

Isolierung und Charakterisierung
von hNLP, einem humanen
zirkulierenden Peptid

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Biol. Burkhard Kleemeier
geboren am 14.06.68 in Bad Oeynhausen

Februar 1998

Referent: Prof. Dr. Bernd Otto
Abteilung Gentechnologie
Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung,
Hannover

Korreferent: PD. Dr. Walter Müller
Abteilung Physiologische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 05.02.98

Meinen Eltern

Abstract

Hemofiltration is a routine treatment for patients with chronic renal failure to remove substances that are normally cleared by the kidney. A filter membrane with a molecular mass cut-off of 20 kD is used, which virtually excludes plasma proteins. Being available in large quantities, the hemofiltrate is an excellent source of biologically active peptides that circulate in the human blood.

A novel regulatory peptide, named hNLP, was isolated from the hemofiltrate of patients with end stage renal disease. hNLP has a relative molecular mass of 3762 dalton and consists of 34 amino acids including four cysteines linked to disulfide bonds. A search for homology which was performed in the Swiss-Prot, PIR, EMBL and gene bank data bases showed that the sequence is new and does not belong to an already known peptide family. Additionally two other molecular forms of the hNLP circulate in the blood which is the transport medium of many peptide hormones. A fragment of the hNLP was even detected in the urine of healthy probands, probably the peptide is excreted by the kidney. By sequencing of homolog EST-clones and application of the RACE technique the complete sequence of the human and murine cDNA was determined. The human cDNA revealed that the isolated peptides represent C-terminal fragments of a 77-amino acid long precursor. The N-terminal region of the precursor possesses characteristics of a signal peptide. Several mono and dibasic regions indicate the processing of the precursor by prohormone-convertases such as subtilisins. The comparison of the human and the murine NLP showed a sequence identity of 84,4 %. The high sequence conservation refers to an essential function of the discovered peptide in the human organism. The expression of the hNLP gene was studied in several tissues by Northern analysis. Positive bands of the expected size were obtained with RNA extracted from liver, kidney and small intestine. This tissue specific expression is another hint for the regulatory role of the hNLP.

keywords: hemofiltrate, peptide trapping, regulatory peptides

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Integration und Kommunikation in lebenden Systemen | 1 |
| 1.2 | Synthese, Prozessierung und Sekretion von regulatorischen Peptiden..... | 2 |
| 1.3 | Liganden-Rezeptor-Interaktion und Signaltransduktion | 4 |
| 1.4 | Isolierung von biologisch aktiven Peptiden..... | 5 |
| 1.5 | Hämofiltrat als Quelle biologisch aktiver Peptide..... | 7 |
| 1.6 | Peptide-Trapping | 9 |
| 1.7 | Zielsetzung | 10 |
| 2 | Material..... | 11 |
| 2.1 | Chemikalien und Verbrauchsmaterialien..... | 11 |
| 2.2 | Enzyme..... | 12 |
| 2.3 | Kits..... | 12 |
| 2.4 | Vektoren..... | 12 |
| 2.5 | Mikroorganismen..... | 13 |
| 2.6 | DNA-Größenmarker..... | 13 |
| 2.7 | Oligonukleotide | 13 |
| 3 | Methoden..... | 15 |
| 3.1 | Gewinnung des Hämofiltrates (HF)..... | 15 |
| 3.2 | Peptidextraktion aus Hämofiltrat | 15 |
| 3.2.1 | HF-Batchextraktion | 15 |
| 3.2.2 | pH-Stufenelution | 16 |
| 3.2.3 | Präparative Reverse-Phase-Chromatographie | 16 |
| 3.2.4 | Semi-Präparative Kationenaustauscher-Chromatographie | 17 |
| 3.2.5 | Analytische Reverse-Phase-Chromatographie | 17 |
| 3.2.6 | Analytische Kationenaustauscher-Chromatographie | 18 |
| 3.3 | Peptidanalytik..... | 18 |
| 3.3.1 | Massenspektrometrie (MS)..... | 18 |
| 3.3.2 | Sequenzierung | 19 |
| 3.3.3 | Kapillarzonelektrophorese (CZE)..... | 19 |
| 3.3.4 | Aminosäureanalyse (ASA)..... | 20 |
| 3.3.5 | Ellman-Test..... | 21 |
| 3.3.6 | Proteaseverdau | 21 |
| 3.4 | Peptidsynthese..... | 21 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.4.1 | Synthese des linearen Peptids [Cys(Trt)16,27, Cys(Acm)22,32] NLP(38-77) | 21 |
| 3.4.2 | Selektive Einführung der Disulfidbrücken | 22 |
| 3.5 | Datenbankrecherche | 23 |
| 3.6 | Molekularbiologische Standardmethoden | 24 |
| 3.6.1 | Sterilisation von Lösungen und Materialien | 24 |
| 3.6.2 | Kultivierung von E.coli Stämmen und Klonen | 24 |
| 3.6.3 | Präparation von Plasmid DNA | 24 |
| 3.6.4 | Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen | 25 |
| 3.6.5 | Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen | 26 |
| 3.6.6 | Agarosegelelektrophorese von DNA | 26 |
| 3.6.7 | Phenolextraktion | 27 |
| 3.6.8 | Ethanol-fällung | 28 |
| 3.6.9 | PEG-Fällung | 28 |
| 3.6.10 | Aufreinigung von Oligonukleotiden | 28 |
| 3.7 | Klonierung von DNA-Fragmenten | 29 |
| 3.7.1 | Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA | 30 |
| 3.7.2 | Ligation | 30 |
| 3.7.3 | Herstellung transformationskompetenter E.coli Zellen | 31 |
| 3.7.4 | Transformation | 31 |
| 3.8 | Northern Blot | 32 |
| 3.8.1 | RNA-Extraktion | 33 |
| 3.8.2 | Formaldehyd Agarosegelelektrophorese von RNA | 33 |
| 3.8.3 | Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Blotten) | 34 |
| 3.8.4 | Herstellung von Gensonden | 35 |
| 3.8.5 | Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten | 35 |
| 3.8.6 | Reinigung radioaktiv markierter DNA | 35 |
| 3.8.7 | Aktivitätsmessung | 36 |
| 3.8.8 | Hybridisierung | 36 |
| 3.8.9 | Autoradiographie | 37 |
| 3.9 | Southern Blot | 37 |
| 3.10 | Sequenzierung | 38 |
| 3.10.1 | Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs | 39 |
| 3.10.2 | Denaturierende Polyacrylamid-Sequenziergele | 39 |
| 3.10.3 | Elektrophoresebedingungen | 40 |
| 3.11 | Genbank-Screening | 41 |
| 3.11.1 | Herstellung der murinen Cosmidbank | 41 |
| 3.11.2 | Organisation der Cosmidbank | 41 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.11.3 | Kolonie-Screening..... | 42 |
| 3.11.4 | Präparation der Cosmid-DNA | 42 |
| 3.12 | Polymerasekettenreaktion (PCR) | 42 |
| 3.12.1 | Kolonie-PCR..... | 44 |
| 3.12.2 | Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)..... | 45 |
| 3.12.3 | RACE-PCR | 46 |
| 3.13 | Genome Walking..... | 47 |
| 3.14 | Radiation Hybrid Mapping..... | 48 |
| 4 | Ergebnisse..... | 49 |
| 4.1 | Peptide Trapping | 49 |
| 4.1.1 | Isolierung und Strukturaufklärung von hNLP..... | 50 |
| 4.1.2 | Kapillarzonenelektrophorese | 53 |
| 4.1.3 | Massenspektrometrie | 53 |
| 4.1.4 | Analyse der Primärstruktur und der Kettenkonformation (Disulfidbrücken)..... | 54 |
| 4.1.5 | Datenbankrecherche | 56 |
| 4.1.6 | Isolierung weiterer Molekülformen des NLPs..... | 58 |
| 4.2 | Sequenzierung der humanen und der murinen NLP cDNA..... | 58 |
| 4.2.1 | Humane cDNA..... | 58 |
| 4.2.2 | Murine cDNA..... | 60 |
| 4.2.3 | 5'-RACE der humanen cDNA des NLPs | 60 |
| 4.3 | Gewebeverteilung des NLPs..... | 62 |
| 4.3.1 | RT-PCR Analyse | 62 |
| 4.3.2 | Northern Blot | 63 |
| 4.4 | Klonierung und Sequenzierung des humanen NLP Gens..... | 65 |
| 4.4.1 | Sequenzierung der Promotorregion..... | 68 |
| 4.4.2 | Nukleotidsequenz des humanen NLP Gens..... | 68 |
| 4.4.3 | Sequenzanalyse der Promotorregion des hNLP Gens..... | 70 |
| 4.5 | Chromosomale Lokalisation des hNLP Gens..... | 71 |
| 4.6 | Screening einer murinen Genbank nach dem homologen NLP Gen..... | 74 |
| 4.6.1 | PCR-Screening..... | 74 |
| 4.6.2 | Kolonie-Screening..... | 75 |
| 4.6.3 | Restriktionskartierung des Cosmidclons 127-2..... | 76 |
| 4.6.4 | Subklonieren des mNLP Gens..... | 78 |
| 4.6.5 | Nukleotidsequenz des murinen NLP Gens | 78 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 5 | Diskussion | 80 |
| 5.1 | Isolierung des hNLPs aus Hämofiltrat | 80 |
| 5.2 | hNLP, ein cyclisches Peptid..... | 81 |
| 5.3 | Sequenzanalyse der cDNA des hNLP..... | 82 |
| 5.3 | Prozessierung des NLPs | 82 |
| 5.4 | Vergleich der Primärstrukturen des humanen und des murinen NLPs..... | 85 |
| 5.5 | Expressionsmuster des humanen und des murinen NLPs..... | 86 |
| 5.6 | Sequenzanalyse des humanen NLP Gens | 87 |
| 5.7 | Chromosomale Lokalisation des hNLP Gens..... | 89 |
| 5.8 | Knock-out Maus | 91 |
| 5.9 | Biologische Relevanz von hNLP..... | 93 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 95 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... | 97 |
| 8. | Abkürzungen | 106 |

1 Einleitung

1.1 Integration und Kommunikation in lebenden Systemen

Die kaum zu überschauende Vielfalt von gleichzeitig oder in gesetzmäßiger Folge und Abhängigkeit ablaufenden Vorgänge in lebenden Organismen "zeigt eine bewundernswerte Regelmäßigkeit und Ordnung, die in der unbelebten Materie nicht ihresgleichen findet" (Schrödinger, 1944).

Im menschlichen und tierischen Organismus sind zwei Kommunikationssysteme, das phylogenetisch ältere endokrine System und das phylogenetisch jüngere Nervensystem, für die Koordination verantwortlich. Ersteres besteht aus spezialisierten Zellen, den endokrinen Zellen, die chemische Signalstoffe bilden und ins Kreislaufsystem abgeben. Diese Hormone werden mit dem Blutstrom in alle Teile des Körpers transportiert, steuern aber nur in bestimmten, jeweils auf sie abgestimmten Zielorganen bzw. -geweben (Targetstrukturen) Stoffwechselforgänge, kinetische oder morphogenetische Prozesse oder beeinflussen das Verhalten. Erfolgt die Bildung der Hormone in besonderen innersekretorischen Drüsen, handelt es sich um glanduläre Hormone, die von den aglandulären Hormonen (Gewebehormonen) unterschieden werden. Neurohormone werden im Perikaryon von Nervenzellen gebildet, im Axon transportiert und häufig in sekretorischen Vesikeln gespeichert. Bei Bedarf werden sie im Bereich eines Neurohämalorgans an das Blut abgegeben. Die Freisetzung der Neurosekrete kann durch chemische oder elektrische Reizung der Nervenzelle geschehen. Anhand der Neurosekretorischen Zellen wird die enge Wechselwirkung zwischen dem Hormonsystem und dem Nervensystem deutlich.

Das phylogenetische jüngere Nervensystem setzt sich aus Neuronen zusammen, die über ihre Axone miteinander in Kontakt stehen. Die Signalübertragung erfolgt hier über elektrische Impulse und Neurotransmitter, wobei letztere durch den synaptischen Spalt zur Empfängerzelle diffundieren und dort eine Änderung des Membranpotentials hervorrufen.

Nerven- und Hormonsysteme unterscheiden sich jedoch in der Art der Informationsübertragung. Das neuronale Kontrollsystem kommt mit wenigen und relativ unspezifischen Transmittersubstanzen aus, da die Anatomie der Nervenschaltungen die Spezifität gewährleistet. Die Hormone nutzen einen gemeinsamen Transportweg - nämlich das Kreislaufsystem - und wirken auf ihre Zielzellen ein; die Spezifität der Information wird in der chemischen Natur des Signals verschlüsselt.

Neben dieser klassischen Hormondefinition treten andere Hormone nicht in die Blutbahn ein, sondern wirken nur lokal über die interstitielle Flüssigkeit auf die eigene oder auf benachbarte Zellen (auto- bzw. parakriner Mechanismus).

Die Hormone gehören den unterschiedlichsten Stoffklassen an. Zu ihnen zählen die Steroide (Sexualhormone, Mineralocorticoide, Glucocorticoide u.a.), biogene Amine und Aminosäurederivate (Thyroxin, Adrenalin, Melatonin u.a.) sowie Peptide und Proteine (Insulin, Glucagon, Sekretin, Gastrin u.a.) (Karlson, 1982). Die zahlenmäßig größte Gruppe stellen die Peptide und Proteine dar. So handelt es sich bei den Hormonen des Gastrointestinaltraktes und des Hypothalamus-Hypophysen-Systems ausschließlich um Peptide und Proteine. Auch bei der interzellulären Kommunikation im hämatopoetischen System und im Immunsystem spielen Peptide und Proteine als Cytokine eine zentrale Rolle. Unter dem Oberbegriff Cytokine fassen Hopkins und Rothwell (1995) folgende Peptid- bzw. Proteinfamilien zusammen: Interleukine, Chemokine, Tumornekrose-Faktoren, Interferone, Koloniestimulierende Faktoren, Wachstumsfaktoren, Neurotrophine und Neuropoietine.

1.2 Synthese, Prozessierung und Sekretion von regulatorischen Peptiden

Die Biosynthese der regulatorischen Peptide verläuft nach den Prinzipien der Proteinbiosynthese über die Aktivierung ihrer Gene. Dabei wird zunächst durch die Transkription der DNA ein Primärtranskript gebildet, das dann durch Capping, Polyadenylierung und Splicing in eine reife mRNA überführt wird. Nach der Ausschleusung der mRNAs aus dem Zellkern in das Cytoplasma werden sie an den Ribosomen des rauhen Endoplasmatischen Retikulums (rER) in eine Folge von Aminosäuren translatiert. Die sekretorischen Peptide weisen an ihrem N-terminus ein Signalpeptid auf, das durch Wechselwirkung mit einem Signal Recognition Particle (SRP) und einem SRP-Rezeptor (Docking-Protein) die Anlagerung der Ribosomen am endoplasmatischen Retikulum bewirkt. Das lipophile Signalpeptid dringt in die Membran ein und wird im Lumen des ER proteolytisch abgespalten. Danach erfolgt die Translokation der wachsenden Peptidkette durch die ER-Membran (vektorielle Translation). Das Signalpeptid eines Präproteins fungiert somit als topogenes Signal in der Zelle (Blobel, 1980; Walter et al., 1984).

Sekretorische Peptide und Proteine werden in der Regel im rauhen Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat cotranslational oder posttranslational modifiziert, bevor sie in sekretorische Vesikel verpackt und durch Exocytose aus der Zelle ausgeschleust

werden. Zu den häufigsten posttranslationalen Modifikationen gehören die Disulfidbrücken-Bildung, die Ausbildung der Tertiärstruktur, die proteolytische Spaltung und die enzymatische Modifizierung von Aminosäureresten (Wold, 1981). Beispiele für die kovalente Modifikation einzelner Aminosäurereste in einer Polypeptidkette sind die Glykosylierung, die N-terminale Acetylierung, die C-terminale Amidierung sowie die Sulfatierung von Tyrosinresten (Baeuerle und Huttner, 1987).

Die Ausbildung der Oligosaccharidketten wird z.T. bereits während der vektorialen Translation im Lumen des rER begonnen und im Golgi-Apparat vollendet (N-Glykosylierung) oder findet ausschließlich im Golgi-Apparat statt (O-Glykosylierung). Die N-glykosidischen Ketten sind an Asparaginreste des Sequenzmotivs Asn-X-Thr/Ser gebunden. Nicht jedes Glykosylierungsmotiv wird jedoch glykosyliert (Hirschberg und Snider, 1987). Für die O-Glykosylierung ist kein Sequenzmotiv erforderlich, sie kann an Serin- und Threoninresten der Polypeptidkette erfolgen. Bei einigen Hormonen, wie z.B. dem Thyrotropin und dem Choriongonadotropin beeinflusst die Glykosylierung deren Affinität zu ihrem Rezeptor (Kobata, 1992).

Die posttranslationalen Modifikationen sind oft für die biologische Aktivität der Peptide von entscheidender Bedeutung. Für Gastrin (Rehfeld, 1981) und Substance P (Escher et al., 1982) ist bekannt, daß nur die Moleküle mit einem C-terminalen Amid biologisch aktiv sind. Beim β -Endorphin handelt es sich nur bei der acetylierten Form um das biologisch aktive Peptid (Glembotski, 1982). Von Gastrin und Cholecystokinin sind mehrere Varianten vorhanden, die sich in ihrer Kettenlänge und im Sulfatierungsmuster unterscheiden. Diese strukturellen Unterschiede wirken sich auch auf die biologische Aktivität der Peptide aus (Mutt, 1982).

Die Bindung eines Hormons an seinen Rezeptor ist durch eine hohe Spezifität und eine große Affinität gekennzeichnet. Die dreidimensionale Struktur ist ein wesentlicher Faktor bei dieser Liganden-Rezeptor-Interaktion. Disulfidbrücken, die zwischen Cysteinresten durch die Protein-Disulfid-Isomerase im ER-Lumen gebildet werden, tragen maßgeblich zur Ausbildung und Stabilisierung bestimmter Peptid- und Proteinkonformationen bei (Freedman, 1989). Bei Peptiden und Proteinen mit mehreren Cysteinen sind zahlreiche Kombinationen der Disulfidbrücken-Anordnung möglich. Dennoch wird in vivo nur eine der vielen Möglichkeiten realisiert. Da eine Vorhersage aus der Aminosäuresequenz nicht möglich ist, muß die Anordnung der Disulfidbrücken experimentell bestimmt werden.

1.3 Liganden-Rezeptor-Interaktion und Signaltransduktion

Regulatorische Peptide entfalten ihre Wirkung indirekt auf die Zielzelle, indem sie nach Bindung an Rezeptoren der Zellmembran die Synthese eines intrazellulären second messengers induzieren, der dann seinerseits erst den physiologischen Effekt bewirkt. Die Rezeptoren für die regulatorischen Peptide sind in der Regel integrale Membranproteine. Ihre extrazelluläre Domäne bildet den Hauptanteil des Membranproteins. Sie enthält die Ligandenbindungsstelle und trägt Oligosaccharidgruppen. Die Transmembrandomäne tritt entweder als einfache α -Helix auf oder sie kommt in mehrfachen, zusammengelagerten Helices vor. Homologien zwischen Rezeptoren sind in diesem Bereich besonders ausgeprägt, z.B. sind die G-Protein gekoppelten Rezeptoren durch sieben Transmembranhelices gekennzeichnet (Dohlmann et al., 1987). Die intrazelluläre Domäne ist für die Signaltransduktion besonders wichtig. Hier besitzen manche Rezeptoren eine Tyrosin-Kinase- oder eine Guanylatcyclase-Aktivität (Ullrich und Schlessinger, 1989; Garbers, 1989). Andere Rezeptoren leiten mittels ihrer intrazellulären Domäne das Hormonsignal über zwischengeschaltete Elemente, sogenannte G-Proteine (GTP-bindende Proteine), in die Zelle weiter (Gilman, 1987; Rodbell, 1992). G-Proteine wiederum können, je nach Zelltyp eine Reihe von membrangebundenen Enzymen modulieren. Zu diesen Enzymen gehören die Adenylatcyclase, die Phospholipase C und die Phospholipase A₂.

Da die Bindung eines Peptidliganden an seinen spezifischen Rezeptor die Bildung von vielen second messenger Molekülen auslöst, ist die Signaltransduktion mit einer enormen Verstärkung des Signals verbunden. Man kennt bisher drei second messenger Systeme:

1. Zyklische Nukleotide, wie cAMP und cGMP, die von der membranständigen Adenylatcyclase bzw. einer Guanylatcyclase gebildet werden. Das bei der Aktivierung der Adenylatcyclase aus ATP gebildete cAMP bindet an eine cAMP-abhängige lösliche Protein-Kinase, die - auf diese Weise aktiviert - zahlreiche zelluläre Proteine phosphoryliert und dadurch in ihren Aktivitäten beeinflusst (Taylor, 1989). Ein Kaskadenmechanismus setzt ein, der durch eine Phosphodiesterase, die cAMP in inaktives AMP umwandelt, und natürlich auch durch entsprechende Phosphatasen unterbrochen werden kann.

2. Auch Calcium-Ionen zählen zu den second messenger Molekülen. Zahlreiche enzymatische und andere Vorgänge in der Zelle werden durch Ca²⁺ beeinflusst. Dabei wirkt dieses Ion in der Regel nicht direkt, sondern in Kombination mit besonderen Ca²⁺ bindenden Proteinen. Das bekannteste dieser Proteine ist das ubiquitäre Calmodulin.

3. Die beiden sekundären Boten Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) (Berridge, 1987) entstehen aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül, dem Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat. Dieses nur in sehr geringer Konzentration vorkommende Phospholipid der Plasmamembran wird durch die Phospholipase C hydrolytisch gespalten. IP₃ ist wasserlöslich und kann so ungehindert in das Cytoplasma diffundieren. Dort löst es die Freisetzung von Ca²⁺ aus, das im Endoplasmatischen Retikulum gespeichert ist.

Diacylglycerol bleibt als Lipid in der Plasmamembran und aktiviert die Protein-Kinase C, die auch noch Ca²⁺ und Phospholipide für ihre Aktivierung benötigt. Vertreter dieser Enzymfamilie üben in der Zelle viele regulatorische Funktionen aus, z.B. aktivieren sie den Na⁺/H⁺-Translokator (Kikkawa und Nishizuka, 1986). Das besondere an dieser Phosphoinositol-Lipid-Kaskade ist, daß gleichzeitig zwei second messenger entstehen, die verschiedene Wirkungsbereiche haben und zusätzlich mit einem dritten second messenger System, dem des Calciums, verknüpft sind.

1.4 Isolierung von biologisch aktiven Peptiden

Mit dem Fortschritt des Humanen Genom Projektes stellt sich die Frage, inwieweit die Peptidisolierung noch sinnvoll ist, da nach Aufklärung der Gensequenzen die entsprechenden Peptidsequenzen deduktiv abgeleitet werden können. Der nächste Schritt wäre dann anhand der Sequenzinformation die entsprechenden bioaktiven Peptide zu synthetisieren. Trotz dieser potentiellen Möglichkeit gibt es doch verschiedene Gründe für die Notwendigkeit der Weiterführung von Peptidisolierungen. Nicht alle biologisch aktiven Peptide werden ribosomal synthetisiert und bei den primären Biosyntheseprodukten erfolgt in vielen Fällen ein nachgeschaltetes, posttranslationales Processing, so daß aus der Gensequenz nur unvollständige Informationen über die tatsächliche Sequenz und Struktur abgeleitet werden können (Mutt, 1983 und 1993).

Der sprunghafte Anstieg der Anzahl neuer regulatorischer Peptide ging mit der Entwicklung chromatographischer Trenntechniken und schnellerer und empfindlicherer Analyseverfahren zur Strukturaufklärung einher, wie z.B. der schrittweisen, N-terminalen Peptidsequenzierung (Edman, 1956; Hewick, 1981) und der automatisierten Aminosäureanalyse (Spackman et al., 1958, Hendrickson et al., 1984). Es konnten zunehmend Peptide isoliert werden, die in weitaus geringerem Maße im Organismus gebildet werden. Ein Überblick über die veröffentlichten Peptidsequenzen bioaktiver Peptide bis 1988 wird in Abbildung 1.1 gezeigt (Sundler & Håkanson 1988).

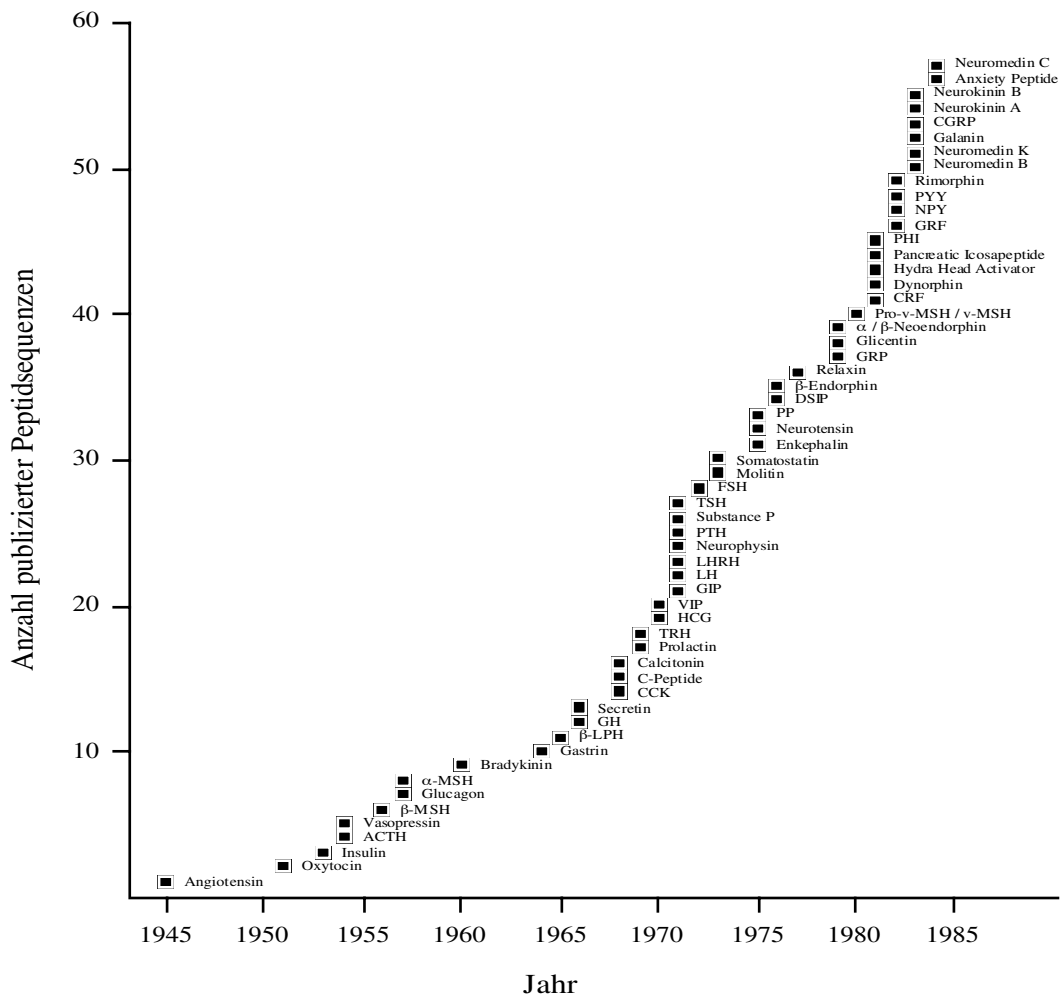


Abb. 1.1 Veröffentlichte Sequenzen biologisch aktiver Peptide bis 1988 im Überblick (Sundler & Håkanson 1988).

Der klassische physiologische Ansatz zur Isolierung von Peptiden ist der Nachweis einer biologischen Aktivität und die Verfolgung dieser bis zur Endaufreinigung und der Strukturaufklärung der dafür verantwortlichen Substanz. Als Assaysysteme werden neben in vivo-Experimenten und isolierten Organen und Geweben in letzter Zeit vermehrt zelluläre Assaysysteme verwendet. Zur gezielten Isolierung von Peptiden mit identischen und ähnlichen Strukturmerkmalen können immunologische Techniken wie ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) und RIA (Radioimmunoassay) eingesetzt werden. Durch kreuzreagierende Antikörper können dabei Peptide einer Familie identifiziert werden. Posttranslationale Modifikationen können chemisch detektiert und zum Screening bestimmter Stoffeigenschaften bei der Isolierung herangezogen werden. Zum Beispiel wurden bei der Suche nach C-terminal amidierten Peptiden NPY, PHI und

PYY isoliert und als hormonale Substanzen charakterisiert (Tatemoto und Mutt 1980, Tatemoto et al. 1982, Tatemoto 1982).

1.5 Hämofiltrat als Quelle biologisch aktiver Peptide

Die Isolierung und Analyse von humanen, biologisch aktiven Peptiden ist nicht nur von Bedeutung für die medizinische Grundlagen-Forschung, sondern auch für die Diagnostik und Therapie menschlicher Erkrankungen. Die zunehmende Kenntnis der vielfältigen Wirkungen bioaktiver Peptide führte zu einem verstärkten pharmakologisch-medizinischen Interesse an dieser Naturstoff-Klasse. In steigendem Maße versucht man, diese endogenen Substanzen als potentielle körpereigene Wirkstoffe zur Normalisierung oder Beeinflussung krankhaft veränderter biochemischer Mechanismen zu gewinnen und gezielt einzusetzen. Von der pharmazeutischen Industrie werden enorme Mengen an Peptiden und Proteinen zum therapeutischen Einsatz hergestellt. Dazu zählen z.B. Erythropoietin zur Behandlung (renal)er Anämien, Faktor VIII zur Therapie der Hämophilie A, das Wachstumshormon Somatotropin zur Behandlung des Zwergwuchses und Interferon- β zur Therapie von Multipler Sklerose.

Zirkulierende Peptide werden entweder direkt in den Blutstrom sezerniert oder diffundieren vom interstitiellen in den intravaskulären Raum. Im Plasma werden in der Regel Spuren aller regulatorischen Peptide gefunden. Für die Isolierung und Charakterisierung systemisch agierender regulatorischer Peptide stellt es damit die umfassendste Quelle dar (Forssmann et al. 1993). Bekannte Peptidhormone kommen im Plasma im mittleren bis unteren picomolaren Bereich vor und besitzen relativ niedrige Molekulargewichte (Kramer et al. 1978, Schepky et al. 1994).

Für die Aufklärung der Primärstruktur eines Peptides werden ca. 50 bis 100 pmol der aufgereinigten Substanz benötigt. Wegen der geringen Plasmakonzentrationen der regulatorischen Peptide, wären für eine Aufarbeitung mehrere 1000 l Plasma erforderlich. Eine weitere Schwierigkeit bei der Verwendung von Plasma als Ausgangsmaterial ergibt sich aus dem ungünstigen Verhältnis zwischen der Gesamtproteinkonzentration und der Konzentration der zirkulierenden Peptide. Es beträgt zum Beispiel $1:10^9$ für Gastrin, einem Peptidhormon mit einer relativen Molekülmasse $M_r = 2115$ und einer mittleren Plasmakonzentration von $c = 30$ pmol/l gegenüber der Proteinkonzentration von 70-80 g/l im Plasma (Andersson et al., 1979). Da Blutplasma vordringlich für die medizinische Versorgung gebraucht wird, mußte eine alternative Peptidquelle gefunden werden.

Als alternative Quelle zur Isolierung humaner, regulatorischer Peptide wird am Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung GmbH (IPF) das Hämofiltrat benutzt, das bei der Blutwäsche niereninsuffizienter Patienten durch arteriovenöse Blutfiltration in großen Mengen anfällt. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, das als weiterentwickelte Methode neben der Hämodialyse 1977 von Quellhorst in die Therapie eingeführt wurde (Quellhorst et al. 1977). Zur Entfernung der harnpflichtigen Stoffe der niereninsuffizienten Patienten werden dabei hauptsächlich Membranfilter mit einer Ausschlußgröße von 20 kDa eingesetzt.

Das Hämofiltrat enthält in der Regel die niedermolekularen Bestandteile des Plasmas bis zu einer relativen Molekülmasse von 10 kDa in vergleichbaren Konzentrationen (Matthaei et al. 1977, Schepky et al. 1994).

Tabelle 1.2 Konzentrationen einiger Peptidhormone im menschlichen Plasma und im Hämofiltrat (Schepky et al. 1994).

| Peptidhormone | MW (Dalton) | Konz. im Plasma (pmol/l) | Konz. in HF (pmol/l) |
|----------------|----------------|-----------------------------|-------------------------|
| Insulin | 5400 | 93 - 185 | 179 |
| Endothelin | 2492 | 2,3 ± 3,0 | 2,7 |
| Gastrin | 2115 | 12 - 53 | 86,5 |
| Vasopressin | 1084 | 1,9 ± 1,3 | 3,8 |
| Angiotensin II | 1046 | 0 - 14 | 38 |

Ein Peptid/Proteinextrakt aus 50 µl Plasma und 50 ml Hämofiltrat wurden für einen qualitativen Vergleich einer Größenausschlußchromatographie unterworfen (Abb. 1-4.). Nur etwa 0,07 % der Plasmaproteine werden bei der Hämofiltration filtriert. Hämofiltrat stellt eine fast proteinfreie Quelle für die Isolierung zirkulierender biologisch aktiver Peptide dar (Schepky et al. 1994).

