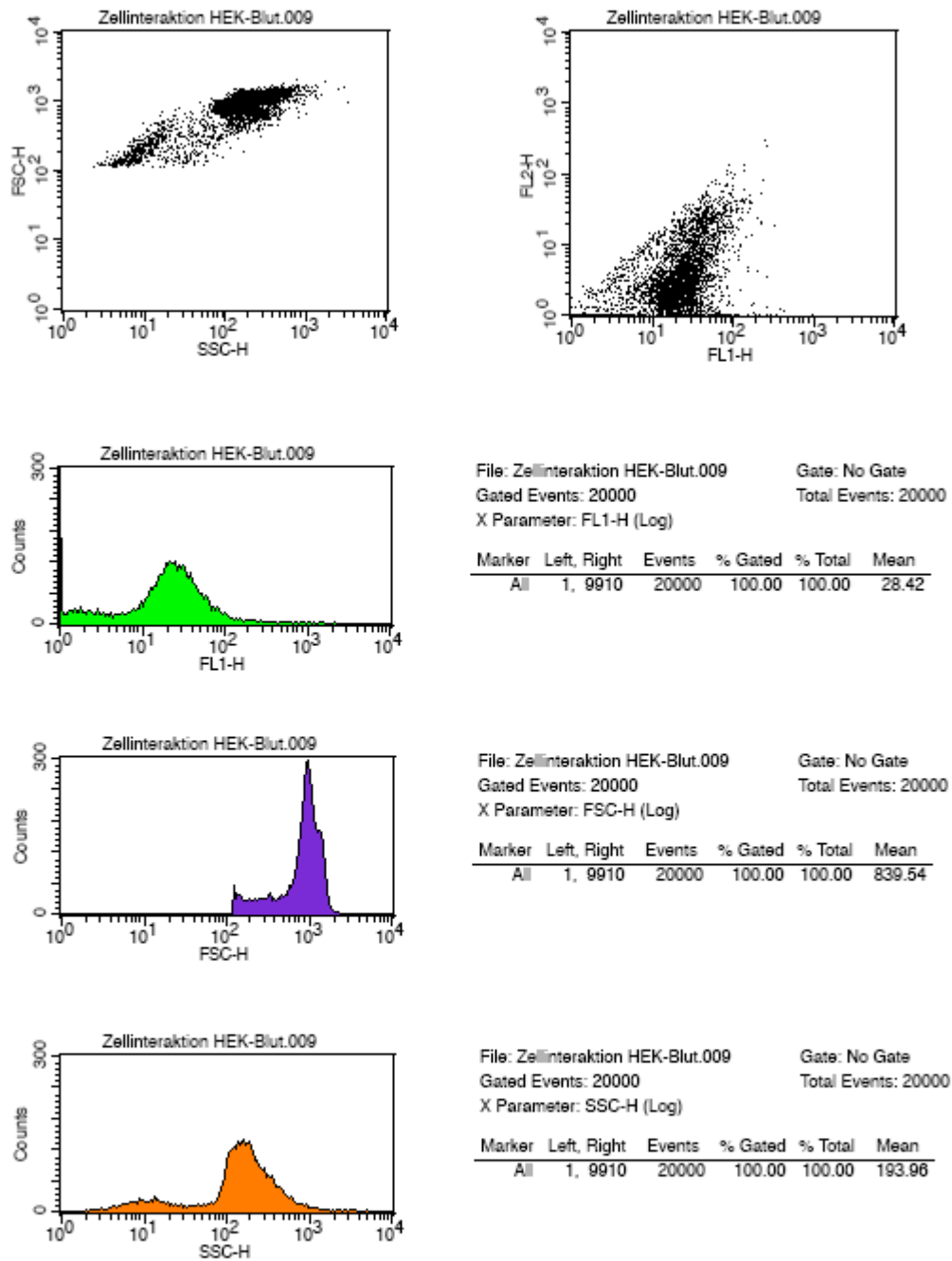


Abb. 8.37 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

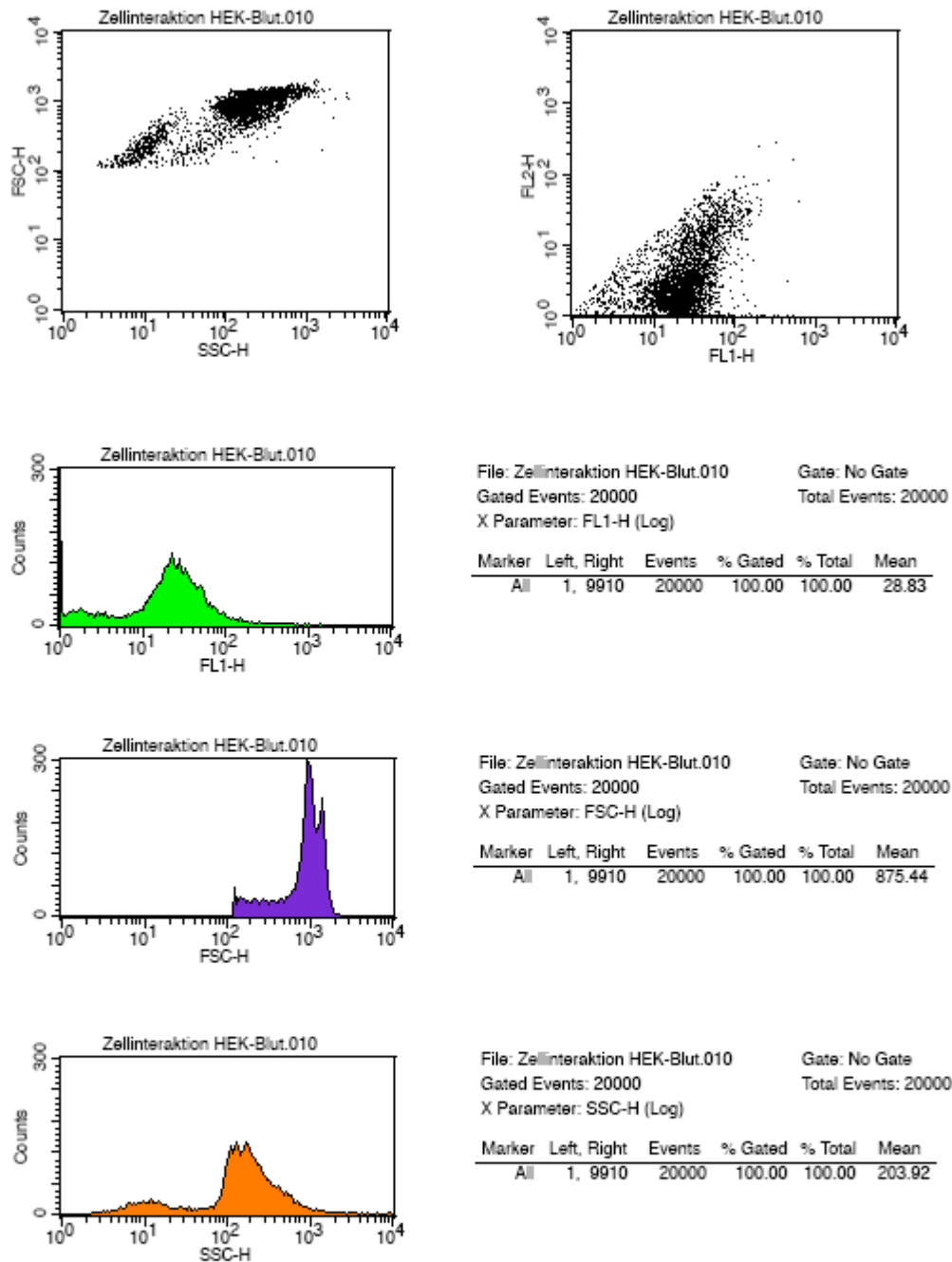


Abb. 8.48 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

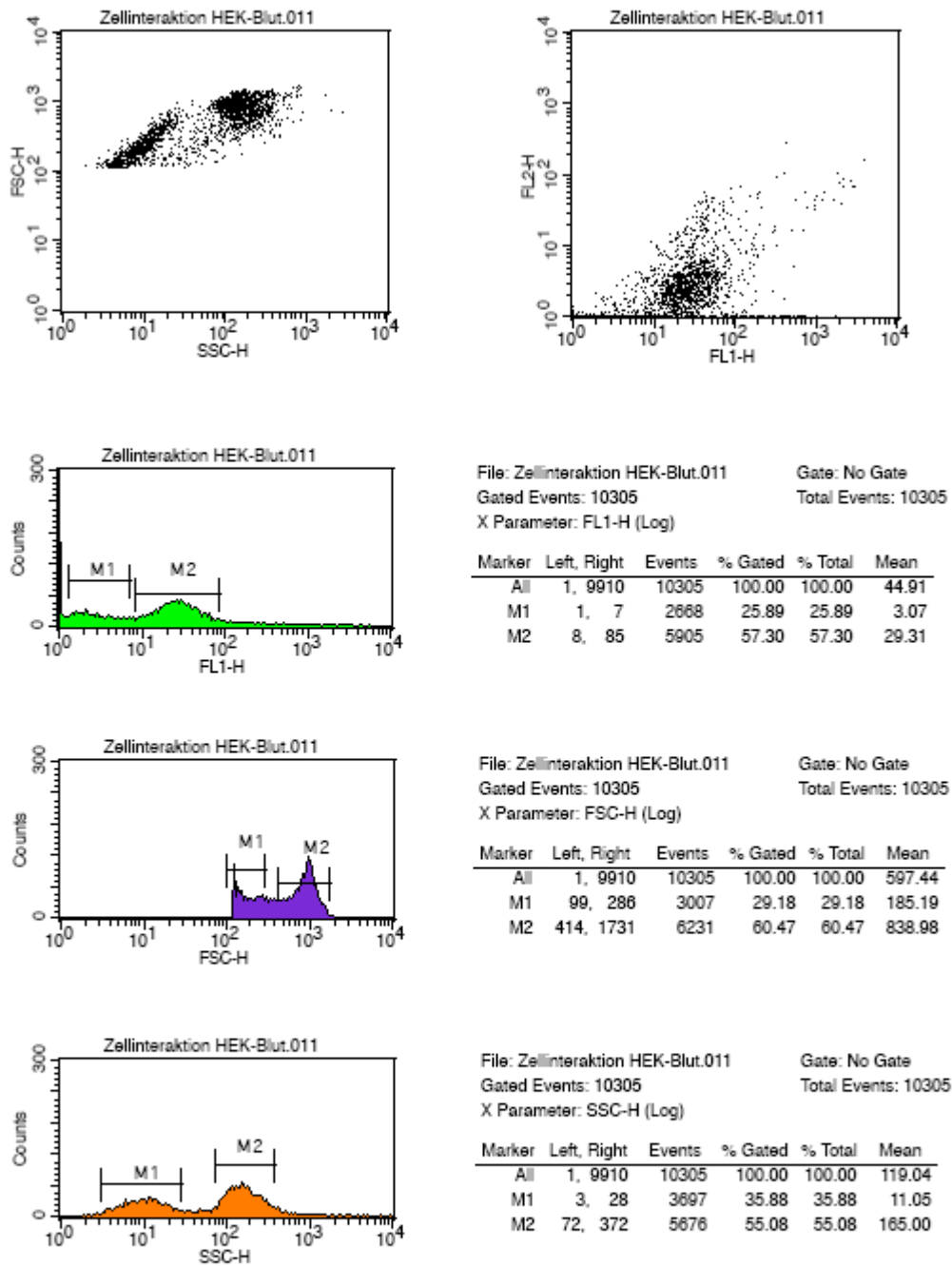


Abb. 8.39 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

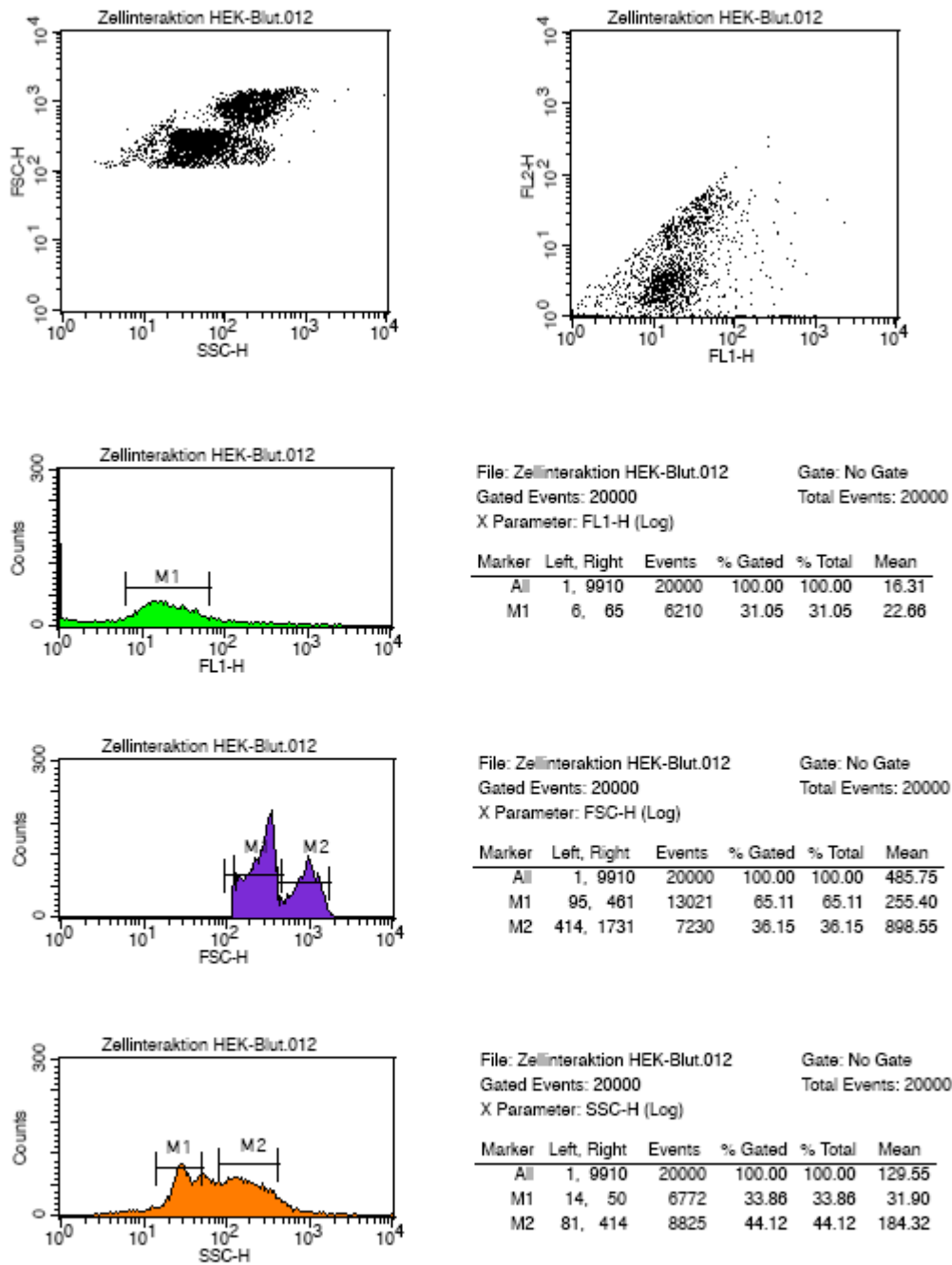


Abb. 8.40 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

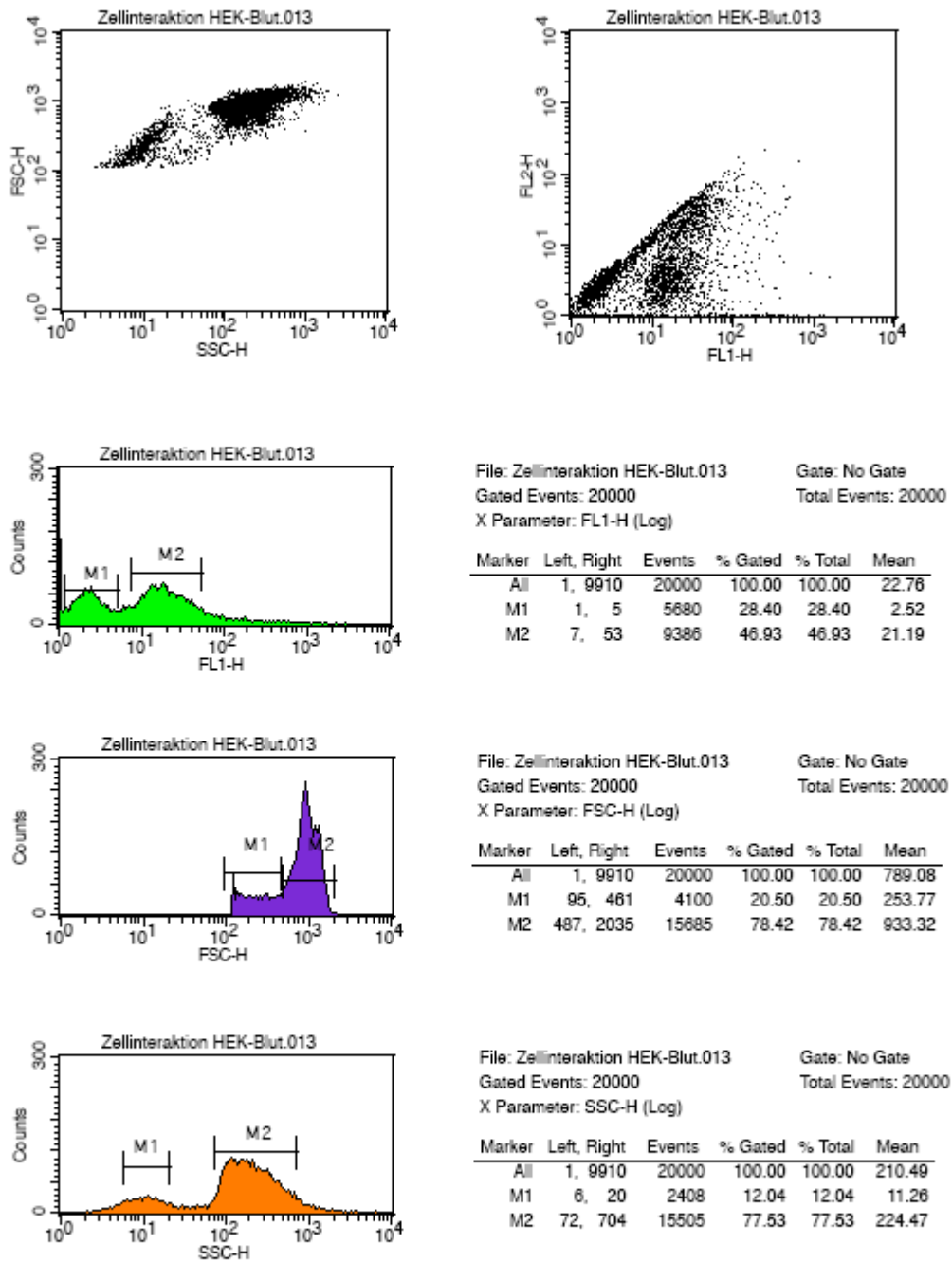