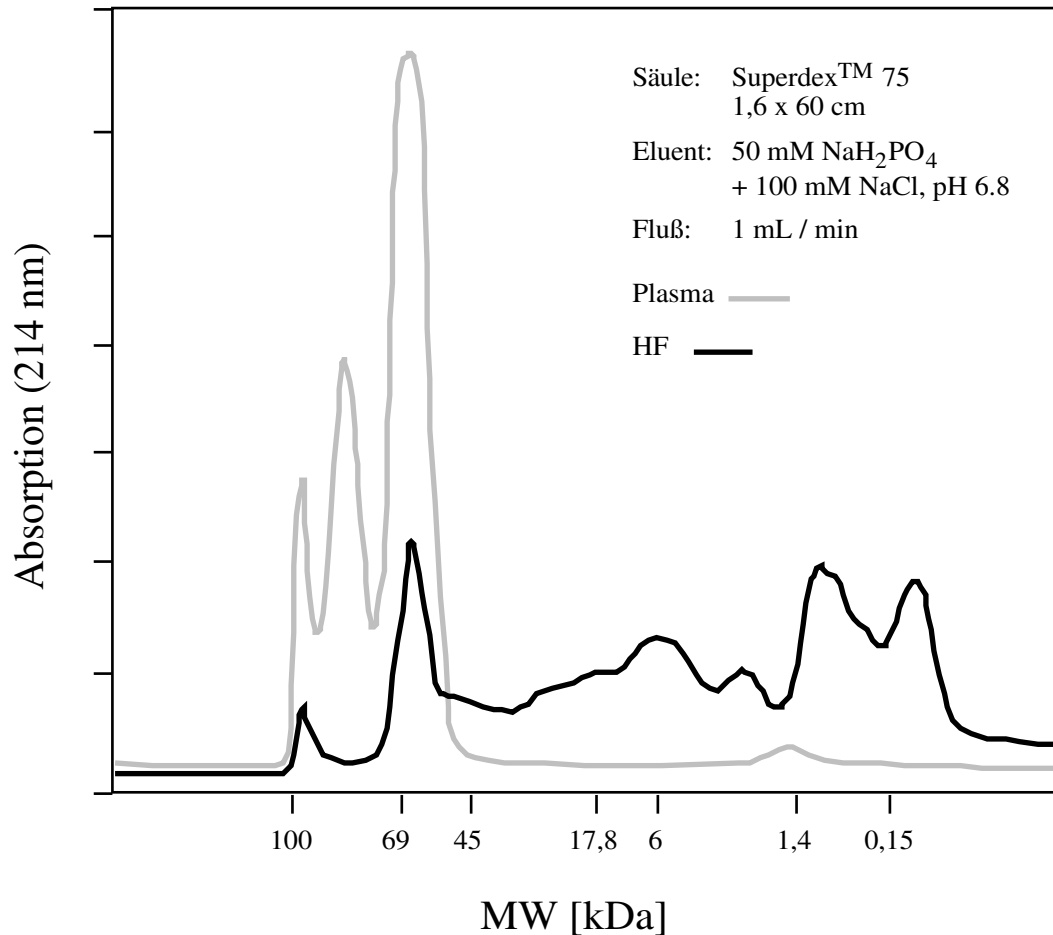


Abb. 1.4. Größenausschlußchromatographie von Peptid/Proteinextrakten aus 50 ml HF und 50 µl Plasma (Schepky et al. 1994).

1.6 Peptide Trapping

Nach einem standardisiertem Verfahren werden die Peptide aus dem Hämofiltrat durch Kationenaustauschchromatographie extrahiert und anschließend durch eine pH-Stufenelution nach ihrem Ladungsmuster in sieben Pools unterteilt. Danach erfolgt eine Auftrennung der Peptide entsprechend ihrer Hydrophobizität durch Reverse Phase Chromatographie in ca. 300 Fraktionen. Mit dieser Subfraktionierung ist zugleich eine starke Anreicherung der Peptide verbunden. Diese reproduzierbar hergestellte Peptidbank stellt die Grundlage des Peptide Trapping dar (Schulz-Knappe et al., 1996a). Beim Peptide Trapping werden die zirkulierenden, humanen Peptide anhand ihrer Masse und ihres Elutionsverhaltens kartiert. Zu diesem Zweck werden die Fraktionen der Peptidbank mit den modernen Methoden der Massenspektrometrie (LC-ESI-MS und MALDI-MS) analysiert. Dadurch werden alle Peptide einer Fraktion bis in den

pikomolaren Bereich erfaßt. Einzelne Peptide werden chromatographisch aufgereinigt und durch Edman-Abbau sequenziert. Zur Identifikation des isolierten Peptides wird eine Datenbankrecherche bereits durchgeführt, nachdem die ersten N-terminalen Aminosäuren bestimmt wurden. Zeigt der Abgleich der erhaltenen Sequenz mit den zur Verfügung stehenden Datenbanken, daß es sich um ein neues Peptid handelt, wird die vollständige Primärstruktur aufgeklärt. Bisher wurden mit diesem Verfahren etwa 300 Peptide des menschlichen Blutes isoliert und identifiziert (Schulz-Knappe et al., 1996b). Darunter befinden sich erwartungsgemäß sehr viele bekannte Peptide oder Fragmente von Plasmaproteinen. Es wurden aber auch einige neue Peptide entdeckt, deren Sequenz in keiner Datenbank vorhanden war. Es handelt sich also beim Peptide Trapping um eine sehr effiziente Strategie zur Isolierung neuer humaner Peptide, die sehr stark von den technologischen Fortschritten auf den Gebieten der Massenspektrometrie und der Chromatographie profitiert.

1.7 Zielsetzung

Die Aufgabe der Abteilung Präparative Peptid-Chemie am Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung ist die Extraktion und Charakterisierung von Peptiden aus humanem Hämofiltrat zur Erstellung einer Peptidbank. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Isolierung eines neuen Peptides aus dem pH-Pool 6 des Hämofiltrats. Dazu wurden mehrere Peptide aus dem pH-Pool 6 des Hämofiltrats anhand des Peptide Trappings aufgereinigt, ansequenziert und ihre Identität durch Datenbankvergleiche festgestellt. Zur Analyse eines dabei entdeckten neuen Peptides sollten proteinchemische und molekularbiologische Methoden angewendet werden.

2 Material

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die Chemikalien für die Aminosäureanalyse wurden von der Firma Hewlett Packard (Waldbronn) erworben. Alle anderen Chemikalien wurden, wenn nicht anders beschrieben, von der Firma Merck in p.a. Qualität, die HPLC-Lösungen in gradient-grade Qualität bezogen.

| Chemikalien / Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| Acrylamid | Sigma / Deisenhofen |
| Adenosin 5'Triphosphat (ATP) | Boehringer / Mannheim |
| Agar | Sigma / Deisenhofen |
| Agarose, Medium EEO Typ II | Applichem / Darmstadt |
| Amberlite | Sigma / Deisenhofen |
| Ammoniumperoxodisulfat | Sigma / Deisenhofen |
| Ampicillin | Sigma / Deisenhofen |
| β-Mercaptoethanol | Applichem / Darmstadt |
| Bisacrylamid | Sigma / Deisenhofen |
| Borsäure | Sigma / Deisenhofen |
| 5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl--D-Galactosid | Biomol / Hamburg |
| Bromphenolblau | Merck / Darmstadt |
| Casein-Hydrolysat, enzymatisch | Sigma / Deisenhofen |
| Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphate | Pharmacia / Freiburg |
| Dextransulfat, MG 500.000 | Sigma / Deisenhofen |
| DTT | Merck / Darmstadt |
| (³² P)-dNTPs | Hartmann / Braunschweig |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Applichem / Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Applichem / Darmstadt |
| Glycerin | Sigma / Deisenhofen |
| Harnstoff | Sigma / Deisenhofen |
| Hefe-Extrakt | Sigma / Deisenhofen |
| Filterpapier | Schleicher u. Schuell / Hannover |
| Formamid | Merck /Darmstadt |
| NuSieve GTG Agarose | Biozym / Hameln |
| Nylonmembran Hybond N+ | Amersham / Braunschweig |
| OPC-Säulen | Applied Biosystems / Weiterstadt |
| PBS-Puffer Konzentrat | Gibco BRL / Eggenstein |
| Penicillin / Streptomycin-Lösung | Gibco BRL / Eggenstein |
| Phenol / Chloroform / Wasser | Applied Biosystems / Weiterstadt |
| Polyethylenglykol 6000 | Merck / Darmstadt |

| | |
|--------------------------------|----------------------------------|
| Push-Columns | Stratagene / Heidelberg |
| RNasin Ribonukleaseinhibitor | Promega / Madison, Wisconsin |
| Röntgenfilme, X-Omat AR5 | Kodak / Frankfurt |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Sigma / Deisenhofen |
| Triethylaminacetat | Applied Biosystems / Weiterstadt |
| Tris-Base | Applichem / Darmstadt |

2.2 Enzyme

| | |
|--|------------------------|
| Alkalische Phosphatase (E.C.3.1.3.1.) | Boehringer / Mannheim |
| Combi Pol DNA Polymerase Mix (E.C.2.7.7.7/E.C.3.6.1.1.) | Invitek / Berlin |
| Proteinase K (EC 3.4.21.14.) | Boehringer / Mannheim |
| RNase A (EC 3.1.27.5) | Boehringer / Mannheim |
| RNase H (EC 3.1.4.34) | Gibco BRL / Eggenstein |
| SuperscriptII TM Reverse Transcriptase (EC 2.7.7.49.) | Gibco BRL / Eggenstein |
| T4-DNA-Ligase (EC 6.5.1.1.) | Gibco BRL / Eggenstein |
| Taq DNA Polymerase (EC 2.7.7.7.) | Biomol / Hamburg |
| Terminale Transferase (EC 2.7.7.31.) | Gibco BRL / Eggenstein |
| Trypsin (sequencing grade) (EC 3.4.21.4) | Boehringer / Mannheim |

Sämtliche Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Gibco BRL (Eggenstein) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen.

2.3 Kits

| | |
|---|--------------------------------|
| pGEM-T Vector System | Promega / Madison |
| Genome Walker TM Kit Human | Clontech / Heidelberg |
| Random Primed DNA Labelling Kit | Boehringer / Mannheim |
| Taq Dye Terminator Cycle Sequencing Kit | Applied Biosystems/Weiterstadt |
| TIP 20 / TIP 100 Plasmid DNA Kit | Qiagen / Hilden |

2.4 Vektoren

| | |
|---------------------------------|-------------------------|
| Plamide | |
| pBSK+ (Alting-Mees et al. 1989) | Stratagene / Heidelberg |

| | |
|--------------------------------|-------------------------|
| pGEM-T Vektor | Promega / Madison US |
| Cosmide | |
| Supercos 1 (Wahl et al., 1987) | Stratagene / Heidelberg |
| 2.5 Mikroorganismen | |

Hefestamm

Saccharomyces cerevisiae AB1380 (Burke et al., 1987):

MAT a, ade2-1, can 1-100, lys2-1, trp1, ura3, his5, Thr-, (y⁺)

Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue (Bullock et al., 1987):

recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, lac [F⁺proAB, lacI^q, lacZΔM15, Tn10(tet^r)]

E. coli XL1-Blue MR:

Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdMR-mrr)173, endA1, supE44, thi, recA1, gyrA96, relA1, lac

E. coli TG 1:

supE44, thi, Δ(lac-proAB), Δ(mcrB-hsdSM)5, (r_k⁻m_k⁻), [F⁺traD36, proAB, lacI^q, lacZΔM15]

2.6 DNA-Größenmarker

Lambda / Hind III (Gibco BRL)

1 kbp ladder (Gibco BRL)

100 bp ladder (Gibco BRL)

pUC18 / Sau 3 A

2.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden aus experimentell ermittelten oder publizierten DNA-Sequenzen abgeleitet und in einem DNA-Synthesizer (ABI 394 DNA/RNA-Synthesizer) nach der Phosphoamidit-Methode synthetisiert oder als Auftragssynthese von der Firma ABI (Weiterstadt) bezogen. Die Aufreinigung erfolgte mit OPC-Säulen (Oligonucleotide Purification Cartridge) der Firma ABI (Weiterstadt).

| Bezeichnung | Sequenz 5'→3' | Gen/Vektor/Kommentar |
|-------------|---------------------------------------|--|
| T3 | AATTAACCCTCACTAAAGGG | pBSK / pGEM-T / pT7T3D Sequenzierprimer |
| T7 | GTAATACGACTCACTATAGGGC | pBSK / pGEM-T / pT7T3D Sequenzierprimer |
| UNIP5 | CCTCAGCTGCAGCTCGAG(T) ₂₄ | Oligo(dT)-Primer |
| UNIP6 | CCTCAGCTGCAGCTCGAG | Ankerprimer zu UNIP-5 |
| β-TUB-1 | TTCCCTGGCCAGCTGAANGCNGACCT NCGCAAG | β-Tubulin universal |
| β-TUB-2 | CATGCCCTCGCCNGTGTACCAGTGNA NGAAGGC | β-Tubulin universal |
| BKL1 | TCTGAGCTCCAATACCAGAAGTGAGT TCG | hNLP RT-PCR, Genomische PCR |
| BKL2 | TCTCGAGGAGCATTGTCGGAGGTGAC | hNLP RT-PCR, 5' RACE |
| BKL3 | TCTGAGCTCCTGGTATGTACATCATT CTG | hNLP 5' RACE |
| BKL4 | TCTGAGCTCAGGAGGCTCCAATAGGC CTGA | hNLP 5' RACE |
| ALPHA1 | TCGGATCCAACATCCTCCCCCTGTCAA GATG | hNLP Genomische PCR |
| PF1 | AGACATTCAGATATGAAAGTGTTGA | hNLP Genome Walking |
| PF2 | CATTCCTCAGGACTGAATCCTAGC | hNLP Genome Walking |
| PF3 | CAACAGGAAGATCATGAGGACTG | hNLP Genome Walking |
| RS1 | TTTGTGCAGTCCTCATGATC | hNLP Exon1 RHM |
| RS2 | CTGCGGAATGGAATGATCAC | hNLP Intron1 RHM |
| RS3 | GTGACAAGGGGACACATGA | hNLP Intron2 RHM |
| RA2 | AAAGGGTAGTTTTTTAAGACCTG | hNLP Intron2 RHM |
| RA3 | AAGGGATTTTCCATGGAGCT | hNLP Intron2 RHM |
| MS2 | GGCTTTCAGACTCCAACATCATT | mNLP Genomische PCR |
| MA2 | AACAAAGACTACTTCACTTATCTAT | mNLP Genomische PCR |
| MS4 | CTTTTGCCAAGATGCTACAGCTA | mNLP Sonde |
| NLP2 | CTGCATAGTCTTGTGATACAC | mNLP Sonde |
| AP-1 | GTAATACGACTCACTATAGGGC | Genome Walking PCR-Kit |
| AP-2 | ACTATAGGGCACGCGTGGT | Genome Walking PCR-Kit |

3 Methoden

3.1 Gewinnung des Hämofiltrates (HF)

Das am IPF zur Isolierung humaner zirkulierender Peptide verwendete Hämofiltrat wird vom Nephrologischen Zentrum Niedersachsen in Hannoversch-Münden bezogen. Das Filtrat fällt bei der Hämofiltration niereninsuffizienter Patienten in großen Mengen an. Die Patienten werden pro Woche dreimal behandelt, wobei jeweils 20 bis 25 Liter Hämofiltrat entstehen. Verwendet werden Filter mit einer spezifischen Ausschlußgröße von 20 kDa (Hemoflow F60 und Hemoflow HF 80 S aus Polysulfon, Fresenius, Hemoflow FH 77 H und Hemoflow FH 88 H aus Polyamid, Gambro). Filtriert wird bei einer Blutflußrate von 250 bis 350 ml/min bei einem Transmembrandruck von 60 bis 100 mm Hg. Das filtrierte Volumen wird durch Elektrolytlösungen ersetzt. Das Hämofiltrat der Patienten wird auf 4°C gekühlt und mit HCl auf pH 3,0 eingestellt, um das Wachstum von Bakterien und Proteolyse zu vermeiden. Pro Woche stehen so dem IPF bis zu 2000 Liter Hämofiltrat zur Verfügung.

3.2 Peptidextraktion aus Hämofiltrat

3.2.1 HF-Batchextraktion

In einem Edeltank werden pro Batchextraktion ca. 800 Liter Hämofiltrat vorgelegt und mit HCl auf pH 2,7 eingestellt. Die verwendete Pilot-Scale-Anlage wird mit einer 5 Liter-Säule, gefüllt mit einem starken Kationenaustauscher (Fractogel SP-650 (M), 25 cm x 10 cm, Merck), betrieben. Beim Auftrag des Hämofiltrats wird dieses mit VE-Wasser verdünnt. Bei einem resultierenden pH von 3,0, einer Leitfähigkeit von 5,5 mS/cm und einem Fluß von 2 l/min werden die Peptide quantitativ gebunden. Der Durchlauf wird verworfen.

Die Säule wird nach Beendigung des Auftrages solange mit VE-Wasser gespült, bis die Leitfähigkeit des Durchlaufes kleiner als 1 mS/cm ist. Eluiert werden die gebundenen Peptide bei einem Fluß von 1 l/min mit 0,5 M Ammoniumacetatlösung. Pro Batchelution werden 5 Liter Eluat gesammelt, die eingefroren und gefriergetrocknet werden. Das Lyophilisat wird bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

3.2.2 pH-Stufenelution

Im Anschluß an die Extraktion werden die Peptide durch eine pH-Stufenelution am Kationenaustauscher Fractogel SP-650 (M), (25 cm x 10 cm, Merck) in sieben Pools unterteilt. Dazu wurde nach dem Auftrag des HF die Säule mit VE-Wasser (pH 2.6, Puffer A) gewaschen und die Peptide anschließend mit sieben verschiedenen Puffern (Puffer B-H) batch-eluiert.

Folgende Puffer mit jeweils steigendem pH-Wert wurden in der aufgeführten Reihenfolge eingesetzt; die jeweilige Elutionspuffermenge entspricht dabei drei Säulenvolumen.

| Puffer | pH-Wert | Leitfähigkeit |
|---|----------|---------------|
| A : VE - Wasser | pH= 2.42 | LF= 0.10 mS |
| B: 0,1 M Citronensäure-1-hydrat | pH= 3.60 | LF= 2.92 mS |
| C: 0,1 M HAc + 0,1 M NaAc | pH= 4.50 | LF= 4.06 mS |
| D: 0,1 M Äpfelsäure | pH= 5.00 | LF= 6.15 mS |
| E: 0,1 M Bernsteinsäure | pH= 5.60 | LF= 6.10 mS |
| F: 0,1 M NaH ₂ PO ₄ | pH= 6.60 | LF= 4.87 mS |
| G: 0,1 M Na ₂ HPO ₄ | pH= 7.40 | LF= 6.73 mS |
| H : 0,1 M Ammoniumcarbonat | pH= 9.00 | LF= 6.65 mS |

Im Anschluß an diese Stufenelution erfolgt der Auftrag der einzelnen pH-Pools auf präparative RP-Medien mit anschließender Fraktionierung.

3.2.3 Präparative Reverse-Phase-Chromatographie

Zur Trennung der komplexen, peptidhaltigen Gemische werden diese vor dem Auftrag mit HCl auf pH 3,0 eingestellt bzw. mit Puffer A (10 mM HCl) verdünnt. Unlösliche Bestandteile werden durch Filtration abgetrennt (Minisart NML 0,45 µm, Sartorius, Göttingen). Nach dem Auftrag der Probe wird die Säule mit Puffer A gespült und die gebundenen Peptide mit Puffer B (80 % (v/v) Acetonitril, 10 mM HCl) im Gradienten eluiert.

Durchgeführt werden die präparativen Chromatographien mit der BioCAD 250 Workstation (PerSeptive Biosystems GmbH, Wiesbaden). Aufgezeichnet werden die

Absorptionen bei den Wellenlängen 214 und 280 nm. Es wurde eine Fineline Säule mit Source 15RPC Material der Dimension 15-20 μm , 300 \AA , 10 cm x 30 cm (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Bei einem Fluß von 150 ml/min werden 200 ml-Fraktionen gesammelt. Die einzelnen Fraktionen werden eingefroren und gefriergetrocknet.

3.2.4 Semi-Präparative Kationenaustauscher-Chromatographie

Die Proben (jeweils 100 mg) werden in Puffer A gelöst und zur Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen filtriert (Minisart NML 0,45 μm , Sartorius, Göttingen). Die Säule wird mit Puffer A (25 mM NaAcetat, 25 mM HAcetat pH 4,5) gespült und die gebundenen Peptide mit Puffer B (1,0 M NaCl, 25 mM NaAcetat, 25 mM HAcetat pH 4,5) im Gradienten eluiert. Verwendet wird ein schwacher Kationenaustauscher (Parcosil Prokat, 2 cm x 12,5 cm, 7 μm , 300 \AA , Biotek, Östringen).

Durchgeführt werden die Chromatographien an einer BioCAD Workstation (PerSeptive Biosystems GmbH, Wiesbaden). Aufgezeichnet werden die Absorptionen bei den Wellenlängen 214 und 280 nm. Bei einem Fluß von 10 ml/min werden 10 ml-Fraktionen mit dem Fraktionssammler Advantec gesammelt.

3.2.5 Analytische Reverse-Phase-Chromatographie

Die Proben werden mit Puffer A (10 mM HCl bzw. 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure) verdünnt, aufgetragen, und die Säule mit Puffer A gespült. Die gebundenen Peptide werden mit Puffer B (80 % bzw 100% (v/v) Acetonitril, 10 mM HCl bzw. 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure) im Gradienten eluiert. Verwendet wird eine Anlage der Firma Kontron (Neufahrn) und die BioCAD Workstation Sprint (PerSeptive Biosystems GmbH, Wiesbaden), ausgestattet mit einem BioRad Fraktionssammler Modell 2120. Es wurden die folgenden selbstgepackten Säulen und Fertigsäulen für die Trennungen verwendet:

YMC RP-C18, 300 \AA , 5 μm , 1 cm x 25 cm

Vydac RP-C18, 300 \AA , 5 μm , 1 cm x 25 cm

Vydac RP-C18, 300 \AA , 5 μm , 0,46 cm x 25 cm

Parcosil RP-C4, 300 \AA , 0,4 cm x 25 cm

Parcosil RP-C4, 300 \AA , 0,4 cm x 5 cm

Die Puffer werden mit reinstem Wasser aus einer Nanopure Anlage der Firma Barnstedt (Wilhelm Werner GmbH, Bergisch Gladbach) angesetzt. Im Einzelfall werden die Säule und die verwendeten Puffer im Diagramm angegeben.

3.2.6 Analytische Kationenaustauscher-Chromatographie

Die Proben werden bei einem pH von 2,6 und einer Leitfähigkeit unter 5 mS/cm aufgetragen. Die Säule wird mit Puffer A (25 mM Na_2HPO_4 , pH 3,0 (mit Phosphorsäure eingestellt)) gespült und die gebundenen Peptide mit Puffer B (1,5 M NaCl, 25 mM Na_2HPO_4 , pH 3,0) im Gradienten eluiert. Verwendet wird ein starker Kationenaustauscher (Parcosil Pepkat, 0,4 cm x 5 cm, 5 μm , 300 Å, Biotek, Östringen). Durchgeführt werden die Chromatographien an einer Anlage der Firma Kontron (Neufahrn), bestehend aus dem Datensystem 450 (Version 3.9), zwei Pumpen P420, einer Mischkammer M494, einem Photometer D320 und einem Rheodyne Injektionsventil Typ 7125. Bei einem Fluß von 1 ml/min werden 1,5 ml-Fractionen mit dem Fraction Collector Model 2110 (BioRad, München) gesammelt.

3.3 Peptidanalytik

3.3 .1 Massenspektrometrie (MS)

Die Massenbestimmungen werden auf einem Elektrospray-Massenspektrometer (Sciex ABI III, Perkin-Elmer, Überlingen) durchgeführt.

Dazu werden die salzfreien und lyophilisierten Proben in einem Analysenpuffer (50 % (v/v) Acetonitril, 0,2 % (v/v) Essigsäure) gelöst und mit Hilfe einer Hamilton-Spritze und eines Dosierautomaten (Harvard Apparatus 22, FMI GmbH, Egelsbach) mit einem Fluß von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert.

Bei komplexen Peptidgemischen oder zur Aufkonzentrierung bei sehr kleinen Peptidmengen werden die Massen durch Microbore-HPLC-MS-Kopplung bestimmt. Dazu wird eine AQS 1,0 mm x 250 mm RP C18-Säule (YMC, Schernbeck) an einem Dual Syringe Solvent Delivery System ABI 140A (Applied Biosystems, Weiterstadt) mit einem Standard-Puffersystem und einem Standardgradienten (0 bis 100 % Puffer B in 30 Minuten, Puffer A: 0,1 % TFA, Puffer B: 80 % Acetonitril in 0,1 % TFA) betrieben, die direkt an das Sciex-Elektrospray-Massenspektrometer gekoppelt ist.

Während der Chromatographie werden einzelne Massenscans von 400-2400 atomare Masseneinheiten alle sieben Sekunden durchgeführt.

Das Massenspektrometer wird im positiven Modus betrieben. Zur Datenaufnahme und Auswertung wird das Programmpaket MacSpec 3.22 (Sciex, Perkin-Elmer, Überlingen) auf einem Apple MacIntosh IICI verwendet.

3.3.2 Sequenzierung

Die Edman-Sequenzierung (Hewick 1981, Edman 1956) wird auf einem 473A Sequencer (ABI, Weiterstadt) mit MicroCartridge nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Datenaufnahme, Speicherung und Auswertung wird die Model 610A Data Analysis Software (Version 1.2.1, ABI, Weiterstadt) auf einem Apple MacIntosh IISI verwendet.

Die Reinheit und die Masse der salzfreien Proben werden mit Hilfe der CZE und dem Sciex-Massenspektrometer vor der Sequenzierung überprüft. 50 pmol bis 100 pmol dieser Probe werden auf eine BioBrene Plus vorbehandelte Glasfasermembran aufgetragen. Der Edman-Abbau wird mit dem Reagentien-Kit von ABI nach dem Fast Cycle Protocol durchgeführt.

3.3.3 Kapillarzonenoelektrophorese (CZE)

Die Kapillarzonenoelektrophorese ist eine hochauflösende Methode, die hier zur Überprüfung der Reinheit eingesetzt wurde.

Die Auswertung und Steuerung des zur Durchführung verwendeten Gerätes der Firma Beckman (P/ACE 2000, Beckman, München) wird durch die mitgelieferte Gold-Software (Beckman, Version 6.01) geleistet. Die mit Polyimid beschichteten Kapillaren aus fused silica (Typ TSP 075375, Composite Metal Services LTD, Polymicro Technology Inc., Phoenix, USA) haben einen inneren Durchmesser von 75 µm und einen äußeren Durchmesser von 400 µm.

Die salzfreien und lyophilisierten Proben werden in 10 µl VE-Wasser gelöst. Die Probe wird durch Anlegen eines geringen Überdruckes 1 bis 20 s in die Kapillare injiziert. Detektiert werden die Peptide bei 200 nm. Alle Messungen werden bei einem Strom von 120 µA durchgeführt, die Spannung wird auf 16 kV bis 18 kV eingestellt. Die Temperatur wird konstant auf 25°C gehalten. Verwendet wird der Standardpuffer für die CZE (100 nM NaH₂PO₄, pH 2,5, 0,2 mg/ml Hydroxypropylmethylcellulose).

Die Mobilität eines Peptids im elektrischen Feld der mit Puffer gefüllten Kapillare kann durch folgende Gleichung berechnet werden (Rickard, 1991): $m = KzM^{2/3}$

K ist eine Konstante, z ist die Ladung des Peptids im Puffersystem und M ist die Peptidmasse.

Die Selektivität der CZE kann beeinflusst werden durch (Schwer, 1994):

- den pH-Wert des Puffers
- Reagentien, die Micellen bilden
- Ionenpaar-Moleküle
- Komplexbildende Reagentien
- Cyclodextrine
- organische Lösungsmittel

3.3.4 Aminosäureanalyse (ASA)

Die in einem Hydrolyseröhrchen lyophilisierten Proben werden in einem Borat-Puffer (0,4 M Natriumborat, pH 7,2) gelöst, der als internen Standard die Aminosäuren Norvalin und Sarkosin (je 50 μM) enthält. Der Meßbereich liegt zwischen 9-90 pmol / μl . Die Gasphasenhydrolyse wird mit einer Waters Pico Tag Workstation (Millipore, Eschborn) durchgeführt, die über eine Kühlfalle mit einer Vakuumpumpe (RZ 2, Vacubrand GmbH & Co., Wertheim) verbunden ist. Die salzfreien und lyophilisierten Proben werden durch Anlegen eines Vakuums nachgetrocknet und in ein Hydrolysegefäß gestellt. 0,4 ml 6 M HCl werden auf den Boden des Gefäßes pipettiert. Dem dreimaligem Evakuieren und Belüften mit trockenem Stickstoff folgt eine Hydrolyse im Vakuum für 1h bei 160°C. Die Salzsäure wird nach dem Abkühlen im Vakuum abgezogen.

Von dem Aminosäurestandard (Hewlett Packard, Waldbronn), der die Aminosäuren Ala, Arg, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Val und Cystin enthält, und den getrennt eingewogenen Aminosäuren Asn, Gln und Trp werden drei Standardverdünnungen (9 pmol/ μl , 22 pmol/ μl , 90 pmol/ μl pro Aminosäure) angesetzt und zu Beginn jeder Analyse mitgemessen. Die Kalibration erfolgt durch den internen Standard.

Die Aminosäureanalyse wird auf einem Aminosäure-Analyser (AminoQuant 1090, Series II, Hewlett Packard, Waldbronn) mit Vorsäulenderivatisierung durchgeführt. Diese erfolgt mit OPA für primäre Aminogruppen in Anwesenheit von 3-Mercaptopropionsäure unter Bildung eines intensiv fluoreszierenden Isoindolderivates und mit FMOC für sekundäre Aminogruppen unter Bildung eines sekundäre Amids in einem zweiten Schritt.

3.3.5 Ellman-Test

Dieser Test dient dem Nachweis aliphatischer Thiole durch die Bildung eines gelben Farbstoffes bei der Reaktion mit DTNB (5,5'-Dithiobis[2-nitrobenzoesäure]). Dazu wurden 40 mg DTNB in 10 ml eines 0,1 M Natriumphosphat-Puffers (pH 8) gelöst. Eine Probe des Thiols wurde mit demselben Phosphatpuffer auf eine Konzentration von 0,1-0,2 mmol in insgesamt 3 ml Lösung verdünnt und es wurde 0,1 ml des Ellman-Reagenzes hinzugegeben. Nach 15 min bei Raumtemperatur konnte die Farbe der Lösung mit der einer Referenzlösung (mit freien Thiolen) verglichen werden.

3.3.6 Proteaseverdau

Ein proteolytischer Verdau und eine Analyse der Fragmente kann zur Klärung der Disulfidbrücken-Anordnung in Peptiden beitragen. Die Auswahl der Protease richtet sich nach der Sequenz des zu untersuchenden Peptids. In der vorliegenden Arbeit wurde das Peptid hNLP zu diesem Zweck mit der Serinprotease Trypsin (E.C. 3.4.21.4, Boehringer Mannheim) gespalten. Es wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer (0,4 M Ammoniumbicarbonat, pH 8,0) verwendet. Die Spaltungen werden in 100 ml Puffer mit einem Enzym/Substratverhältnis zwischen 1:25 und 1:100 (w/w) bei einer Inkubationstemperatur von 37°C für 24 h durchgeführt. Die entstandenen Fragmente werden nach erfolgter Spaltung durch RP-Chromatographie aufgetrennt.

3.4 Peptidsynthese

3.4.1 Synthese des linearen Peptids [Cys(Trt)^{16,27}, Cys(Acm)^{22,32}] NLP(38-77)

Das Peptid [Cys(Trt)^{16,27}, Cys(Acm)^{22,32}] NLP(38-77), im folgenden als lineares NLP(38-77) bezeichnet, wurde durch Festphasensynthese nach Merrifield (1986) mit einem automatischen Peptid Synthesizer (Perkin Elmer/ABI) unter Verwendung der N_α-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppenchemie synthetisiert (Atherton & Sheppard 1989).

Ausgegangen wurde dabei von 0.1 mmol des vorbeladenen Harzes Fmoc-Glu(t-Bu)-Tentagel-S-PHB (Belegungsgrad 0.22 mmol/g). Die Fmoc geschützten Aminosäuren wurden in zehnfachem Überschuß in Anwesenheit der Aktivierungsreagenzien HBTU/DIPEA/HOBt eingesetzt. Cys²² und Cys³² lagen Acm-geschützt vor, während

Cys16 und Cys27 Trt-geschützt waren. Die Synthese wurde unter Verwendung des FastMoc-Standardzyklus in N-Methylpyrrolidinon (NMP) als Lösungsmittel durchgeführt. Im folgenden sind die Parameter für einen Zyklus angegeben:

1. Das Harz wird mit NMP gewaschen und vorgequollen. Anschließend wird mit einer 22% Piperidin/NMP-Lösung die Fmoc-Schutzgruppe des Peptidylharzes abgespalten.
2. 2 ml NMP, sowie 0.9 mmol einer 0.45 M HBTU/HOBt-Lösung (2ml) werden in die Aminosäurekartusche gepumpt und die Aminosäure somit aufgelöst. Anschließend wird die Aminosäure in den Aktivierungsreaktor überführt.
3. Das Harz wird mehrfach mit NMP gewaschen.
4. Um die Aktivierung der Aminosäure zu initiieren wird 1 ml einer 2 M DIPEA/NMP-Lösung in den Aktivierungsreaktor gegeben. Diese wird dann zur Reaktion in den Reaktor mit dem Harz überführt.
5. Nach Acylierung wird der Reaktor von überschüssiger Aminosäure und Aktivator befreit und mehrfach mit NMP gespült.

Nach beendeter Synthese wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe mit einer 22% Piperidin/NMP Lösung entfernt. Das so erhaltene Peptidylharz wurde in eine Glasfritte überführt, jeweils zweimal mit NMP, Isopropanol und MTBE gewaschen und anschließend im Hochvakuum über P_4O_{10} getrocknet.

Zur Abspaltung des Peptides vom Harz und zur Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen wurde das harzgebundene Peptid mit einer frisch angesetzten Abspaltnischung, bestehend aus TFA/EDT/ H_2O (94:3.3), mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Pro 100 mg Harz wurden 2 ml Abspaltnischung verwendet. Anschließend wurde die Suspension mit einer groben Glasfritte filtriert und das Peptid durch Zugabe von eisgekühltem MTBE aus dem Filtrat ausgefällt. Das Harz wurde mit wenig TFA nachgewaschen und das ausgefallene Rohpeptid wurde zentrifugiert und im Exsikkator getrocknet.

3.4.2 Selektive Einführung der Disulfidbrücken

- Bildung des monozyklischen Produkts durch Luftoxidation

Das lineare Rohpeptid (50 mg) wurde in Wasser (1 mg/ml) gelöst. Grobes unlösliches Material wurde mittels Ultraschall zerkleinert. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 M NH_3 auf 8.0 eingestellt. Anfänglich unlösliches Material löste sich im Laufe weniger Stunden. Die Lösung wurde so lange unter Lufteinwirkung heftig durchmischt, bis kein

freies Thiol mehr durch einen Ellman-Test nachzuweisen war. Nach beendeter Oxidation wurde die Lösung mit Eisessig angesäuert und der entstehende Niederschlag wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde durch präparative RP Chromatographie (Vydac, 47x300 mm, 300 Å, 15-20 µm) gereinigt. Fraktionen, die das monozyklische Intermediat in ausreichender Reinheit enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert.

- Iodoxidation des monozyklischen, Cys(Acm)-geschützten Peptids

Die oxidative Abspaltung von Acm unter direkter Bildung einer zweiten Disulfidbrücke wurde für das NLP-Derivat folgendermaßen durchgeführt. Das monozyklische Edukt wurde in Eisessig/0.1 M HCL (4:1, pH 2.0, Peptid Konz. 0.5 mg/ml) gelöst. 40 eq. einer frisch angesetzten 0.5 M Iod-Lösung in Eisessig wurden hinzugegeben, und die Reaktionslösung wurde 30 min gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das überschüssige Iod mit 0.1 M Ascorbinsäure reduziert bis sich die Reaktionslösung entfärbte. Nach der Aufreinigung des synthetisierten Peptides durch RP-Chromatographie wurde eine Reinheitskontrolle durch CZE, Massenspektrometrie und Sequenzierung durchgeführt. Der Peptidgehalt wurde mittels ASA bestimmt: Es wurden 12 mg bilyklisches NLP(38-77) synthetisiert.

3.5 Datenbankrecherche

Die durch die DNA- bzw. Proteinsequenzierungen erhaltenen Sequenzen werden mit den Programmpaketen MacMolly (Softgene, Berlin) oder on-line über den NCBI-Server mit dem BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool) auf bereits bekannte Sequenzen oder auf Homologien untersucht (Altschul et al., 1990, Ginsburg, 1994).

Das Programmpaket MacMolly ist ein kommerziell erhältliches Programmpaket auf CD-ROM für die Bearbeitung von EMBL- und SwissProt-Datenbanken. Es dient der Auswertung, Analyse und Bearbeitung von Sequenzdaten. Da ein Update alle sechs Monate erfolgt, enthalten diese Datenbanken nicht die neuesten Sequenz-Informationen.

Der BLAST-Algorithmus ist ein umfassendes Datenbankprogramm für Protein- und DNA-Sequenzen unterteilt in einzelne Anwenderprogramme. Mit dem Programm TBLASTN können auch Proteinsequenzen direkt mit Nukleinsäuresequenzen verglichen werden. Es werden von diesem Suchprogramm stets die aktuellsten Version der wichtigen Sequenzdatenbanken (GenBank, dbEST, dbSTS und SwissProt, PIR) verwendet.

3.6 Molekularbiologische Standardmethoden

3.6.1 Sterilisation von Lösungen und Materialien

Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-QUFplus, Millipore) angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert. Lösungen, die hitzeempfindliche Bestandteile enthielten, wurden durch Cellulose-Acetat-Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert. Glas-, Keramik und Metallwaren wurden für 4 h bei 180°C trockener Hitze entkeimt.

3.6.2 Kultivierung von E.coli-Stämmen und Klonen

Für eine Übernachtskultur wurden 5 ml Luria-Bertani-(LB)Medium (oder LB-Amp-Medium) mit einer Bakterienkolonie oder mit 10 µl einer entsprechenden Dauerkultur beimpft und in einem Kulturschüttler (180 rpm) bei 37°C über Nacht inkubiert. Um eine Dauerkultur anzulegen, wurden 1 ml einer Vorkultur mit der gleichen Menge einer autoklavierten 80 %igen Glycerinlösung mit Hilfe eines Labormixers gemischt und bei -80°C gelagert.

LB-Medium: 10 g/l Casein-Hydrolysat
 5 g/l Hefeextrakt
 5 g/l NaCl
 mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt

LB-Amp-Medium: LB-Medium mit 50-100 µg/ml Ampicillin

LB-Agar LB-Medium mit 15g/l Bacto-Agar

LB-Amp-Agar LB-Agar mit 50-100 µg/ml Ampicillin

3.6.3 Präparation von Plasmid DNA

Es wurden je nach Aufgabenstellung verschiedene Protokolle zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien verwendet. Die angewandten Verfahren unterscheiden sich vornehmlich in der Reinheit der isolierten DNA, der Präparationsausbeute sowie in der Durchführungszeit.

Mini- und Midi-Plasmidpräparationen

Das Verfahren der Firma Qiagen stellt eine Variante der alkalischen Extraktionsmethode von Birnboim und Doly (1979) mit anschließender Anionenaustauschchromatographie dar. Mit Hilfe dieser Technik wurde hochreine Plasmid DNA z.B. zur Sequenzierung isoliert.

Für Mini-Präparationen wurden 1,5 ml Zellsuspension, für Midi-Präparationen 150 ml Zellsuspension einer auf LB-Amp-Medium gezogenen ü.N.-Kultur eingesetzt und die DNA-Präparation nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Plasmidschnellpräparation aus E.coli-Kulturen

Zur schnellen Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus E.coli-Bakterien wurden jeweils 5 ml LB-Amp-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C/180rpm kultiviert. Je 1,5 ml dieser Kulturen wurde anschließend in einer Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert, die sedimentierten Zellen in 200 µl Puffer P1 resuspendiert und für 5 min bei RT belassen. Nach Zugabe von 200 µl Lösung P2 und Mischen wurden die Ansätze für 5 min auf Eis gestellt, mit 150 µl Lösung C vermischt und weitere 5 min auf Eis belassen. Nach anschließender Zentrifugation (15000 x g, 4°C, 10 min) wurde die Plasmid-DNA aus dem Überstand mit Ethanol gefällt. Das DNA-Sediment wurde in 100 µl H₂O aufgenommen und mit 50 µl PEG-Lösung vermischt. Der Ansatz wurde 30 min bei 4°C inkubiert und die DNA sedimentiert (15000 x g, 20 min, 4°C). Das Sediment wurde zweimal mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 30 µl H₂O gelöst.

| | | |
|----|--|---|
| P1 | 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA RNase A (100µg/ml) | PEG-Lsg. 30% (w/v) PEG 6000 1,5 M NaCl |
| P2 | 200 mM NaOH 1% (w/v) SDS | |
| P3 | 2,55 M KaAc, pH 4,8 | |

3.6.4 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurde durch Aufnahme von UV-Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 230-320 nm in einer Quarzglas-Küvette mit einem Spektralphotometer bestimmt. Zur Berechnung der Konzentration wurden folgende Gleichungen herangezogen (bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm):

- Doppelstrang-DNA: $c = E_{260} \text{ nm} \times 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$
- Oligodesoxynucleotide: $c = E_{260} \text{ nm} \times 33 \text{ } \mu\text{g/ml}$
- Ribonukleinsäuren: $c = E_{260} \text{ nm} \times 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$

Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde anhand des E_{260}/E_{280} -Quotienten ermittelt. Für reine Nukleinsäurelösungen sollte dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Bei Verunreinigungen der Proben mit Proteinen oder auch Phenolresten sinkt dieser Wert ab.

3.6.5 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme gehören zu den Endonucleasen. Sie spalten doppelsträngige DNA sequenzspezifisch durch Hydrolyse kovalenter Bindungen.

Zur Restriktionsspaltung von DNA wurden die vom Hersteller für das jeweilige Restriktionsenzym empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen übernommen. Im Allgemeinen wurden 2-5 Units Restriktionsendonuclease zur Spaltung von 1 μg DNA eingesetzt. Die Inkubationen fanden 1-2 h bei der optimalen Temperatur im Wasserbad oder Wärmeschrank statt. Die Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen erfolgte durch Phenol/Chloroformextraktion oder alternativ durch Inkubation des Ansatzes für 15 min bei 75°C. Zur Kontrolle der Spaltung wurde ein Aliquot des Restriktionsansatzes gelelektrophoretisch analysiert.

3.6.6 Agarosegelelektrophorese von DNA

Analytische Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrem relativen Molekulargewicht erfolgte in horizontalen Agarosegelen. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/5 Volumen Blaumarker versetzt, und je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde die Elektrophorese in 0,8-3 %igen Agarosegelen (in 1 x TAE) bei 90-120 V mit 1 x TAE als Laufpuffer durchgeführt. Nach der anschließenden

Ethidiumbromid(EtBr)-Färbung wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator bei 260 nm Wellenlänge durch einen Rot-Filter mit einer Polaroidkamera fotografiert oder mit einem Gelscanner aufgenommen. Die relative Größe von unbekanntem DNA-Fragmenten wurde anhand eines im Gel aufgetrennten DNA-Größenstandards bestimmt.

| | | | |
|----------|----------------|---------------------|----------|
| 50 x TAE | 2 M Tris-Base | Ethidiumbromid-Lsg. | 10 µg/ml |
| | 1 M Essigsäure | | |
| | 100 mM EDTA | | |

Blaumarker 5 x TAE
50 % (v/v) Glycerin
0,2% (w/v) SDS
0,25 % (w/v) Bromphenolblau

Präparative Gelelektrophorese mit LM-Agarose

Zu präparativen Zwecken wurden die zu isolierenden DNA-Fragmente in 1-3 %igen niedrig schmelzenden GTG-Agarosegelen (NuSieve GTG Agarose, Biozym) aufgetrennt. Dabei wurde die Elektrophorese bei 90-120 V durchgeführt. Der Gelbereich mit den gewünschten DNA-Fragmenten wurde auf einem Transilluminator mit einer sterilen Klinge ausgeschnitten. Die Aufarbeitung der DNA erfolgte durch eine Phenolextraktion mit anschließender Ethanol-fällung oder mit dem Gel-Purification-Kit von Qiagen.

3.6.7 Phenolextraktion

Phenolextraktion von DNA aus LM-Agarose

Das die DNA enthaltende Gelstück wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit H₂O auf ein Endvolumen von ca. 450 µl gebracht und mit 50 µl 3 M NaAc pH 6,0 versetzt. Die Agarose wurde bei 72°C für 10 min im Heizblock geschmolzen und die Lösung einmal mit 250 ml äquilibriertem Phenol (pH 8,0) extrahiert. Die wässrige Phase wurde nach einem Zentrifugationsschritt (12000 x g, 30 s, RT) in ein neues Gefäß überführt. Die Phenolreste wurden durch zweimalige Chloroformextraktion entfernt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol gefällt.

Phenolextraktion von DNA aus Lösungen

Zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wurden diese mit Phenol / TE (pH 8,0), Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1) bzw. Phenol / Chloroform (Applied Biosystems) extrahiert. Die entsprechende Lösung wurde dazu mit dem gleichen Volumen Phenollösung versetzt, intensiv gemischt und 1 min bei 15000 rpm in einer Tischzentrifuge zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und die phenolische Phase mit 1 Volumen TE (pH 8,0) reextrahiert. Die wäßrigen Phasen wurden vereinigt, bei Bedarf erneut phenolisiert und anschließend zweimal mit Chloroform extrahiert, um Phenolreste zu entfernen. Die Phasentrennung erfolgte auch hier durch einminütige Zentrifugation bei 15000 rpm. Anschließend wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt.

TE-Puffer 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
 1 mM EDTA

3.6.8 Ethanol-fällung

Um DNA oder RNA aus einer Lösung aufzureinigen oder zu entsalzen, wurde zu dem Ansatz das 0,1fache Volumen an 3 M Natriumacetat pH 5,2 sowie das 2,5fache Volumen eiskalten absoluten Ethanols zugegeben und die DNA / RNA 1 Stunde bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde die Lösung 30 min bei 15000 g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in dem gewünschten Volumen Wasser oder TE aufgenommen. Die Lagerung von DNA erfolgte bei -20 °C, die von RNA bei -80 °C.

3.6.9 PEG-Fällung

Zur Fällung wurde der gelösten DNA 1/2 Volumen einer 30 %igen PEG-Lösung zugefügt. Der Ansatz ist durch Vortexen gründlich vermischt und für 30 min auf Eis gekühlt worden. Die DNA konnte dann mittels Zentrifugation (30 min, 15000 rpm, 4°C) sedimentiert werden. Zur quantitativen Entfernung von PEG-Resten wurde das Sediment zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen.

PEG-Lösung 30% (w/v) PEG 6000
 1,5 M NaCl

3.6.10 Aufreinigung von Oligonukleotiden

Die am DNA-Synthesizer (Applied Biosystems / Weiterstadt) synthetisierten Oligonukleotide wurden über OPC-Säulen (Applied Biosystems) aufgereinigt. Die Oligonukleotide trugen nach ihrer Synthese im DNA-Synthesizer am 5'-Terminus eine Dimethoxytritylgruppe, die an das C 18 Silicagel-Säulenmaterial bindet. Die Kartusche wurde zunächst mit 5 ml Acetonitril gewaschen, um organische Reste vom Harz zu entfernen. Anschließend wurden 5 ml 2 M Triethylammoniumacetat (TEAA) aufgetragen, um die saure Hydrolyse der Tritylgruppe vom Oligonukleotid zu verhindern. Das Oligonukleotid-Rohgemisch wurde auf ein Vol. von 5 ml mit H₂O aufgefüllt und auf die Säule aufgetragen. Das Eluat wurde aufgefangen und noch zweimal in gleicher Weise auf die Säule gegeben. Die Elution von nicht an das Harz gebundenen Oligonukleotiden erfolgte durch Auftragen von 5 ml einer 10 %-igen Ammoniaklösung. Die gebundenen Oligonukleotide wurden schließlich mit 5 ml 2 %-iger Trifluoressigsäure (TFA) detrityliert und das überschüssige TFA mit 5 ml H₂O von der Säule entfernt. Die Oligonukleotide wurden im letzten Schritt der Aufreinigung durch Zugabe von 1,3 ml 20 %-iger Acetonitrillösung von der Säule eluiert und auf eine gebrauchsfertige Konzentration von 10 pmol / µl eingestellt.

3.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten zur Sequenzanalyse wurden die Plasmide pBSK+ und pGEM-T verwendet. Die Klonierung in den Vektor pBSK+ erfolgte durch die Verwendung geeigneter Restriktionsenzyme. Für die Klonierung von PCR-Produkten mittels Restriktionsendonukleasen wurden in den 5'-Terminus der verwendeten PCR-Primer entsprechende Erkennungssequenzen integriert. Vektor und Passagier-DNA wurden mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert, über ein präparatives Agarosegel mit anschließender Phenolextraktion aufgereinigt und ligiert. Vor der Ligation wurde die Vektor-DNA dephosphoryliert. Alternativ zur Verwendung von Restriktionsendonukleasen wurden PCR-Produkte nach der Methode von Marchuk et al. (1990) über T/A-Klonierung in den T-Vektor pGEM-T kloniert.

Sowohl das Plasmid pBSK+ als auch das Plasmid pGEM-T besitzen ein Resistenzgen für β -Lactamantibiotika (Ampicillin, Penicillin, Carbenicillin), Bindungsstellen für Sequenzier-primer und eine lacZ-Region, die für das sogenannte α -Fragment (N-

terminales Fragment) der β -Galactosidase codiert. In die lacZ-Region ist der Polylinker des Plasmids eingefügt. Werden Ligationsprodukte dieser Plasmide in einem E.coli Stamm propagiert, der im lacZ-Gen eine bestimmte Partialdeletion besitzt (lacZ Δ M15), ist eine farbliche Unterscheidung zwischen Kolonien mit rekombinanter Plasmid-DNA und Kolonien mit nichtrekombinanter Plasmid-DNA nach der Transformation möglich. E.coli Stämme des lacZ Δ M15 Genotyps exprimieren nur das C-terminale Fragment der β -Galactosidase, das enzymatisch inaktiv ist. Durch α -Komplementation kann aber ein enzymatisch aktives Protein rekonstituiert werden. Solche Zellen sind nach Induktion des lac-Promotors durch das Lactose-Analogon IPTG in der Lage, das farblose Galactosid X-Gal zu hydrolysieren, aus dem durch oxidative Dimerisierung eines der Hydrolyseprodukte blau gefärbtes 5-Brom-3-Chlor-Indigo entsteht. Die entsprechende Kolonie ist blau gefärbt. Da eine Insertion der Passagier-DNA in den Polylinker des Plasmides zu einer Veränderung des plasmidkodierten lacZ-Gens führt, wird in den entsprechenden Kolonien kein funktionsfähiges α -Fragment gebildet, mit dem die β -Galactosidase rekonstituiert werden kann: Die Kolonie erscheint auf den Transformationsplatten weiß (Blau-Weiß-Screening). Der Zusatz entsprechender Chemikalien zu den Agarplatten ermöglicht somit eine schnelle Selektion rekombinanter Plasmide in E.coli Klonen aufgrund ihres Phänotyps. Positive (weiße) Kolonien wurden anschließend mittels Kolonie-PCR überprüft.

3.7.1 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA

Um die Klonierungseffizienz zu erhöhen, wurde die enzymatisch hydrolysierte Vektor-DNA vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase an den 5'-Enden dephosphoryliert. Dazu wurden zwei Units alkalische Phosphatase (AP) pro μ g Vektor-DNA direkt in den Restriktionsansatz gegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Nach der Inaktivierung der AP (10 min bei 65°C) wurde die Vektor-DNA über ein präparatives Agarosegel mit anschließender Phenolextraktion und Ethanol-Fällung gereinigt.

3.7.2 Ligation

Unter ATP-Hydrolyse stellen DNA Ligasen Phosphodiesterbindungen zwischen dsDNA-Fragmenten her. Voraussetzung hierfür sind überhängende, komplementäre Einzelstrangenden (sticky ends) oder stumpfe Enden (blunt ends) der beteiligten DNA Moleküle. Zusätzlich muß einer der beiden Reaktionspartner am 5'-Ende phosphoryliert

sein. Für die Ligation wurden Passagier- und Vektor-DNA routinemäßig in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Die DNA-Konzentrationen in den Ligationsreaktionen betragen zwischen 2-5 µg/ml und wurden in einem Endvolumen von 20 µl durchgeführt. Die Reaktion erfolgte mit 1 Unit T4 DNA Ligase für 2 h bei RT oder über Nacht bei 15°C im Wasserbad.

| | |
|-----------------------------------|-------------------------|
| 5 x T4 DNA Ligase Reaktionspuffer | 250 mM Tris-HCl, pH 7,6 |
| | 50 mM MgCl ₂ |
| | 5 mM ATP |
| | 5 mM DTT |
| | 25 % (w/v) PEG 8000 |

3.7.3 Herstellung transformationskompetenter E.coli Zellen

Transformationskompetente E.coli Zellen wurden nach der Methode von Nishimura et al. (1990) hergestellt.

Mit 500 µl einer ü.N.-Kultur (E.coli XL1-blue) wurden 50 ml Medium A angeimpft und bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD_{578nm} von 0,55 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur in ein steriles 50 ml PE-Reaktionsgefäß überführt, 10 min auf Eis gekühlt und die Zellen sedimentiert (2000 x g, 10 min, 4°C). Das Zellsediment wurde in 500 µl eiskaltem Medium A resuspendiert, mit 2,5 ml kaltem Medium B vorsichtig vermischt und in 100 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Um die Transformationseffizienz (cfu/µg DNA) der jeweiligen Charge zu bestimmen, wurden jeweils 0,1 ng, 1 ng und 10 ng superhelicale Vektor-DNA (pBSK+) für die Transformation der Zellen verwendet. Die Transformationsansätze wurden auf Selektionsnährböden ausplattiert und ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Kolonienanzahl pro Platte bestimmt und die Transformationseffizienz errechnet.

| | |
|----------|---------------------------------|
| Medium A | 10mM MgSO ₄ |
| | 0,2% (w/v) Glucose |
| | in LB-Medium (sterilfiltrieren) |

| | |
|----------|-------------------------|
| Medium B | 36% (w/v) Glycerin |
| | 12% (w/v) PEG 8000 |
| | 12 mM MgSO ₄ |

in LB-Medium (sterilfiltrieren)

3.7.4 Transformation

Die Transformation von Bakterienzellen mit rekombinanten Plasmiden erfolgte unter Verwendung kompetenter Zellen der Stämme E. coli XL 1-Blue bzw. JM109. Hierzu wurde 1/4 Volumen eines Ligationsansatzes mit 100 µl auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen vorsichtig vermischt, der Ansatz für 30 min auf Eis stengelassen und anschließend für 2 min bei 42° C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis für 2 min wurde dem Ansatz 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium hinzugefügt und die Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen sind daraufhin bei 4°C und 3000 upm für 3 min sedimentiert worden. Das Sediment wurde in 400 µl SOC-Medium resuspendiert, je 200 µl auf LB-Amp / X-Gal / IPTG-Platten ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Die Insertionsgrößen rekombinanter Zellkolonien wurden mittels Kolonie-PCR oder durch Plasmidschnellpräparationen mit anschließender Restriktionsanalyse ermittelt.

| | |
|--------------|---|
| IPTG-Lösung | 0,1 M in H ₂ O |
| X-Gal-Lösung | 2% (w/v) in Dimethylformamid |
| SOC-Medium | 20 g/l Casein 5 g/l Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCL 10 mM MgCL ₂ 20 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose |

3.8. Northern-Blot

Die Übertragung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren oder Proteinen auf eine Membran - ursprünglich aus Nitrocellulose - wird als "Blotten" bezeichnet. Unter einem Southern-Blot (Southern 1975) versteht man den Transfer von DNA auf eine Membran. Analog dazu nennt man die Übertragung von RNA auf eine Membran Northern-Blot (Thomas 1983). Beim Northern-Blot wurde die zu analysierende RNA wie im folgenden beschrieben mit Formaldehyd denaturiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, dann auf eine Nylonmembran transferiert und anschließend mit einer radioaktiv markierten Gensonde hybridisiert. Die Verwendung von Nylonmembranen gegenüber Nitrocellulosefiltern bietet mehrere Vorteile (Darling und Brickell 1996):

- Nylonmembranen haben eine größere Bindungskapazität für Nukleinsäuren als Nitrocellulosefilter.
- Nylonmembranen sind reißfester als Nitrocellulosefilter. Außerdem werden NC-Filter nach Behandlung mit Alkali (wie beispielsweise in Koloniehybridisierungsexperimenten) oder nach einer Inkubation bei hohen Temperaturen, wie bei einer Hybridisierung leicht brüchig.
- Nylonmembranen sind hydrophil und behalten bei hohen Temperaturen ihre Größe und Form.

Dadurch kann mit Nylonmembranen wiederholt hybridisiert und gewaschen werden.

3.8.1 RNA-Extraktion

Zur Isolierung von RNA wurde ein Protokoll von Chomzynski und Sacchi (1987) verwendet. Dazu wurde schockgefrorenes Gewebe zermahlen und anschließend homogenisiert. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte in eiskaltem RNA-Lysispuffer (100mg Gewebe / ml Lysispuffer) mit einem Ultraturrax T25. Das in der Homogenisierungslösung vorhandene Guanidinium-Thiocyanat bewirkt in Anwesenheit von β -Mercaptoethanol eine Denaturierung aller Proteine einschließlich der RNasen. Durch einen Zentrifugationsschritt (10000 x g, 10 min, 4°C) wurden unlösliche Bestandteile des Homogenats abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Isolierung der RNA aus dem Gewebehomogenat erfolgte durch saure Phenolextraktion. Hierfür wurde das Gewebehomogenat mit 0,1 Volumen 2M NaAc pH 4,0 versetzt und mit gleichem Volumen wassergesättigtem Phenol vermischt. Anschließend wurde die Lösung mit 0,1 Volumen Chloroform vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Phasentrennung (10000 x g, 10 min, 4°C) wurde die wäßrige Oberphase in ein neues Gefäß überführt und die Phenol / Chloroformextraktion wiederholt. Zur Entfernung der Phenolreste wurde die wäßrige Phase zweimal mit gleichem Volumen Chloroform extrahiert. Die RNA wurde aus der Lösung durch Zugabe eines gleichen Volumenanteils Isopropanol gefällt und durch eine weitere Zentrifugation (10000 x g, 10 min, 4°C) sedimentiert. Das Präzipitat wurde zweimal mit eiskaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in dem gewünschten Volumen H₂O gelöst. Der Nukleinsäuregehalt der Lösung wurde photometrisch bestimmt und die Qualität der RNA-Präparation gelelektrophoretisch kontrolliert.

| | |
|-----------------|---|
| RNA-Lysispuffer | 4 M Guanidiniumisothiocyanat 25 mM Natriumcitrat pH 7,0 0,5% (w/v) Sarcosyl 0,1 M β -Mercaptoethanol |
|-----------------|---|

3.8.2 Formaldehyd Agarosegelelektrophorese von RNA

RNA-Moleküle müssen durch Zugabe von geeigneten Denaturierungsreagenzien komplett entfaltet vorliegen, damit sich ihre Migrationsgeschwindigkeit in Agarosegelen umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts verhält. Eine vollständige Denaturierung beinhaltet die Zerstörung von intra- und intermolekularen Basenpaarungen. Dadurch wird die Möglichkeit, daß eine RNA-Bande eine Aggregation von zwei oder mehr distinkten Banden darstellt, verringert. Bei dem angewandten Verfahren enthalten sowohl der Probenpuffer als auch das Agarosegel Formaldehyd als denaturierendes Agens.

Für eine Analyse wurden 5-20 μ g RNA in 11 μ l Probenpuffer aufgenommen und für 15 min bei 55°C denaturiert. Nach Zugabe von 1 μ l Ethidiumbromid (1mg/ml) wurden die Proben für 3 h bei 100 V elektrophoretisch in einem 1,2 %igen Midigel in MOPS-Puffer und 1,1% Formaldehyd (Kroczeck und Siebert, 1990; Fourney et al., 1988) aufgetrennt. Dabei war die Gelkammer zur Inaktivierung von RNasen vorab mit 10 % H_2O_2 behandelt worden.

| | |
|------------------|---|
| RNA-Probenpuffer | 50 % deionisiertes Formamid 2,2 M Formaldehyd 6,6 % Glycerin 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 1 x MOPS |
|------------------|---|

| | |
|-----------|--|
| 10 x Mops | 0,2 M 3-(N-Morpholino)propan sulfonsäure 0,05 M NaAcetat 0,01 M EDTA |
|-----------|--|

3.8.3 Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Blotten)

Für den Transfer von RNA auf Nylonmembranen wurde eine Druckblotapparatur (Stratagene PosiBlot™) verwendet. Hierbei wurde nach der Elektrophorese eine Transferlösung mit einem angelegtem Überdruck von 60-70 mm Hg senkrecht durch das Agarosegel gepreßt. Die Nukleinsäuren wurden dabei durch den Flüssigkeitsstrom auf

komplementäre DNA-Strang wird durch den Einbau eines [^{32}P]-dNTP radioaktiv markiert.

Dazu wurden 50-100 ng aufgereinigtes DNA-Fragment, das in einem Volumen von 9 μl vorlag, für 5 min im Wasserbad auf 100°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Im Folgenden wurden 2 μl Hexanukleotide in 10 x Klenow-Puffer, 3 μl dNTP-Mix (je 0,5 mM dATP, dGTP, dTTP) sowie 5 μl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (spezifische Aktivität 3000 Ci/mMol) zugegeben. Nach Zugabe von 1 μl Klenow-Polymerase wurde der Ansatz für 2-3 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Markierungsreaktion durch 10 minütiges Erhitzen auf 65°C gestoppt.

3.8.6 Reinigung radioaktiv markierter DNA

Um nichteingebaute radioaktive Nucleotide von der markierten DNA abzutrennen, erfolgte eine Gelfiltration des Ansatzes mit Einwegsäulen ("NucltrapTM push-columns", Stratagene). Der Ansatz wurde hierfür mit STE-Puffer auf ein Endvolumen von 70 μl gebracht und mittels einer Einwegspritze durch die vorab mit 70 μl STE-Puffer äquilibrierte Säule gedrückt. Anschließend wurde die DNA mit 70 μl STE-Puffer eluiert.

| | |
|-----|-----------------------|
| STE | 20 mM Tris-Cl, pH 7,5 |
| | 100 mM NaCl |
| | 10 mM EDTA |

3.8.7 Aktivitätsmessung

Die spezifische Aktivität von radioaktiv markierten DNA-Fragmenten wurde unter Verwendung eines β -Scintillationszählers (Canberra Packard, 2500 TR) bestimmt. Ein Aliquot von 10 μl einer wie unter 3.8.5 beschrieben hergestellten Hybridisierungssonde wurde im Tritiumkanal des Zählers unter Ausnutzung des Cerenkov-Effektes gemessen. Die Zählrohrbeute bei dieser Messung beträgt erfahrungsgemäß nur ca. 30 %, so daß der erhaltene Wert mit dem Faktor 3,3 multipliziert werden muß, um die tatsächliche Aktivität zu erhalten.

3.8.8 Hybridisierung

Die Hybridisierungen membrangebundener Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten Gensonden wurden in einem temperierbaren Inkubationsofen (Bachofer, 400 HY) in rotierenden Glasröhren durchgeführt. Pro Röhre wurden 12-15 ml Hybridisierungslösung verwendet. Die Prähybridisierung wurde für 1 - 4 h und die Hybridisierung für 16 - 20 h bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur durchgeführt. Um die freien Bindungsstellen auf den Membranen abzusättigen, enthielt die Hybridisierungslösung 100 µg/ml denaturierte Heringssprema-DNA (hs-DNA) und 5 x Denhardt's. Doppelsträngige Gensonden wurden unmittelbar vor ihrer Verwendung für 5 min bei 100°C im Wasserbad denaturiert und in einer Aktivitätskonzentration von 10^5 - 10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung eingesetzt.

Hybridisierungslösung 5 x SSC
5 x Denhardt's
1% (w/v) SDS
10% (w/v) Dextransulfat oder 10% (w/v) PEG (MW 6000)
100 µg/ml denaturierte hs-DNA

100 x Denhardt's 2% (w/v) Ficoll 400
2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon
2% (w/v) BSA

Im Anschluß an die Hybridisierung wurden die Filter zur Entfernung unspezifisch gebundener DNA-Sonden und zur Erhöhung der Stringenz mit SSC-Lösungen mit 0,1% SDS gewaschen. Die Salzkonzentration in der Waschlösung als auch die Dauer und die Temperatur der Waschschriffe richteten sich dabei nach dem jeweiligen Experiment.

Allgemeine Waschbedingungen: 1. 2 x 10 min (2 x SSC, 0,1% SDS) bei RT
2. 3 x 10 min (0,2 x SSC, 0,1% SDS) bei 42-65°C

3.8.9 Autoradiographie

Die Membranen wurden in Polyethylen-Folie eingeschlagen und mit Röntgenfilmen (Kodak X-Omat AR) in Autoradiographie-Kassetten mit Verstärkerfolie bei -80°C für Stunden bis Tage exponiert. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte für 4 min im Entwicklungsbad, 30 s im Stoppbad (0,5 %ige Essigsäure) und 5 min im Fixierbad. Danach wurde der Film für ca. 10 min gewässert.

3.9 Southern-Blot

Nach Auftrennung der DNA im Agarosegel und anschließender Ethidiumbromidfärbung wurde die DNA durch eine 10 minütige Inkubation in 0,25 N HCl partiell depuriniert. Einem einmaligen Waschen in H₂O folgte eine Denaturierung der DNA in 0,5 N NaOH und 1,5 M NaCl für 30 min. Zur Neutralisierung wurde das Gel 2 mal 20 min in Neutralisierungslösung geschwenkt. Für den anschließenden Kapillarblot wurde eine Hybond N⁺ Membran verwendet. Die Transferapparatur hatte folgenden Aufbau:

- Ein Reservoir für den Transferpuffer 20 x SSC, ein Gelträger und eine Fließverbindung aus feuchtem Whatman 3MM-Papier.
- Das Gel.
- Die luftblasenfrei aufgelegte Nylonmembran.
- Drei Lagen mit 20 x SSC angefeuchtetem Whatman 3MM-Papier.
- Ein 5 cm hoher Stapel aus trockenem saugfähigem Papier.
- Abschließend eine Glasplatte, die mit einem Gewicht beschwert wurde.

Der Transfer erfolgte über Nacht. Die DNA wurde anschließend durch UV-Bestrahlung kovalent an die Nylonmembran gebunden.

| | |
|------------------------|--|
| Denaturierungslösung | 1,5 M NaCl 0,5 M NaOH |
| Neutralisierungslösung | 1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl pH 7,2 1 mM EDTA |

3.10 Sequenzierung

Zur Ermittlung der Nukleotidsequenz von PCR-Produkten und klonierten DNA-Fragmenten wurde ein modifiziertes Verfahren der von Sanger et al. (1977) eingeführten Kettenabbruchmethode angewandt. Bei diesem Verfahren, dem Cycle-Sequencing wird eine DNA-Sequenz in einer PCR-Reaktion mit nur einem Primer linear amplifiziert (Adams et al., 1991). Im PCR-Ansatz befinden sich neben Desoxynukleotiden (dNTPs) auch Didesoxy-nukleotide (ddNTPs): wird ein ddNTP anstatt eines dNTPs bei der Extension durch die Taq Polymerase eingebaut, bricht die Strangsynthese an dieser Stelle ab, da am 3'-Ende der Nukleotidsequenz keine freie Hydroxylgruppe zur Knüpfung einer weiteren Phosphodiesterbindung mehr vorliegt. Der Einbau eines ddNTPs erfolgt mit

statistischer Wahrscheinlichkeit, so daß die Kettenlänge der Abbruchprodukte nur durch die Konzentration der Nukleotide und durch das Verhältnis von Desoxy- zu Didesoxynukleotiden gesteuert werden kann.

Im Vergleich zu anderen enzymatischen Sequenzierungsreaktionen reichen bei dieser Methode geringe DNA Mengen für eine erfolgreiche Sequenzierung aus (Craxton, 1991). Die DNA-Fragmente werden entweder mit fluoreszierenden Primern (Dye Primer) oder Didesoxynukleotiden (Dye Terminator) markiert (Smith et al., 1986; Prober et al., 1987). Der Nachweis erfolgt mit dem DNA-Sequencer 373 A (ABI). Das Gerät ist eine Kombination aus einer Elektrophoreseeinheit und einem "on-line" Detektionssystem. Von einem im unteren Drittel des Gels positionierten Argon-Laserscanner werden die nach Größe getrennten, fluoreszenzmarkierten DNA-Moleküle, die diesen Bereich passieren zu einer charakteristischen Fluoreszenz angeregt. Das Fluoreszenzlicht wird von Photodioden gemessen und in elektrische, digitale Signale verwandelt. Jede Probe benötigt nur eine Spur auf dem Sequenziergel, da für jede Base ein anderer Fluorezenzfarbstoff verwendet wird. Die Steuerung und Datenaufnahme erfolgen mit der Data Collection Software (ABI) auf einem Macintosh-Computer. Für die Auswertung wird die Data Analysis Software (ABI) benutzt.

3.10.1 Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs

Für Sequenzierungen von DNA-Fragmenten mit spezifischen Primern wurde das "Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" der Fa. Applied Biosystems verwendet. Die Sequenzierungsreaktion wurde unter Einhaltung der Vorschrift des Herstellers in einem Thermocycler 9600 (Applied Biosystems) durchgeführt.