Abb. 8.41 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

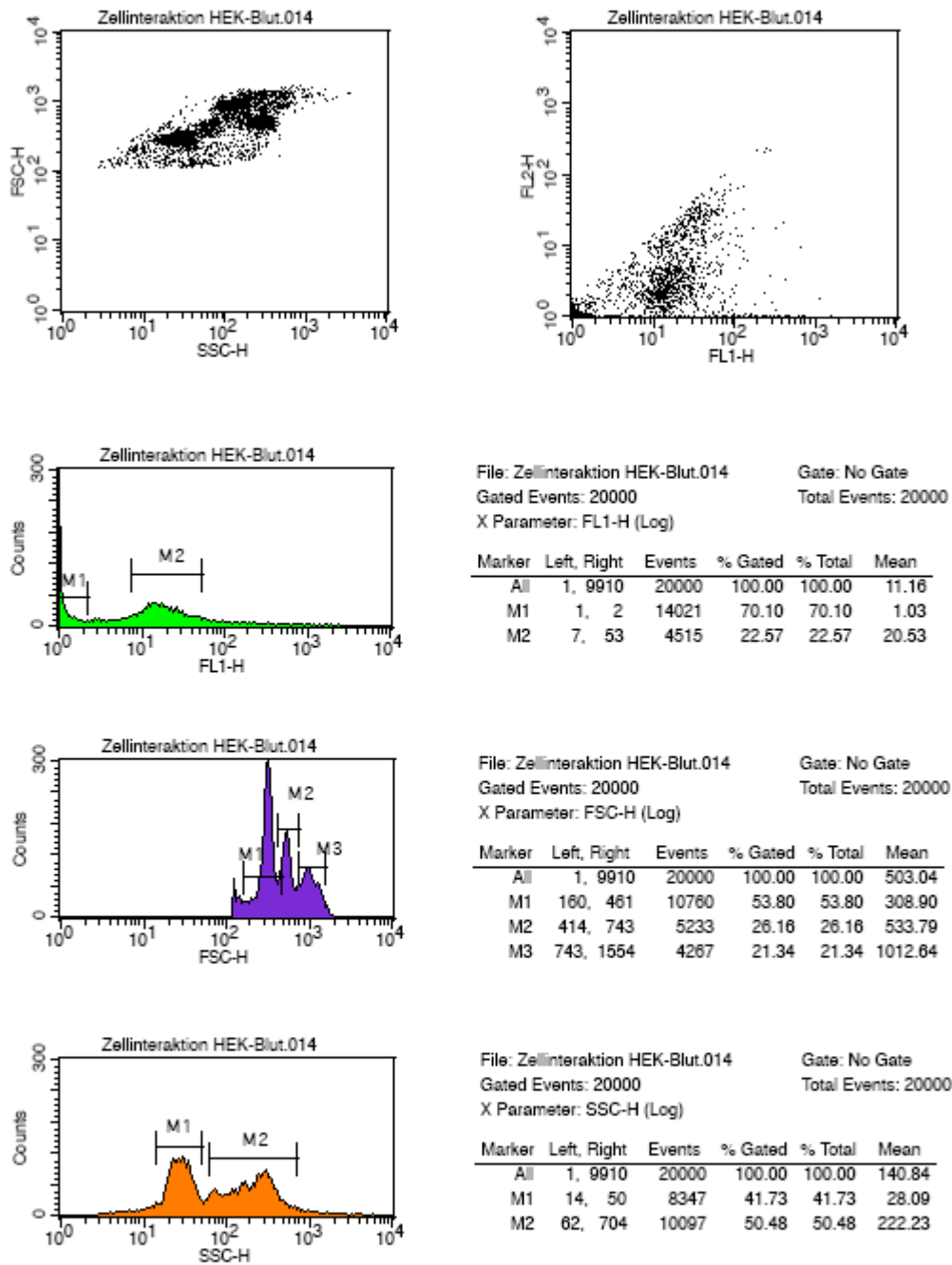


Abb. 8.42 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

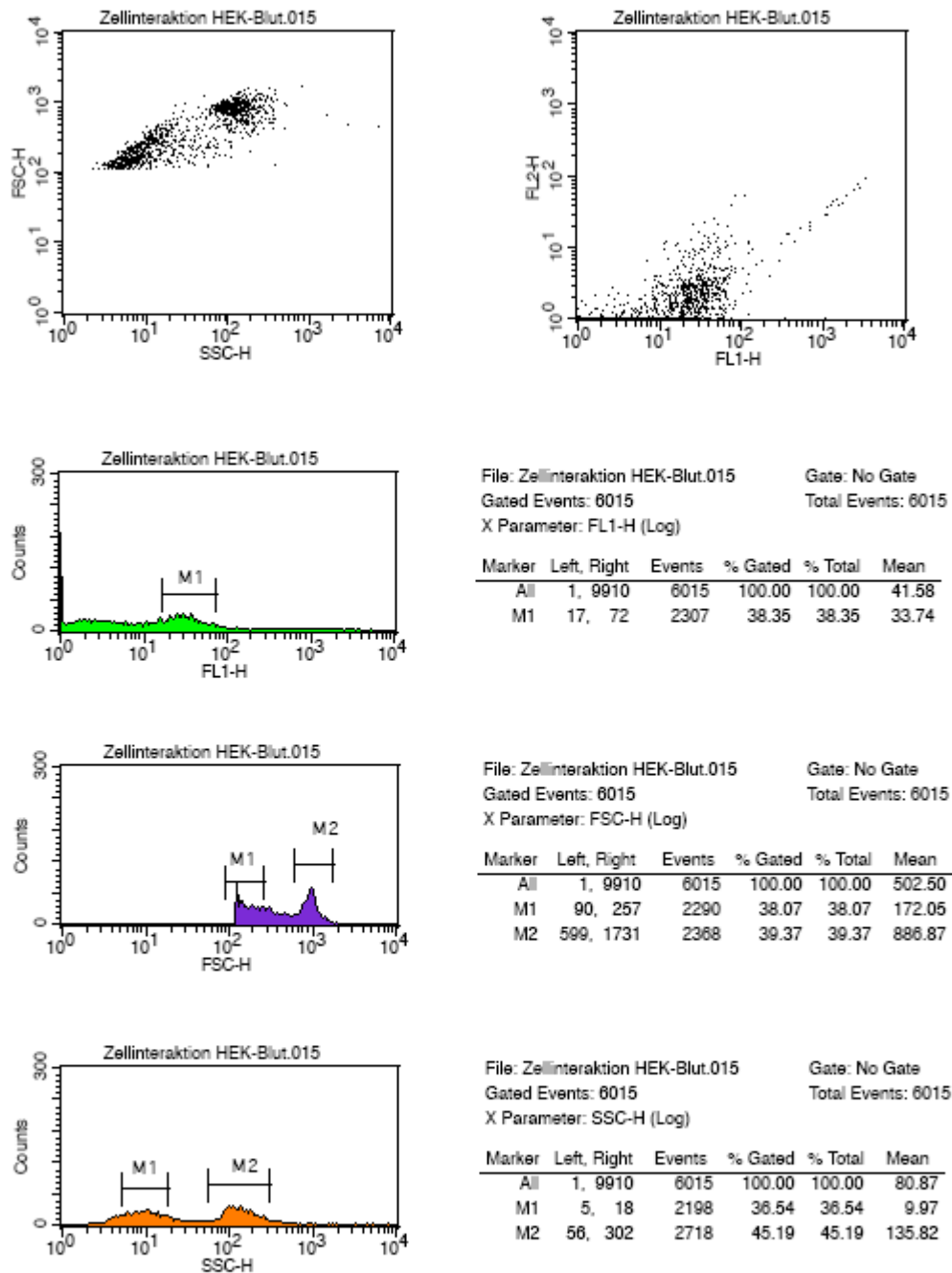


Abb. 8.43 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

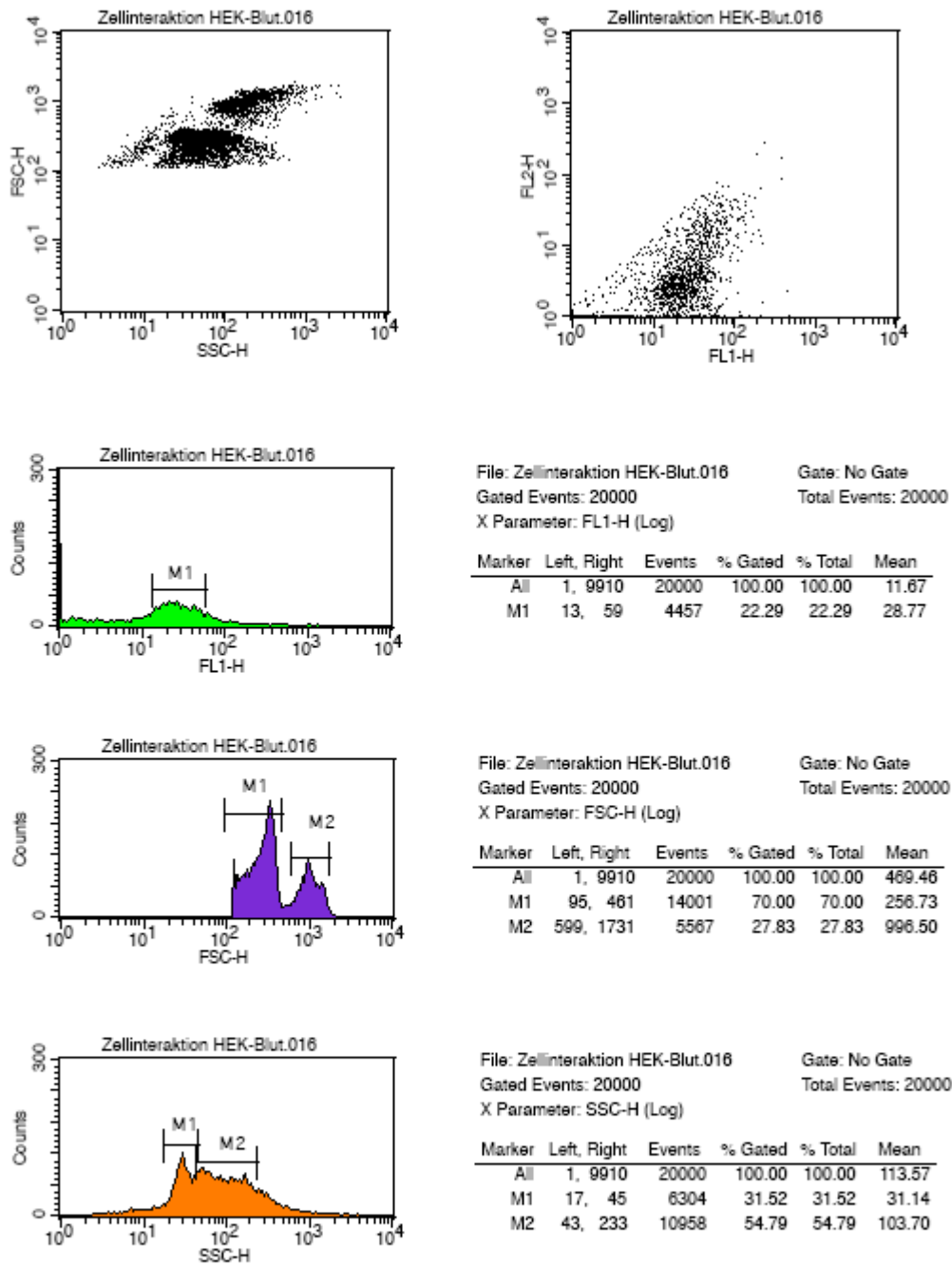


Abb. 8.44 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

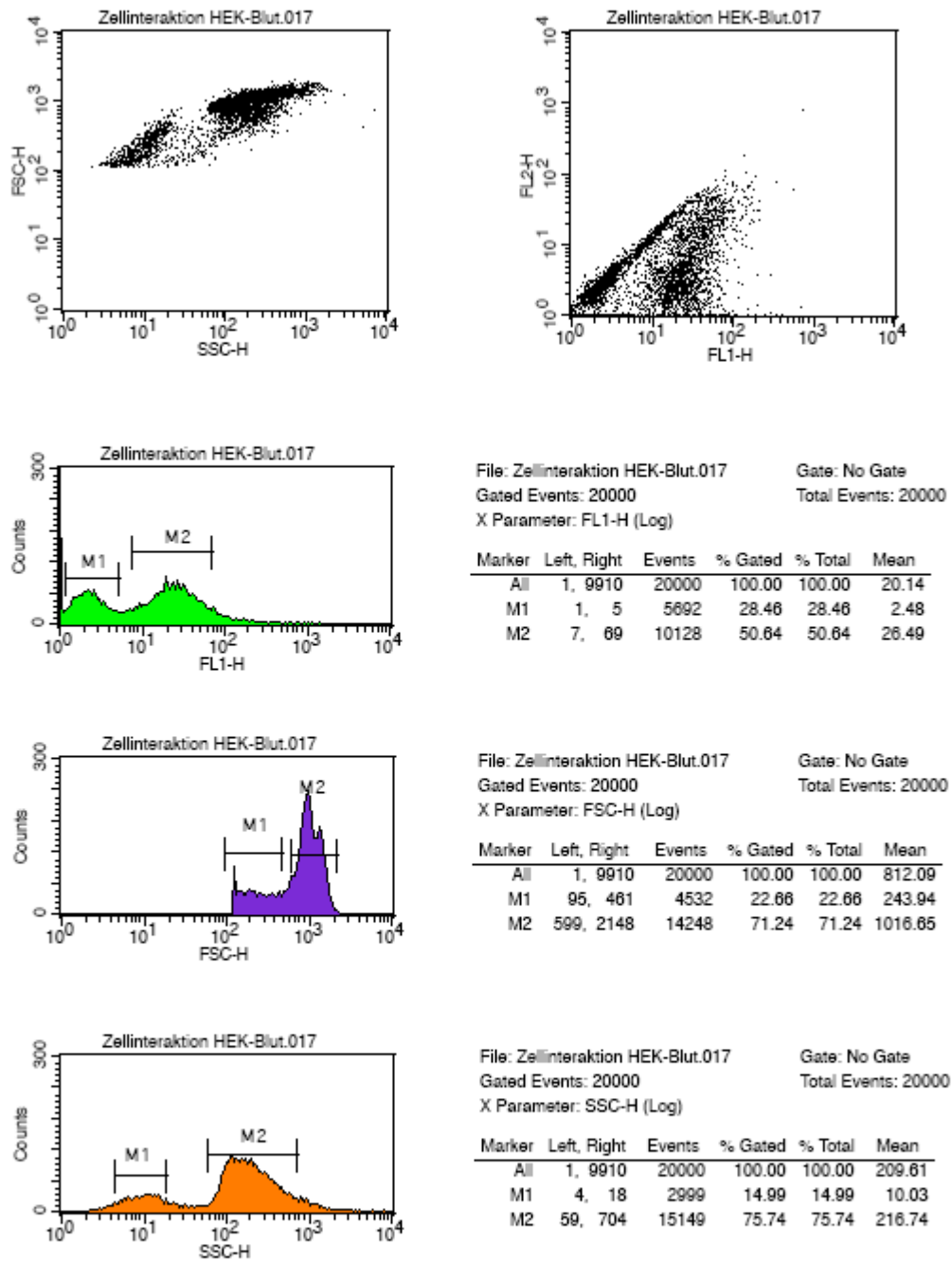


Abb. 8.45 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