Reaktionsansatz:

| | |
|-------------------------------|------------|
| Terminator Ready Reaction Mix | 8 µl |
| Template | |
| einzelsträngige DNA | 50-100 ng |
| doppelsträngige DNA | 250-500 ng |
| PCR DNA | 30-90 ng |
| Primer | 5-10 pmol |
| ad 20 µl mit H ₂ O | |

Thermocyclerprotokoll:

96°C 10 s

50-55 °C 5 sec
60°C 4 min
25 Zyklen

Nach der Sequenzierungsreaktion wurden die Proben mit abs. Ethanol gefällt, gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die Sedimente wurden in Formamid / 50 mM EDTA (Verhältnis 5:1, pH 8,0) gelöst. Direkt vor dem Auftragen wurden die Proben für 2 min bei 90°C in einem Heizblock denaturiert und auf Eis abgekühlt.

3.10.2 Denaturierende Polyacrylamid-Sequenziergele

Denaturierende Polyacrylamidgele wurden zur Auftrennung der fluoreszenzmarkierten DNA-Einzelstränge aus den Sequenzierreaktionen eingesetzt. Unter den denaturierenden Bedingungen dieser Gele wird die Ausbildung von Sekundärstrukturen der DNA unterbunden, so daß ihre Mobilität nur vom Molekulargewicht abhängig ist. Für die Sequenzierung wurden 7 %-ige Polyacrylamidgele (7% T, 5% C) mit 8 M Harnstoff gegossen. Für ein Gelvolumen von 100 ml wurden 50 g Harnstoff in 35 ml H₂O und 17,5 ml 40% Acrylamidlösung gelöst und mit einem Mischbett-Ionenaustauscher Amberlite MB-1 entionisiert. Die Lösung wurde durch einen 0,2 µm Membranfilter (Satorius, Göttingen) filtriert, mit 10 ml 10 x TBE-Puffer vermischt und 10 min entgast. Nach Zugabe von 350 µl frisch angesetzter 10% APS Lösung und 40 µl TEMED wurde das Gel luftblasenfrei zwischen zwei planare Quarzglasplatten gegossen und der Kamm eingesteckt. Nach Abschluß der Polymerisation wurden die Glasplatten außen gereinigt und in die Elektrophoreseapparatur des Sequencers eingesetzt. Die Pufferkammern wurden mit dem Laufpuffer 1 x TBE gefüllt, der Kamm gezogen und die Probenfächer gründlich gereinigt.

| | |
|------------------------------|--|
| Ansatz für 100 ml Gelvolumen | 50g Harnstoff 35 ml H ₂ O 17,5 ml 40% Acrylamidlösung 10 ml 10x TBE 350 µl 10% (w/v) APS 40 µl TEMED |
| 40 %ige Acrylamid-Lösung | 38 % (w/v) Acrylamid 2 % (w/v) N,N'-Metylenbisacrylamid deionisiert und filtriert |
| 10x TBE | 890 mM Tris-HCl, pH 8,3 890 mM Borsäure 20 mM EDTA |

3.10.3 Elektrophoresebedingungen

Nach einer Vorelektrophorese für 30 min bei 30 W wurden die Probenaschen noch einmal mit dem Laufpuffer gespült, bevor jeweils 5 µl der Proben aufgetragen wurden. Danach schließt sich die Hauptelektrophorese für 10 Stunden bei 30 W (ca. 1500 V, 20-25 mA) an. Das Gel wurde durch ein Peltierelement auf 40°C thermostatisiert.

3.11 Genbank-Screening

Um das homologe NLP Gen der Maus zu finden, wurde eine murine genomische Bank des Mausstammes 129/Sv gescreent.

3.11.1 Herstellung der murinen Cosmidbank

In vielen Fällen ist eine genomische Genbank die Grundvoraussetzung für die Isolierung und Charakterisierung eines Gens. Die Konstruktion einer solchen Genbank erfordert möglichst hochmolekulare chromosomale DNA, die spezifisch mit Restriktionsendonucleasen fragmentiert, mit Vektoren verknüpft und kloniert wird.

Die murine chromosomale DNA wurde nach der Methode von Herrmann und Frischauf (1987) isoliert und partiell mit dem Restriktionsenzym Sau 3A verdaut. Dieses Enzym ist isoschizomer zu Bam HI, benötigt aber nur das Tetranucleotid 5'-GATC-3' als Erkennungssequenz. Die dabei generierten Fragmente mit einer Größe von 30-42 kb wurden durch eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation isoliert und in die Bam HI-Schnittstelle des Vektors SuperCos I (Stratagene) kloniert. Die Ligierungsbedingungen wurden so gewählt, daß die zu klonierende DNA mit den Cosmid-Vektoren Concatemere bildet. Nach der in vitro Verpackung der Cosmid-DNA in Lambdaphagen-Partikel mit Hilfe des Gigapack III XL Packaging Extraktes (Stratagene) wurden E.coli XL1-Blue MR Zellen infiziert und die rekombinanten Cosmide darin vermehrt. Da Cosmide im Gegensatz zu Lamdaphagen-Vektoren kein Gen für die Lysis der Bakterienzelle tragen, verbleiben sie (als zirkuläre Moleküle) in der Zelle. Die Selektion von Bakterien, die Cosmide enthalten, erfolgte auf Ampicillin-haltigen Nährböden.

3.11.2 Organisation der Cosmibank

Die Cosmidbank umfaßt ca. 400000 Klone, die sich insgesamt auf 357 Platten verteilen. Um einen bestimmten rekombinanten Clon durch ein PCR-Screening möglichst schnell finden zu können, wurden die Cosmidbank in Pools unterteilt:

1. Die Bakterien einer Platte bilden einen Subpool.
2. Es wurden 21 Superpools gebildet, die aus jeweils 17 Platten bestehen.

Die Bakterien eines Superpools wurden von den Platten abgeschwemmt und aliquotiert. Ein Aliquot wurde mit Glycerin vermischt und als Dauerkultur bei -80°C aufbewahrt. Aus dem anderen Aliquot wurden die Cosmide isoliert und konnten als Template in PCR-Reaktionen eingesetzt werden.

3.11.3 Kolonie-Screening

Die von Grunstein und Hogness (1975) entwickelte Methode dient der Identifizierung rekombinanter Clone, die ein bestimmtes Insert enthalten. Diese Methode konnte durch einige Modifikationen verbessert werden. Zum Screening wurden Replikafilter von den Bakterienplatten mit runden Papierfiltern von Schleicher und Schuell erstellt. Um die DNA aus den E.Coli freizusetzen und an die Filter zu fixieren wurde zunächst ein Whatman 3 MM-Papier mit einer Lösung aus 2 x SSC und 5% SDS durchtränkt. Darauf wurden die Bakterienfilter für 2 min plziert und anschließend für 2 min in einer Mikrowelle bei 600 W getrocknet. Die Filter konnten nun mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert werden. Dabei ist zu beachten, daß die Sonde keine Sequenzen enthält, die homolog zum Vektor sind, der zur Konstruktion der Genbank verwendet worden ist. Durch den Vergleich der Autoradiogramme mit den Originalplatten wurden die positiven Clone ermittelt und anschließend in Kultur genommen.

3.11.4 Präparation der Cosmid-DNA

Die Isolierung der Cosmid-DNA aus den rekombinanten Bakterien erfolgte nach dem "Cosmid Purification Protocol" der Firma Qiagen (Hilden).

3.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist ein In vitro-Verfahren zur selektiven enzymatischen Amplifikation eines DNA-Bereiches definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von DNA-Molekülen (Saiki et al. 1985). Dabei wird die Eigenschaft von DNA-Polymerasen genutzt, zu einer einzelsträngigen Matrizen-DNA einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren, sofern ihnen ein kurzer doppelsträngiger Bereich als "Primer" zur Verfügung steht. Dies gelingt durch den Einsatz von zwei spezifischen, chemisch synthetisierten Oligonukleotiden, die zu jeweils einem der beiden DNA-Stränge komplementär sind und die zu amplifizierende Sequenz flankieren.

Neben der DNA-Matrize, den Primern und der DNA-Polymerase werden außerdem Desoxynucleosid-5'-triphosphate (dNTPs) und ein Mg^{2+} -haltiger Reaktionspuffer benötigt.

Die Grundlage der PCR ist die zyklische Wiederholung von drei aufeinanderfolgenden Schritten (Mullis & Faloona, 1987): Hitzedenaturierung der DNA, Anlagerung der Primer (Annealing), enzymatische Synthese des komplementären DNA-Stranges durch eine DNA-Polymerase (Extension). Die Verwendung von hitzestabilen DNA-Polymerasen, z.B. der Taq-DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus Aquaticus* (Saiki et al. 1988) und die Entwicklung von programmierbaren Thermocyclern ermöglicht eine Automatisierung der PCR. Die Taq-Polymerase besitzt ein Temperaturoptimum von $72^{\circ}C$ und ist für kurze Zeit bei Temperaturen von bis zu $95^{\circ}C$ stabil. Es können daher alle Reaktionsschritte im gleichen Reaktionsansatz durchgeführt werden, ohne daß nach jedem Denaturierungsschritt neues Enzym hinzugefügt werden muß. Ein weiterer Vorteil der thermostabilen DNA-Polymerase ist die gegenüber anderen DNA-Polymerasen wesentlich höhere Prozessivität. Dadurch können sogar Fragmente mit einer Länge von mehreren kb amplifiziert werden.

Die Schmelztemperatur T_m eines PCR-Primers ist abhängig von seiner Basenzusammensetzung und läßt sich mit einer Vielzahl verschiedener Formeln berechnen, z.B. der 2+4 Regel: $(\text{Anzahl von A+T}) \times 2^{\circ}C + (\text{Anzahl von G+C}) \times 4^{\circ}C$. Für jede Amplifizierung wurden Primer mit einer ähnlichen Schmelztemperatur verwendet. Geeignete Annealingtemperaturen lassen sich nur in etwa aus der T_m ableiten, die berechnete T_m dient lediglich als Anhaltspunkt zu Beginn der Experimente. Die in dieser Arbeit verwendeten PCR Protokolle wurden durch Variation der Primerkonzentration, der Annealingtemperatur und der Zyklusanzahl optimiert.

Lösungen und Puffer:

| | |
|--------------------------------|---|
| 10 x Taq-DNA-Polymerase-Puffer | 100 mM Tris-HCl 500 mM KCl 15 mM $MgCl_2$ pH 8,8 |
| $MgCl_2$ -Lösung | 50 mM |
| Oligonukleotide | 10 pM/ μ l |
| dNTP-MIX | 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10mM dGTP, 10mM dTTP |
| Taq-DNA-Polymerase | 4 U / μ l |

| | |
|--------------------|---|
| PCR-Standardansatz | DNA (genomisch 200 ng, Plasmid DNA 5-10 ng) 10 mM Tris-HCl (pH 8,8) 50 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂ 0,4 µM Primer 1 0,4 µM Primer 2 200 µM dNTPs 1-2 U Taq-DNA-Polymerase |
|--------------------|---|

Standard-PCR-Protokoll:

3 min 95°C Initiale Denaturierung

30-40 Zyklen 20sec 95°C, 20sec 55-60°C, 1min 72°C

10min 72°C Finale Extension

3.12.1 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine Methode zur schnellen Durchmusterung rekombinanter Bakterienklone mit einem hohen Probendurchsatz (Güssow und Clackson, 1989). Hierbei werden Bakterienklone, die rekombinante Plasmide enthalten, im Anschluß an die Transformation (3.7.4) durch eine PCR selektiert. Dazu wurde mit einem sterilen Zahnstocher in die Bakterienkolonie eingestochen und die anhaftenden Bakterien mit dem Zahnstocher direkt in den PCR-Premix 1 übertragen. Für die PCR wurde ein Primer aus der Sequenz der Insertion sowie ein Gegenprimer aus dem Polylinkerbereich des Plasmidvektors eingesetzt, um zu gewährleisten, daß ausschließlich rekombinante Plasmide in der PCR als Ziel-DNA dienen. Nach der PCR-Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und positive rekombinante Klone anhand der amplifizierten Fragmente detektiert. Von den korrespondierenden Bakterienklonen wurde anschließend eine Plasmid-DNA-Präparation durchgeführt (3.6.3).

| | |
|--------------|---|
| PCR-Premix 1 | 2 µl 10 x PCR-Reaktionspuffer 10 pmol Primer 1 10 pmol Primer 2 0,5 µl dNTP-Mix (Endkonzentration 200 µM) ad 25 µl H ₂ O, steril |
| PCR-Premix 2 | 0,5 U Taq-Polymerase 0,5 µl 10 x PCR-Reaktionspuffer ad 5 µl H ₂ O, steril |

PCR-Programm 3 min 98 °C, 20 sec 55 °C (Zugabe Premix 2), 1 min 72 °C,
1 Zyklus
1 sec 98 °C, 20 sec 55 °C, 1 min 72 °C, 37 Zyklen
10 min 72 °C

3.12.2 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Bei der RT-PCR, angelehnt an Jackson, Hayden und Quirke (1991), wurde ausgehend von 5 µg der wie unter 3.8.1 beschrieben isolierten Gesamt-RNA unter Verwendung eines universalen Oligo dT-Primers (UNIP 5) Erststrang-cDNA synthetisiert. Die cDNA-Erststrangsynthese wird durch ein gentechnisch modifiziertes Enzym, die Superscript II RNase H⁻ Reverse Transkriptase (Gibco) katalysiert. Dieses Enzym ist eine Mutante der MMLV Reversen Transkriptase (MMLV= Molony-Maus-Leukämie-Virus) und besitzt im Unterschied zu anderen RTs keine RNase Aktivität mehr, die bei der cDNA-Erststrangsynthese eine Degradation der mRNA hervorrufen könnte. Aus diesem Grund synthetisiert sie mehr cDNA-Moleküle, die die vollständige Länge der mRNA abdecken, und insgesamt größere Mengen an cDNA.

Ein µl einer 10⁻¹ Verdünnung des cDNA-Erststrang-Ansatzes wurde routinemäßig in einer nachfolgenden PCR-Reaktion mit einem spezifischen Sense- und einem Antisense-Oligonukleotid eingesetzt. Parallel wurde von jedem cDNA-Erststrang-Syntheseansatz eine PCR mit spezifischen Primern für β-Tubulin durchgeführt, um die Synthese der cDNA-Erststränge zu überprüfen.

cDNA-Erststrang-Synthese 5 µg Gesamt-RNA (in 0,1 % DEPC-H₂O)
30 pmol UNIP-2
3 min bei 70 °C denaturieren
6 µl 5 x RTase-Reaktionspuffer
3 µl dNTP-Mix (15 mM Endkonzentration)
3 µl 0,1 M DTT (10 mM Endkonzentration)
1 µl MMLV RTase (200 U)
mit 0,1 % DEPC-H₂O auf 30 µl Endvolumen
auffüllen
1 h bei 37 °C inkubieren

PCR (Standardansatz 50 µl)

5 µl 10 x Reaktionspuffer
MgSO₄ (Endkonzentration 1,5 mM)
1 µl cDNA-Erststrang (10⁻¹-fach verdünnt)
15 pmol Primer 1 (Endkonzentration 0,3 µM)
15 pmol Primer 2 (Endkonzentration 0,3 µM)
1 U Taq-Polymerase
mit sterilem H₂O auf 50 µl auffüllen

3.12.3 RACE-PCR

Bei der RACE (rapid amplification of cDNA ends) wird ein kleiner, bekannter Sequenzabschnitt innerhalb eines Gens genutzt, um die 3'-und 5'-Enden einer cDNA zu amplifizieren (Frohman et al., 1988). Diesen Sequenzabschnitt erhält man entweder durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines Proteins, durch homologe Sequenzbereiche innerhalb einer Genfamilie oder man bedient sich einer bereits experimentell ermittelten Teilsequenz des untersuchten Gens (Zhao et al., 1990). Für eine RACE-PCR des 3'-Endes wird zunächst eine cDNA-Erststrangsynthese mit einem Oligo(dT)-Primer durchgeführt an dessen 5'-Ende eine Adaptersequenz angefügt ist. Nachfolgend werden PCR-Reaktionen mit einem genspezifischen sense-Primer und dem Adapterprimer durchgeführt. Die Amplifikation spezifischer Produkte kann in Nachverstärkungen durch weitere, verschachtelt angeordnete genspezifische sense-Primer erhöht werden.

Bei der RACE-PCR des 5'-Endes wird zunächst eine cDNA-Erststrangsynthese mit einem genspezifischen antisense Primer durchgeführt und an das 3'-Ende des cDNA-Erststranges mit Hilfe einer Terminalen Transferase eine Homopolymersequenz, etwa von Adeninbasen, angefügt. Die PCR-Reaktionen werden dann mit einem zum Homopolymer komplementären Ankerprimer und verschachtelt angeordneten, genspezifischen antisense-Primern durchgeführt.

Die 5'-RACE PCR (Frohmann et al., 1988) ist eine Methode zur 5'-terminalen Sequenzerweiterung von cDNA-Teilfragmenten. Das hier vorgestellte Protokoll bezieht sich auf das 5' RACE-System der Firma Gibco ("5' RACE System for rapid amplification of cDNA ends"). Für die Reaktion wurden zunächst 5 µg Gesamt-RNA mit einem aus der bekannten Partialsequenz der cDNA abgeleiteten Oligonukleotid in Erststrang-cDNA umgeschrieben. Nach der Reaktion wurde verbliebene RNA mit RNase H hydrolysiert und der Ansatz für die nachfolgende Reaktion unter Verwendung der "GlassMAX DNA Isolation Spin Cartridge" der Firma Gibco aufgereinigt (Vogelstein und Gillespie 1979).

Im zweiten Schritt erfolgte ein Homopolymer-Tailing am 3'-Ende des spezifischen cDNA-Erststranges mit Desoxyadenosin-5'-Triphosphat (dATP). Anschließend wurde eine PCR (35 Zyklen) mit einem Oligo dT-Primer (UNIP 5) in Kombination mit dem für die Erststrangsynthese verwendeten spezifischen Primer durchgeführt. Der Oligo dT-Primer besitzt zusätzlich eine Adaptersequenz an die ein zweiter Primer (UNIP 6) binden kann. Zur Erhöhung der Spezifität erfolgten mehrere Nachverstärkung (35 Zyklen) aus dem PCR-Ansatz mit UNIP 6 und weiteren sequenzspezifischen, verschachtelt

angeordneten Oligonukleotiden. Amplifikationsprodukte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, aus GTG low melting Agarose aufgereinigt (3.6.7) und direkt sequenziert.

3.13 Genome Walking

Die Promotorregion des humanen NLP Gens wurde nach der Methode von Siebert et al. (1995) mit Hilfe des GenomeWalker Kits der Firma Clontech analysiert. Das Verfahren stellt eine Kombination aus einer Vektoretten-PCR (Riley et al., 1990) und einer Suppressions-PCR (Lukyanow et al., 1994) dar und ermöglicht die Charakterisierung unbekannter DNA-Bereiche, die an bereits sequenzierte Abschnitte angrenzen. Als Template der PCR-Reaktionen werden fünf verschiedene DNA-Libraries, die aus nicht klonierten, Adaptor-ligierten genomischen DNA-Fragmenten bestehen, eingesetzt. Zur Herstellung dieser DNA-Libraries wurde menschliche, chromosomale DNA mit den Restriktionsenzymen EcoRV, ScaI, DraI, PvuII und SspI hydrolysiert. Die erhaltenen DNA-Fragmente weisen glatte Enden auf, an die ein definierter Adaptor ligiert werden kann. Der Adaptor (Abb. 3.1) besitzt am 3'-Ende des unteren Stranges eine Aminogruppe. Diese blockiert die Extension des 3'-Endes der Adaptor-ligierten Fragmente und verhindert dadurch die Bildung einer Bindungsstelle für den Adaptorprimer AP1. Erst wenn in der PCR-Reaktion der genspezifische Primer verlängert wurde und die komplementäre Sequenz entstanden ist, kann der Primer AP1 an den Adaptor hybridisieren.

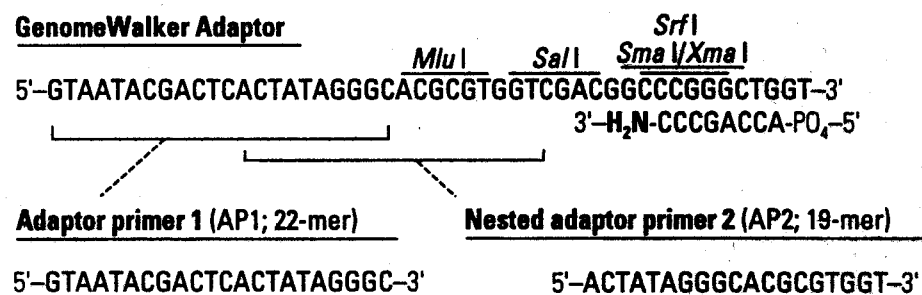


Abb. 3.1 Struktur des Genome Walker Adaptors und der Adaptorprimer AP1 und AP2.

Nach den Empfehlungen des Herstellers werden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt. Eine Vorverstärkung mit dem äußeren Adaptorprimer AP1 und einem genspezifischen Primer GSP1 sowie eine Nachverstärkung mit verschachtelten Primern (AP2/GSP2). Für die Amplifikation wird die Tth-DNA-Polymerase aus *Thermus thermophilus*

zusammen mit einer korrekturlesenden DNA-Polymerase verwendet (Perkin Elmer Gene Amp XL PCR Kit). Die Kombination aus zwei thermostabilen DNA-Polymerasen erhöht die Effektivität und die Präzision der PCR (Barnes, 1994; Cheng et al., 1994). Die PCR-Reaktionen werden mit zwei Temperatursegmenten je Zyklus durchgeführt.

Thermoprofil der Vorverstärkung (AP1/GSP1):

3min 94°C Initiale Denaturierung
7 Zyklen 25sec 94°C, 4min 72°C;
32 Zyklen 25sec 94°C, 4min 67°C
4min 67°C Finale Extension

Thermoprofil der Nachverstärkung (AP2/GSP2):

3min 94°C Initiale Denaturierung
5 Zyklen 25sec 94°C, 4min 72°C;
22 Zyklen 25sec 94°C, 4min 67°C
4min 67°C Finale Extension

3.14 Radiation Hybrid Mapping

Das Radiation Hybrid Mapping ist eine Methode, die man zur Kartierung des Humangenoms anwendet. Die Erstellung einer physikalischen Karte des menschlichen Genoms anhand dieser Technik wurde von Walter et al. (1994) beschrieben. Sie basiert auf der PCR-Analyse von somatischen Mensch-Nager-Hybridzellen. Eine Feinkartierung des hNLP Gens erfolgte unter Verwendung der kommerziell erhältlichen DNA der Mensch-Hamster-Hybridzellen des Genebridge 4 Radiation Hybrid Panel (Research Genetics, Huntsville, Alabama). Für die PCR-Reaktionen wurden je 25 ng denaturierte genomische DNA der 93 Hybrid-Zelllinien, der Donor- und der Rezipientenzelllinie mit hNLP-spezifischen Primerkombinationen in 50 µl-Ansätzen eingesetzt (dNTP-Endkonzentration 200 µM; Primer-Endkonzentration je 0,4 µM; 2 U Taq DNA Polymerase). Die Durchführung der PCR erfolgte nach einem Hot Start Protokoll mit insgesamt 35 Zyklen. Die Hybridisierungstemperaturen in den PCR-Reaktionen wurden der jeweiligen mittleren Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Primerkombinationen angepaßt. Je 15 µl der PCR-Ansätze sind im Anschluß an die Reaktion in einem 1,5 %igen Agarosegel analysiert worden.

4 Ergebnisse

4.1 Peptide Trapping

Im Rahmen des Peptide Trappings wurden zahlreiche Peptide aus dem Hämofiltrat nach einem standardisiertem Verfahren isoliert und anhand ihrer Masse und ihres Elutionsverhaltens charakterisiert. Diese Informationen werden in einer Datenbank gesammelt, um langfristig das komplexe Peptidgemisch des Hämofiltrats umfassend beschreiben zu können. Eine Auswahl der aus HF (Pool 6) isolierten Peptide zeigt die Tab. 4.1. Unter den isolierten Peptiden befinden sich Fragmente von Plasmaproteinen (z.B. Albumin, Fibrinogen, Serum Amyloid A Protein), Enzymen (Cystatin C, Carboxypeptidase N), Wachstumsfaktoren (IGF I, IGF II, PDGF) und Complementfaktoren (C3F, Anaphylatoxin). Ein Peptid aus dieser Liste, das mit dem Laborkürzel hNLP bezeichnet wird, ist bisher in keiner Protein-Datenbank (Swissprot, PIR) eingetragen und ist daher als unbekannt einzustufen.

Tab. 4.1 Auswahl einiger Peptide, die aus Hämofiltrat (Pool 6) isoliert wurden.

| Name | theo av. mass | pI calc. | Sequenz |
|--|------------------|----------|--|
| Complement C3 (prec.1304-1313) | 1264.5 | 11.6 | SSKITHRIHW |
| Complement C3 prec. 1304-1320, Fragment C3F | 2021.3 | 11.5 | SSKITHRIHWESASLLR |
| Compl. D 207-218 (prec.226-237) CFAD | 1382.6 | 10.9 | KKPGIYTRVAS Y |
| Complement C4 prec. 680-755 C4A Anaphylatoxin. | 8601.9 | 9.6 | NVNFQKAIN EKL GQYASPTAK RCCQDGVTRL P M M R S C E Q R A ARVQQPDCRE P F L S C C Q F A E S LRKKS R D K G Q A G L Q |
| ProIGF Ia 123-153 C-term. Peptid | 3555.0 | 11.3 | AQRHTDMPKTQKEVHLKNAS RGSAGNKNYRM |
| IGF II prec. 149-160 (C-term. von IGF II) | 1493.8 | 12.2 | FREAKRHRPLIA |
| PDGF prec. 61-81 | 3041.6 | 12.7 | TSLRAHGVHATKHVPEKR |

| | | | |
|---|--------|------|---|
| Fib B prec. 42-75 | 3678.2 | 11.9 | SARGHRPLDKKREEAPSLRPA PPPISGGGYRARP |
| Fib B prec. 42-78 | 3948.5 | 11.9 | SARGHRPLDKKREEAPSLRPA PPPISGGGYRARPAKA |
| Fib B prec. 42-82 | 4319.9 | 11.9 | SARGHRPLDKKREEAPSLRPA PPPISGGGYRARPAKAAATQ |
| Fib B prec. 39-51 | 1487.7 | 11.5 | GFFSARGHRPLDK |
| Albumin prec. 450-456 | 892.1 | 10.9 | LLVRYTK |
| Cystatin C prec.92-120 | 3377.9 | 8.7 | VELFLDVELGRITTXTKTQPNL DNCPFHDQPHLKRK |
| Carboxypeptidase N prec. 434-458 C-term. von SCPN | 2897.1 | 11.6 | GVRKAVQPQARKKEMEMRQ LQRGPA |
| SAA prec. 103-122 C.-term. | 2312.6 | 10.5 | WGRSGKDPNHFRPAGLPEKY |
| hNLP | 3766.4 | 8.6 | GVSLRPIGASCRDDSECITRLC RKRRCSLSVAQE |

4.1.1 Isolierung und Strukturaufklärung von hNLP

Das Peptid hNLP mit der relativen Molekülmasse von 3762 Da ist durch die folgenden chromatographischen Schritte aus dem Hämofiltrat isoliert worden (Abb. 4.1):

1. Peptid-Extraktion mit dem Kationenaustauscher Fraktogel TSK SP-650 (M) aus 2500 l Hämofiltrat

2. pH-Stufenelution am Kationenaustauscher Fraktogel TSK SP-650 (M)

Durch die Stufenelution mit Puffern von ansteigenden pH-Werten werden die Peptide des Hämofiltrats nach ihrem Ladungsmuster und ihrem isoelektrischen Punkt in sieben Pools unterteilt. Pool 1 enthält vorwiegend saure Peptide, Pool 7 entsprechend die basischen Peptide.

3. Präparative Reverse Phase Chromatographie von Pool 6 auf einer Fineline Säule mit einer Matrix aus Source 15 RPC

Durchgeführt wurde die präparative Chromatographie mit der BioCAD 250 Workstation. Als Puffer wurden 10 mM HCl (Puffer A) und 80% (v/v) Acetonitril in 10 mM HCl (Puffer B) verwendet. Die gebundenen Peptide wurden im Gradienten (von 0 auf 60% Puffer B in 55 min, von 60 auf 95% in 5 min) eluiert. Jeweils 30 Fraktionen mit 300 ml wurden gesammelt und anschließend lyophilisiert.

4. Semi-Präparative Kationenaustauschchromatographie mit einer selbstgepackten Säule aus Parcosil Prokat Material

Durchgeführt wurde die präparative Chromatographie mit einer BioCAD Workstation. Von der Fraktion 12 wurden 100 mg auf die Säule aufgetragen. Die Säule wird mit Puffer A (25 mM NaAcetat, 25 mM HAcetat pH 4,5) gespült und die gebundenen Peptide mit Puffer B (1,0 M NaCl, 25 mM NaAcetat, 25 mM HAcetat pH 4,5) im Gradienten (von 0 auf 100% B in 42 min) eluiert. Jeweils 42 Fraktionen mit 10 ml wurden gesammelt.

5. Analytische Reverse Phase Chromatographie mit einer VYDAC-RP-C18 Säule

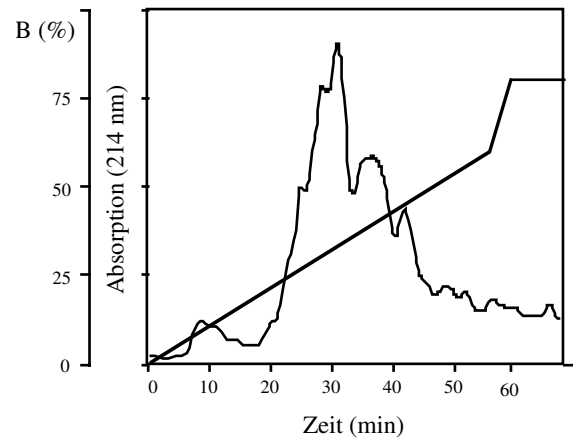
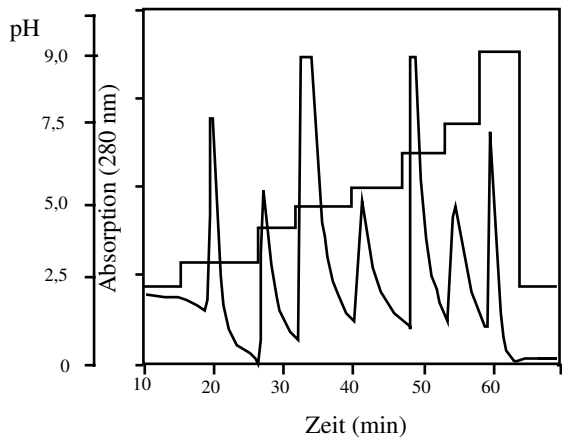
Von der Fraktion 16 wurden 10 ml mit Puffer A (0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure) verdünnt, aufgetragen, und die Säule mit Puffer A gespült. Die gebundenen Peptide wurden mit Puffer B (100 % (v/v) Acetonitril, 0,1% TFA) im Gradienten (von 0 auf 60% B in 55 min, von 60 auf 80% B in 5 min) eluiert. Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt.

6. Analytische Kationenaustauschchromatographie mit einer selbstgepackten Säule aus Parcosil Pepkat Material

Nach dem Auftrag der Fraktion 29 wurde die Säule mit Puffer A (25 mM Na₂HPO₄, pH 3,0) gespült und die gebundenen Peptide mit Puffer B (1,0 M NaCl, 25 mM Na₂HPO₄, pH 3,0) im Gradienten eluiert. Die Fraktionen wurden manuell gesammelt.

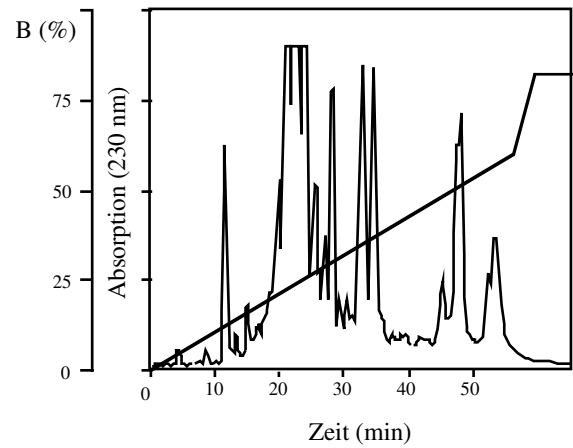
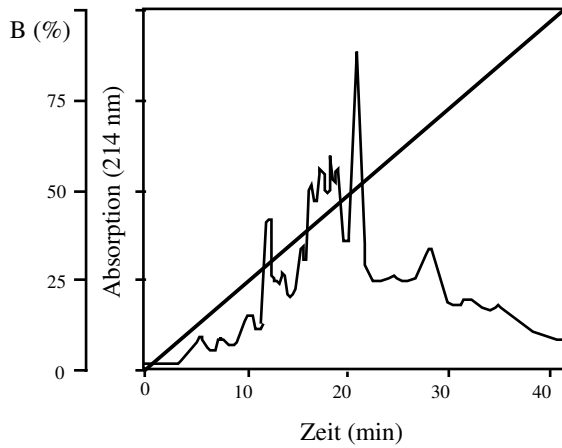
7. Entsalzen der Fraktionen durch RP C4 Chromatographie

In der Fraktion 7 ist das hNLP enthalten.



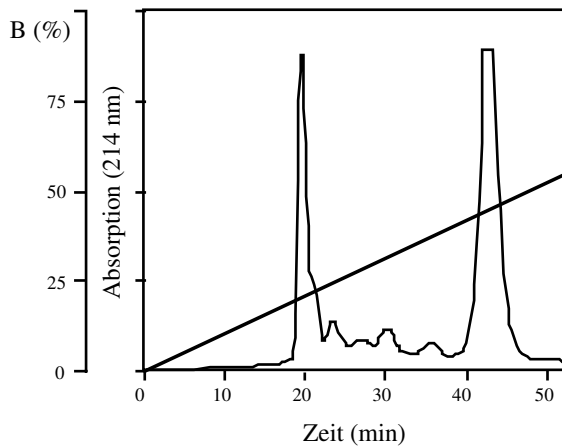
pH-Stufenelution

Präparative RP Chromatographie



Semi-Präparative Kationenaustausch Chromatographie

Analytische RP Chromatographie



Analytische Kationenaustausch Chromatographie

Abb. 4.1 Aufreinigung von hNLP aus humanem Hämofiltrat.

4.1.2 Kapillarzonenelektrophorese

Um die Reinheit des isolierten Peptids zu überprüfen, wurde eine Kapillarzonenelektrophorese (CZE) durchgeführt. Die Kapillarzonenelektrophorese ist ein hochauflösendes, schnelles analytisches Verfahren zur Trennung von Bio- und Makromolekülen (Krull und Mazzeo, 1992). Bei der CZE wird eine Hochspannung an eine mit Puffer gefüllte Kapillare angelegt. In diesem elektrischen Feld werden die Peptide nach ihrer Ladung und ihrer Masse getrennt.

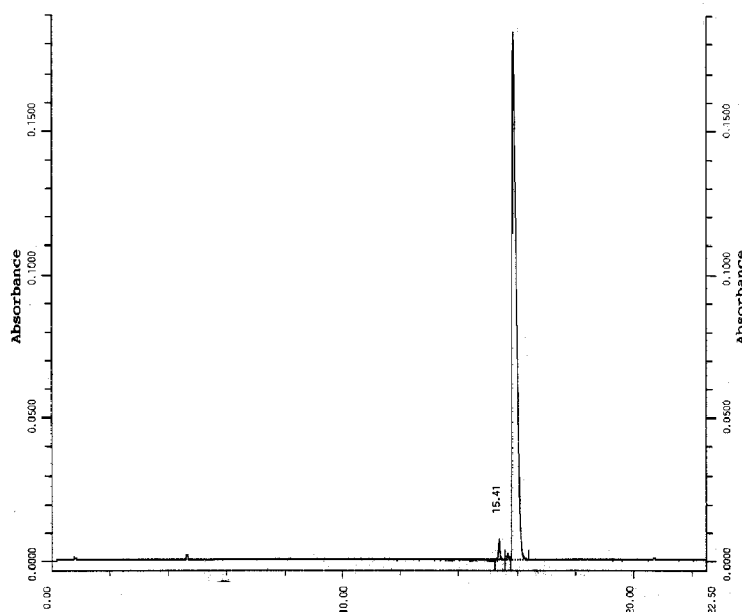


Abb. 4.2 Elektropherogramm des aufgereinigten Peptids.

Die Kapillarzonenelektrophorese wies eine Homogenität der Probe von mehr als 95% aus.

4.1.3 Massenspektrometrie

Durch Elektrospray-Massenspektrometrie wurde die Masse des Peptids bestimmt. Das ES/MS wurde im Positiv-Modus betrieben, d.h. das bei der Messung vorwiegend positiv geladene Moleküle der Probensubstanz erzeugt werden. Das Spektrum (Abb 4.3) zeigt die Massen der mehrfach geladenen Ionen des Peptids. Aus der Ionenserie kann die Masse des hNLPs ermittelt werden, sie beträgt 3762.1 Da.

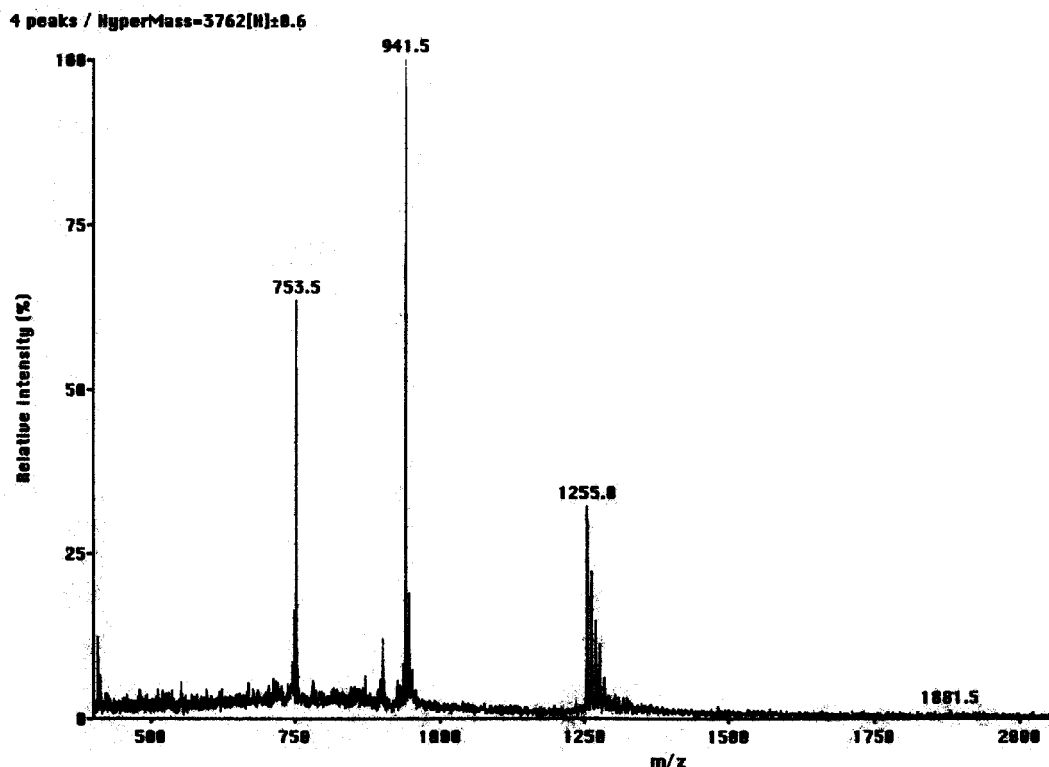


Abb. 4.3 Massenspektrum von NLP.

Das Spektrum setzt sich zusammen aus den Masse/Ladungsquotienten des zweifach (753,5), dreifach (941,5), vierfach (1255,0) und fünffach (1882,0) protonierten Peptids. Aus diesen Meßwerten wird durch die Auswertungssoftware das kleinste gemeinsame Vielfache (kgV) errechnet. Das kgV entspricht der Molekularmasse der Probe.

4.1.4 Analyse der Primärstruktur und der Kettenkonformation (Disulfidbrücken)

Für den Edman-Abbau mit einem Gasphasen-Sequenator wurden 50-100 pmol Peptid eingesetzt. Es konnten 34 Aminosäuren mit der folgenden Sequenz ermittelt werden:

GVSLRPIGASCRDDSECITRLCRKRRCSLSVAQE

Aus der Sequenz ist zu entnehmen, daß es sich beim hNLP um ein cysteinreiches, basisches Peptid ($pI= 8,6$) handelt. Cysteine haben statistisch betrachtet einen relativen Anteil von 2,8% an der Aminosäurezusammensetzung durchschnittlicher Proteine (Klapper, 1977). Damit ist der Cysteinanteil des hNLPs mit 11,8% (4 Cysteinreste von 34 AS) auffallend hoch.

Die Differenz zwischen der theoretischen Masse 3766,4 und der mit Hilfe des ES/MS gemessenen Masse 3762,1 ist auf zwei Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten zurückzuführen. Bei vier Cysteinresten sind drei Anordnungen der Disulfidbrücken denkbar (Abb. 4.4).

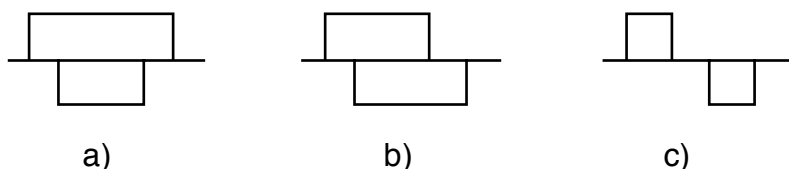


Abb. 4.4 Verknüpfungsmöglichkeiten der Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste.

Die Anordnung der Disulfidbrücken wurde durch tryptischen Verdau des Peptids und anschließende LC/MS-Messung der erhaltenen Fragmente aufgeklärt. In der Abbildung 4.5 ist das Total Ionenstrom Chromatogramm (TIC) des tryptischen Verdau dargestellt.

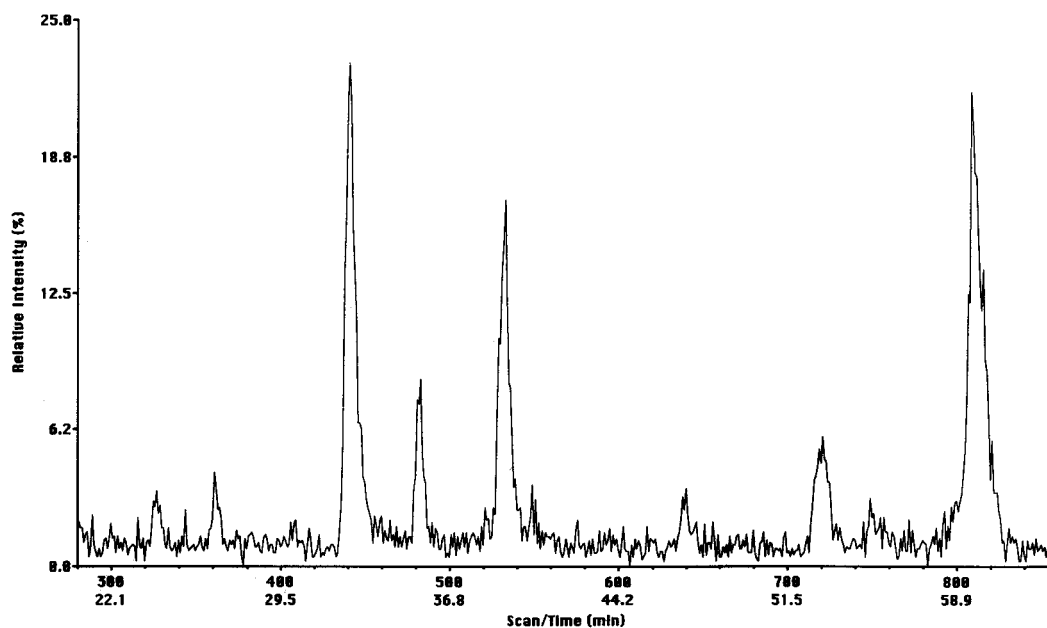


Abb. 4.5 TIC des tryptischen Verdau von NLP.

Die Serinprotease Trypsin spaltet Peptidbindungen spezifisch hinter den basischen Aminosäureresten Arginin und Lysin. Befindet sich der basische Aminosäurerest vor einem Prolinrest verläuft die Hydrolyse nur sehr langsam. Durch den tryptischen Verdau von NLP sind zwei Hauptfragmente mit einer Masse von 1603 Da (Fragment A) und

1771 Da (Fragment B) entstanden. Es kann sich dabei nur um die folgenden Spaltprodukte handeln :

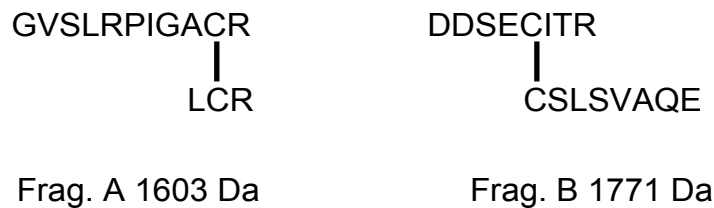


Abb. 4.6 Tryptische Fragmente des NLPs

Demnach liegt eine verschachtelte Anordnung der Disulfidbrücken im NLP vor, wie schematisch in Abb. 4.4 b dargestellt. Beim proteolytischen Verdau entstanden in geringem Maße Nebenprodukte, die auf Umlagerungen von Disulfidbrücken im alkalischen Milieu zurückzuführen sind.

4.1.5 Datenbankrecherche

Ein Datenbankvergleich mit Hilfe des BLAST-Algorithmus an den Swissprot-, PIR-, EMBL-Nukleinsäure- und GenBank-Datenbanken ergab, daß ein bisher unbekanntes Peptid isoliert worden war. Ferner wurde keine signifikante Sequenzhomologie zu Mitgliedern von bekannten Peptidfamilien gefunden.

Mit dem Sequenzanalyseprogramm Prosite wurde das Peptid nach Motiven und Domänen wie z.B. Glycosylierungssignalen, Phosphorylierungsstellen und Bindungsdomänen für Rezeptoren untersucht. Diese Sequenzanalyse gibt häufig einen ersten Hinweis zur Funktion des unbekanntes Peptids (Doolittle, 1986; Lesk, 1988). Das Ergebnis dieser Suche ist in Tab. 4.2 dargestellt.

Tab.4.2 Prosite Pattern Analyse.

1. cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase Phosphorylierungssignal

Position 25-28 Motiv RRCS

2. Proteinkinase C Phosphorylierungssignal

Position 3-5 Motiv SLR

Position 10-12 Motiv SCR

Das isolierte Peptid zeigt keine derartige posttranslationale Modifikation. Vermutlich wird das Peptid in vivo nicht phosphoryliert, da es sich bei den angegebenen Proteinkinasen um intrazelluläre Enzyme handelt, mit denen das zirkulierende Peptid nicht in Kontakt gerät.

Eine Datenbankrecherche in der dbEST (Database of Expressed Sequence Tags), die eine Sammlung von Teilsequenzen aus cDNA-Clonen (Boguski et al., 1993, Boguski und Schuler 1995) darstellt, lieferte drei humane EST-Clone und zwei murine EST-Clone mit entsprechender Homologie (Tab. 4.3). ESTs werden zur Entdeckung neuer humaner Gene, der Kartierung des humanen Genoms und zur Identifizierung von codierenden Regionen in genomischen Sequenzen verwendet (Adams et al., 1991). Diese EST-Clone können vom IMAGE-Konsortium (integrated molecular analysis of gene expression) gegen eine geringe Gebühr bezogen werden. Das IMAGE-Konsortium beschäftigt sich vor allem mit der Sequenzierung von EST-Clonen sowie deren Kartierung und leistet so einen wertvollen Beitrag zum Human Genome Project (Lennon, 1996).

Tab. 4.3 Homologe EST-Clone

| cDNA clone | Spezies | Library |
|--|--------------|---------------------------------|
| T60528 Hepatectomy from normal 49 year old male caucasian | Homo sapiens | Stratagene, adult liver |
| T82264 Liver and spleen from a 20 week post-conception male fetus | Homo sapiens | Soares fetal liver/spleen 1NFLS |
| T84493 Liver and spleen from a 20 week post-conception male fetus | Homo sapiens | Soares fetal liver/spleen 1NFLS |
| W29825 Dev-stage 19 weeks | Mus musculus | Soares mouse p3NmF19.5 |
| W82161 Dev-stage 13.5-14.5 dpc total fetus, strain C57BL/6 | Mus musculus | Soares mouse embryo NbME |

4.1.6 Isolierung weiterer Molekülformen des NLPs

Im Verlauf der Arbeit wurden noch ein längeres und ein kürzeres Fragment des NLPs aus dem Hämofiltrat isoliert. Unabhängig von diesem Projekt gelang es ein weiteres Fragment des NLPs aus humanem Urin gesunder Probanden aufzureinigen (Heine, Mitarbeiterin des IPF, pers. Mitteilung). Dabei könnte es sich um ein Abbauprodukt des NLPs handeln, das mit dem Urin aus dem Körper ausgeschieden wird.

Zur Vollständigkeit werden an dieser Stelle alle Fragmente des NLPs, die bisher aus Körperflüssigkeiten isoliert wurden, aufgelistet:

1. NLP-Fragmente im Hämofiltrat

| Sequenz | Name | Länge |
|---|---------|-------|
| TPFWRGVSLRPIGASCRDDSECITRLCRKRRCSLSVAQE | HF 4451 | 39 AS |
| GVSLRPIGASCRDDSECITRLCRKRRCSLSVAQE | HF 3762 | 34 AS |
| RPIGASCRDDSECITRLCRKRRCSLSVAQE | HF 3406 | 30 AS |

2. NLP-Fragment im Urin

| Sequenz | Name | Länge |
|--------------------|--------|-------|
| GVSLRPIGASCRDDSECI | U 1877 | 18 AS |

Die Namen der Fragmente setzen sich zusammen aus der Abkürzung der Ausgangsquelle (HF = Hämofiltrat, U = Urin) und der Molekularmasse des Peptids.

4.2 Sequenzierung der humanen und der murinen NLP cDNA

4.2.1 Humane cDNA

Zur Bestimmung der cDNA-Sequenz des NLPs wurden die in Tab 3.3 aufgelisteten EST-Clone in Kultur genommen, die Plasmide aus den Bakterienzellen isoliert und anschließend mit den vektorständigen Primern T3 und T7 sequenziert. Aus den überlappenden Sequenzen der EST-Clone T82264, T60528, T84493 konnte die vollständige humane cDNA-Sequenz des NLPs zusammengestellt werden (Abb 4.7). Die vollständige cDNA hat eine Länge von 512 Basenpaaren und codiert für ein Polypeptid aus 77 Aminosäuren. Aus der Nukleotidsequenz der cDNA des hNLPs ist zu entnehmen, daß es sich bei dem isolierten Peptid HF 3762 um ein C-terminales Fragment

eines größeren Vorläufermoleküls handeln muß; denn der zugehörige Open Reading Frame beginnt strangaufwärts mit dem Startcodon ATG.

Die cDNA enthält im 3'UTR (3' nichttranslatierte Region) das Polyadenylierungssignal ATTTAAA. Diese Hexanukleotidfolge befindet sich 12 Nucleotide vor der poly(A)-Stelle.

```

-----ALPHA----->
          M W H L K L C A V
TC AGG CTC CAA CAT CCT CCC CCT GTC AAG ATG TGG CAC CTC AAA CTT TGT GCA GTC
                                                                56

-----BKL1-----
L M I F L L L L G Q I D G S P I P E V S
CTC ATG ATC TTC CTG TTG CTG TTG GGC CAG ATA GAT GGC TCC CCA ATA CCA GAA GTG AGT
                                                                116

---->
<-----
S A K R R P R R M T P F W R G V S L R P
TCG GCA AAG AGA AGG CCA CGG AGA ATG ACC CCA TTT TGG AGA GGG GTT TCC CTC AGG CCT
                                                                176

---BKL4-----
I G A S C R D D S E C I T R L C R K R R
ATT GGA GCC TCC TGC CGG GAT GAT TCT GAG TGT ATC ACA AGG CTA TGC AGA AAA AGA CGC
                                                                236

<-----BKL3-----
<-----
C S L S V A Q E Ter
TGT TCC TTA AGT GTG GCC CAG GAA TGA TGT ACA TAC CAG GGA AAG AAA GGA CAG CAG TCA
                                                                296

---BKL2-----
CCT CCG ACA ATG CTC CGT TCT ATG GAA TAT TGA TTA ACT GCA TTT TGG CTG GAG ACA CCC
                                                                356

AAG TGA AGC AAT CTT GTA TTT TTA ATA TTT AAA GGC AGA TGT ACG CTT TAA ATT GGT CTC
                                                                416

CAT TTC TTC TTA GAA TGT TGA TAT ATG GAT AAG CAT AAC TAA ACT TGT CAA TTT AGA GTT
                                                                476

Poly(A)Signal

TAT TTT TCT ATG GAT ACT ATT AAA TGT CTC AAA TTG
                                                                512

```

Abb. 4.7 Nukleotidsequenz der humanen NLP cDNA. Die cDNA besteht aus 512 Nucleotiden und codiert für ein 77 Aminosäuren langes Polypeptid. Der C-terminale Bereich dieses Polypeptides stimmt mit der Aminosäuresequenz des aus Hämofiltrat isolierten HF 3762 überein. Dieser Abschnitt ist kursiv dargestellt.

Länge des Open Reading Frame: 234 bp

4.2.2 Murine cDNA

Aus den Sequenzierungen der EST-Clone W82161 und W29825 konnte die murine cDNA erhalten werden, die in Abb. 4.8 dargestellt ist. Sie umfaßt den vollständigen Open Reading Frame, der für ein Polypeptid aus 76 Aminosäuren codiert. In der Sequenz des 3'-UTR ist kein klassisches Polyadenylierungssignal vorhanden.

```

                                     -----MS2----->
GT CGG TCT ATA AAA GGA AAC GGG AAC TGC CCC CTG GCT TTC AGA CTC CAA CAT CAT
                                     56
      M  L  Q  L  K  L  F  A  V  L  L  T  C  L  L  L
TCT TTT GCC AAG ATG CTA CAG CTA AAA CTC TTT GCA GTG CTC CTG ACT TGC CTG CTG CTG
                                     116
L  G  Q  V  N  S  S  P  V  P  E  V  S  S  A  K  R  S  R  R
CTG GGT CAG GTC AAT AGT TCC CCA GTA CCA GAA GTG AGT TCA GCA AAG AGA TCC CGG AGA
                                     176
M  T  P  F  W  R  G  V  S  L  R  P  I  G  A  S  C  R  D  D
ATG ACC CCA TTT TGG AGA GGG GTT TCC CTC AGG CCC ATT GGT GCC TCG TGC CGG GAT GAC
                                     236
S  E  C  I  T  R  L  C  R  K  R  R  C  S  L  S  V  A  Q  E
TCT GAG TGT ATC ACA AGA CTA TGC AGA AAA AGA CGC TGT TCC CTA AGT GTG GCC CAG GAG
                                     296

Ter
TGA TGT CCA TAC TGG GGA AGA GTC ACC TCC AAC AGT GAT CTG TTC TGG GGA ATA TTG TTA
                                     356

<-----MA2-----
ACG ACA TTT TGG TTG GAG ATA GAT AAG TGA AGT AGT CTT TGT TTT TAA TAT TTA AAG ACG
                                     416

GAT ACT TGC TTT A
                                     429

```

Abb. 4.8 Nukleotidsequenz der murinen NLP cDNA. Die Sequenz besteht aus 429 Nukleotiden und codiert im ersten offenen Leseraster für ein Polypeptid aus 76 Aminosäuren.

4.2.3 5'RACE der humanen cDNA des NLPs

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem in Abb. 4.7 gezeigten Open Reading Frame (ORF) tatsächlich um die vollständige humane cDNA-Sequenz des NLPs handelt, wurde unter Anwendung der RACE-PCR (3.12.3) das 5'-Ende der cDNA amplifiziert und

direkt sequenziert. Bei der RACE-PCR nutzt man einen kleinen bekannten Sequenzbereich innerhalb eines Gens, um das 3'-Ende oder das 5'-Ende einer cDNA zu amplifizieren. Dazu wurde Gesamt RNA aus humaner Leber isoliert und mit dem genspezifischen Antisense-Primer BKL2 eine cDNA-Erststrangsynthese durchgeführt. Die cDNA-Erststränge wurden aufgereinigt und anschließend beim Homopolymertailing an ihrem 3'-Ende mit Hilfe der Terminalen Transferase mit dATP verlängert. Danach erfolgte die Amplifikation des 5'-Bereiches durch eine sequentielle PCR mit verschachtelten Primern. Durch den Einsatz von verschachtelten Primern läßt sich die Effektivität des Verfahrens deutlich steigern, da so unspezifische Amplifizierungen verringert werden und ein vergleichsweise reines spezifisches Produkt entsteht. Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Touchdown (Don et al., 1991) Protokoll durchgeführt:

3min 95°C Initiale Denaturierung;
5 Zyklen 20sec 95°C, 20 sec 50°C, 1min 72°C;
30 Zyklen 20sec 95°C, 20 sec 45°C, 1min 72°C;
10min 72°C Finale Extension.

Es konnte ein Amplifikationsprodukt mit der Primerkombination BKL3/UNIP6 mit einer Produktgröße von ca. 310 Basenpaaren und ein weiteres Amplifikationsprodukt mit der Primerkombination BKL4/UNIP6 mit einer Produktgröße von ca. 220 Basenpaaren isoliert und sequenziert werden (Abb. 4.9). Die Sequenzen der PCR-Produkte bestätigten, daß es sich bei dem ATG-Codon in Abb. 4.7 an der Position 30-33 um das Startcodon des ORF handelt und somit die Abb. 4.7 die vollständige cDNA Sequenz zeigt.

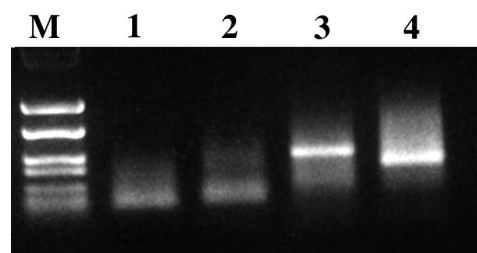


Abb 4.9 Gelelektrophorese der 5'RACE Amplifikationsprodukte.

M: Marker pUC18/Sau3A (943 bp, 585 bp, 341 bp, 258 bp, 153 bp, 105 bp)

Bahn 1: Vorverstärkung mit der Primerkombination BKL2/UNIP5

Bahn 2: Erste Nachverstärkung mit der Primerkombination BKL2/UNIP6

Bahn 3: Zweite Nachverstärkung mit der Primerkombination BKL3/UNIP6

Bahn 4: Dritte Nachverstärkung mit der Primerkombination BKL4/UNIP6

Durch die Nachverstärkungen können spezifische PCR-Produkte des 5'-Terminus der hNLP cDNA erhalten werden (distinkte Banden in Bahn 3 und Bahn 4). Die Positionen der genspezifischen Antisense-Primer BKL2, BKL3 und BKL4 können aus der Abb. 4.7 entnommen werden. Der Oligo dT-Primer UNIP 5 besitzt zusätzlich eine Adaptersequenz an die ein zweiter Primer (UNIP 6) binden kann.

4.3 Gewebeverteilung des NLPs

4.3.1 RT-PCR Analyse

Um das Expressionsmuster des Peptids zu bestimmen, wurde RNA aus verschiedenen humanen Geweben nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) isoliert. Ausgehend von den mRNAs erfolgte die cDNA Erststrangsynthese (3.12.2) mit Hilfe von Oligo dT Primern und Reverser Transkriptase. Die cDNA Erststränge wurden dann für PCR-Analysen als Matrizen verwendet. Die spezifischen Primer BKL1 und BKL2 wurden hierzu aus der Nukleotidsequenz der humanen cDNA abgeleitet (Primerposition siehe Abb. 4.7). Jeweils 10 µl der PCR Reaktionen wurden in einem 1% Agarosegel analysiert. Die RT-PCR Experimente zeigen, daß das Peptid in der Lunge, Leber, Niere, Blase und im Darm gebildet wird (Abb. 4.10). Weitere RT-PCR Experimente ergaben, daß das Peptid sowohl in allen Dünndarmabschnitten (Duodenum, Jejunum, Ileum) als auch im Dickdarm in geringerem Maße gebildet wird.

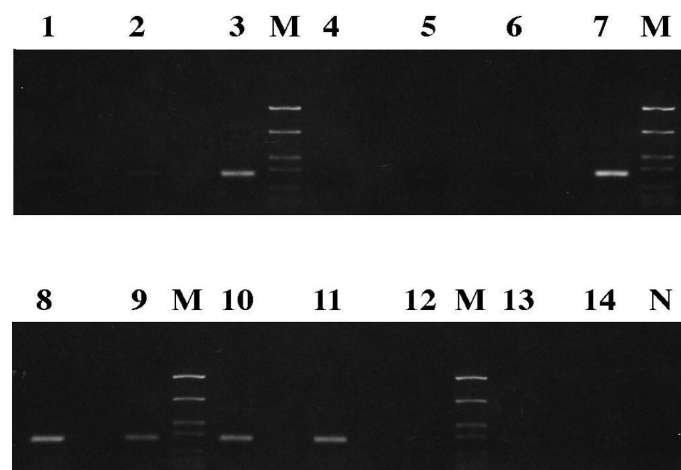


Abb. 4.10 Gelelektrophorese der Amplifikationsprodukte der RT-PCR.

Bahnen 1: Parotis, 2: Tonsillen, 3: Lunge, 4: Herz, 5: Magen, 6: Pancreas, 7: Leber, 8: Gallenblase, 9: Colon, 10: Blase, 11: Niere, 12: Corpus Cavernosum, 13: Vagina, 14: Nebenniere, N: Negativkontrolle. Als Marker wurde pUC18/Sau3A eingesetzt.

Für die Amplifikation wurde die Primerkombination BKL1/BKL2 verwendet. Thermoprofil: 3min 95°C Initiale Denaturierung; 35 Zyklen 20sec 95°C, 20sec 55°C, 1min 72°C; 10min 72°C Finale Extension.

Durch die RT-PCR konnte gezeigt werden, daß das NLP gewebespezifisch exprimiert wird. In den PCR-Reaktionen mit cDNA-Erststrängen aus Lunge, Leber, Niere, Blase und Darm als Template wird ein einheitliches Produkt (ca. 220 bp) gebildet.

4.3.2 Northern-Blot

Zur Untersuchung der humanen Gewebeverteilung der NLP-Genexpression wurden Multiple Tissue Northern (MTN) Blots der Firma Clontech mit einer NLP-spezifischen Gensonde hybridisiert. Jede Bahn eines MTN Blots enthält ca. 2 µg gereinigter poly A⁺ RNA eines bestimmten menschlichen Gewebes. Die RNA wurde elektrophoretisch in einem denaturierenden Formaldehyd / 1,2% igen Agarose Gel getrennt und anschließend auf eine positiv geladene Nylonmembran geblotet. Die MTN Blots eignen sich zur Hybridisierung sowohl mit radioaktiv als auch mit nichtradioaktiv markierten Sonden.

Als Gensonde wurde ein radioaktiv markiertes PCR-Produkt verwendet. Aus dem EST-Clon T60528 wurde ein 296 bp großes Fragment der humanen NLP cDNA mit der Primerkombination ALPHA1/BKL2 amplifiziert, durch Gelelektrophorese und Phenolextraktion gereinigt und anschließend durch random primed labelling radioaktiv markiert.

Die Hybridisierung der Northern Blots mit dieser Sonde erfolgte unter hochstringenten Bedingungen. Die Autoradiogramme in Abb. 4.11 und 4.12 zeigen den Nachweis eines ca. 0,7 kb großen Transkripts in Leber, Niere und im Dünndarm. Dieses Transkript entspricht unter der Berücksichtigung, daß eukaryontische mRNAs am 3'-Ende einen Poly (A)-Schwanz von durchschnittlich 150-250 Adeninresten besitzen, der cDNA des hNLPs. Desweiteren wird deutlich, daß das hNLP vor allem in der Leber gebildet wird. Es konnten außerdem noch zwei längere Transkripte (ca. 2,0 und 4,2 kb) in diesen Geweben nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich entweder um Alternative Spleißprodukte oder um Transkripte von homologen Proteinen. Danach sind im ersten Fall weitere Exons vorhanden, aus denen durch Exon-Shuffling längere Transkripte gebildet werden können. Im zweiten Fall würde das hNLP ein Mitglied einer Proteinfamilie darstellen.

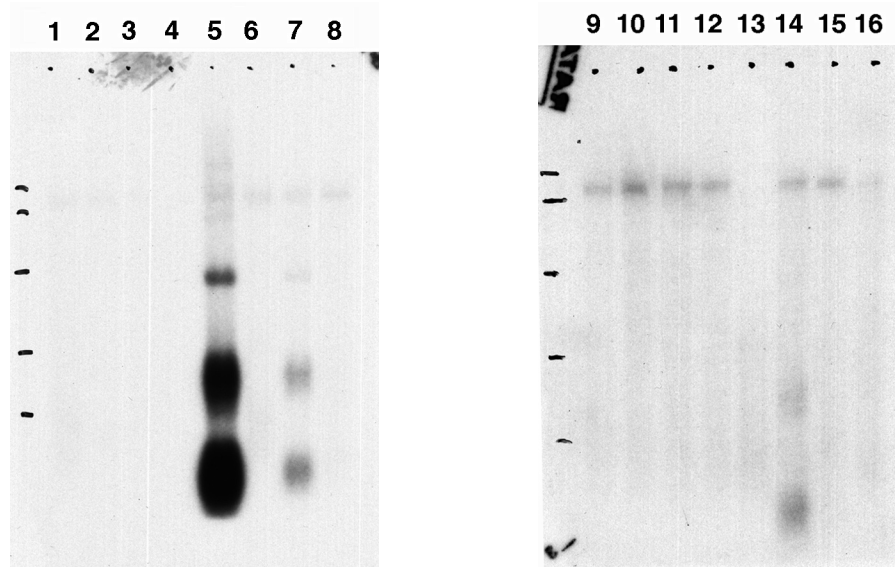


Abb. 4.11 Northern Blot Analyse der hNLP Genexpression.

Dargestellt sind die Autoradiogramm der MTN Blots I und II nach Hybridisierung mit einer hNLP-spezifischen Sonde. Die Northern Blots enthalten poly A⁺ RNAs aus folgenden menschlichen Geweben: 1 Herz, 2 Gehirn, 3 Placenta, 4 Lunge, 5 Leber, 6 Skelett Muskel, 7 Niere, 8 Pancreas und 9 Milz, 10 Thymus, 11 Prostata, 12 Hoden, 13 Ovar, 14 Dünndarm, 15 Colon (Mucosa), 16 Leukocyten.

Um die NLP-Genexpression bei unterschiedlichen Spezies miteinander vergleichen zu können, wurde zunächst aus verschiedenen Geweben der Maus die Gesamt-RNA nach der Methode von Chomcynski und Sacchi (1987) isoliert. Von jedem Gewebe wurden ca. 20 µg Gesamt-RNA elektrophoretisch in einem denaturierenden Formaldehyd / 1,2% igen Agarose Gel getrennt und anschließend auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺) geblottet.

Als Sonde wurde ein radioaktiv markiertes PCR-Produkt verwendet. Aus dem EST-Clon W82161 wurde ein 367 bp großes Fragment der murinen NLP cDNA mit der Primerkombination MS2/MA2 amplifiziert, durch Gelelektrophorese und Phenolextraktion gereinigt und anschließend durch random primed labelling radioaktiv markiert.

Die Hybridisierung des Northern Blots mit dieser Sonde erfolgte unter hochstringenten Bedingungen. Auf diese Weise konnte ein etwa 0,7 kb großes Transkript im Duodenum, Ileum, Jejunum und in der Leber nachgewiesen werden (Abb. 4.12). Demnach müßte die vollständige cDNA des murinen NLPs eine Größe von etwa 0,5 kb haben.

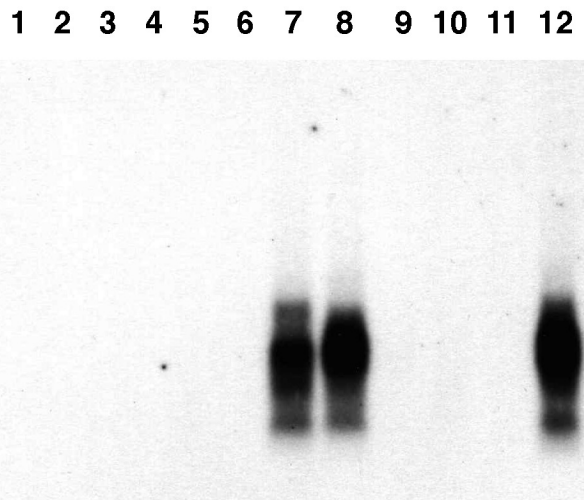


Abb. 4.12 Northern Blot Analyse der mNLP Genexpression.