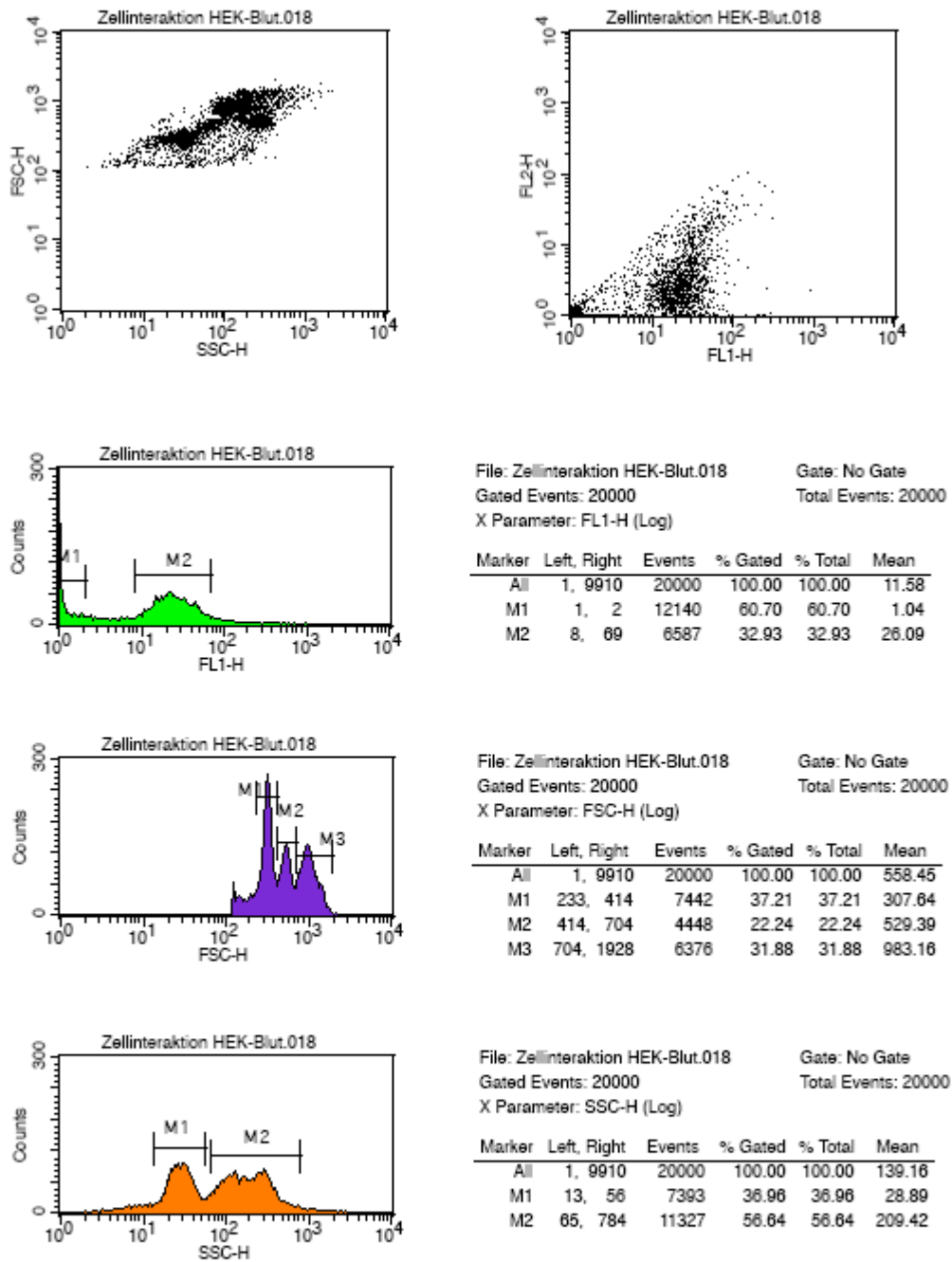


Abb. 8.46 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

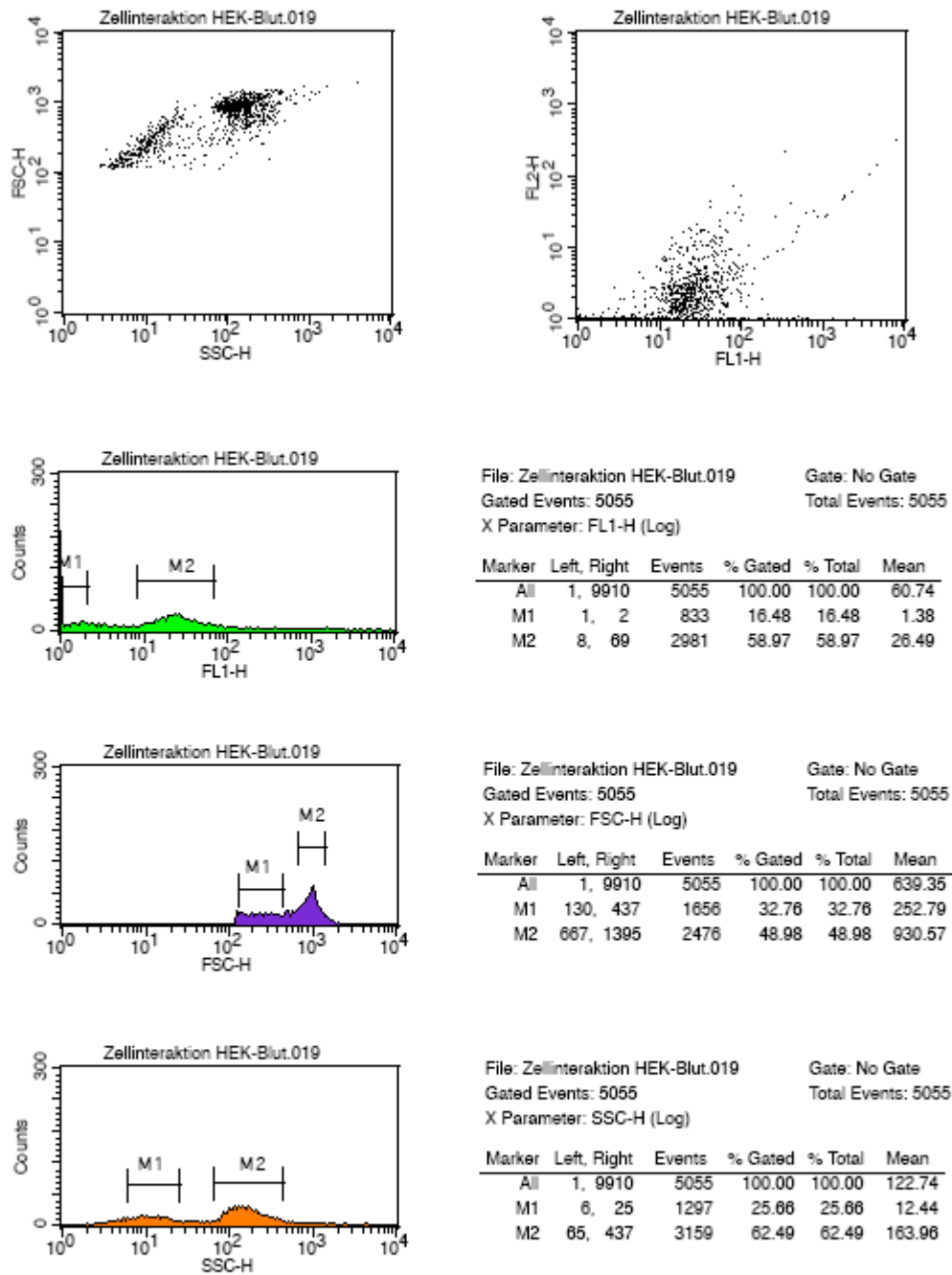


Abb. 8.47 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

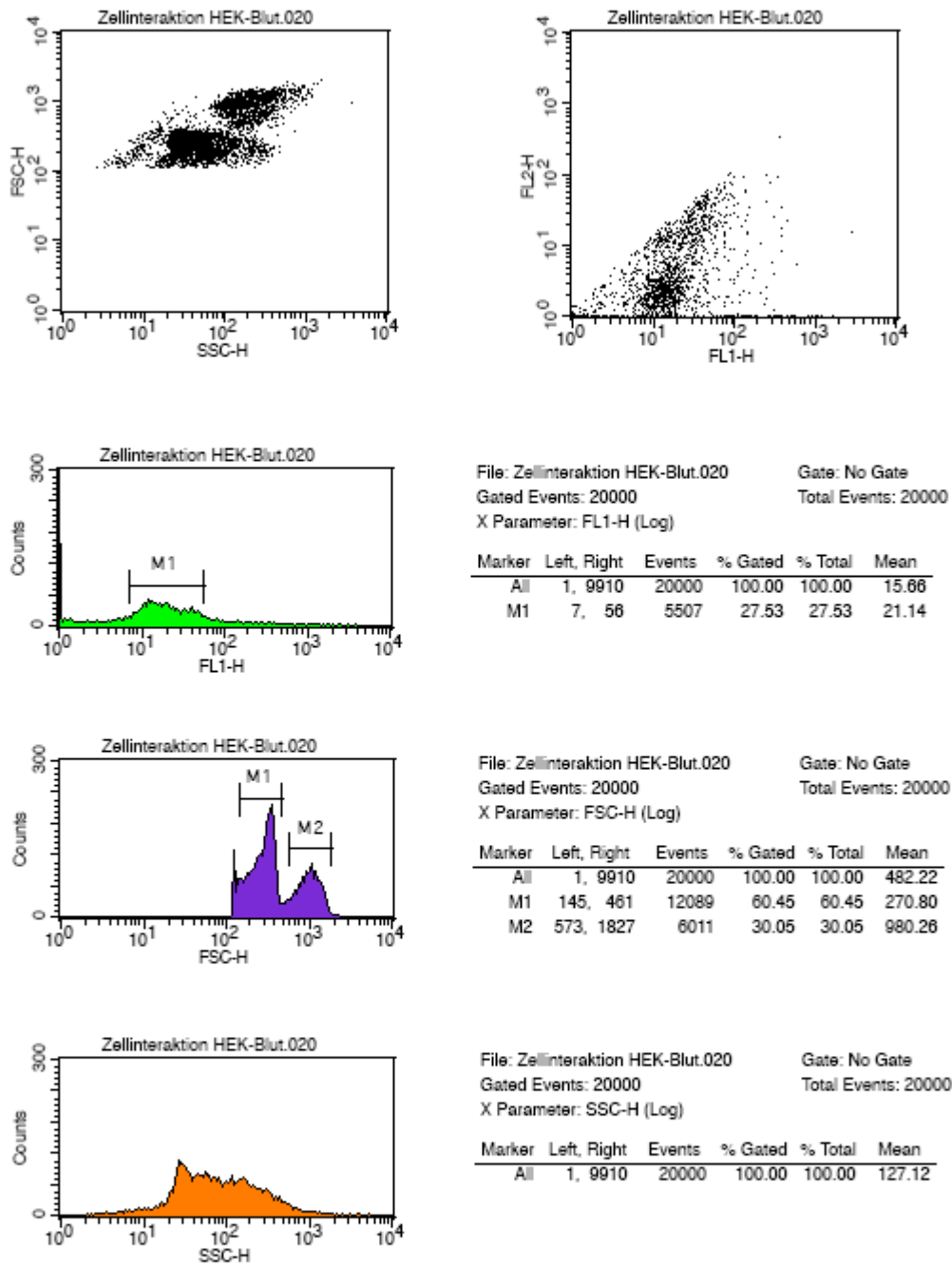


Abb. 8.48 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

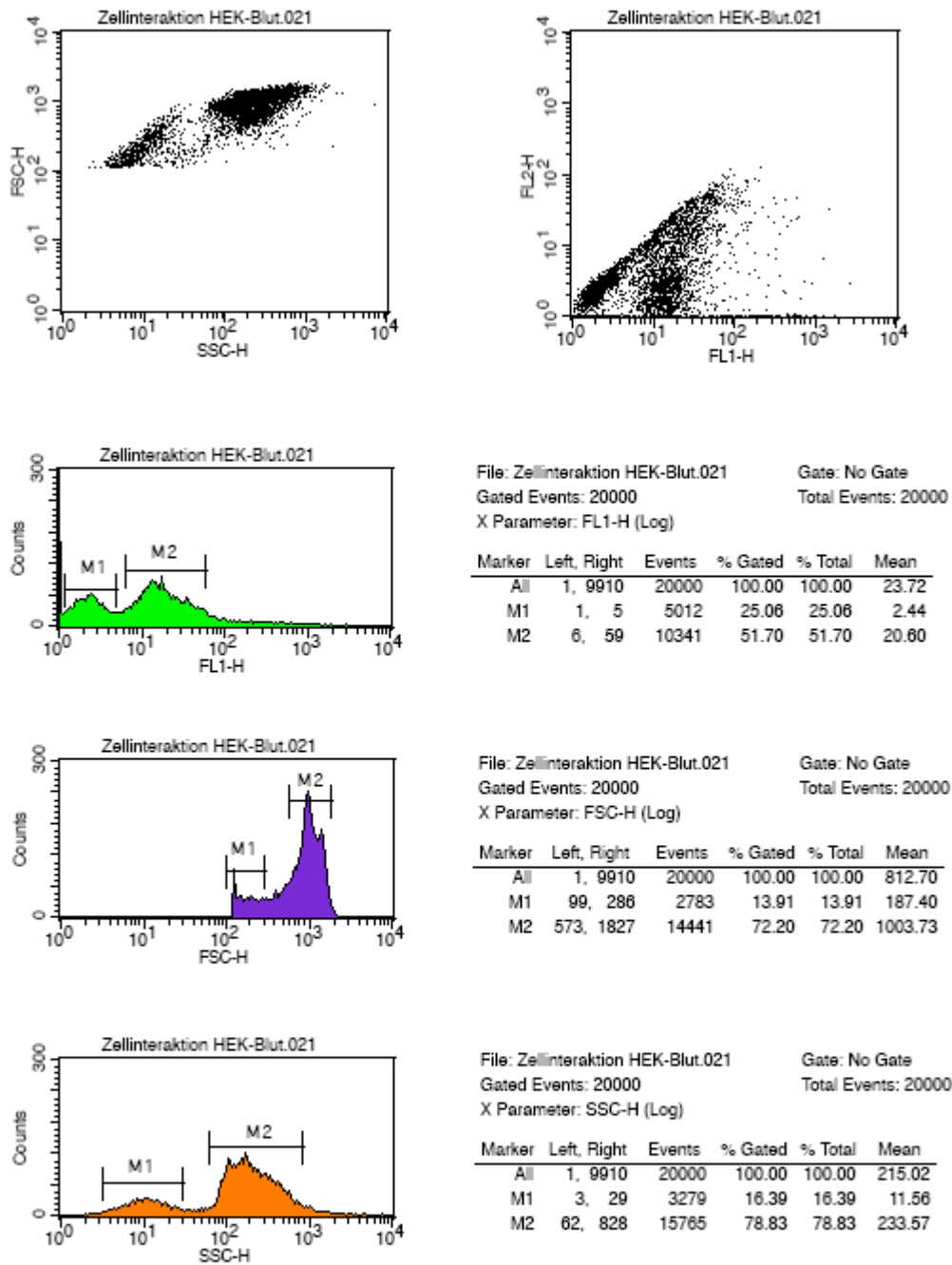


Abb. 8.49 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

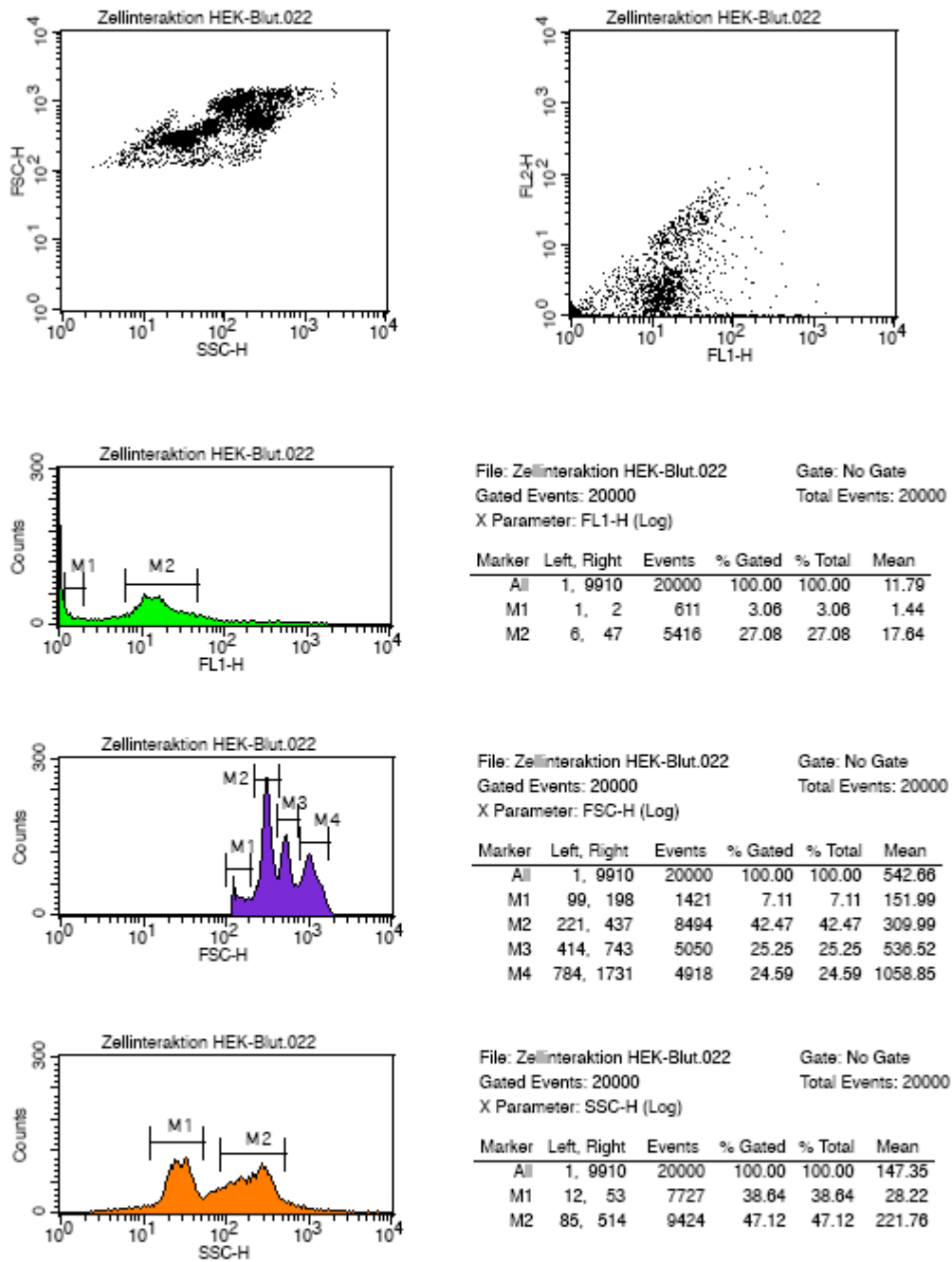


Abb. 8.50 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

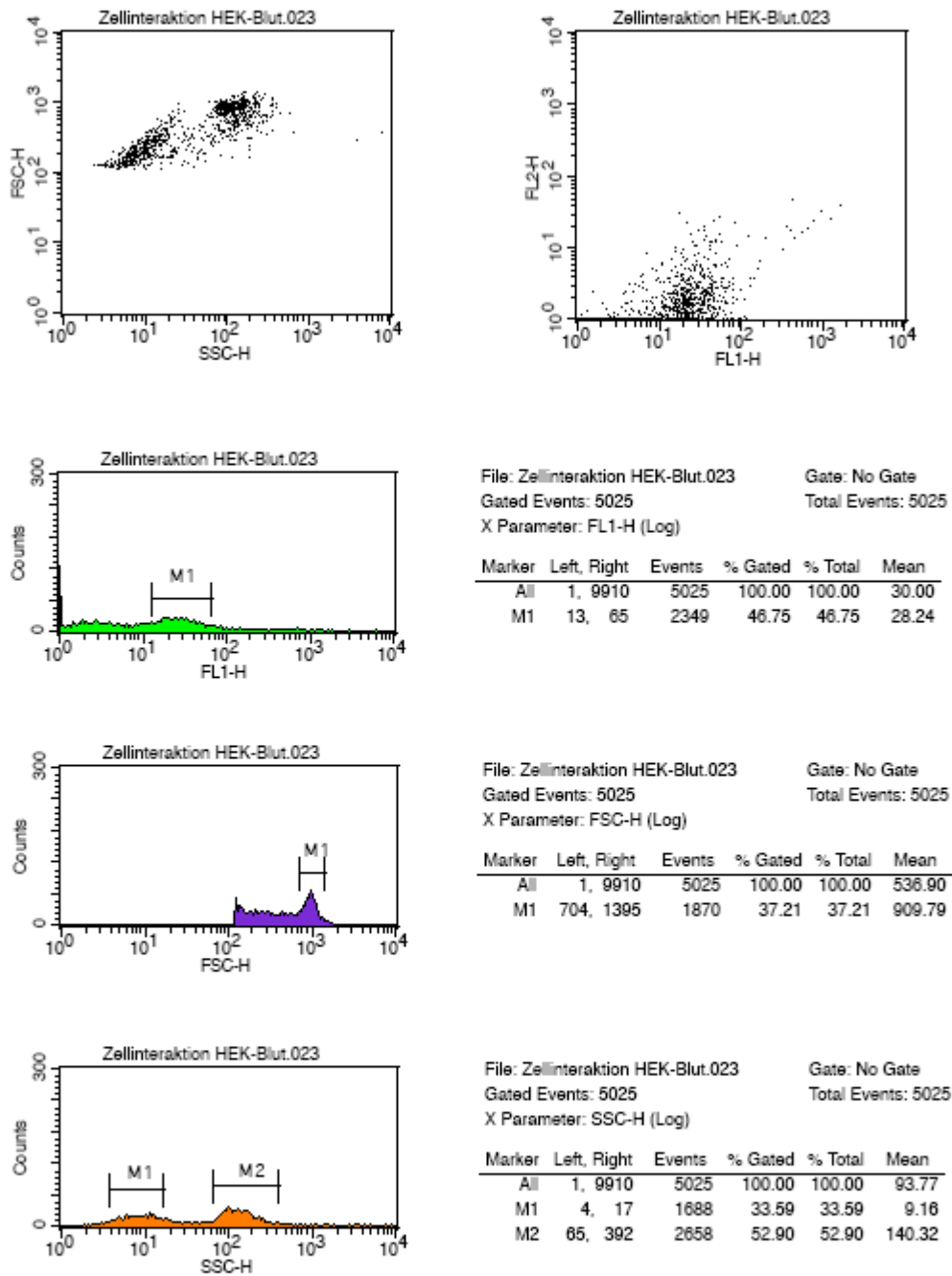


Abb. 8.51 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

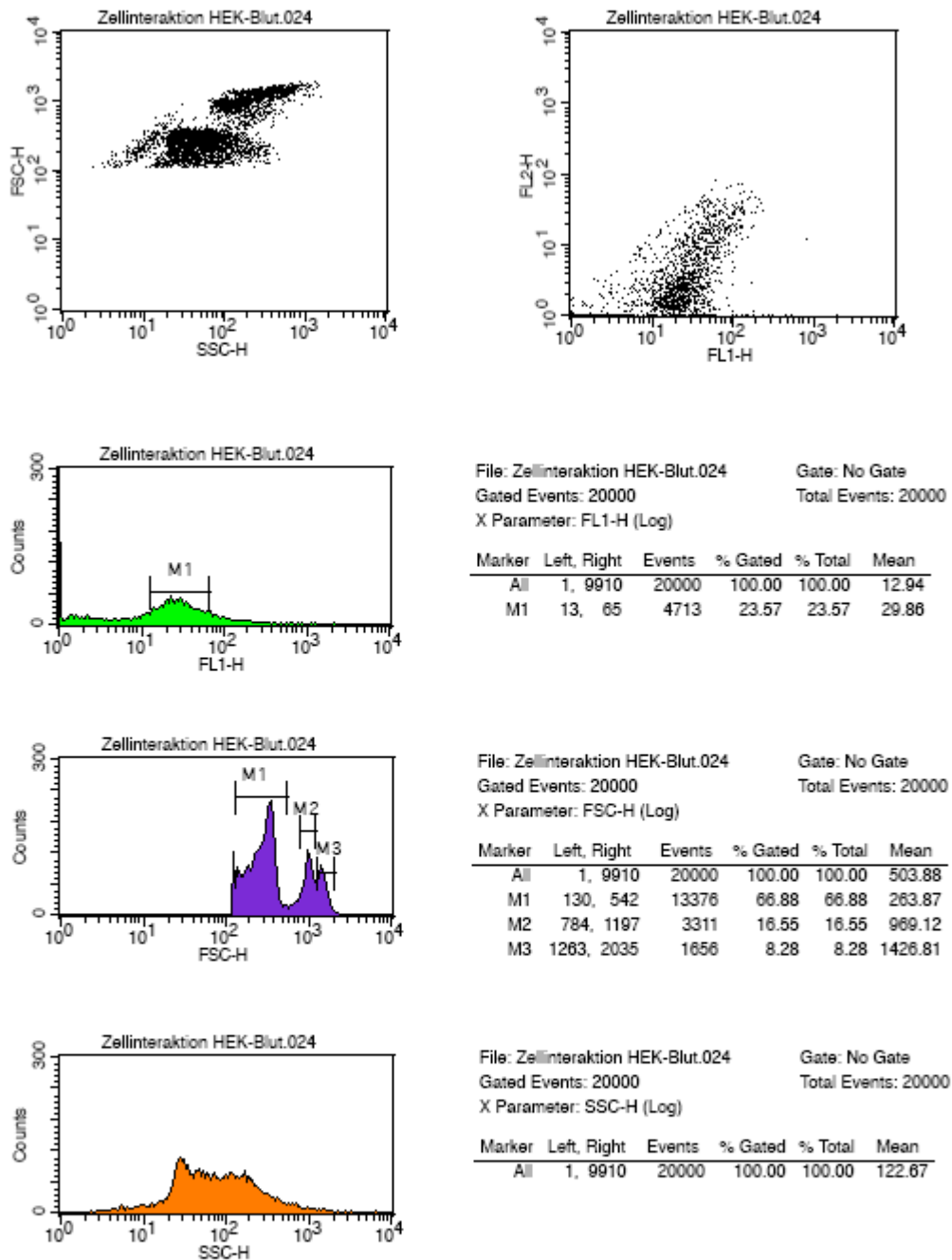


Abb. 8.52 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

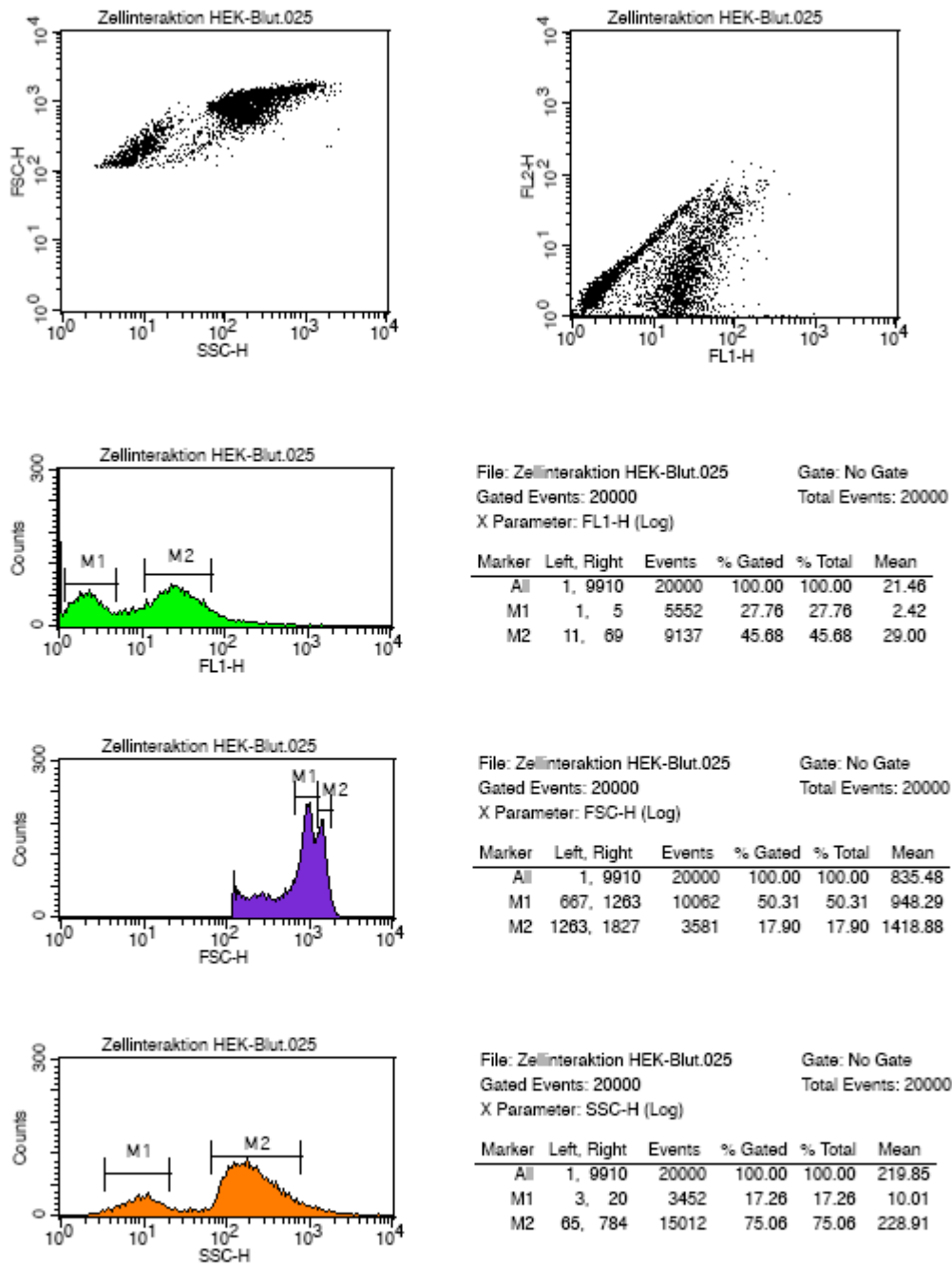


Abb. 8.53 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

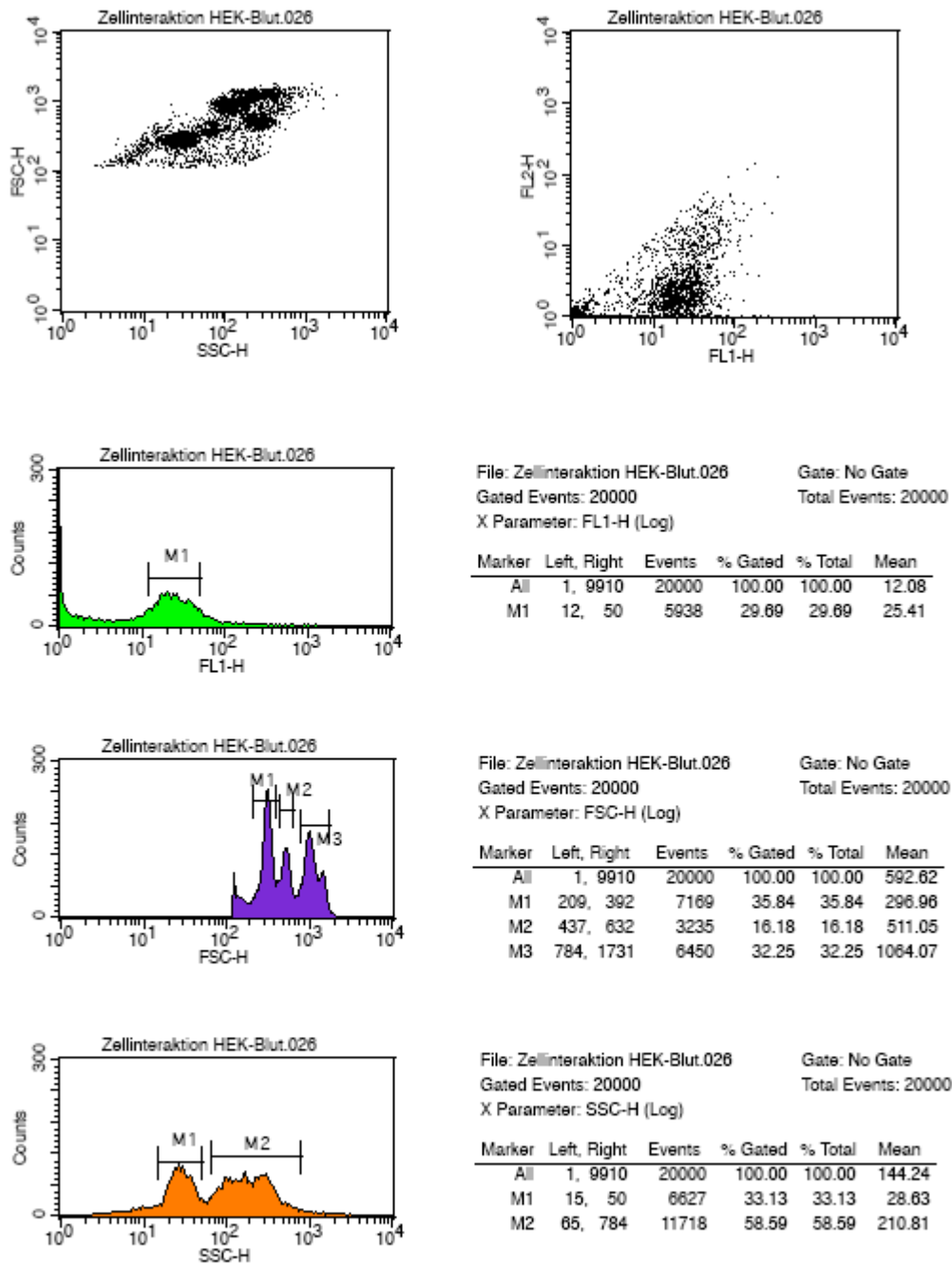