Dargestellt ist das Autoradiogramm des Northern Blots nach Hybridisierung mit einer mNLP-spezifischen Sonde. Der Northern Blot enthält Gesamt-RNAs aus folgenden Geweben der Maus: 1 Nebenniere, 2 Gehirn, 3 Magen, 4 Skelett Muskel, 5 Lunge, 6 Speicheldrüse, 7 Duodenum, 8 Ileum / Jejunum, 9 Colon, 10 Thymus, 11 Niere, 12 Leber.

4.4 Klonierung und Sequenzierung des humanen NLP-Gens

Die PCR mit chromosomaler DNA dient zur Amplifikation von Teilbereichen eines Gens. Sofern die Größe des Gens die Kapazität der Polymerase nicht überschreitet, kann auch ein komplettes Gen amplifiziert werden. Ist das Gen zu groß, besteht die Möglichkeit das gesamte Gen in Form von überlappenden Subklonen zu amplifizieren. Gegenüber dem herkömmlichen Durchmustern einer Genbank bietet diese Methode den Vorteil, daß sie wesentlich schneller ist. Mit dieser Methode können wichtige Informationen, wie beispielsweise die Lokalisation und Länge von Introns eines Gens, gewonnen werden. Die Grundvoraussetzung für ein solches Experiment ist eine partielle Sequenzinformation.

Aus der Nukleotidsequenz der humanen NLP cDNA wurden Primer für eine genomische PCR abgeleitet. Als Matrize diente chromosomale DNA, die aus menschlichen Leukozyten isoliert worden ist. Zur Amplifikation der genomischen Fragmente wurde die Pfu-DNA-Polymerase verwendet. Die Pfu-DNA-Polymerase aus dem thermophilen marinen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* besitzt sowohl eine

5'→3' DNA Polymeraseaktivität als auch eine 3'→5' Exonuclease-Proofreading-Aktivität. Die 3'→5' Exonucleaseaktivität steigert die Präzision der DNA-Synthese, da sie am 3'-Ende falsch angeheftete und gepaarte Nucleotide entfernt und an deren Stelle das richtige Nucleotid einsetzt. Um die Bildung von unspezifischen Nebenprodukten zu minimieren, wurde eine Hot Start PCR (D' Aquila et al., 1991) nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

5min 95°C Initiale Denaturierung;

78°C Zugabe der Pfu-DNA-Polymerase;

5 Zyklen 20sec 95°C, 20 sec 65°C, 3min 72°C;

30 Zyklen 20sec 95°C, 20 sec 60°C, 3min 72°C; 10min 72°C Finale Extension.

Jeweils 10 µl der PCR Reaktionen wurden in einem 1% Agarosegel analysiert. Mit den gewählten Primerkombinationen gelang es unter den genannten Bedingungen pro PCR-Ansatz ein homogenes Produkt zu erhalten (Abb. 4.14).

Aus der Anordnung der Primer (Primerpositionen sind aus der Abb. 4.7 zu entnehmen) und der Größe der PCR-Produkte war ersichtlich, daß sich zwischen den Primern ALPHA1 und BKL1 sowie zwischen den Primern BKL1 und BKL2 ein Intron befinden muß. Eine Klärung der Exon / Intron Struktur erfolgte schließlich durch die Klonierung der PCR-Produkte über die Restriktionsschnittstellen der verwendeten Primer in die Multiple Cloning Site des Vektors pBSK+ und die anschließende Sequenzierung der rekombinanten Plasmide.

Die Sequenzierung der klonierten hNLP-Gensequenzen erfolgte durch die Strategie des Primer walkings (Strauss et al., 1986). Sequenzierprimer für Intronbereiche sind fortlaufend aus den erhaltenen Sequenzdaten abgeleitet worden. Durch die Suche nach überlappenden Bereichen der Sequenzierdaten konnte die codierende Region des hNLP Gens vollständig in ihrer Sequenz aufgeklärt werden. Durch Vergleich der genomischen Sequenz mit der cDNA war darüber hinaus die Bestimmung der Exon / Intron Übergänge im hNLP Gen möglich. Das hNLP Gen setzt sich aus drei Exons und zwei Introns zusammen, eine Übersicht der Exon / Intron Verteilung gibt die Tab. 4.4.

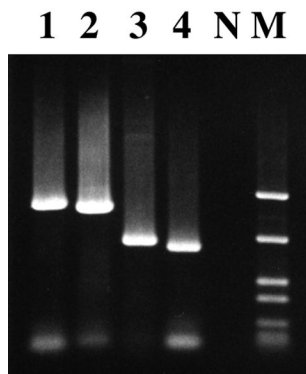


Abb. 4.13 PCR mit humaner, chromosomaler DNA.

Bahn 1: Primerkombination ALPHA1 / BKL2

Bahn 2: Primerkombination ALPHA1 / BKL3

Bahn 3: Primerkombination BKL1 / BKL2

Bahn 4: Primerkombination BKL1 / BKL3

N : Negativkontrolle. Als Marker wurde pUC18/Sau3A eingesetzt (943 bp, 585 bp, 341 bp, 258 bp, 153 bp, 105 bp).

Tab. 4.4 Exon/Intron Verteilung des hNLP Gens.

| Exon | Größe | Spleiß- donor | Intron | Größe | Spleißakzeptor |
|-----------|-------|------------------|--------|-------|-----------------|
| 1 | 86 | GTAAGG | 1 | 198 | TCTTTGCCCTTACAG |
| 2 | 140 | GTA CTC | 2 | 320 | TTTCTTTTCCCCTAG |
| 3 | 286 | | | | |
| Consensus | | GTRAGT | | | YYYYYYYYYNYAG |

Die Übergänge zwischen einzelnen Exon- und Intronbereichen innerhalb eines einzigen Gens und auch zwischen verschiedenen eukaryontischen Genen sind stark konserviert (Sharp, 1987). Die Sequenzen der Spleißdonor- und der pyrimidinreichen Spleißakzeptorstellen des hNLP Gens entsprechen den Consensussequenzen. Introns beginnen praktisch immer mit GT und enden mit AG (GT-AG Regel).

4.4.1 Sequenzierung der Promotorregion

Um Informationen über die Regulation des hNLP Gens zu erhalten, wurde der Promotorbereich des Gens mit Hilfe des Genome Walker Kits der Firma Clontech analysiert. Als genspezifische Primer wurden die antisense Oligonucleotide PF1 und PF2 in den PCR-Reaktionen mit den fünf verschiedenen DNA-Libraries verwendet. Beide Primer wurden aus dem 5'-Bereich des ersten Introns des hNLP Gens abgeleitet. Die erste PCR-Reaktion erfolgte mit dem äußeren Adaptorprimer AP1 und PF1; die zweite PCR-Reaktion mit den inneren Primern AP2 und PF2.

Mit den gewählten Primerkombinationen gelang es unter den genannten Bedingungen (3.13) aus der DNA-Library DL4 (Pvu II Fragmente) ein 0,7 kb großes PCR-Produkt zu amplifizieren. Eine Direktsequenzierung des aufgereinigten PCR-Produkts mit dem Primer PF3 bestätigte die Amplifikation der Promotorregion des hNLP Gens. Die Klonierung des PCR-Produktes erfolgte mit Hilfe der überstehenden 3'-dA-Nucleotide in den pGem T-Vektor. Es wurden drei unabhängige Klone sequenziert. Aus den erhaltenen Sequenzdaten des Promotor-Amplifikationsproduktes und des genomischen PCR-Produktes konnte eine 1,6 kb umfassende Sequenz des humanen NLP Gens zusammengestellt werden.

4.4.2 Nukleotidsequenz des humanen NLP Gens

Die Abbildung 4.15 zeigt den codierenden Strang des humanen NLP Gens. Exonbereiche sind durch Großbuchstaben, Intronbereiche durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Weiterhin sind Lage und Orientierung der verwendeten Oligonucleotide in der Sequenz durch Pfeile angegeben. Die Promotorregion des hNLP Gens enthält zwei TATA-Box-Motive in dichter Reihenfolge vor dem Transkriptionsstart.

```
ctgggtcttc attttactag ttagataaag aggtgcagat tagggtgaca gtccatctaa   60
gcaagtggac gatctgggga actgtaggcc ttgctgaagc atcctcccac agaaaggaga  120
taagggcctt atccaattgg ctgtacacaa tagatcagtg cttctttcct agacaaggct  180
gaaaggggcc aacattatct ctgaagactt cattattgga attctatggg agtgatctca  240
ctgagctatt ttggaataga aatgtgtggc tagttgcctg acctccctca atggtttcac  300
```

```

gtggctttca aaggaagga agggcagtgc tgacttttgg taaaatgggc gaaaggtcc 360

atgccagcaa cacaatcact caaagtccag atgagggatc agtaaataca acgtgcctga 420

aaggtggccc ttgagcacat tcctccgga gacattaact tattaattg attctgatta 480

      TATA 1
caaatataaactttgcccc atctcaccca gtaacaatgc aagagttgat gtcagtcat 540      TATA 2

      Exon 1
aaaaggaagt aggaactgtc cctggcttTCAGGCTCCAAC ATCCTCCCC TGTCAGATG 600      Start
      -----RS1----->
      <-----PF3-----
TGGCACCTCA AACTTTGTGC AGTCCTCATG ATCTTCCTGT TGCTGTTGGG CCAGgtaagg 660

      Intron 1
aggaagat acttatgtgt gtgtgtggag tgtggagatg atagtgggg tggaactga 720

      <-----PF2-----
aagctagatt cagtcctgag gaatggttcc tctgttctga gtctacagca tctgcggaat 780

      --RS2----->
      <-----PF1-----
ggaatgatca ctctccaag gtgtgcagca ggggtgtcaac actttcatat ctgaatgtct 840

      Exon 2
ttgcccttac agATAGATGG CTCCCCAATA CCAGAAGTGA GTTCGGCAA GAGAAGGCCA 900

CGGAGAATGA CCCCATTTTG GAGAGGGGTT TCCCTCAGGC CTATTGGAGC CTCCTGCCGG 960

      Intron 2
GATGATTCTG AGTGATCAC AAGGCTATGC AGgtactccc tgaacctggg agcagggttg 1020

      -----RS3----->
ggccagagag ccctgggaag ctgggcagag gagtgacaag gggacacatg aacctaagaa 1080

      <-----RA3-----
taaagctggg atggaggagt tctagactga gactgggagc tccatggaaa atcccttagg 1140

agttaggagc caagaacagc tctatgtggg taccatgaaa gagtgggtgcc tttccattct 1200

tcagtctttc ctgagactgg acagatcaag caaagaggaa ggaaatgcag cataggtggc 1260

      <-----RA2-----
cctggtcatt cctagacca gtcttaaaaa actacccttt cttttcccct agAAAAAGAC 1320      Exon3

      Stop
GCTGTTCCCTT AAGTGTTGCC CAGGAATGAT GTACATACCA GGGAAAGAAA GGACAGCAGT 1380

CACCTCCGAC AATGCTCCGT TCTATGGAAT ATTGATTAAC TGCATTTTGG CTGGAGACAC 1440

CCAAGTGAAG CAATCTTGTA TTTTAAATAT TTAAAGGCAG ATGTACGCTT TAAATTGGTC 1500

TCCATTTCTT CTTAGAATGT TGATATATGG ATAAGCATAA CTAAACTTGT CAATTTAGAG 1560

TTTATTTTTC TATGGATACT ATTAAATGTCTCAAATTG

```

Abb. 4.14 Nukleotidsequenz des hNLP Gens.

4.4.3 Sequenzanalyse der Promotorregion des hNLP Gens

Potentielle Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren in der 5'-flankierenden Region des hNLP Gens wurden durch computerunterstützte Sequenzanalyse identifiziert (MacMolly, Softgene; MatInspector (Quandt et al., 1995)). Es wurden nur solche Bindungsmotive in der Tab. 4.5 aufgelistet, die mit der Core-Consensussequenz zu 100% übereinstimmen und eine Matrixhomologie von mehr als 85% aufweisen. Die Positionsangaben beziehen sich jeweils auf das 5'-terminale Nukleotid der TF-Erkennungssequenz.

Tab. 4.5 Potentielle Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren.

| TF | Sequenzmotiv | Position | Matrixhomologie |
|-----------|------------------|-----------------|-----------------|
| CREB | TGACatca | 527/ (-) Strang | 85,4 |
| HNF4 | atgggggcAAAGttta | 484/ (-) Strang | 91,9 |
| LF-A1 | TGGCCC | 425/ (+) Strang | - |
| N-Myc | tttcaCGTGgct | 295/ (+) Strang | 97,0 |
| NF-IL6 | TTTTGGAAT | 249/ (+) Strang | - |
| RORalpha1 | tgagggaGGTCag | 278/ (-) Strang | 91,0 |
| Sox-5 | gtaaCAATgc | 511/ (+) Strang | 99,8 |
| TBP | TATAAA | 485/ (+) Strang | - |
| TBP | TATAAA | 538/ (+) Strang | - |
| USF | tttCACGtgct | 295/ (+) Strang | 98,8 |

4.5 Chromosomale Lokalisation des hNLP Gens

Zur Kartierung des hNLP Gens mittels Radiation Hybrid Mapping wurde die kommerziell erhältliche DNA der Mensch-Hamster-Hybridzellen des Genebridge 4 Radiation Hybrid Panel (Research Genetics, Huntsville, Alabama) verwendet. Für die PCR-Reaktionen wurden je 25 ng denaturierte genomische DNA der 93 Hybrid-Zelllinien, der Donor- und der Rezipientenzelllinie mit hNLP-spezifischen Primerkombinationen in 50 µl-Ansätzen eingesetzt (dNTP-Endkonzentration 200 µM; Primer-Endkonzentration je 0,4 µM; 2 U Taq DNA Polymerase). Die Durchführung der PCR erfolgte nach folgendem Hot Start Protokoll:

3min 95°C Initiale Denaturierung; 78°C Zugabe der Taq-DNA-Polymerase;

5 Zyklen 20sec 95°C, 20 sec 65°C, 1,5min 72°C;

30 Zyklen 20sec 95°C, 20 sec 60°C, 1,5min 72°C; 10min 72°C Finale Extension.

Jeweils 15 µl der PCR-Ansätze sind im Anschluß an die Reaktion in einem 1% Agarosegel analysiert worden.

Bei der Auswahl der Primer wurde berücksichtigt, daß die Intron und die 3'UTR Sequenzen orthologer Gene im allgemeinen nur verhältnismäßig gering konserviert sind. Vor der PCR-Analyse der somatischen Hybridzellen wurden 5 Primerkombinationen in einer PCR mit Hamster DNA und humaner DNA getestet (Abb. 4.15). Alle getesteten Primerkombinationen eignen sich für die Kartierung des hNLP Gens, da sie nur in einer PCR mit humaner DNA als Matrize ein singuläres Amplifikationsprodukt erzeugen.

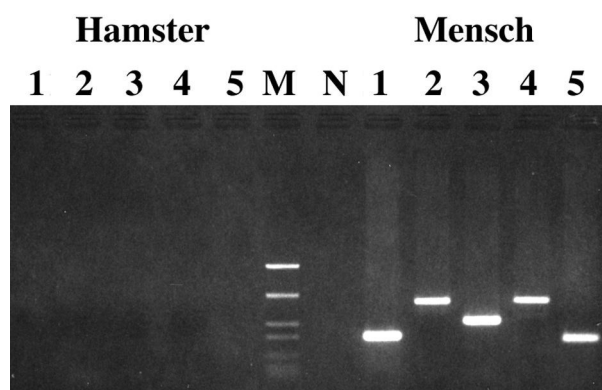


Abb. 4.15 Auswahl der Primerkombination

Es wurden 5 Primerkombinationen in einer PCR mit Hamster DNA und humaner DNA getestet. Die Lage der Primer innerhalb der Introns des hNLP Gens ist der Abbildung 4.14 zu entnehmen. Als Größenmarker wurde pUC18/Sau3A verwendet (943 bp, 585 bp, 341 bp, 258 bp, 153 bp, 105 bp). N Negativkontrolle

| Primerkombination | Produktgröße |
|-------------------|--------------|
| 1 RS1 / RA3 | 263 bp |
| 2 RS1 / RA3 | 523 bp |
| 3 RS2 / RA3 | 365 bp |
| 4 RS2 / RA2 | 529 bp |
| 5 RS3 / RA2 | 248 bp |

Die anschließende PCR-Analyse der somatischen Hybridzellen des Genebridge 4 Radiation Hybrid Panels erfolgte mit der Primerkombination RS2 / RA3. Das Ergebnis wird in Abb. 4.16 dargestellt.

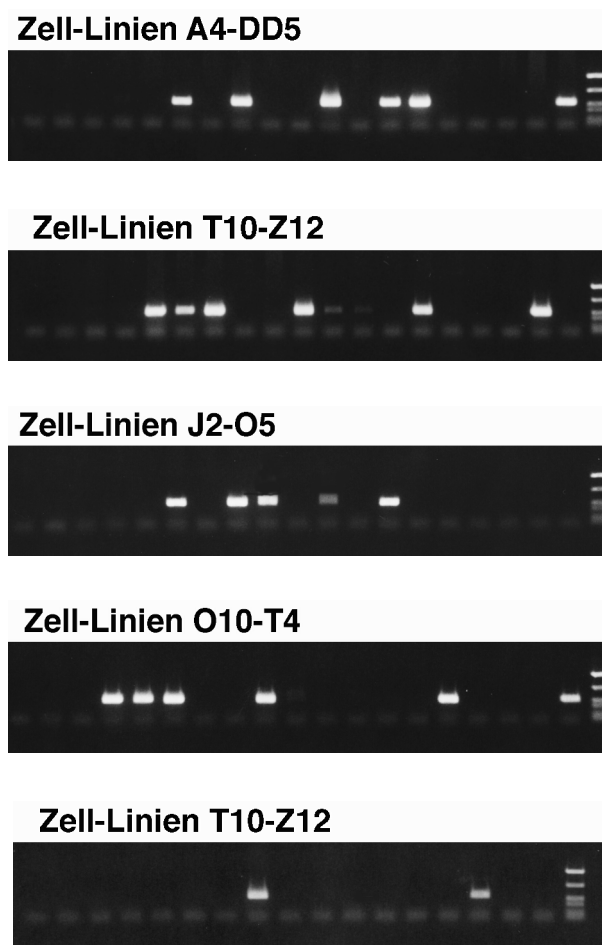


Abb. 4.16 PCR-Analyse der somatischen Hybridzellen des Genebridge 4 Radiation Hybrid Panels. Die Hybridzellen wurden daraufhin untersucht, ob sie den STS-Marker (sequence tagged site), der durch das Primerpaar RS2 / RA3 und die oben angegebenen PCR-Bedingungen definiert wird, enthalten. Die Hybrid-Zelllinien sind durch einen alphanumerischen Code gekennzeichnet: A4 bis Z12. HFL humane Donorzelllinie, A23 Hamster Rezipientenzelllinie

Zur Auswertung wird jeder Zelllinie, die den STS-Marker enthält eine 1 zugewiesen. Entsprechend wird den Zelllinien, die den STS-Marker nicht enthalten eine 0 zugewiesen. Bei nicht eindeutigen Ergebnissen werden die Zelllinien durch eine 2 gekennzeichnet. Anhand des so erstellten Datenvektors kann mit einem Computerprogramm (RHMAPPER) die relative Position des STS-Markers auf der physikalischen Karte des Whitehead-Institutes / MIT Center for Genome Research berechnet werden. Danach befindet sich das hNLP-Gen auf Chromosom 5q31 und ist 1,6 centiRays vom STS-Marker WI-7743 entfernt (lod score > 3).

Der STS-Marker WI-7743 entspricht einer Teilsequenz des Interleukin 13 Gens und befindet sich auf den humanen YACs 764-C-11 und 854-G-6. Diese YAC-Klone und der YAC 761-F-10 gehören zum Contig WC-1250. Die drei genannten YAC-Klone sollten überlappend die DNA-Region abdecken, in der auch das hNLP Gen zu finden ist. Zur Kontrolle der Kartierungsdaten wurden daher diese YAC-Klone auf DOBA-Agar (BIO 101, Vista CA) kultiviert. Durch eine Kolonie-PCR mit hNLP spezifischen Primerkombinationen gelang es das hNLP Gen auf dem YAC 764-C-11 nachzuweisen. Es konnte also durch ein zweites unabhängiges Verfahren die Lokalisation des hNLP Gens auf dem Chromosom 5q31 bestätigt werden.

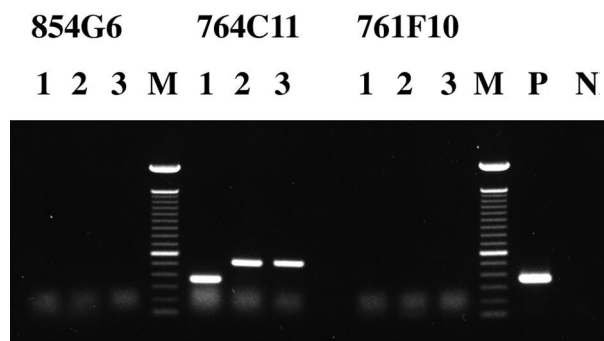


Abb. 4.17 Nachweis des hNLP Gens auf dem YAC 764-C-11

Es wurden Kolonie-PCR Experimente mit den YACs 854-G-6, 764-C-11 und 761-F-10 und den hNLP spezifischen Primerpaaren 1 RS2 / RA3, 2 RS1 / RA3, 3 RS2 / RA2 durchgeführt. P Positivkontrolle mit humaner DNA, N Negativkontrolle, M 100 bp Leiter. Die Gelelektrophorese der PCR-Produkte zeigt, daß sich das hNLP Gen und das IL13 Gen auf dem gleichen YAC-Klon befinden.

4.6 Screening einer murinen Genbank nach dem homologen NLP Gen

Um das homologe NLP Gen der Maus zu isolieren und zu charakterisieren, wurde eine murine Cosmidbank des Mausstammes 129/Sv gescreent. Die Organisation der Cosmidbank war bei der Suche nach dem mNLP Gen von entscheidendem Nutzen. Die Cosmidbank besteht aus 21 Superpools, die sich jeweils in 17 Subpools untergliedern. Die einzelnen Pools der Genbank liegen als Cosmidpräparationen vor, dadurch war es möglich sie durch ein PCR-Screening auf die Existenz des murinen NLP Gens hin zu untersuchen.

4.6.1 PCR-Screening

Zum Screenen der Cosmidbank kommen nur solche Primerpaare in Frage, die bei einer gemischten PCR mit muriner DNA nur ein singuläres, spezifisches Amplifikationsprodukt erzeugen. Die aus der Sequenz der murinen cDNA des NLPs abgeleiteten Primer wurden hinsichtlich dieser Kriterien überprüft. Die Primerkombination MS2 / MA2 erfüllt diese Voraussetzungen und wurde für das PCR-Screening der Cosmidbank eingesetzt.

Thermoprofil der PCR:

3min 94°C Initiale Denaturierung,

5 Zyklen 1sec 97°C, 30 sec 58°C, 1,5min 72°C;

30 Zyklen 1sec 97°C, 30 sec 52°C, 1,5min 72°C; 10min 72°C Finale Extension.

Jeweils 15 µl der PCR-Ansätze sind im Anschluß an die Reaktion in einem 1% Agarosegel analysiert worden.

Von 21 Superpools zeigten vier, nämlich die Superpools 1, 8, 11 und 20 eine intensive Bande bei der analytischen Gelelektrophorese der PCR-Produkte. Danach wurden die entsprechenden Subpools in der nächsten Screening-Runde untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildung 4.18 dargestellt.

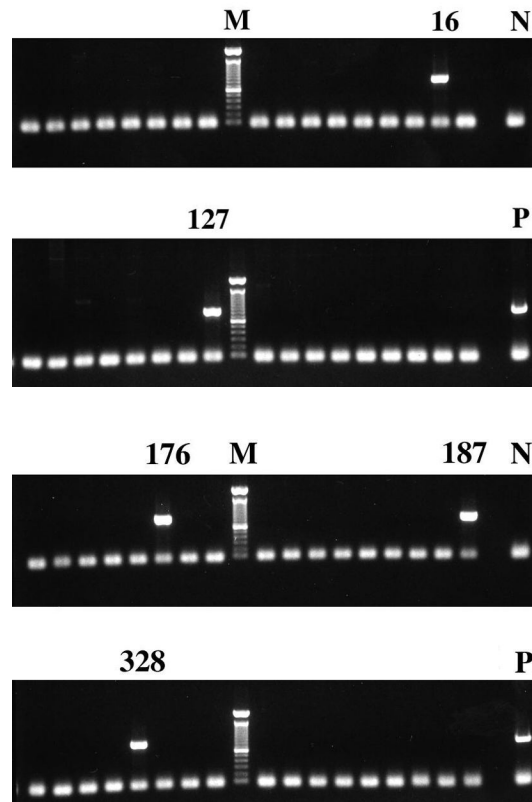


Abb. 4.18 Screening der Subpools von Superpool 1, 8, 11 und 20.
M 100 bp Leiter, N Negativkontrolle, P Positivkontrolle

4.6.2 Kolonie-Screening

Die rekombinanten Bakterien (*E.coli* XL1-Blue MR) der Subpools 16, 127, 176, 187 und 328 wurden auf Ampicillin-haltigen Nährböden in drei Verdünnungsstufen (10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3}) ausplattiert. Nach einer modifizierten Methode von Grunstein und Hogness (1975) wurden Replikafilter von den Bakterienplatten erstellt und mit einer radioaktiv markierten mNLP spezifischen Sonde hybridisiert. Zur Herstellung der Sonde wurde ein kloniertes mNLP Genfragment mit der Primerkombination MS2 / MA2 amplifiziert und mittels GTG-Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Die radioaktive Markierung des PCR-Produktes erfolgte durch random primed labelling mit α ^{32}P -dCTP. Nach der Hybridisierung der Replikafilter über Nacht bei 60°C wurden diese unter stringenten Bedingungen gewaschen. Durch den Vergleich der Autoradiogramme mit den Originalplatten wurden die positiven Clone (127-2, 187-2 und 328-2) ermittelt und anschließend in Kultur genommen.

4.6.3 Restriktionskartierung des Cosmidclons 127-2

Für eine erfolgreiche Subklonierung des mNLP Gens war zunächst die Restriktionskartierung des Cosmidclones 127-2 erforderlich. Dazu ist aus 100 ml einer Kulturlösung dieses Clons die Cosmid-DNA präpariert worden. 10 µg der Cosmid-DNA, in 200 µl Enzympuffer gelöst, wurde mit Eco RI vollständig verdaut. Nach einer Phenol/Chloroformextraktion des Restriktionsansatzes wurden die DNA-Fragmente in 200 µl H₂O resuspendiert und in 10 Ansätze a 20 µl aliquotiert. Es folgte ein zweiter Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen.

Die DNA-Fragmente der Restriktionsansätze wurden in einem 1% igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt (Abb. 4.19) und auf eine Nylonmembran geblottet. Zur Hybridisierung der Membran ist ein radioaktiv markiertes 364 bp großes Fragment des murinen NLP Gens verwendet worden (MS4 / NLP2 PCR-Produkt). Die Abb. 4.20 zeigt das dazugehörige Autoradiogramm des Southern Blots.

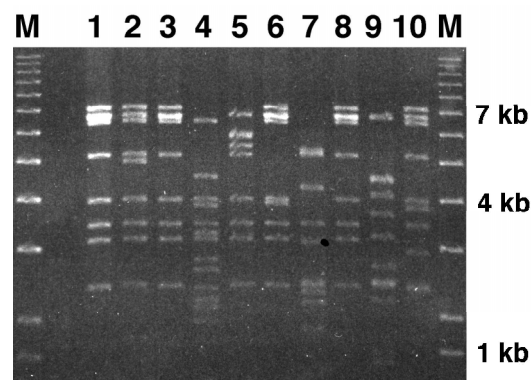


Abb. 4.19 Gelelektrophorese der Restriktionsansätze des Cosmids 127-2

Bahn: 1 Eco RI, 2 Bam HI / Eco RI, 3 Cla I / Eco RI, 4 Hind III / Eco RI, 5 Kpn I / Eco RI, 6 Not I / Eco RI, 7 Pst I / Eco RI, 8 SstII / Eco RI, 9 Xba I / Eco RI, 10 Xho I / Eco RI, M 1kb DNA Leiter

Aus dem Eco RI Verdau des Cosmids 127-2 sind acht DNA-Fragmente hervorgegangen, deren Größen 2-7 kb betragen. Da der Vektor Supercos I zwei Eco RI Schnittstellen in seiner Multiple Cloning Site besitzt, entspricht ein Eco RI Fragment mit einer Größe von ca. 7 kb dem linearisierten Cosmid-Vektor.

Die Eco RI Fragmente des rekombinanten Cosmids werden von den Restriktionsenzymen Cla I und Sst II nicht geschnitten (die Bahnen 1, 3 und 8 zeigen das gleiche Fragmentmuster).

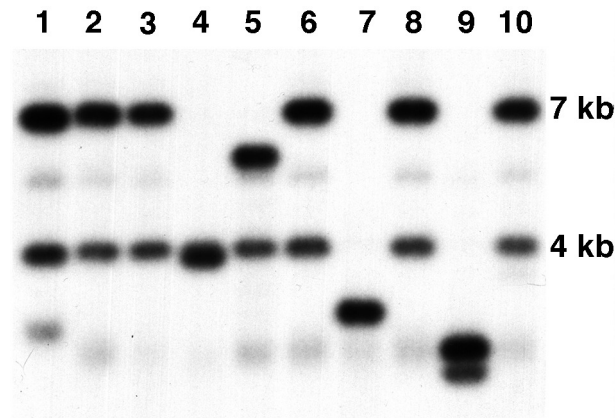


Abb. 4.20 Southernblot. Als Sonde wurde ein mNLP Genfragment eingesetzt (MS4 / NLP2 PCR-Produkt).

Bahn: 1 Eco RI, 2 Bam HI / Eco RI, 3 Cla I / Eco RI, 4 Hind III / Eco RI, 5 Kpn I / Eco RI, 6 Not I / Eco RI, 7 Pst I / Eco RI, 8 SstII / Eco RI, 9 Xba I / Eco RI, 10 Xho I / Eco RI

Die Sequenzierung eines klonierten Fragmentes des mNLP Gens hatte gezeigt, daß sich im Intron I eine Eco RI Schnittstelle befindet. Die beim Southern Blot verwendete Sonde, das radioaktiv markierte MS4 / NLP2 PCR-Produkt, überlappt diesen Bereich asymmetrisch (Abb. 4.22). Dadurch werden die beiden Eco RI Fragmente des mNLP Gens im Autoradiogramm des Southernblots als eine starke und eine schwache Bande sichtbar. Die Positionen der Schnittstellen von den Restriktionsenzymen des Doppelverdaus relativ zur Position der Eco RI Schnittstelle des Intron 1 können daher aus der Änderung des Fragmentmusters des Southernblots abgeleitet werden.

In der Abb. 4.21 ist die Anordnung der Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme im mNLP Gen dargestellt.

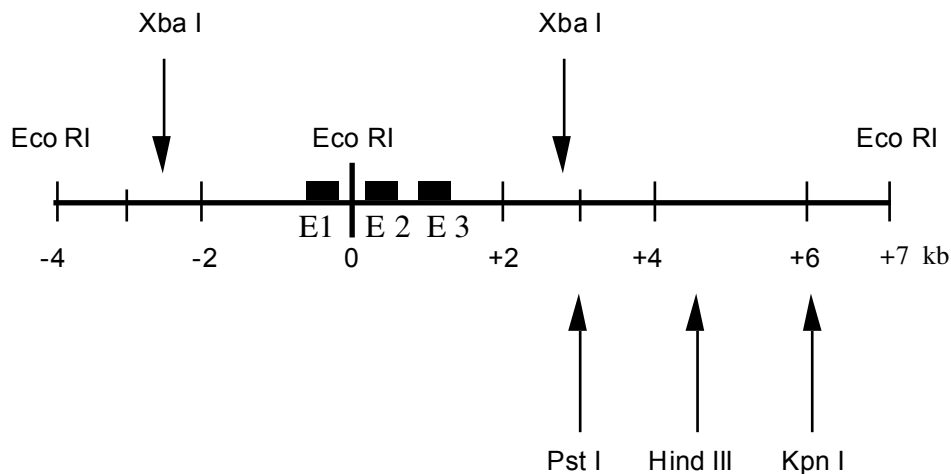


Abb. 4.21 Restriktionskarte des mNLP Gens

Die Eco RI Fragmente des mNLP Gens werden von folgenden Restriktionsenzymen nicht geschnitten: Bam HI, Cla I, Not I, Sst II und Xho I. E1 Exon 1, E2 Exon 2, E3 Exon 3

4.6.4 Subklonieren des mNLP Gens

Nach den Daten der Restriktionskartierung befindet sich das mNLP Gen auf einem ca. 5,5 kb großen Xba I Fragment des Cosmids 127-2. Daher wurden 10 µg des Cosmids 127-2 mit dem Restriktionsenzym Xba I vollständig verdaut. Aus dem Restriktionsansatz wurde das entsprechende Fragment durch präparative Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Phenolextraktion aufgereinigt und in die Xba I Schnittstelle des dephosphorylierten Plasmids pBSK kloniert. Eine Transformation von E.coli Zellen des Stammes TG1 erfolgte wie unter 3.7.4 beschrieben.

4.6.5 Nucleotidsequenz des murinen NLP Gens

Mit der Primerkombination MS2 / MA2 konnte ein Fragment des murinen NLP Gens in einer genomischen PCR amplifiziert werden, dieses wurde in den pGEM-T Vektor kloniert und sequenziert. Die Sequenz des klonierten murinen NLP Genfragmentes kann der Abb. 4.22 entnommen werden.