Abb. 8.54 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

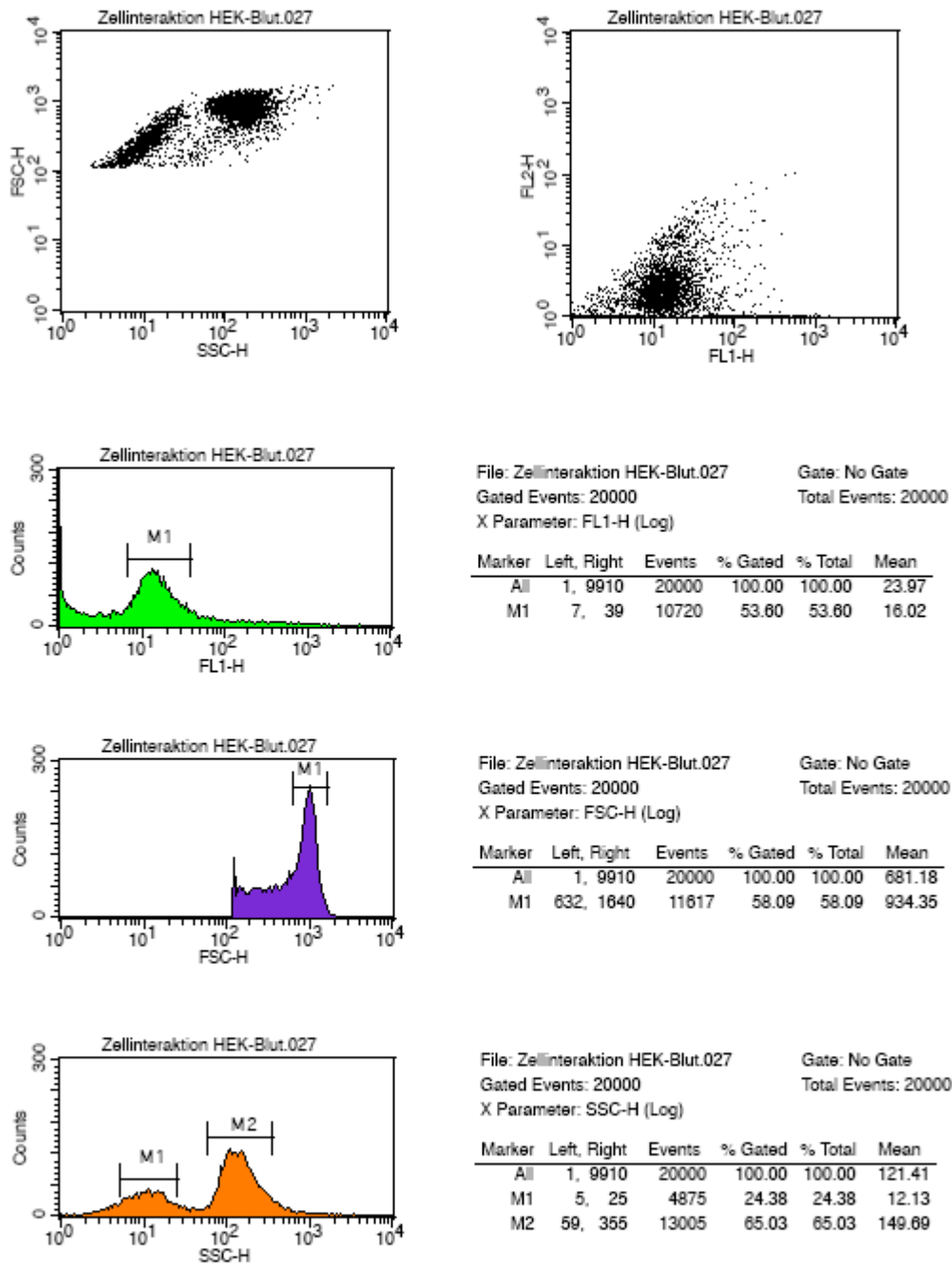


Abb. 8.55 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

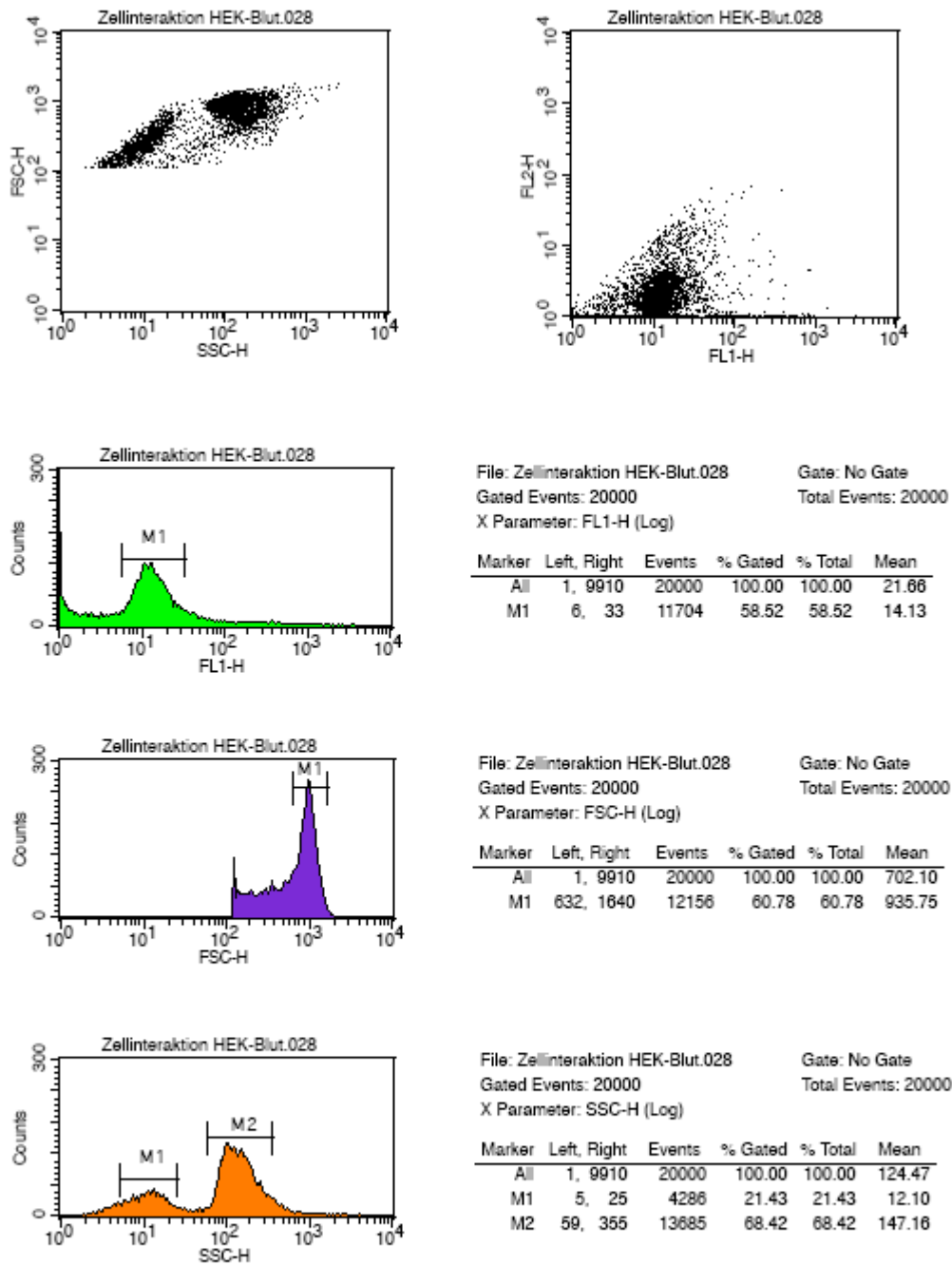


Abb. 8.56 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

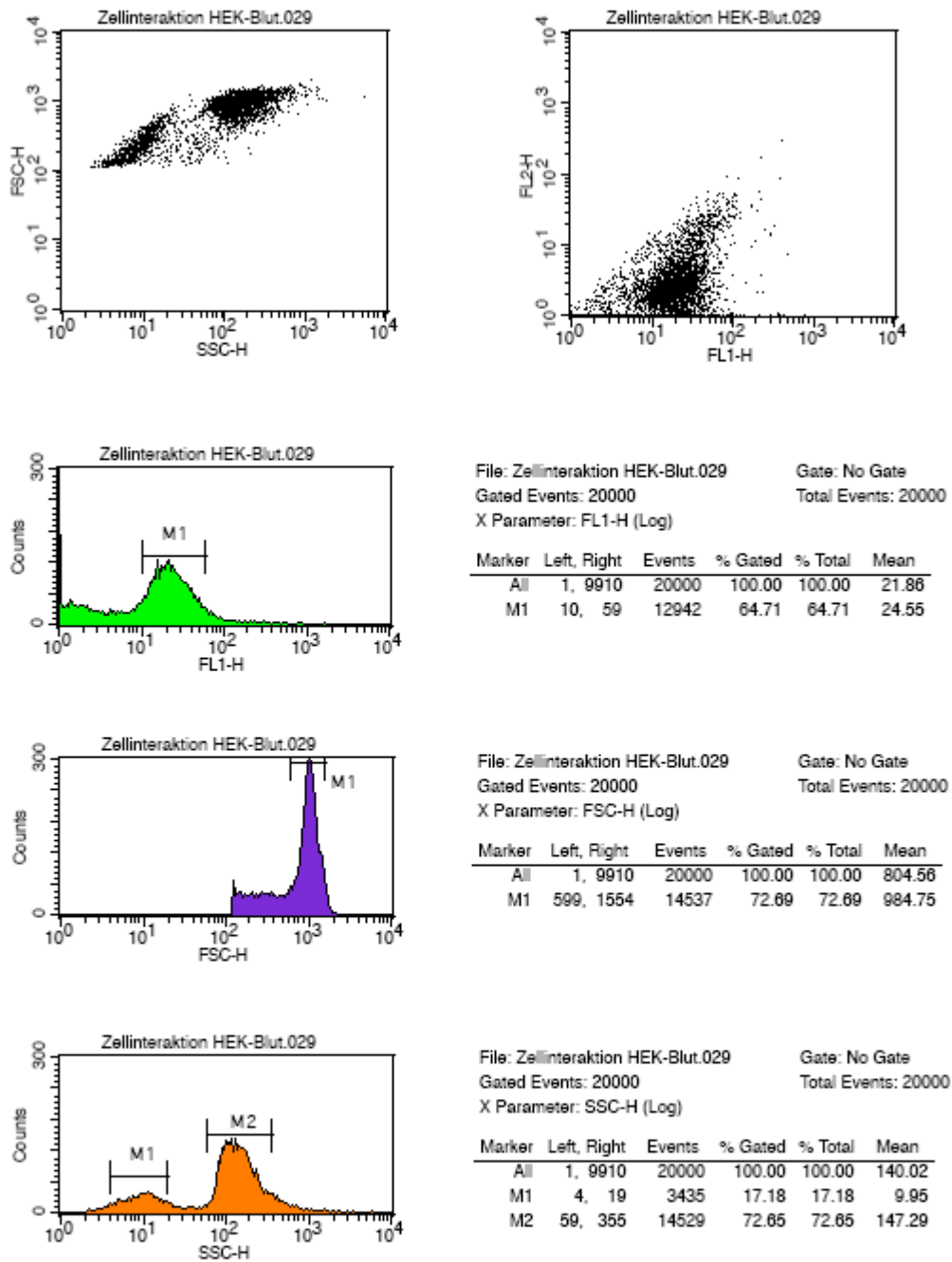


Abb. 8.57 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

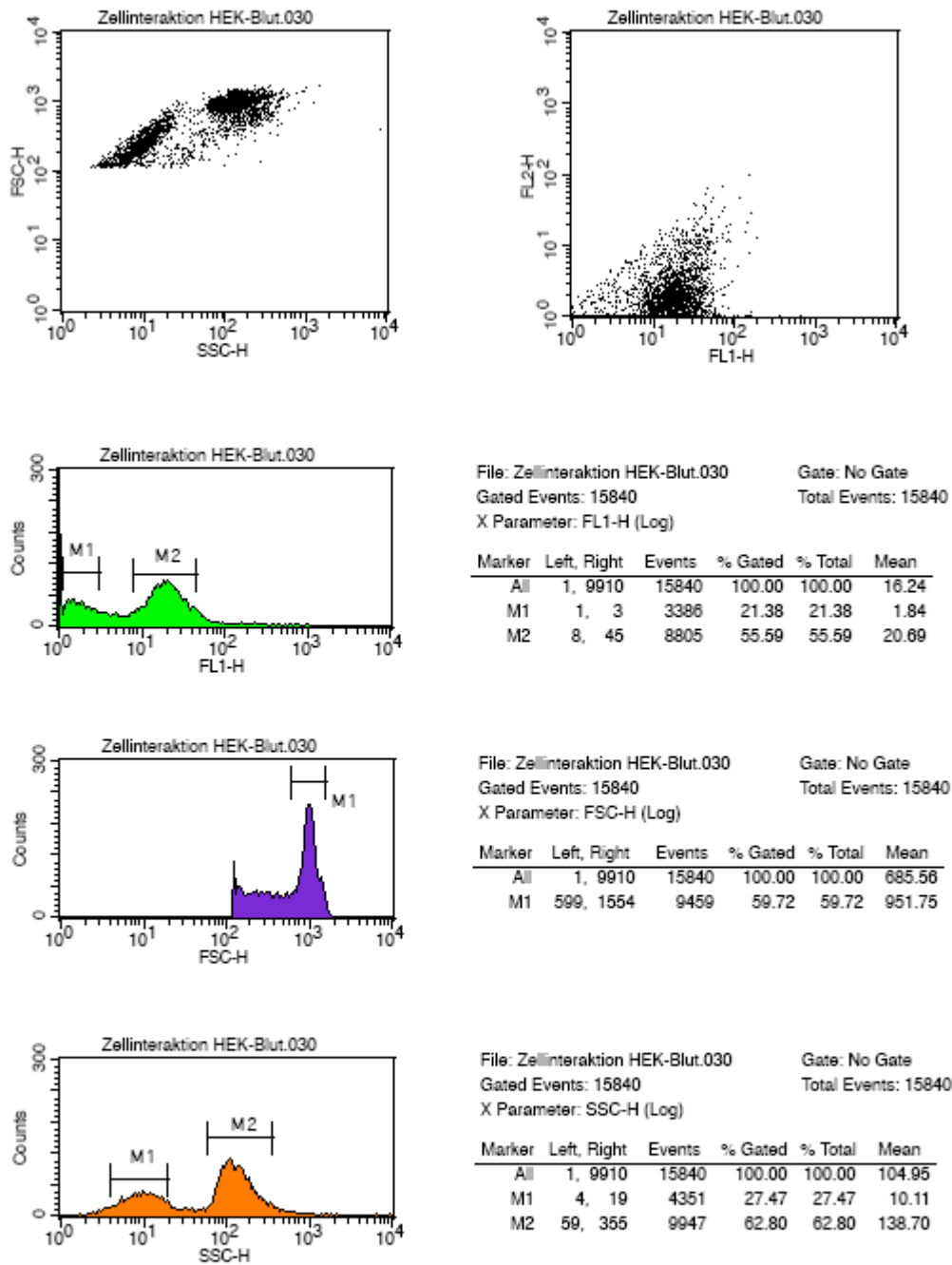


Abb. 8.58 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

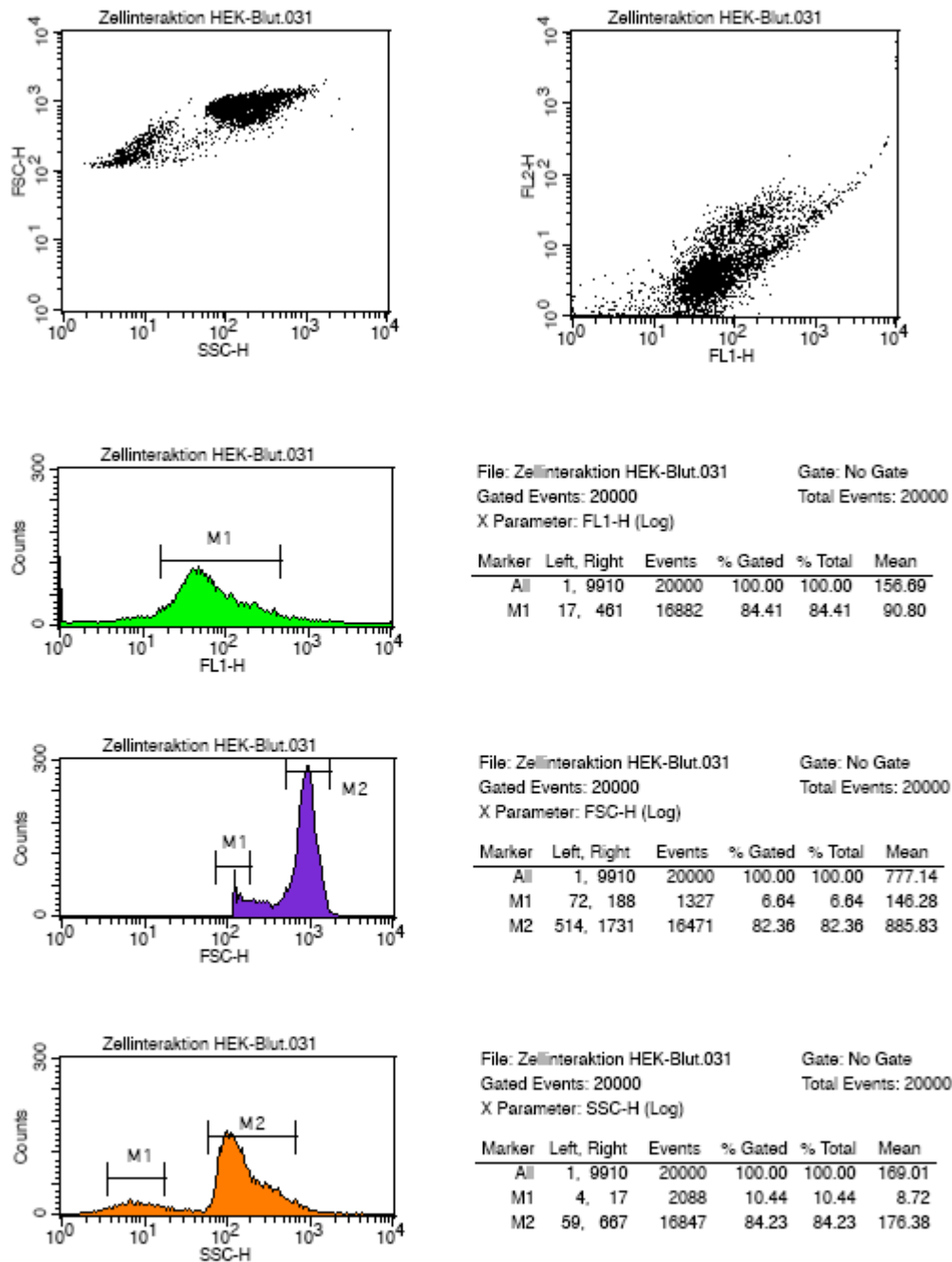


Abb. 8.59 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

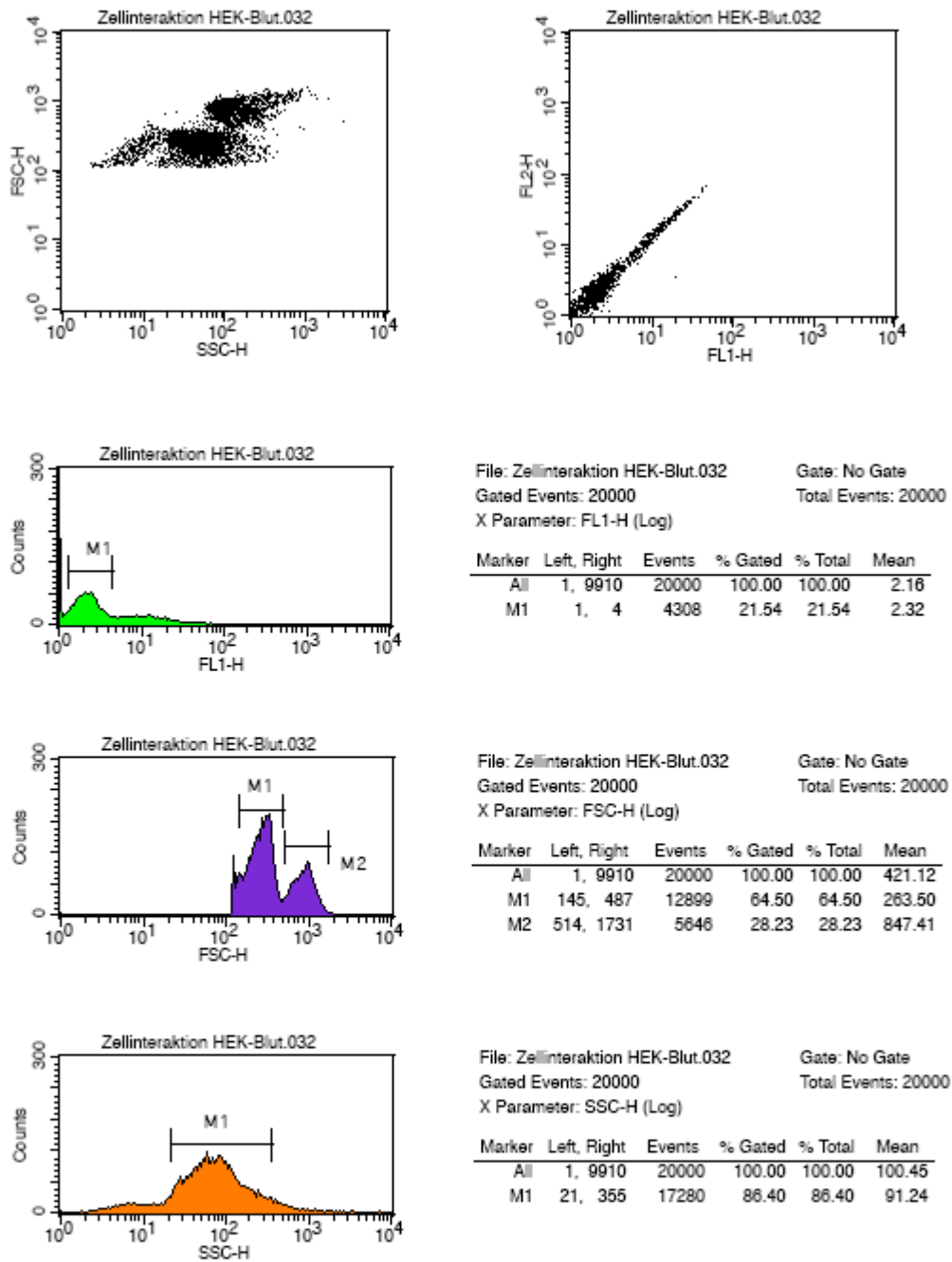


Abb. 8.60 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

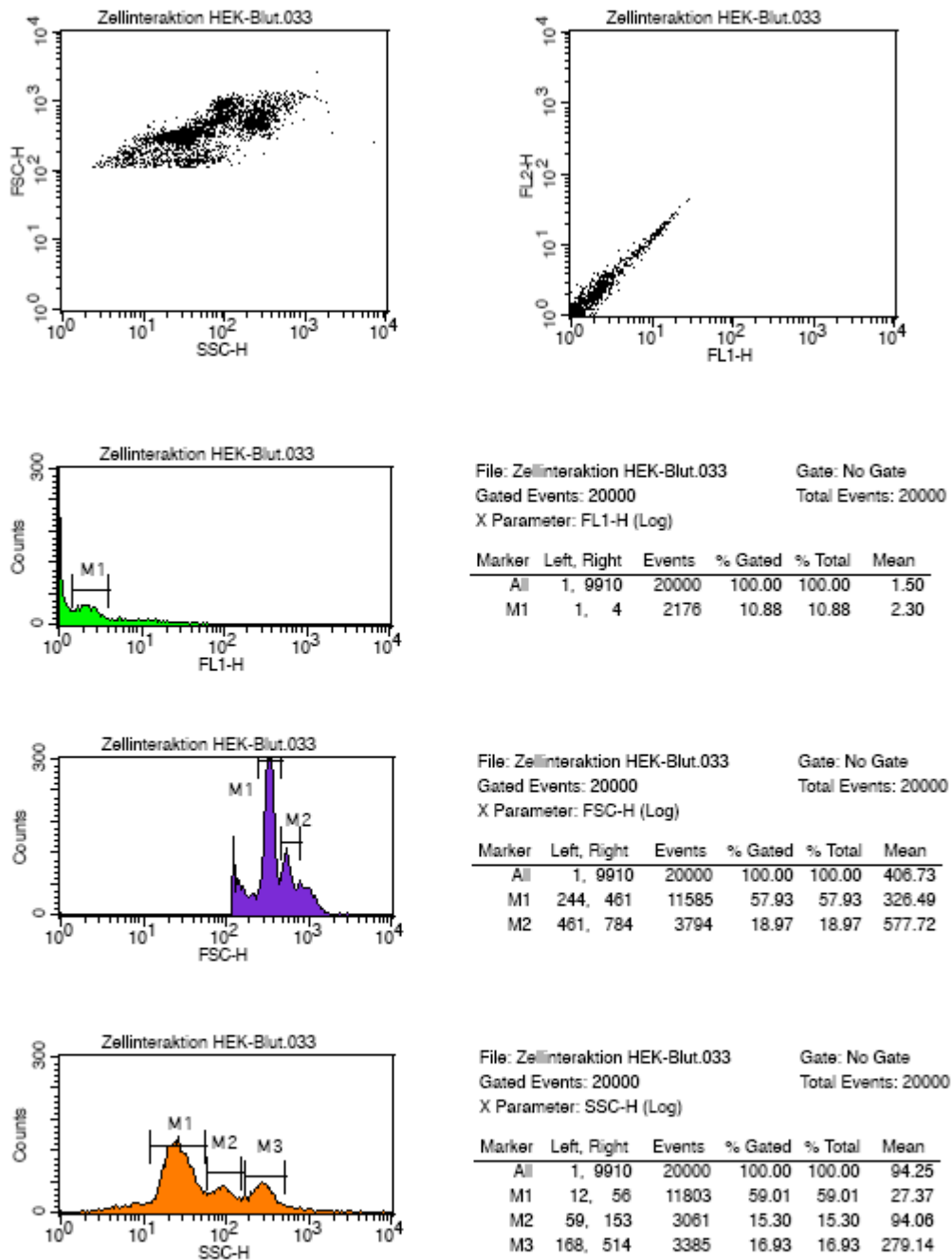


Abb. 8.61 Durchflusszytometrische Auswertung des zellfreien Überstandes des Zell-Zell Interaktionsversuches (vgl. 3.3.1 Versuche mit unterschiedlichen Blutzellen); der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der