Murines NLP Gen

```

          Exon 1          Start
-----MS2----->-----MS4----->
GGCTTTCAGA CTCCAACATC ATTCTTTTGC CAAGATGCTA CAGCTAAAAC TCTTTGCAGT    60

          Intron 1          Eco RI
GCTCCTGACT TGCCTGCTGC TGCTGGGTCA Ggtaaggaag gaaacagtag tggcgtgaa    120

ttccaagtca gactcagtcc ttagaaatgc agttcgatct cctgcaacct gcaaagggcc    180

cttcttctga ggctgtgcag cagaggggtgg gtgcttcctc agctaaagtg agtatgcctt    240

          Exon 2
tgctctacag GTCAATAGTT CCCCAGTACC AGAAGTGAGT TCAGCAAAGA GATCCCGGAG    300

AATGACCCCA TTTTGGAGAG GGGTTCCCT CAGGCCCAT TGGTGCCTCGT GCCGGGATGA    360

<-----NLP2-----          Intron 2
CTCTGAGTGT ATCACAAGAC TATGCAGgta tttgatgatc ccaggtacag ggtggaccag    420

agagcactgg gaaagctggg agagatgaga tcagaaaaca gagaccaag ggtaaagctg    480

aaattagtgg tgtgggggtgg ggggtgggggt ggggggaata tatgaagctg tgaactccat    540

ggaggggatt ccgtgacagt caagaacat tcagattcct aacactgaac gacagatgaa    600

acaaggaata atggaggcag cagaggtgtc ccagggctcc ttaggtctac atccaatctt    660

          Exon 3
aatcacttct tttcttcccc ccactagAAA AAGACGCTGT TCCCTAAGTG TGGCCCAGGA    720

Ter
GTGATGTCCA TACTGGGGAA GAGTCACCTC CAACAGTGAT CTGTTCTGGG GAATATTGTT    780

<-----MA2-----
AACGACATTT TGGTTGGAGA TAGATAAGTG AAGTAGTCTT TGTT

```

Abb 4.22 Partiaalsequenz des murinen NLP Gens.

Die Sequenz besteht aus 824 bp und enthält den vollständigen Open Reading Frame des murinen NLP Gens. Durch den Vergleich der genomischen Sequenz mit der cDNA wurden die Exon / Intron-Übergänge im mNLP Gen bestimmt. Das murine Gen ist ebenso wie das humane Gen aus 3 Exons und 2 Introns aufgebaut.

5 Diskussion

5.1 Isolierung des hNLPs aus Hämofiltrat

Ein Forschungsschwerpunkt am Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung ist die Isolierung und Charakterisierung von neuen, humanen, zirkulierenden Peptiden. Als Ausgangsquelle dient dabei Hämofiltrat, das bei der Blutwäsche niereninsuffizienter Patienten durch arteriovenöse Blutfiltration in großen Mengen anfällt. Die Hämofiltration ist ein alternatives Verfahren zur Hämodialyse und wurde 1977 von Quellhorst in die Therapie eingeführt (Quellhorst et al., 1977). Peptidhormone sowie Fragmente von Plasmaproteinen und der extrazellulären Matrix bis zu einer relativen Molekülmasse von 10 kDa liegen im Hämofiltrat und im Plasma in vergleichbaren Konzentrationen vor. (Schepky et al., 1994). Die Aufreinigung von zirkulierenden Peptiden aus Hämofiltrat wird durch größere Plasmaproteine kaum beeinträchtigt, da die Proteingesamtkonzentration durch die Membranfiltration um den Faktor 1000 reduziert wird. Die Hämofiltration stellt also den ersten effektiven Aufreinigungsschritt dar. Durch den Ausschluß von höhermolekularen Exo- und Endoproteasen wird zusätzlich ein proteolytischer Abbau der Peptide im Hämofiltrat stark verringert. Da Hämofiltrat außerdem in ausreichendem Maße (2000 l pro Woche) dem IPF zur Verfügung steht, ist es eine ideale Quelle zur Identifizierung biologisch aktiver Peptide humanen Ursprungs.

Im Rahmen des Peptide Trappings konnte ein humanes Peptid mit einer Masse von 3762 Dalton aus 2200 l Hämofiltrat in sieben chromatographischen Schritten isoliert werden (Abb. 4.1). Die anschließende Edman-Sequenzierung und Datenbankrecherche ergab, daß es sich dabei um ein neues zirkulierendes Peptid aus 34 Aminosäuren handelt, das keine Homologie zu einer der bekannten Peptid/Proteinfamilien aufweist. Aus der Aminosäurezusammensetzung des Peptids mit der Bezeichnung hNLP geht hervor, daß es sowohl basisch ($pI=8,6$) als auch cysteinreich ist. Cysteine sind statistisch mit einem relativen Anteil von 2,8% an der Aminosäurezusammensetzung durchschnittlicher Proteine beteiligt (Klapper, 1977). Mit 11,8% liegt der Cysteinanteil des hNLPs (4 Cysteinreste von 34 Aminosäuren) deutlich über dem Durchschnitt. Aus der Differenz der mit ES/MS detektierten Masse und der theoretischen Masse ließ sich ableiten, daß die Cysteinreste miteinander verbrückt sein müssen. Die 1,3 und 2,4 Anordnung der Disulfidbrücken konnte durch tryptischen Verdau des Peptids und LC/MS-Messung der erhaltenen Fragmente bestimmt werden (Abschnitt 4.1.4).

5.2 hNLP, ein cyclisches Peptid

Aus der Sequenz und der massenspektrometrischen Analyse der Trypsin-Fragmente ist zu entnehmen, daß hNLP zu den Cyclopeptiden gehört, deren Ringschluß über Disulfidbindungen erfolgt. Eine Vielzahl biologischer Studien an cyclischen Peptiden weisen darauf hin, daß ringförmige Strukturen eine höhere metabolische Stabilität, verbesserte Rezeptorselektivitäten, eine kontrolliertere Bioverfügbarkeit und erhöhte Wirkungsprofile gegenüber linearen Strukturen aufweisen. Darüber hinaus bietet die eingeeengte Geometrie cyclischer Peptide günstige Voraussetzungen für Konformationsstudien und für das Modeling von Sekundärstruktur-Elementen bei der Proteinfaltung. Cyclopeptide werden im Säugetierstoffwechsel aufgrund der enzymatischen Resistenz nur schwierig verwertet, so daß auch eine Ausscheidung durch Abbau erschwert ist. Aufgrund der höheren Lipophilie können andererseits ringförmige Peptide im Vergleich zu den offenkettigen Analoga auch über die Leber ausgeschieden werden (Jakubke, 1996).

Cyclische Peptide zeigen vielfältige biologische Wirkungen als Hormone, Antibiotica, Antimycotica, Cancerostatica und Toxine. Ovchinnikov (1982), Hruby (1990), Rizo und Girasch (1992) haben sich ausführlich mit dem natürlichen Vorkommen, der biologischen Bedeutung, dem Design und der Anwendung einschließlich synthetischer Aspekte von cyclischen Peptiden beschäftigt.

Da die Bildung der Disulfidbrücken im rauhen Endoplasmatischen Retikulum erfolgt, sind sie charakteristische Kennzeichen von Membranproteinen oder sekretorischen Peptiden.

5.3 Sequenzanalyse der cDNA des hNLP

Durch die Sequenzierung homologer EST-Clone konnte die vollständige humane cDNA-Sequenz des hNLPs aufgeklärt werden. Sie umfaßt 512 Nukleotide und codiert im ersten Open Reading Frame für ein 77 Aminosäuren langes Polypeptid (Abb. 4.7). Der Transkriptionsstart wurde zudem durch eine 5'-RACE ermittelt.

Die 3'-nichttranslatierte Region der hNLP cDNA enthält das eukaryontische Polyadenylierungssignal ATTAAA. An diese Hexanukleotidfolge bindet das Protein CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor) und leitet so die Polyadenylierung der mRNA ein (Wahle et al., 1992). Die Funktion der Polyadenylierung ist noch nicht vollständig geklärt, aber nach neuen Erkenntnissen kann sie den Transport der mRNA aus dem Zellkern ins Cytoplasma erleichtern.

Zudem kann die Polyadenylierung die Stabilität der mRNA im Cytoplasma erhöhen und eine Steigerung der Translationsrate bewirken (Munroe und Jacobson, 1990; Jackson und Standart, 1990). Die Halbwertszeiten von mRNAs in eukaryontischen Zellen unterscheiden sich beträchtlich. Der Turnover von Transkripten verschiedener "Housekeeping-Genes" ist mit Halbwertszeiten von mehr als 24 Stunden ziemlich langsam. Dagegen sind die mRNAs von Cytokinen, Wachstumsfaktoren und Proto-Onkogenen, die 20 oder 30 min nach ihrer Synthese schon wieder abgebaut werden, sehr kurzlebig. Da die Translation einer spezifischen mRNA unter anderem auch von ihrer Konzentration abhängig ist, stellt die Abbaurate einer mRNA eine wichtige Größe für die Regulation der genetischen Aktivität dar. Allerdings sind die zugrundeliegenden Mechanismen, die die Abbaurate von mRNAs beeinflussen, alles andere als einheitlich. Sie werden aber in allen Fällen durch Sequenz-Elemente in den betreffenden mRNAs, vor allem im 3'UTR, bestimmt. Der Abbau der mRNA beginnt fast immer mit einer Verkürzung des Poly(A)-Endes, bevor dann der weitere Abbau erfolgt. Dieser kann vom 3'-Ende, vom 5'-Ende oder von internen Schnittstellen ausgehen, je nach der beteiligten mRNA und nach Lage der Destabilisierungselemente (Decker und Parker, 1994; Sachs, 1993).

Die Wiederholung des Sequenzmotivs AUUUA im 3'UTR ist mit verantwortlich für die geringe Halbwertszeit der mRNA von Proto-Onkogenen, Cytokinen und Wachstumsfaktoren (Shaw und Kamen, 1986). Es konnte gezeigt werden, daß dieses Sequenzmotiv mit der verstärkten Degradation des Poly(A)-Endes korreliert (Wilson und Treismann, 1988).

Auch in der mRNA des hNLPs befinden sich zwei Sequenzwiederholungen dieses Motivs in der 3' nichttranslatierten Region. Demzufolge besitzt auch die messenger RNA des hNLPs eine geringe Halbwertszeit und zeigt ein Strukturmerkmal, das auch für messenger RNAs von Cytokinen, Wachstumsfaktoren und Proto-Onkogenen charakteristisch ist.

5.3 Prozessierung des NLPs

Die Freisetzung eines aktiven Hormons aus dem biosynthetischen Präkursor erfolgt durch limitierte Proteolyse, auch als Processing (Maturation) bezeichnet, wobei zunächst durch Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz das Prohormon gebildet wird. Dieses ist - von wenigen Ausnahmen abgesehen - selbst noch inaktiv und bildet erst durch

weiterführendes Processing die eigentlichen regulatorischen Peptide. Die limitierte Proteolyse findet allgemein an Sequenzen mit basischen Aminosäuren (Arg, Lys) statt, aber auch Ala, Gly, Ile und Ser können als Processing-Signale fungieren (Van de Veen und Roebroek, 1993; Lindberg, 1991; Steiner et al., 1992).

Der N-terminale Bereich des hNLPs weist die charakteristischen Merkmale eines Signalpeptids auf (von Heijne, 1983 und 1990). Von Heijne hat über 50 Signalpeptide von Peptidhormonen miteinander verglichen und konnte die folgenden Gemeinsamkeiten feststellen:

- Signalpeptide sind ca. 15-30 AS lang.
- Das aminoternale Ende enthält mindestens einen positiv geladenen Rest.
- Ein stark hydrophober Abschnitt bildet das Zentrum der Signalsequenz und ist typischerweise 10-15 Reste lang. Ala, Leu, Val, Phe sind in dieser Region häufig anzutreffen.
- Der Spaltungsstelle am carboxyterminalen Ende geht eine Sequenz von etwa fünf Resten voraus, die polarer als das hydrophobe Core ist. Jedoch besitzen die Aminosäuren an den Positionen -1 und -3 meist kleine neutrale Seitenketten (Ala, Cys, Thr, Ser, Gly).

Nach diesen Kriterien liegt die Spaltungsstelle der Signalpeptidase mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der Carboxylseite des Glycinrestes an der Position 22 des hNLPs. Graphisch veranschaulicht wird dies durch den Hydrophilizitätsplot nach Hopp und Woods (1981).

Die Prozessierung des Prohormons könnte durch Subtilisine, einer Klasse von Prohormon Convertasen, die zur Serinfamilie gehören, erfolgen (Barr, 1991; Chretien et al., 1993). Als Spaltstellen kommen die benachbarten basischen Aminosäuren in der Partialsequenz Lys32-Arg-Arg-Pro-Arg-Arg37 des NLPs in Frage.

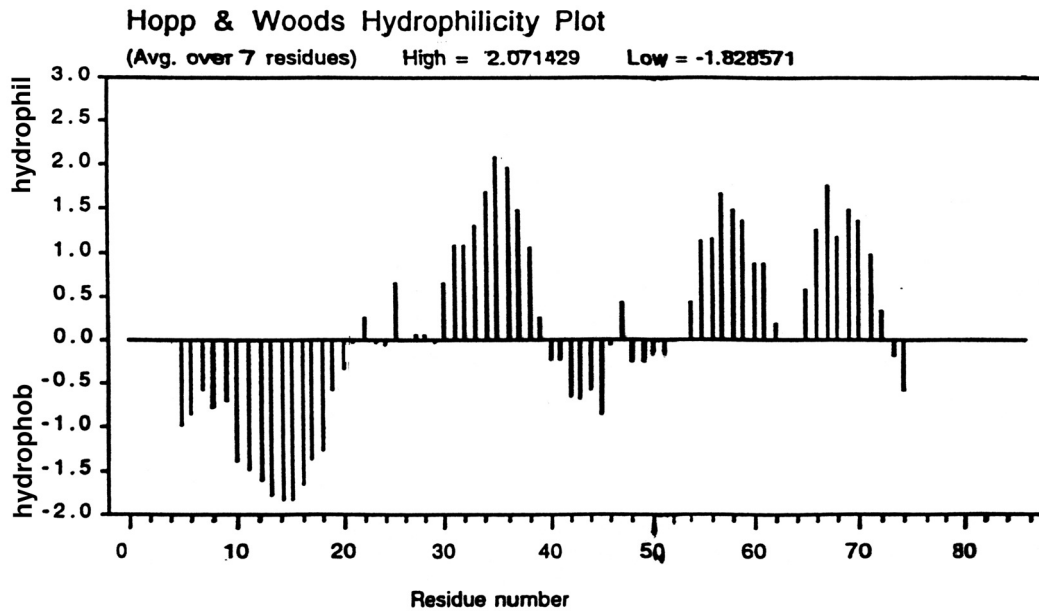


Abb. 5.1 Hydrophilizitätsplot nach Hopp und Woods des hNLPs.

Die 22 N-terminalen Aminosäuren des aus der cDNA Sequenz abgeleiteten NLP-Präpropeptides sind sehr hydrophob und weisen typische Charakteristika eines Signalpeptides auf. Dagegen ist der C-terminale, im Blut zirkulierende Bereich überwiegend hydrophil.

Die Biosynthese und die Prozessierung des humanen NLPs kann nach den erzielten Versuchsergebnissen folgendermaßen schematisch dargestellt werden (Abb. 5.2): Das Gen des NLPs befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 5 in der cytogenetischen Region 31, und besteht aus drei Exons und zwei Introns. Die mRNA des transkribierten Gens codiert für ein Präprohormon aus 77 Aminosäuren. Die 22 N-terminalen Aminosäuren besitzen die charakteristischen Eigenschaften eines Signalpeptides und werden demzufolge im rauhen Endoplasmatischen Retikulum noch während der Translation von der Polypeptidkette abgespalten. Die limitierte Proteolyse des Prohormons könnte an benachbarten basischen Aminosäuren durch Subtilisine erfolgen. Es wurden bisher drei zirkulierende, C-terminale Fragmente des hNLPs aus dem Hämofiltrat isoliert, diese stellen vermutlich die bioaktive Form des NLPs dar. Das NLP wird proteolytisch abgebaut und mit dem Urin aus dem Körper ausgeschieden.

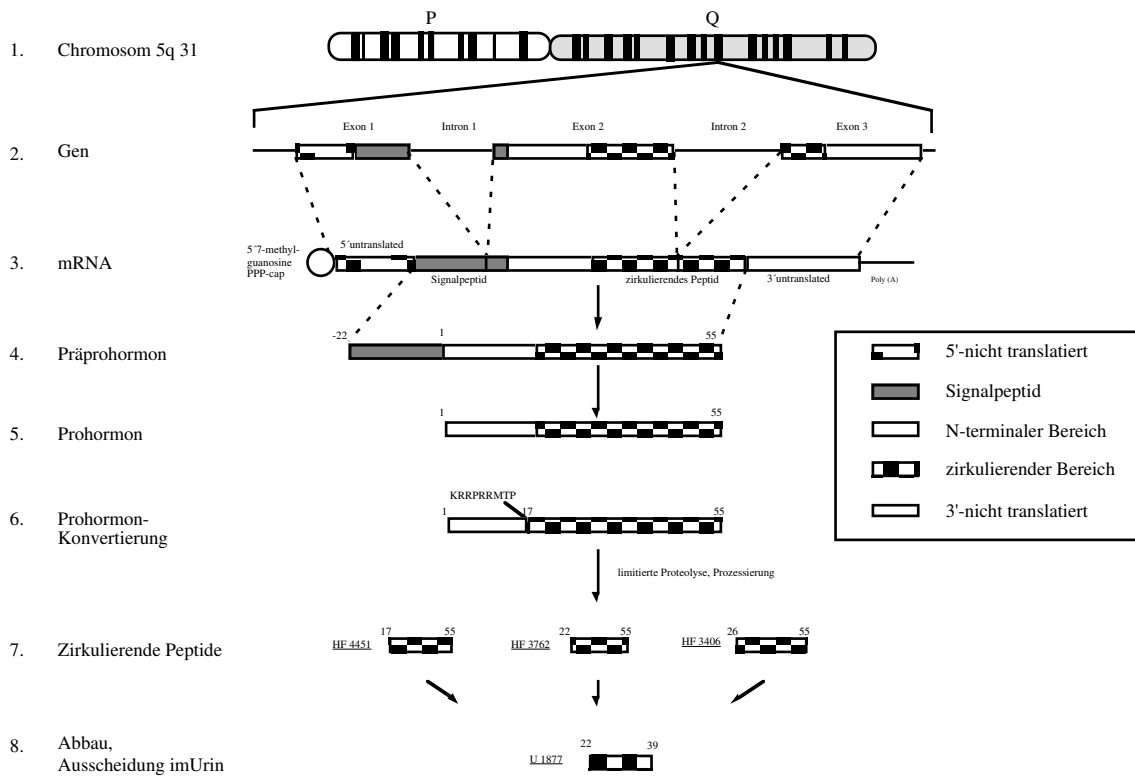


Abb. 5.2 Biosynthese und Prozessierung des humanen NLPs

5.4 Vergleich der Primärstrukturen des humanen und des murinen NLPs

Beim Vergleich des humanen NLPs mit der Aminosäuresequenz des aus der murinen cDNA abgeleiteten mNLPs zeigt sich, daß das NLP eine sehr konservierte Struktur besitzt (Abb. 5.2). Beide Peptide besitzen ein N-terminales Signalpeptid und einen hydrophilen C-terminalen Bereich. Es ist daher davon auszugehen, daß sie von den Zellen, in denen sie gebildet werden, prozessiert und in den Blutkreislauf sezerniert werden.

Das humane und das murine Peptid haben fast die gleiche Größe (77 AS bzw. 76 AS) und weisen im C-terminalen Bereich, der dem zirkulierenden Molekül entspricht, die identische Aminosäuresequenz auf. Diese hohe Homologie ist ein prägnanter Hinweis darauf, daß das Peptid eine essentielle Funktion im Organismus einnimmt. Das Molekül muß einem hohen Selektionsdruck unterliegen, da sich im Laufe der Evolution seine Sequenz kaum verändert hat.

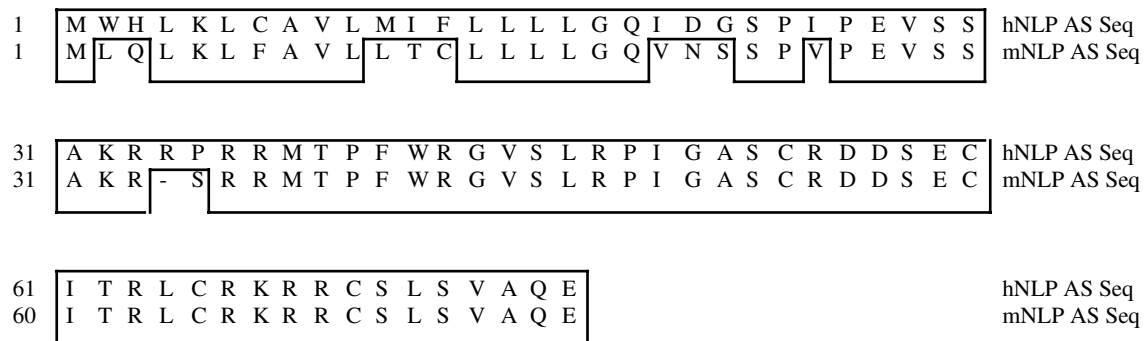


Abb. 5.3 Sequenzvergleich zwischen dem humanen und dem murinen NLP

Das NLP besitzt eine sehr konservierte Struktur: Die Sequenzhomologie der Präpropeptide beträgt 84,4 %; die C-terminalen Aminosäuren, die den prozessierten, zirkulierenden Genprodukten entsprechen, sind sogar identisch. Auffällig ist die gleichartige Anordnung der 4 Cysteinreste in den C-terminalen Bereichen, die über die Ausbildung von Disulfidbrücken die Konformation der zirkulierenden Peptide maßgeblich bestimmen.

5.5 Expressionsmuster des humanen und des murinen NLPs

Mittels RT-PCR und Northern-Blot wurde die Gewebeverteilung der Genexpression des NLPs untersucht (vgl. Abschnitt 4.3). Nach den Ergebnissen der Northern Blot Analyse mit humanen poly(A+)RNAs wird das hNLP vor allem in der Leber gebildet. In der Niere und im Dünndarm wird das hNLP Gen in deutlich geringerem Ausmaß transkribiert. In anderen menschlichen Geweben war keine Expression des hNLPs mit dieser Methode nachzuweisen. Die hNLP spezifische Sonde hybridisiert nicht nur mit dem Transkript des hNLP Gens (0,7 kb), sondern auch mit längeren RNA-Spezies (2,0 kb bzw. 4,2 kb). Es ist daher anzunehmen, daß es sich beim hNLP um einen Vertreter einer größeren Peptid/Proteinfamilie handelt. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, daß die einzelnen Mitglieder dieser Peptid/Proteinfamilie das gleiche Expressionsmuster zeigen und folglich koexprimiert werden.

Durch die sensitivere Methode der RT-PCR konnte zusätzlich die Expression des hNLP Gens in der Lunge, dem Colon, der Blase und der Gallenblase nachgewiesen werden. Da

für den Nachweis eines bestimmten Transkriptes mit dieser Methode schon die mRNA einer Zelle ausreicht, kann die Expression des hNLP Gens in der Gallenblase vielleicht auch auf eine Kontamination dieser Gewebeprobe mit Leberzellen zurückzuführen sein.

Auch bei der Maus wird das homologe Gen, das mNLP Gen, gewebespezifisch exprimiert. Mit Hilfe eines Northern Blots mit Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben der Maus wurde ein ähnliches Expressionsmuster festgestellt. Danach wird das homologe Peptid bei der Maus im Dünndarm und in der Leber gebildet. In der Niere konnte keine Expression des mNLP Gens mit einer spezifischen Sonde detektiert werden. Auch gibt es bei der Maus keine Hinweise darauf, daß das NLP einer Peptid/Proteinfamilie angehört. Die in der Northern Blot Analyse ermittelten Transkriptgrößen korrelieren mit der Länge der dargestellten cDNA-Sequenz.

Das humane und das murine NLP werden nicht nur im adulten Organismus gebildet, sondern auch schon während der Embryonalentwicklung. Dieses besondere gemeinsame Kennzeichen des zeitlichen Expressionsmusters der Peptide ist aus der Liste der EST-Clone zu entnehmen, die für das NLP codieren. Einige EST-Clone aus dieser Liste stammen aus cDNA-Banken, die aus RNA embryonaler Gewebe angelegt wurden (siehe Abschnitt 4.1.5).

5.6 Sequenzanalyse des humanen NLP Gens

Der transkribierte Bereich der Nukleotidsequenz des humanen NLP Gens konnte durch eine Genomische PCR ermittelt werden (Abschnitt 4.4). Die Promotor-Region des Gens wurde mit Hilfe eines speziellen Verfahrens zur Charakterisierung unbekannter DNA-Bereiche, dem Genome Walking amplifiziert, kloniert und sequenziert (Abschnitt 4.4.1). Die Ergebnisse aus diesen Experimenten lieferten zusammen die vollständige Sequenz des humanen NLP Gens.

Das humane und das murine NLP Gen besitzen einige strukturelle Gemeinsamkeiten. Beide sind aus drei Exons und zwei Introns aufgebaut, darüber hinaus befinden sich die jeweiligen Exon/Intron-Übergänge an den gleichen Positionen. Diese Genstruktur läßt vermuten, daß die Exons des NLP Gens gemäß der Exontheorie der Gene (Traut, 1988; Long, 1995) funktionelle oder strukturelle Domänen des NLPs codieren.

Die Promotorregion des humanen NLP Gens (Abschnitt 4.4.2 und 4.4.3) zeichnet sich durch zwei TATA-Boxen aus, die sich 30 bzw. 80 Basen vor dem Transkriptionsstart befinden. Sie enthält im Gegensatz zu Promotoren von Haushalts-Genen kein Inr-Element und keine GC-Box. Neben Bindungsmotiven für ubiquitäre

Transkriptionsfaktoren wie USF (Upstream Stimulatory Factor) und TBP (TATA-Box Binding Protein, ein zentraler Baustein des TFIID-Komplexes) enthält die 5'-flankierende Region des hNLP Gens auch Bindungsmotive für gewebespezifische Transkriptionsfaktoren. Die hohe Transkriptionsrate dieses Gens in der Leber ist möglicherweise auf die zahlreichen Consensus-Sequenzen für leberspezifische Transkriptionsfaktoren, wie HNF-4, LF-A1 und NF-IL6 zurückzuführen.

Der Faktor HNF-4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4) gehört zur Superfamilie der Steroid Hormon Rezeptoren und wird vor allem in der Leber, aber auch in der Niere und im Darm gebildet (Sladek et al., 1990). Bei der Maus konnte gezeigt werden, daß dieser Faktor von essentieller Bedeutung für die Embryogenese ist (Drewes et al., 1996). Da NLP nicht nur im adulten Organismus, sondern auch schon während der Embryonalentwicklung gebildet wird, scheint HNF-4 eine Schlüsselrolle bei der Transkriptionskontrolle des hNLP Gens zu spielen.

LF-A1 (Liver Factor A1), auch HNF-2 genannt, interagiert mit einer Erkennungssequenz in der Promotorregion verschiedener leberspezifisch exprimierter Gene, wie z.B. dem Alpha-1-Antitrypsin Gen (Ramji et al., 1991; Monaci et al., 1988).

Der Faktor NF-IL6, der auch als LAP (Liver -enriched Activator Protein) bezeichnet wird, gehört zur C/EBP Familie und besitzt ein bZIP Motiv (Descombes et al., 1990). Er wird durch Lipopolysaccharide, IL1 und IL6 induziert und bindet an regulatorische Regionen verschiedener Cytokine (TNF, IL6, IL8 und GCSF). NF-IL6 ist an der Regulation von Akute-Phase-Reaktionen, Entzündungsprozessen sowie der Hämatopoiese beteiligt (Akira et al., 1990; Majello et al., 1990). Falls die Expression des NLPs durch diesen Transkriptionsfaktor reguliert wird, sollte überprüft werden inwiefern das NLP an den genannten Prozessen involviert ist.

Die Transkriptionsrate des hNLP Gens könnte auch einer cAMP abhängigen Regulation unterliegen, denn direkt vor der zweiten TATA-Box befindet sich ein cAMP response element (CRE). Alle bisher bekannten CREBs (CRE Binding Protein) sind Mitglieder der basischen Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren (bZIP) (Sassone-Corsi, 1995). Nach der Dimer-Bildung, die durch den Leucin Zipper vermittelt wird, können diese Transkriptionsfaktoren an ein CRE-Element eines Promotors binden (Lee und Masson, 1993). Die Phosphorylierung eines CRE Binding Proteins durch die cAMP abhängige Proteinkinase ermöglicht die Interaktion mit einer Komponente des TFIID-Komplexes, der an die TATA-Box bindet (Ferreri et al., 1994)

Die Relevanz der beschriebenen Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive muß durch weitere Studien verifiziert werden. Dazu bieten sich Untersuchungen zur Expressionsrate mit verschiedenen Reporter-gen-Konstrukten an. Es sollte vor allem überprüft werden, welchen Einfluß Steroide, Lipopolysaccharide und cAMP auf die Transkription des hNLP Gens haben. An transfizierten Zellen, die ein Reporter-gen-Konstrukt enthalten, kann der

Einfluß von cAMP auf die Transkription durch Experimente mit Forskolin, einem Aktivator der Adenylatcyclase (Seamon und Daly, 1981), untersucht werden.

5.7 Chromosomale Lokalisation des hNLP Gens

Eine Feinkartierung des hNLP Gens erfolgte mit Hilfe des Radiation Hybrid Mappings (Walter et al., 1994). Diese Technik beruht auf der PCR-Analyse von somatischen Mensch-Nager-Hybridzellen. Zur Herstellung der somatischen Hybridzellen werden menschliche Donorzellen mit hochdosierten Röntgenstrahlen (8000 rad) behandelt, die eine Fragmentierung der humanen Chromosomen hervorrufen. Da eine Röntgendosis von 8000 rad den Zelltod herbeiführt, werden die bestrahlten Donorzellen mit HPRT-defizienten Hamsterrezipientenzellen fusioniert. Hybridzellklone werden in HAT-Medium selektioniert und cytogenetisch charakterisiert. Normalerweise findet man die humanen Chromosomenfragmente als Translokationen oder Insertionen in den Hamsterchromosomen wieder (Walter und Goodfellow, 1993).

Die PCR-Analyse der somatischen Hybridzellen gelingt nur mit Primern, mit denen ausschließlich die humane Zielsequenz amplifiziert wird. Aufgrund der verhältnismäßig geringen Konservierung der Intron- und der 3' UTR Sequenzen während der Evolution werden orthologe Sequenzen der Nagetier-DNA bei der PCR-Analyse somatischer Hybridzellen mit Primern aus diesen Bereichen gewöhnlich nicht mitamplifiziert.

Alternativ zur PCR-Analyse können die somatischen Hybridzellen auch mittels Southern-Blotting auf das Vorhandensein des zu kartierenden Gens untersucht werden (Cuticchia, 1995). Die PCR-Technik bietet allerdings mehrere Vorteile gegenüber dem Southern-Blotting (Kelsell et al., 1997):

1. Sie erfordert weniger template DNA.
2. Sie ist sehr viel schneller sowohl bei der Kartierung von Genen als auch von STS (sequence tag sites).
3. Sie ist genspezifischer, da Kreuzhybridisierungen mit Mitgliedern von Gen-Familien oder zwischen verschiedenen Spezies vermieden werden.

Mit Hilfe des Radiation Hybrid Mappings und YAC-Bibliotheken wird am Whitehead Institute / MIT Center for Genome Research eine physikalische Karte des menschlichen Genoms erstellt (Hudson et al., 1995; Boguski und Schuler, 1995; Berry et al., 1995). Diese gibt analog zu einer konventionellen genetischen Karte, die auf meiotischen Kopplungsanalysen beruht, die Distanz zwischen den einzelnen Markern und ihre Reihenfolge auf den Chromosomen an.

Nach den Untersuchungen zur chromosomalen Lokalisation des hNLP-Gens befindet es sich auf Chromosom 5q31 und ist 1,6 cR vom IL-13 Gen entfernt (Abschnitt 4.5). Diese Region ist durch ein IL-Cluster gekennzeichnet zu dem neben IL13 auch IL 3, IL4, IL5, und IL9 gehören (Morgan et al., 1992; Smirnow et al., 1992; Kluck et al., 1993). Das Genprodukt hNLP weist aber keine Homologie hinsichtlich der Aminosäuresequenz und der Anordnung der Disulfidbrücken zu den genannten Interleukinen auf. Daher ist anzunehmen, daß es sich beim hNLP nicht um ein neues Mitglied der Interleukin-Familie handelt.

Die Tabelle 5.1 stellt einen Auszug aus der OMIN (Online Mendelian Inheritance in Man) Datenbank dar und zeigt, daß sich in dem chromosomalen Segment 5q31 zahlreiche Gene befinden, die für Wachstumsfaktoren, Hormonrezeptoren, Transkriptionsfaktoren und Proteine codieren, die an der Signaltransduktion beteiligt sind. Chromosomale Deletionen dieser Region werden häufig bei Patienten, die unter einer myeloischen Leukämie leiden, festgestellt. Daher wird von Le Beau et al. (1993) vermutet, daß sich dort ein Tumor-Supressorgen befindet.

Tab. 5.1 Gene der chromosomalen Bande 5q31

| Gen-Locus | Symbol | Name |
|-----------|-------------|---|
| 5q31 | IL13 | Interleukin 13 |
| 5q31 | TCEB1L | Transcription elongation factor B (SIII) |
| 5q31-q32 | PDGFRB | Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide |
| 5q31.1 | CSF2, GMCSF | Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage) |
| 5q31.1 | EGR1 | Early growth response-1 |
| 5q31.1 | IL3 | Interleukin 3 |
| 5q31.1 | IL4 | Interleukin 4 |
| 5q31.1 | IL5 | Interleukin 5 |
| 5q31.1 | IL9 | Interleukin 9 |
| 5q31.1 | IRF1 | Interferon regulatory factor-1 |
| 5q31.1 | TCF7 | Transcription factor-7, T-cell specific |

5.8 Knock-out Maus

Durch PCR-Screening und Filterhybridisierung konnte aus einer Genbank des Mausstammes 129/Sv ein Cosmid-Clon (127-2) isoliert werden, der das murine NLP-Gen enthält. Um geeignete Restriktionsenzyme für eine Subklonierung des mNLP Gens auswählen zu können, wurde eine Restriktionskarte von diesem Cosmid-Clon erstellt. An die Auswertung der Restriktionsanalyse des Cosmid-Clones schloß sich die Subklonierung eines 5,5 kb großen Xba I Fragmentes in den Vektor pBSK an. Dieses rekombinante Plasmid stellt die Grundlage für weitere gentechnische Eingriffe zur Herstellung eines Knock-out Konstruktes dar. Diese Arbeiten werden bei Lexicon Genetics Inc. (Houston, Texas) fortgesetzt.

Bei der Maus ist es gelungen, isolierte Gene gezielt *in vitro* zu mutieren und mittels homologer Rekombination anstelle des residenten Gens in die Keimbahn zu überführen (Capecchi 1989 a,b; Melton, 1994). Da homologe Rekombination ein relativ seltenes Ereignis ist, verwendet man embryonale Stammzellen (ES-Zellen) als Zwischenstufe, auf der die rekombinanten Zellen ausgelesen werden können (Ramirez-Solis et al.,1993; Bronson et al., 1994). Diese werden anschließend in einen Empfängerembryo im Blastocystenstadium injiziert, wo sie die Gonaden kolonisieren können. Ausgehend von rekombinanten Keimzellen kann man schließlich mutante Mäuse züchten (Robertson, 1986).