einzelnen Probennummern ist in Kapitel 2.20.1 Zell-Zell Interaktionen beschrieben

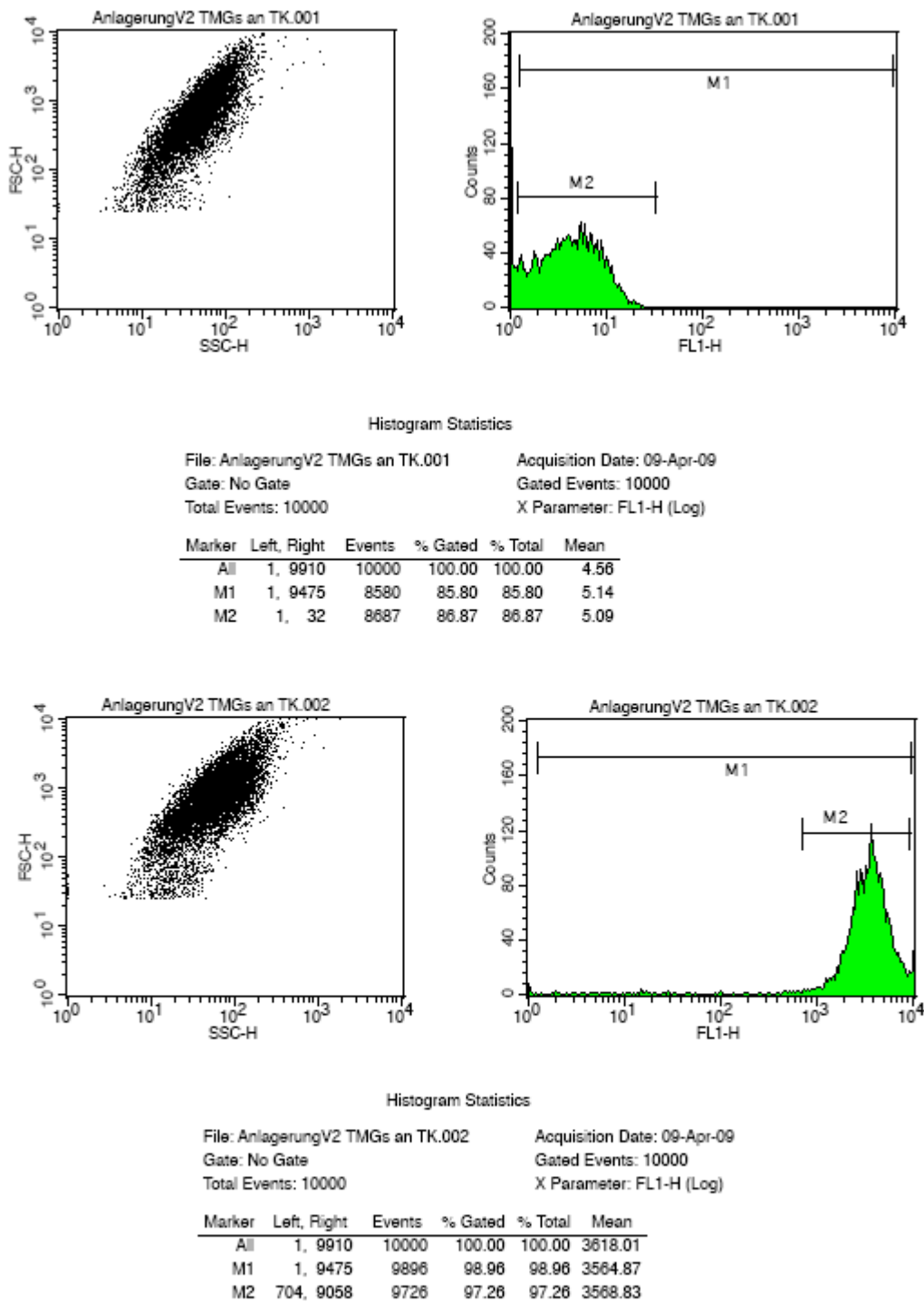


Abb. 8.62 Durchflusszytometrische Auswertung der Anlagerung von löslichem TMG-Albumin-FP an Thrombozyten (vgl. 2.28.2 Inhibitionsversuch: Versuchsaufbau und Zusammensetzung der einzelnen Probennummern; 3.3.2.1 Erste orientierende Experimente: Deutung der Ergebnisse)

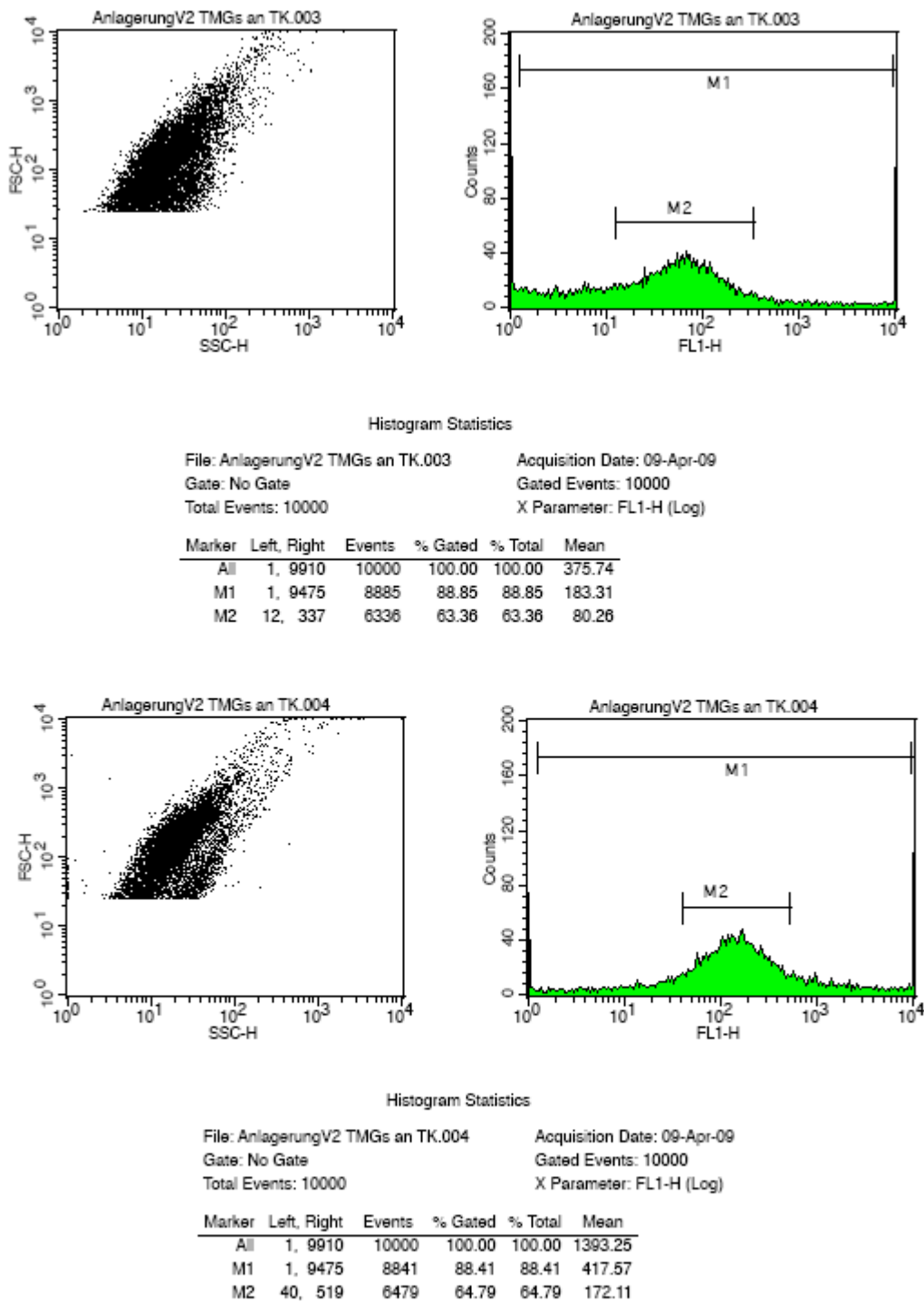
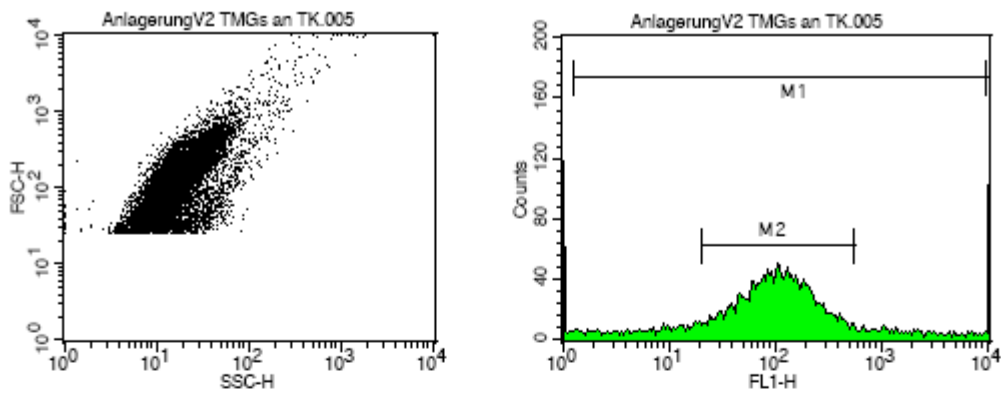