Dieses Verfahren ermöglicht sogar Verlustmutationen gerichtet in ein Zielgen einzuführen, um Aufschluß über die Funktion dieses Zielgens zu erhalten (Brandon et al., 1995). Allerdings wird diese arbeitsaufwendige Methode dadurch eingeschränkt, daß bei der Manipulation von Genen die Letalmutationen herbeiführen, keine Aussage über die Funktion des Gens möglich ist.

Das bisher erfolgreichste Verfahren zur gezielten Induktion von Verlustmutationen (knock-out) ist in Abb. 5.4 dargestellt und umfaßt die folgenden Schritte:

1. Das isolierte Zielgen wird durch Insertion eines Neomycinresistenzgens (*neo^r*) inaktiviert, das das Leseraster unterbricht und gleichzeitig als selektiver Marker dient. Das mutierte Gen wird in einen Austauschvektor eingebaut, der außer bakteriellen Vektorsequenzen noch ein zweites selektives Markergen (Thymidinkinase vom Herpesvirus) enthält. Die linearisierte DNA wird durch Elektroporese in ES-Zellen eingeschleust, wo die DNA entweder durch illegitime oder homologe Rekombination in die Chromosomen eingebaut werden kann.

2. und 3. Homologe Rekombination findet zwischen homologen DNA-Sequenzen am Zielgen statt, während die bakteriellen Vektorsequenzen und das Thymidinkinasegen (tk^+) eliminiert werden.

4. Die resultierenden transformierten Zellen sind somit Neomycin-resistent und Thymidinkinase-negativ ($neo^r tk^-$) und überleben auf einem Selektionsmedium, das die Neomycin-analoge Verbindung G418 und die antivirale Substanz Gangcyclovir enthält. Bei illegitimer Rekombination hingegen wird der ganze Vektor an einer beliebigen Stelle in ein Chromosom eingebaut, so daß die resultierenden transformierten Zellen Neomycin-resistent und Thymidinkinase-positiv ($neo^r tk^+$) werden. Diese rekombinanten Zellen werden von Gangcyclovir abgetötet, während die nichttransformierten ($neo^s tk^-$) Zellen in ihrem Wachstum durch G418 gehemmt werden, so daß auf dem selektiven Medium nur die homologen rekombinanten Zellen überleben.

5. und 6. Durch die Polymerasekettenreaktion lassen sich die heranwachsenden rekombinanten Zellen identifizieren und anschließend in genetisch markierte Empfänger-Blastocysten injizieren, die von superovulierenden Mäusen stammen.

7. Nach Implantation des injizierten Embros in eine scheinträchtige Maus kann eine Maus-Chimaere entstehen, die aus injizierten ES-Zellen und Empfängerzellen hervorgegangen ist.

8. Falls die ES-Zellen die Gonaden der Chimäre kolonisiert haben, kann man nach Rückkreuzung mit einer Empfängermaus neben Mäusen vom Empfänger-genotyp auch mutante Mäuse erhalten, die in allen ihren Zellen die gezielt-induzierte Mutation enthalten.

Es besteht also die Möglichkeit durch Gene Targeting in einer Knock out Maus das NLP Gen selektiv zu inaktivieren und die Auswirkungen der Mutation auf die Entwicklung der Maus sorgfältig zu verfolgen. Auf diese Weise können Informationen zur Funktion des NLPs gewonnen werden. Manchmal hat aber die Inaktivierung eines Gens keine oder nur geringe phänotypische Konsequenzen. In diesen Fällen wird die Funktion des ausgeschalteten Gens von einem anderen funktionell äquivalenten Gen übernommen, die Knock-out-Mutation wird also durch genetische Redundanz kompensiert (Hanks et al., 1995).

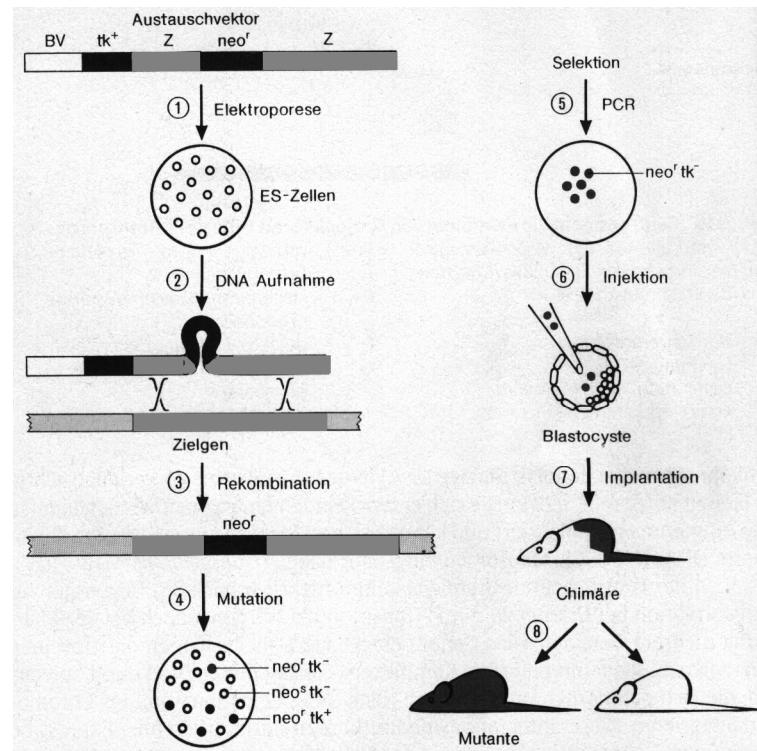


Abb. 5.3 Gezielte Inaktivierung eines Gens bei der Maus (Wehner und Gehring, 1995)

| | | | |
|------------------|-----------------------------|-----------------|------------------------|
| BV | bakterielle Vektorsequenzen | tk ⁺ | Thymidinkinase-positiv |
| ES | Embryonale Stammzellen | tk ⁻ | Thymidinkinase-negativ |
| neo ^r | Neomycin-resistent | Z | isoliertes Zielgen |
| neo ^s | Neomycin-sensitiv | | |

5.9 Biologische Relevanz von hNLP

Für funktionsanalytische Studien wurde das bityrische Peptid NLP (38-77) - wie in Abschnitt 3.4 - beschrieben synthetisiert. Dieses Peptid entspricht der längsten zirkulierenden Form des NLPs (HF 4451). Zusätzlich zu einer Reinheitskontrolle durch CZE, Massenspektrometrie und Sequenzierung wurde die Übereinstimmung des Syntheseprodukts mit dem nativen Peptid durch Koelution nachgewiesen. Dieses Peptid wurde in verschiedenen Bioassays, die am IPF etabliert sind, getestet. Beispielsweise zeigte der Radial Diffusions Assay nach Lehrer et al. (1991) keine antimikrobielle

Wirkung des Peptids sowohl bei grampositiven (*Staphylococcus aureus*) als auch bei gramnegativen (*E. coli* K12) Bakterien.

Bislang können keine Angaben zur funktionellen Bedeutung des Peptids gemacht werden, da auch andere Untersuchungsmethoden (Ussingkammer, T84 Bioassay, Organbadversuche) nicht zur Aufklärung der biologischen Aktivität geführt haben. Vermutlich geben Rezeptorbindungsstudien mit radioaktivmarkiertem Peptid an Membranpräparationen den entscheidenden Hinweis auf das Zielorgan oder das Zielgewebe des NLPs. Ist das Zielgewebe/Zielorgan des Peptids bekannt, kann der Einfluß des Peptids auf die physiologischen Funktionen dieses Organs gezielt untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen des Peptide Trappings wurde ein neues zirkulierendes Peptid aus humanem Hämofiltrat isoliert und charakterisiert. Dieses Peptid mit der Bezeichnung hNLP besitzt eine Masse von 3762 Dalton und besteht aus 34 Aminosäuren. Es enthält vier Cysteinreste, die an der Bildung von zwei intramolekularen Disulfidbrücken beteiligt sind. Die relative Lage der Disulfidbrücken des Peptids in 1-3 und 2-4 Verknüpfung wurde durch enzymatischen Verdau und LC-MS-Messung der gebildeten Fragmente aufgeklärt.

Das isolierte Peptid kann keiner bekannten Peptidfamilie zugeordnet werden, da eine signifikante Sequenzhomologie nicht vorhanden ist. Eine Datenbankrecherche in der dbEST, die einer Sammlung von Teilsequenzen aus cDNA-Clonen entspricht, lieferte drei humane und zwei murine EST-Clone. Durch die Sequenzierung dieser EST-Clone konnte die Nukleotidsequenz sowohl der humanen als auch der murinen cDNA bestimmt werden. Zusätzlich wurde die Sequenz der humanen cDNA durch 5'-RACE überprüft. Aus der cDNA des hNLPs geht hervor, daß es sich bei dem isolierten Peptid um das C-terminale Fragment eines 77 Aminosäuren langen Präkursors handelt.

Der N-terminale Bereich des Polypeptids, der aus der cDNA Sequenz abgeleitet werden kann, zeigt die charakteristischen Merkmale eines Signalpeptids. Mehrere mono- und dibasische Regionen im Präkursor weisen darauf hin, daß das NLP ein sekretorisches Peptid darstellt, daß durch Prohormon-Konvertasen prozessiert wird.

Das Peptid wird vor allem in der Leber, aber auch im Dünndarm, in der Niere und in der Lunge gebildet, wie durch Northern Blots und RT-PCR-Analysen gezeigt wurde. Ferner konnte das entsprechende Gen kloniert und sequenziert werden. Es setzt sich aus drei Exons und zwei Introns zusammen. Die hNLP cDNA stimmt vollständig mit den Exonsequenzen des Gens überein. Die Promotorregion des hNLP Gens ist durch mehrere Bindungsstellen für leberspezifische Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet. Eine Kartierung des hNLP Gens erfolgte durch Radiation Hybrid Mapping. Das Gen befindet sich auf Chromosom 5q31 in der Nähe eines Interleukin-Clusters.

Die wichtigsten Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit sind nachfolgend kurz aufgeführt:

1. Verschiedene Molekülformen des hNLPs zirkulieren im Blut, dem Transportmedium vieler Peptidhormone.
2. Das Peptid konnte nicht nur bei multimorbiden Patienten im Blut, sondern auch bei gesunden Probanden als Abbauprodukt im Urin nachgewiesen werden.

3. Die 22 N-terminalen Aminosäuren des Präpropeptides weisen die charakteristischen Kennzeichen eines Signalpeptids auf.
4. Das hNLP besitzt eine sehr konservierte Aminosäuresequenz, es muß daher einem hohen Selektionsdruck unterliegen. Dies spricht für eine essentielle Funktion des entdeckten Peptids im menschlichen Organismus.
5. Das hNLP Gen wird gewebespezifisch exprimiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Schlußfolgerung zu: das hNLP ist ein regulatorisches Peptid.

7 Literaturverzeichnis

Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, O., Moreno, R.F., Kerlavage, A.R., McCombie, W.R., Venter, J.C. (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252, 1651-1656

Adams, S., Blakesley, R. (1991) Linear amplification sequencing. *Focus (BRL)* 13(2), 56-57

Akira, S., Isshiki, H., Sugita, T., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., Nakajima, T., Hirano, T., Kishimoto, T. (1990) A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.* 9, 1897-1906

Altling-Mees, M.A., Short, J.M. (1989) pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res.* 17, 9494

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* 215, 403-410

Barnes, W.M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91, 2216-2220

Barr, P.J. (1991) Mammalian subtilisins: the long thought dibasic processing endoproteases. *Cell* 66, 1-3

Bauerle, P.A., Huttner, W.B. (1987) Tyrosine sulfation is a trans-Golgi-specific protein modification. *J.Cell. Biol.* 105, 2655-2664

Berridge, M.J. (1987) Inositol triphosphates and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu.Rev.Biochem.* 56, 159-193

Berry, R., Stevens, T.J., Walter, N.A., Wilcox, A.S., Rubano, T., Hopkins, J.A., Weber, J., Goold, R., Soares, M.B., Sikela, J.M. (1995) Gene-based sequence-tagged-sites (STS) as the basis for a human gene map. *Nat.Genet.* 10, 415-423

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7, 1513

Blobel, G. (1980) Intracellular protein topogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 77,1496-1500

Boguski, M., Schuler, G.D. (1995) ESTablishing a human transcript map. *Nature Genet.* 10, 369-371

Boguski, M.S., Lowe, T.M., Tolstoshev, C.M. (1993) dbEST-database for "expressed sequence tags." *Nature Genet.* 4, 332-333

Brandon, E.P., Idzerda, R.L., McKnight, G.S. (1995) Targeting the mouse genome: a compendium of knock-outs. *Curr.Biol.* 5, 625-634

- Bronson, S.K., Smithies, O. (1994) Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. *J.Biol.Chem.* 269, 2715-2718
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376
- Burke, D.T., Carle, G.F., Olson, M.V. (1987) Cloning large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosomes. *Science* 236, 806-812
- Capecchi, M.R. (1989a) Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244, 1288-1292
- Capecchi, M.R. (1989b) The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 5, 70-76
- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W.M., Higuchi, R. (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91, 5695-5699
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162, 156-159
- Darling, D.C., Brickell, P.M. (1994) *Nucleic Acid Blotting*. Oxford University Press, Oxford
- Decker, C.J., Parker, R. (1994) Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes. *Trends Biochem.Sci.* 19, 336-340
- Descombes, P., Chojkier, M., Lichtsteiner, S., Falvey, E., Schibler, U. (1990) LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev.* 4, 1541-1551
- Devi, L. (1991) Consensus sequence for processing of peptide precursors at monobasic sites. *FEBS Lett.* 280, 189-194
- Dohlmann, H.G., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987) A Family of Receptors Coupled to Guanine Nucleotide Regulatory Proteins. *Biochemistry* 26, 2657-2664
- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., Mattick, J.S. (1991) "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19, 4008
- Doolittle, R.F. (1986) *Of URFs and ORFs: a primer on how to analyze derived amino acid sequences*. University Science Books, Mill Valley, California
- Drewes, T., Senkel, S., Holewa, B., Ryffel, G.U. (1996) Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol.Cell.Biol.* 16, 925-931

- D'Aquila, R.T., Bechtel, L.J., Videler, J.A., Eron, J.J., Kaplan, J.C. (1991) Maximizing sensitivity and specificity by preamplification heating. *Nucleic Acids Res.* 19, 3749
- Edman, P. (1956) On the mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides. *Acta.Chem.Scand.* 10, 761-768
- Escher, E., Couture, R., Poulos, C., Pinas, N., Mizrahi, J., Theodoropoulos, D., Regoli, D. (1982) Structure-activity studies on the C-terminal amide of Substance P. *J.Med.Chem.* 25, 1317-1321
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem.* 132, 6-13
- Ferreri, K., Gill, G., Montminy, M. (1994) The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91, 1210-1213
- Forssmann, W.G., Schulz-Knappe, P., Meyer, M., Adermann, K., Forssmann, D., Hock, D., Aoki, A. (1993) Characterization of natural posttranslationally processed peptides from human blood: A new tool in the systematic investigation of native peptides. In *Peptide Chemistry 1992*. ed. Yanaihara, N., Leiden, Netherland, Escom, 553-557
- Fourney, R.M., Miyakoshi, J., Day, R.S., Pattersen, M.C. (1988) Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. *Bethesda Res.Lab.Focus* 10, 5-7
- Freedman, R.B. (1989) Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell* 57, 1069-1072
- Frohman, M.A., Dush, M.K., Martin, G.R. (1988) Rapid production of full length cDNAs from rare transcripts by amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85, 8998-9002
- Garbers, D.L. (1989) Guanylate cyclase, a cell surface receptor. *J.Biol.Chem.* 264, 9103-9106
- Gilman, A. (1987) G Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals. *Ann.Rev.Biochem.* 56, 615-649
- Ginsburg, M. (1994) *Guide to Human Genome Computing*. ed. Bishop, M.J., Academic Press, New York, 215-248
- Glembotski, C.C. (1982) Acetylation of α -Melanotropin and β -Endorphin in the rat intermediate pituitary. *J.Biol.Chem.* 257, 10493-10500
- Grunstein, M., Hogness, D.S. (1975) Colony hybridization - a method for isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 72, 3961-3965
- Güssow, D., Clackson, T. (1989) Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 17, 4000

- Hanks, M., Wurst, W., Anson-Cartwright, L., Auerbach, A.B., Joyner, A.L. (1995) Rescue of the EN-1 mutant phenotype by replacement of EN-1 with EN-2. *Science* 269, 679-682
- Hendrikson, R.L., Meridith, S.C. (1984) Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal.Biochem.* 136, 65-74
- Hewick, R.M., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Dreyer, W.J. (1981) A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J.Biol.Chem.* 256, 7990-7997
- Hirschberg, C.B., Snider M.D. (1987) Topography of glycosylation in the rough endoplasmatic reticulum and Golgi Apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 63-89
- Hopkins, S.J., Rothwell, N.J. (1995) Cytokines and the Nervous System I: expression and recognition. *Trends Neurosci.* 18, 83-88
- Hopp, T.P., Woods, K.R. (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acids sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78, 3824-3828
- Hruby, V.J., Al-Obeidi, F., Kazmierski, W. (1990) Emerging approaches in the molecular design of receptor-selective peptide ligands: conformational, topographical and dynamic considerations. *Biochem.J.* 268, 249
- Hudson, T., Stein, L., Gerety, S., Ma, J., Castle, A., Silva, J., Slonim, D., Baptista, R., Kruglyak, L., Xu, S., Hu, X., Colbert, A., Rosenberg, C., Reeve-Daly, M.P., Rozen, S., Hui, L., Wu, X., Vestergaard, C., Wilson, K., Bae, J., Maitra, S., Ganiatsas, S., Evans, C., DeAngelis, M., Ingalls, K., Nahf, R., Horton, L., Oskin, M., Collymore, A., Ye, W., Kouyoumjian, V., Zernsteva, I., Tarn, J., Devine, R., Courtney, D., Renaud, M., Nguyen, H., O'Connor, T., Fizames, C., Faure, S., Gyapay, G., Dib, C., Morissette, J., Orlin, J., Birren, B., Goodman, N., Weissenbach, J., Hawkins, T., Foote, S., Page, D., Lander, E. (1995) An STS-Based Map of the Human Genome. *Science* 270, 1945-1954
- Jackson, D.P., Hayden, J.D., Quirke, P. (1991) Reverse transcriptase PCR, nested PCR. In *PCR - a practical approach*. eds. McPherson, M.J., Quirke, P., Taylor, G.R., Oxford University Press, Oxford, 43-47
- Jackson, R.J., Standart, N. (1990) Do the poly(A)tail and 3' untranslated region control mRNA translation. *Cell* 62, 15-24
- Jakubke, H.D. (1996) Cyclopeptide. In *Peptide, Chemie und Biologie*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford, 253-262
- Karlson, P. (1982) Was sind Hormone? *Naturwissenschaften* 69, 3-14
- Kelsell, D.P., Spurr, N.K. Gene mapping using somatic cell hybrids. In *Methods in Molecular Biology, Vol.68: Gene Isolation and Mapping Protocols*. ed. Boulwood, J., Humana Press, Totowa, NJ, 45-52

- Kikkawa, U., Nishizuka, Y. (1986) The role of protein kinase C in transmembrane signalling. *Annu.Rev.Cell Biol.* 2, 149-178
- Klapper, M.H. (1977) The independent distribution of amino acid near neighbor pairs into polypeptides. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 78, 1018-1022
- Kluck, P.M., Wiegant, J., Raap, A.K., Vrolijk, H., Tanke, H.J., Willemze, R., Landegent, J.E. (1993) Order of human haematopoietic growth factor and receptor genes on the long arm of chromosome 5, as determined by fluorescence in situ hybridization. *Ann.Haematol.* 66, 15-20
- Kobata, A. (1992) Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur.J.Biochem.* 209, 483-501
- Kramer, P., Matthaei, D., Fuchs, C., Arnold, R., Ebert, R., McIntosh, C., Schauder, P., Schwinn, G., Scheler, F., Ludwig, H., Spitteller, G. (1978). Assessment of hormone loss through hemofiltration. *Artif. Organs* 2, 128-130
- Kroczek, R.A., Siebert, E. (1990) Optimisation of Northern analysis by vacuum blotting, RNA-transfer visualisation and ultraviolet fixation. *Anal.Biochem.* 184, 90-95
- Krull, S., Mazzeo, J.R. (1992) Capillary electrophoresis: The promise and the practise. *Nature* 357, 92-94
- Le Beau, M.M., Espinosa, R., Neumann, W.L., Stock, W., Roulston, D., Larson, R.A., Keinanen, M., Westbrook, C.A. (1993) Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90, 5484-5488
- Lee, K.A., Masson, N. (1993) Transcriptional regulation by CREB and its relatives. *Biochim.Biophys.Acta* 1174, 221-233
- Lehrer, R.I., Rosenman, M., Harwig, S.S.L., Jackson, R., Eisenhauer, P. (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J.Immun.Meth.* 137, 167-173
- Lennon, G., Auffray, C., Polymeropoulos, M., Soares, M.B. (1996) The I.M.A.G.E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics* 33, 151-152
- Lesk, A.M. (1988) *Computational Molecular Biology*. Oxford University Press, Oxford
- Lindberg, I. (1991) The new eukaryotic precursor processing proteinases. *Mol.Endocrinol.* 5, 1361-1365
- Long, M., Rosenberg, C., Gilbert, W. (1995) Intron phase correlations and the evolution of the intron/exon structure of genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92, 12495-12499

- Lukyanov, S.A., Gurskaya, N.G., Lukyanov, K.A., Tarabykin, V.S., Sverdlov, E.D. (1994) Highly efficient subtractive hybridization of cDNA. *Bioorganic Chem.* 20, 701-704
- Majello, B., Arcone, R., Toniatti, C., Ciliberto, G. (1990) Constitutive and IL-6-induced nuclear factors that interact with the human C-reactive protein promoter. *EMBO J.* 9, 457-465
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A., Collins, F.S. (1990) Construction of T-vectors, a rapid and general system for cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acid Res.* 19, 1154
- Melton, D.W. (1994) Gene targeting in the mouse. *BioEssays* 16, 633-638
- Merrifield, B. (1986) Solid Phase Synthesis. *Science* 232, 341-347
- Monaci, P., Nicosia, A., Cortese, R. (1988) Two different liver specific factors stimulate in vitro transcription from the alpha-1-antitrypsin promoter. *EMBO J.* 7, 2075-2087
- Morgan, J.G., Dolganov, G.M., Robbins, S.E., Hinton, L.M., Lovett, M. (1992) The selective isolation of novel cDNAs encoded by the regions surrounding the human interleukin 4 and 5 genes. *Nucleic Acids Res.* 20, 5173-5179
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350
- Munroe, D., Jacobson, A. (1990) mRNA poly(A)tail, a 3' enhancer of translational initiation. *Mol.Cell.Biol.* 10, 3441-3445
- Mutt, V. (1982) Chemistry of the gastrointestinal hormones and hormone -like peptides and a sketch of their physiology and pharmacology. In *Vitamines and Hormones*. New York, London, Academic Press, 231-427
- Mutt, V. (1983) New approaches to the identification of hormonal polypeptides. *Trends Neurosci.* 6, 357-360
- Mutt, V. (1993) On the necessity of isolating peptides. In *Peptides 1992*. eds. Schneider, C.H., Eberle, A.N., Escom Science Publishers B.V., 3-20
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y., Sugino, Y. (1990) A rapid highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acid Res.* 18, 6169
- Ovchinnikov, Y.A., Ivanov, V.T. (1982) The Cyclic Peptides: Structure, Conformation and Function. In *The Proteins*. eds Neurath, H., Hill, R.L., Academic Press, New York
- Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A., Baumeister, K. (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238, 336-341

- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., Werner, T. (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23, 4878-4884
- Quellhorst, E., Doht, B., Schünemann, G. (1977) Hemofiltration: Treatment of renal failure by ultrafiltration and substitution. *Journal of Dialysis* 1, 529-543
- Ramirez-Solis, R., Davis, C., Bradley, A. (1993) Gene targeting in embryonic stem cells. *Methods Enzymol.* 225, 855-877
- Ramji, D.P., Tadros, M.H., Hardon, E.M., Cortese, R. (1991) The transcription factor LF-A1 interacts with a bipartite recognition sequence in the promoter regions of several liver-specific genes. *Nucleic Acids Res.* 19, 1139-1146
- Rehfeld, J.F. (1981) Four basic characteristics of the gastrin-cholecystokinin system. *Am.J.Physiol.* 240, 255-266
- Riley, J., Butler, R., Ogilvie, D., Finniear, R., Jenner, D., Powell, S., Anand, R., Smith, J.C., Markham, A.F. (1990) A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acid Res.* 18, 2887-2890
- Rizo, J., Girasch, L.M. (1992) Constrained peptides: models of bioactive peptides and protein substructures. *Annu.Rev.Biochem.* 61, 387
- Robertson, E.J. (1986) Pluripotential stem cell lines as a route into the mouse germ line. *Trends Genet.* 2, 9-13
- Rodbell, M. (1992) The role of GTP-binding proteins in signal transduction: from the sublimely simple to the conceptually complex. *Curr.Top.Cell Regul.* 32, 1-47
- Sachs, A.B. (1993) Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell* 74, 413-421
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Ehrlich, H.A., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354
- 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, 487-491
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 74, 5463-5467
- Sassone-Corsi, P. (1995) Transcription factors responsive to cAMP. *Ann.Rev.Cell Dev.Biol.* 11, 355-377
- Schepky, A.G., Bensch, K.W., Schulz-Knappe, P., Forrsmann, W.G. (1994) Human hemofiltrate as a source of circulating bioactive peptides: Determination of amino acids, peptides and proteins. *Biomed.Chromatogr.* 8, 90-94

- Schrödinger, E. (1944) *What is Life?* Cambridge University Press, Cambridge
- Schulz-Knappe, P., Raida, M., Hess, R., Kleemeier, B., Richter, R., Schrader, M., Ständker, L., Forssmann, W.G. (1996b) Peptide Trapping from human blood. In *Peptides 1996*
- Schulz-Knappe, P., Raida, M., Meyer, M., Quellhorst, E.A., Forssmann, W.G. (1996a) Systematic isolation of circulating human peptides: the concept of peptide trapping. *Eur.J.Med.Res.* 1, 223-236
- Schwartz, T.W. (1986) The processing of peptide precursors. Proline-directed arginyl cleavage and other monobasic processing mechanisms. *FEBS Lett.* 200, 1-10
- Schwer, C. (1994) Analysis of Peptides and Proteins by Capillary Electrophoresis. In *Microcharacterization of Proteins.* eds. Kellner, R., Lottspeich, F., Meyer, H.E., VCH Weinheim, 47-62
- Seamon, K.B., Daly, J.W. (1981) Forskolin: A unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems. *J.Cyclic Nucleotide Res.* 7, 201-224
- Seidah, N.G., Day, R., Chretien, M. (1993) The family of pro-hormone and pro-protein convertases. *Biochem.Soc.Trans.* 21, 685-691
- Sharp, P.A. (1987) Splicing of messenger RNA precursors. *Science* 235, 766-771
- Shaw, G., Kamen, R. (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46, 659-667
- Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S.A. (1995) An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acid Res.* 23, 1087-1088
- Sladek, F.M., Zhong, W., Lai, E., Darnell, J.E. (1990) Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev.* 4, 2353-2365
- Smirnov, D.V., Smirnova, M.G., Korobko, V.G., Frolova, E.I. (1995) Tandem arrangement of human genes for interleukin-4 and interleukin-13: resemblance in their organisation. *Gene* 155, 277-281
- Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connel, C.R., Heiner, C., Kent, S.B.H., Hood, L.E. (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequencing. *Nature* 321, 674-679
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 98, 503-517
- Spackmann, D.H., Stein, W.H., Moore, S. (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal.Chem.* 30, 1190-1206

- Stoltzfus, A., Spencer, D.F., Zuker, M., Logsdon, J.M., Doolittle, W.F. (1994) Testing the exon theory of genes: the evidence from protein structure. *Science* 265, 202-207
- Strauss, E., Kobori, J., Siu, G., Hood, L. (1986) Specific-primer directed DNA sequencing. *Anal.biochem.* 154, 353-360
- Sundler, F., Hakanson, R. (1988) Peptide hormone producing endocrine/paracrine cells in the gastro-entero-pancreatic region. In *The Peripheral Nervous System*. Elsevier Science Publishers B.V., 219-295
- Tatemoto, K. (1982) Isolation and characterization of peptide YY (PYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79, 2514-2518
- Tatemoto, K., Carlquist, M., Mutt, V. (1982) Neuropeptide Y - a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296, 659-660
- Tatemoto, K., Mutt, V. (1980) Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature* 285, 417-418
- Taylor, S.S. (1989) cAMP-dependent protein kinases. *J.Biol.Chem.* 264, 8443-8446
- Traut, T.W. (1988) Do exons code for structural or functional units in proteins? *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85, 2944-2948
- Ullrich, A., Schlessinger, J. (1989) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-212
- Vogelstein, B., Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76, 615-617
- von Heijne, G. (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur.J.Biochem.* 133, 17-21
- von Heijne, G. (1990) The signal peptide. *J.Membrane Biol.* 115, 195-201
- Wahl, G.M., Lewis, K.A., Ruiz, J.C., Rothenberg, B., Zhao, J., Evans, G.A. (1987) Cosmid vectors for rapid genomic walking, restriction mapping, and gene transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 84, 2160-2164
- Wahle, E., Keller, W. (1992) The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Ann.Rev.Biochem.* 61, 419-440
- Walter, M.A., Goodfellow, P.N. (1993) Radiation hybrids: irradiation and fusion gene transfer. *Trends Genet.* 9, 352-356
- Walter, M.A., Spillet, D.J., Thomas, P., Weissenbach, J., Goodfellow, P.N. (1994) A method for constructing radiation hybrid maps of whole genomes. *Nature Genet.* 7, 22-28

Walter, P., Gilmore, R., Blobel, G. (1984) Protein Translocation across the Endoplasmatic Reticulum. Cell 38, 5-8

Wehner, R., Gehring, W. (1995) Zoologie, Thieme Verlag, Stuttgart, 124-125

Wilson, T., Treisman, R. (1988) Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by AU-rich sequences. Nature 336, 396-399

Wold, F. (1981) In vivo chemical modifications of proteins (post-translational modification). Annu. Rev. Biochem. 50, 783-814

Zhao, Z.Y., Joho, R.H. (1990) Isolation of distantly related members in a multigene family using the polymerase chain reaction technique. Biochem.Biophys.Res.Comm. 167, 174-182

8. Abkürzungen

| | |
|-----------------|--|
| % (v/v) | Volumenprozent |
| Acm | Acetamidomethyl |
| ASA | Aminosäureanalyse |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| bp | Basenpaar |
| C4 | Butyl |
| C18 | Octadecyl |
| cAMP | 3',5'-cyclo-Adenosin-monophosphat |
| cDNA | copy-DNA |
| cGMP | 3',5'-cyclo-Guanosin-monophosphat |
| CZE | Kapillarzonenelektrophorese |
| Da | Dalton |
| DAG | Diacylglycerol |
| DIPEA | N,N-Diisopropylethylamin |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDT | Ethandithiol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| ES | embryonale Stammzellen |
| EST | expressed sequence tag |
| Fmoc | Fluorenylmethoxycabonyl |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HAT | Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin |
| HBTU | 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat |
| HD | Hämodialyse |
| HF | Hämofiltrat |
| HOBt | N-Hydroxybenzotriazol |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| HPRT | Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-triphosphat |
| IPTG | Isopropyl-1-thio-β-D-Galaktosid |
| kgV | kleinstes gemeinsames Vielfaches |
| LM | low melting |
| mRNA | messenger-RNA |

| | |
|----------------|---|
| MS | Massenspektrometrie |
| MTBE | tert-Butylmethylether |
| MW | Molekulargewicht |
| NMP | N-Methylpyrrolidinon |
| OMIN | Online Mendelian Inheritance in Man |
| OPA | ortho-Phtaldialdehyd |
| ORF | Open Reading Frame |
| PBS | Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (0,9 %) |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PIR | Protein Identification Resource |
| PKA | cAMP-abhängige Proteinkinase |
| rER | rauhes Endoplasmatisches Retikulum |
| RIA | Radioimmunoassay |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| RP | Reverse-Phase |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| STS | sequence tagged site |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TF | Transkriptionsfaktor |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TIC | Total Ion Chromatogramm |
| T _m | Schmelztemperatur |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Trt | Trityl |
| UTR | Untranslated Region |
| VE | voll entsalzt |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid |
| YAC | Yeast Artificial Chromosom |

Für die chemischen Elemente, die Nukleotide, die Aminosäuren und SI-Einheiten werden die üblichen Abkürzungen benutzt.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. W.G. Forssmann danke ich für die Bereitstellung des Themas, die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten und die Förderung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. B. Otto vom Fraunhofer Institut Hannover sowie Herrn PD. Dr. W. Müller vom Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover möchte ich für die freundliche Übernahme des Referates bzw. Korreferates danken.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Peter Schulz-Knappe für die gute Betreuung, zahlreiche Anregungen und Diskussionen, Herrn Dr. Manfred Raida und seiner Abteilung für die Hilfe bei der Analytik sowie Herrn Dr. Knut Adermann und seinen Mitarbeitern für die Hilfe bei den Peptidsynthesen. Eine Cosmid-Bank wurde mir freundlicherweise von PD. Dr. Michael Nehls zur Verfügung gestellt.

Ebenfalls unersetzliche Diskussionspartner waren mir meine stets hilfsbereiten Kollegen Herr Dr. Rüdiger Heß, Herr Dr. Oliver Hill, Frau Dipl.-Biol. Annette Busmann, Frau Dipl.-Biol. Gaby Heine, Herr Dipl.-Biol. Peter Kreutzmann, Herr Dipl.-Biol. Stephan Ückert, Herr Dipl.-Biol. Christian Schneider-Fresenius, sowie Cornelia Liepke, Peter Pietrzyk, Valeska Stadie, Robin Ciesielski, Dirk Pape-Lange, Susanne Hollrieder und Ilka Uhrlandt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchte ich ausdrücklich für die idelle und finanzielle Förderung meines Promotionsstudiums danken. Schließlich gilt in diesem Zusammenhang Frau Dr. Sabine Barlach-Bölle mein besonderer Dank, weil sie die Funktion als Koordinatorin unseres Graduiertenkollegs mit großer Herzlichkeit und Engagement wahrnahm.