Abb. 8.63 Durchflusszytometrische Auswertung der Anlagerung von löslichem TMG-Albumin-FP an Thrombozyten (vgl. 2.28.2 Inhibitionsversuch: Versuchsaufbau und Zusammensetzung der einzelnen Probennummern; 3.3.2.1 Erste orientierende Experimente: Deutung der Ergebnisse)



Histogram Statistics

File: AnlagerungV2 TMGs an TK.005 Acquisition Date: 09-Apr-09
 Gate: No Gate Gated Events: 10000
 Total Events: 10000 X Parameter: FL1-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	847.75
M1	1, 9475	9232	92.32	92.32	290.55
M2	20, 542	7567	75.67	75.67	132.53

Abb. 8.64 Durchflusszytometrische Auswertung der Anlagerung von löslichem TMG-Albumin-FP an Thrombozyten (vgl. 2.28.2 Inhibitionsversuch: Versuchsaufbau und Zusammensetzung der einzelnen Probennummern; 3.3.2.1 Erste orientierende Experimente: Deutung der Ergebnisse)

8.11 Thrombozytenversuche – Versuch IV



Abb. 8.65 Optische Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen (vgl. Tab 2.56; Proben Nr. 1, 2) Inkubation von Thrombozyten in TK-Lagerpuffer mit sterilfiltriertem (1.1) oder hitzeinaktiviertem (1.2) TK-Zellüberstand bildete nach Zugabe einer CaCl_2 -Lösung eine gelartige Substanz aus

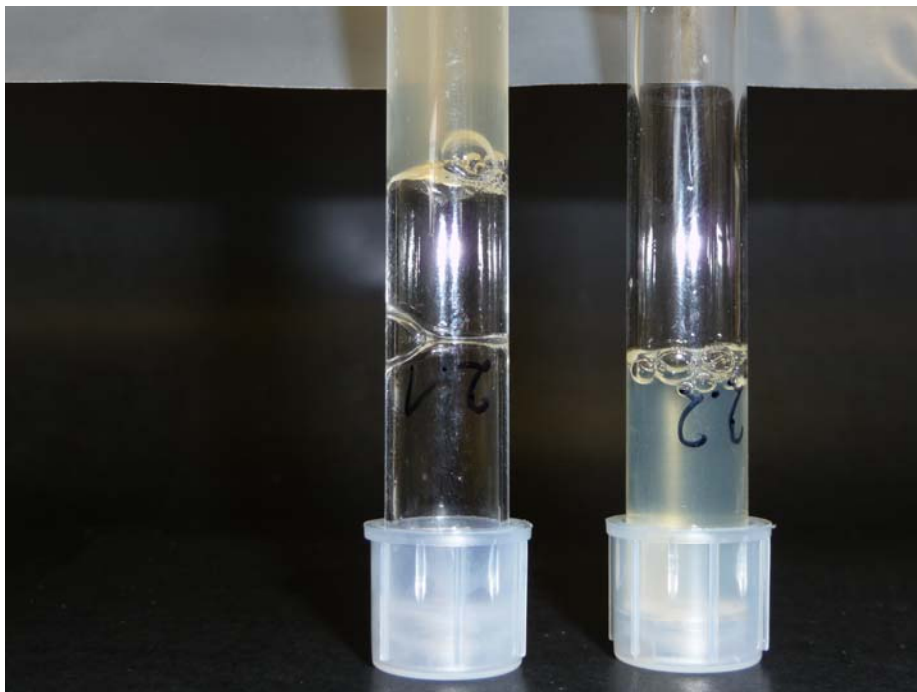


Abb. 8.66 Optische Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen (vgl. Tab 2.56; Proben Nr. 3, 4) Inkubation von HEK293 *MOCK*-Zellen in HEK293-Medium mit sterilfiltriertem (2.1) oder hitzeinaktiviertem (2.2) TK-Zellüberstand. 2.1 bildete nach Zugabe einer CaCl_2 -Lösung eine gelartige Substanz aus



Abb. 8.67 Optische Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen (vgl. Tab 2.56; Proben Nr. 7, 8) Inkubation von TMG3-GFP-FP exprimierenden HEK293-Zellen⁺ in HEK293-Medium mit sterilfiltriertem (3.1b) oder hitzeinaktiviertem (3.2b) TK-Zellüberstand. 3.1b bildete nach Zugabe einer CaCl₂-Lösung eine gelartige Substanz aus

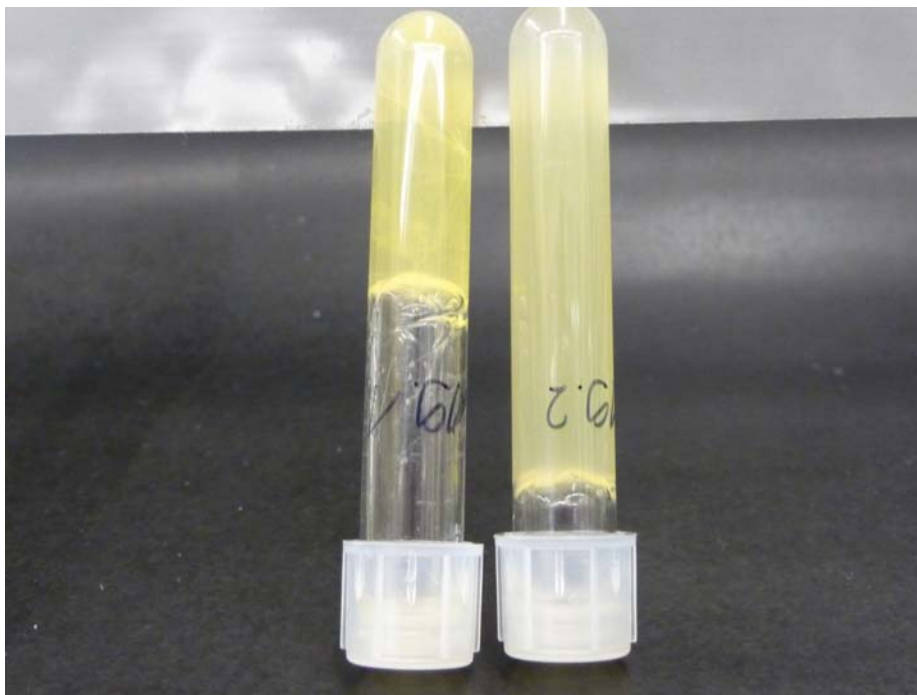


Abb. 8.68 Optische Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen (vgl. Tab 2.56; Proben Nr. 39, 40) Inkubation von TMG3-GFP-FP exprimierenden HEK293-Zellen⁺ in HEK293-Medium mit Thrombozyten in TK-Lagerpuffer und sterilfiltriertem (19.1) oder hitzeinaktiviertem (19.2) TK-Zellüberstand bildeten nach Zugabe einer CaCl₂-Lösung eine gelartige Substanz aus

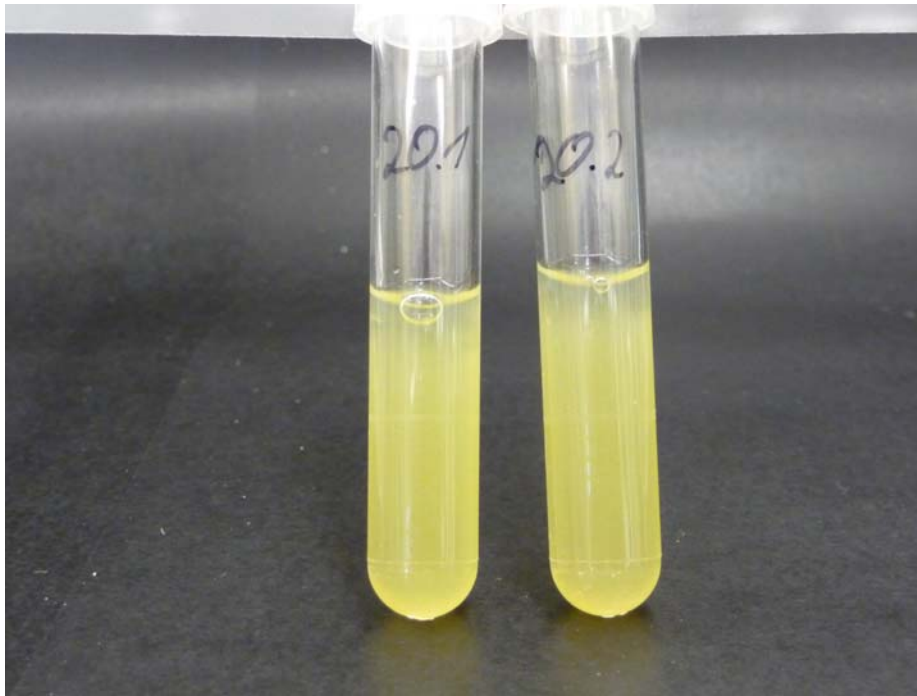


Abb. 8.69 Optische Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen (vgl. Tab 2.56; Proben Nr. 41, 42) Inkubation von TMG3-GFP-FP exprimierenden HEK293-Zellen⁻ in HEK293-Medium mit Thrombozyten in TK-Lagerpuffer und sterilfiltriertem (20.1) oder hitzeinaktiviertem (20.2) TK-Zellüberstand bildeten nach Zugabe einer CaCl₂-Lösung eine gelartige Substanz aus



Abb. 8.70 Optische Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen (vgl. Tab 2.56; Proben Nr. 43, 44) Inkubation von TMG4-GFP-FP exprimierenden HEK293-Zellen⁺ in HEK293-Medium mit Thrombozyten in TK-Lagerpuffer und sterilfiltriertem (21.1) oder hitzeinaktiviertem (21.2) TK-Zellüberstand bildeten nach Zugabe einer CaCl₂-Lösung eine gelartige Substanz aus

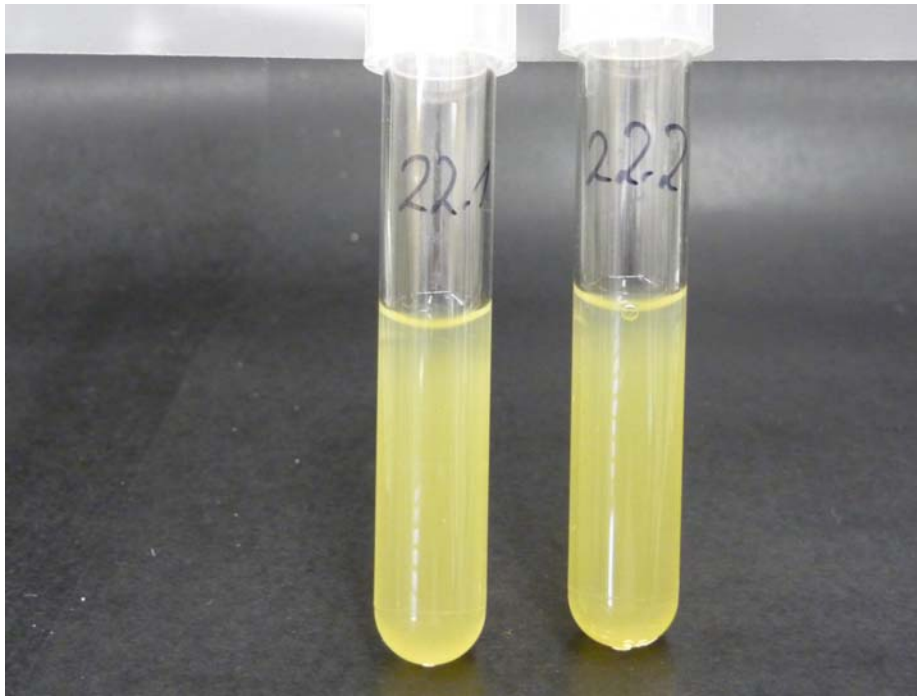


Abb. 8.71 Optische Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und HEK293-Zellen (vgl. Tab 2.56; Proben Nr. 45, 46) Inkubation von TMG4-GFP-FP exprimierenden HEK293-Zellen in HEK293-Medium mit Thrombozyten in TK-Lagerpuffer und sterilfiltriertem (22.1) oder hitzeinaktiviertem (22.2) TK-Zellüberstand bildeten nach Zugabe einer CaCl_2 -Lösung eine gelartige Substanz aus

LEBENS LAUF

ANGABEN ZUR PERSON

Daniel Schürmann

geboren am 29.12.1980 in Siegen,

ledig, deutsch

ARBEITSERFAHRUNG

seit Oktober 2009

ANSTELLUNG ALS JUNIOR SCIENTIST bei der Firma CSL Behring im Bereich Preclinical Research and Development

seit Juli 2006

PROMOTION bei der Firma CSL Behring unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Michael Keusgen von der Philipps Universität Marburg

AUSBILDUNG

November 2005 – April 2006

2. ABSCHNITT DES „PRAKTISCHEN JAHRES“
Pharmaziepraktikum in der Birken Apotheke, Sterzhausen

Mai – Oktober 2005

1. ABSCHNITT DES „PRAKTISCHEN JAHRES“
Pharmaziepraktikum in der pharmazeutischen Industrie im Rahmen eines Kooperationsprojektes der Firmen ZLB Behring, Marburg (Mai – Juli) und Paul-Ehrlich Institut, Langen (August – Oktober)
Arbeitsthema: Untersuchung des Einflusses von proteolytischer Spaltung auf die Aktivität gereinigter anti-D-Immunglobuline

Oktober 2000 – April 2005

STUDIUM DER PHARMAZIE AN DER PHILIPPS UNIVERSITÄT MARBURG

Abschluss: Approbation als Apotheker

März 2003: Erstes Staatsexamen

April 2005: Zweites Staatsexamen

Mai 2006: Drittes Staatsexamen

August 1991 – Juli 2000

STÄDTISCHES GYMNASIUM OLPE

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife