

**Molekularbiologische Untersuchungen zur Charakterisierung des
Uroguanylin-Gens**

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von
Dipl.-Biol. Oliver Hill
geboren am 01.02.1966 in Hannover

-1997-

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.1997
Referent: PD Dr. W. Müller
Korreferent: Prof. Dr. W.G. Forssmann

An dieser Stelle sei all denen, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben gedankt.

Ich danke

Herrn **Prof. Dr. Dr. h.c. W.-G. Forssmann** für die Überlassung des Themas, das entgegengebrachte Vertrauen und die sehr guten Arbeitsbedingungen am Institut.

Herrn **PD. Dr. W. Müller** vom Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover für die freundliche Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn **Dr. H.-J. Mägert** für die Betreuung der molekularbiologischen Arbeiten und die Unterstützung beim Erstellen der Manuskripte.

Herrn **Dr. M. Raida**, Frau **Dipl.-Biol. G. Heine** und allen Mitarbeitern der Abteilung Peptidanalytik für die stets gewährte Hilfeleistung.

Frau **Dipl.-Biol. A. Cieslak**, Herrn **Dr. R. Hess**, Herrn **Dipl.-Biol. Burkhard Kleemeier**, Frau **Dipl.-Biol. S. Martin**, Frau **Dr. P. Vogel**, Herrn **Dr. G. Waschütza**, Frau **Dr. J. Weiß**, Herrn **Dr. H. Zakaria** und Herrn **Dr. H.-D. Zucht** für fruchtbare Diskussionen und Hilfestellung.

Herrn **W. Posselt** für die Hilfe bei der Erstellung zahlreicher Abbildungen.

den technischen Assistenten **Melanie Klingenberg**, **Edda Kock**, **Peter Pietrzyk**, **Helmgard Schindler**, **Gunhild Schmeding** und **Rainer Schreeb** für die hervorragende Hilfe im alltäglichen Laborbetrieb.

Insbesondere möchte ich mich bei **Anne** bedanken, die mich während meiner Promotion mit viel Geduld begleitet hat.

für Anne und Robin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Intestinale Sekretion und Resorption - eine Einführung	1
1.2 Bakteriell verursachte, sekretorische Diarrhoe.....	3
1.3 Primärstruktur der Guanylatcyclase C.....	6
1.4 Gewebelokalisation und mögliche Regulationsmechanismen der Guanylatcyclase C	7
1.5 cGMP stimulierte Chloridsekretion im intestinalen Epithel	10
1.6 Guanylin - ein endogener Ligand der Guanylatcyclase C	13
1.7 Uroguanylin - ein zweiter endogener Ligand der GC-C?.....	17
Aufgabenstellung.....	18
2. Material und Methoden.....	19
2.1.1 Laborgeräte.....	19
2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3 Enzyme	21
2.1.5 Kits	21
2.1.6 Plamide.....	22
2.1.7 Mikroorganismen	22
2.1.7 Genbanken.....	22
2.1.8 DNA-Größenmarker.....	22
2.1.9 Oligonukleotide	22
2.2 Molekularbiologische Standardmethoden	24
2.2.1 Sterilisation von Lösungen und Materialien.....	24
2.2.2 Kultivierung von <i>E.coli</i> -Stämmen und Klonen	24
2.2.3 Plasmidschnellpräparation aus <i>E.coli</i> -Kulturen	24
2.2.4 Präparative Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i> -Kulturen.....	25
2.2.5 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	25
2.2.7 Fällung von Nukleinsäuren aus wäßriger Lösung	25
2.2.8 Agarosegelelektrophorese von DNA.....	26
2.2.9 Extraktion von DNA aus Agarosegelen und wäßrigen Lösungen.....	26
2.2.10 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	27
2.2.11 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA	27
2.2.12 Ligation.....	27
2.2.13 Klonierung von DNA-Fragmenten	28
2.2.14 Herstellung transformationskompetenter <i>E.coli</i> Zellen.....	29
2.2.15 Transformation	29
2.2.16 RNA-Extraktion	30
2.2.17 Agarosegelelektrophorese von RNA	30
2.2.18 Southern-Blot / Northern-Blot.....	31
2.2.19 Herstellung von Gensonden	31
2.3 Radioaktive Markierung von DNA.....	32
2.3.1 Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten	32
2.3.2 Endmarkierung von Oligonukleotiden mit Polynukleotidkinase	32
2.3.3 Reinigung radioaktiv markierter DNA	33
2.3.4 Aktivitätsmessung	33
2.3.5 Hybridisierungen	33
2.3.6 Autoradiographie.....	34
2.4 Sequenzierung.....	34
2.4.1 Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden	34

2.4.2 Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs	35
2.4.3 Denaturierende Sequenziergele	35
2.4.4 Radioaktive Sequenzierung	36
2.5 Gen- und cDNA-Bank- "Screening"	36
2.5.1 Bestimmung des Phagentiters	37
2.5.2 Plattierung der Phagen	37
2.5.3 Erstellung von Replikafiltern	37
2.5.4 Isolierung positiver Phagenklone	37
2.5.5 Minilysate	38
2.5.6 Präparative Lysate	38
2.5.7 PEG-Fällung	39
2.5.8 Glycerin-Stufengradient	39
2.5.9 Isolierung der Phagen-DNA	39
2.6 Polymerase-Kettenreaktion	39
2.6.1 Kolonie-PCR	41
2.6.2 Amplifikation der Phageninsertionen aus λ GT11-Isolaten	42
2.6.3 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	42
2.6.3.1 cDNA-Erststrangsynthese	43
2.6.3.2 RT-Stufen-PCR zur relativen Abschätzung der Genexpression	43
2.6.4 RACE-PCR	44
2.6.4.1 3'-RACE-PCR	45
2.6.4.2 5'-RACE	46
2.6.5 Amplifikation des humanen Uroguanylin-Gen Promotors	49
2.7 Primer-Extension	49
2.8 Heterologe Expression der Uroguanylin-Prohormone in <i>E. coli</i>	50
2.8.1 Genkonstrukte	50
2.8.2 Kulturbedingungen	51
2.8.3 Nickelchelataffinitäts-Chromatographie	52
2.8.4 Bestimmung der Proteinkonzentrationen	53
2.8.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
2.8.6 Färbung der Proteine in Polyacrylamidgelen	54
2.8.7 Western-Blot und Immunfärbung	55
2.8.8 Reverse Phase-HPLC	56
2.8.9 Massenspektrometrie	56
2.8.10 Aminosäuren-Sequenzanalyse	57
2.8.11 T84 Bioassay	57
2.8.12 cGMP-Radioimmunoassay	58
Ergebnisse	59
3.1 Klonierung der humanen Uroguanylin-cDNA	59
3.1.1 Amplifikation eines 3'-terminalen Fragments der humanen Uroguanylin-cDNA	59
3.1.2 Größenbestimmung der vermutlichen Uroguanylin-mRNA mittels Northern-Blot-Analyse	61
3.1.3 cDNA-Bank-Screening	62
3.1.4 Amplifikation des 5'-Terminus der humanen Uroguanylin-cDNA	63
3.1.5 cDNA-Sequenz und Primärstruktur des Uroguanylin-Prohormons	64
3.2 Untersuchungen zum Expressionsmuster des humanen Uroguanylin-Gens	66
3.2.1 Northern-Blot-Analyse	67
3.2.2 RT-Stufen-PCR	68

3.3 Klonierung der porcinen Guanylin- und der porcinen Uroguanylin-cDNA	69
3.3.1 cDNA-Sequenz und Primärstruktur des porcinen Guanylin Prohormons.....	72
3.3.2 cDNA-Sequenz und Primärstruktur des porcinen Uroguanylin-Prohormons .	73
3.4 Untersuchungen zum Expressionsmuster des porcinen Uroguanylin- und Guanylin-	
Gens	74
3.4.1 Northern-Blot-Analyse	74
3.4.2 RT-Stufen-PCR	76
3.5 Expression der Uroguanylin-Prohormone in <i>E.coli</i> BL21(DE3)	77
3.5.1 Expression des humanen His-Prouroguanylins in <i>E.coli</i> BL21 (DE3).....	78
3.5.2 Aufreinigung und Analyse des humanen His-Prouroguanylins aus <i>E.coli</i>	
BL21(DE3)	79
3.5.3 Expression des porcinen Uroguanylin-Prohormons in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	82
3.5.4 Untersuchungen zur Bioaktivität der rekombinanten Proteine.....	84
3.6 Klonierung und Sequenzierung des humanen Uroguanylin-Gens	87
3.7 Sequenzanalyse des humanen Uroguanylin-Gens.....	89
3.7.1 Exon-/ Intronübergänge	89
3.7.2 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des humanen Uroguanylin-Gens	90
3.7.3 Potentielle Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren in der 5'-flankierenden	
Region des Uroguanylin-Gens.....	91
3.7.4 Nukleotidsequenz des humanen Uroguanylin-Gens.....	92
4. Diskussion.....	95
4.1 Klonierung der humanen Uroguanylin-cDNA	95
4.2 Analyse der humanen cDNA-Sequenz und Primärstruktur des Uroguanylin-	
Vorläufers	97
4.3 Gewebeverteilung der humanen Uroguanylin-/Guanylin-Genexpression und	
mögliche Funktionen des Peptides	99
4.4 Analyse der cDNA-Sequenzen für porcines Guanylin/Uroguanylin.....	102
4.5 Sequenzanalyse der porcinen Prohormonsequenzen	103
4.6 Expressionsmuster des Guanylin- und des Uroguanylin-Gens in	
gastrointestinalen Geweben des Schweins	107
4.7 Rekombinante Expression der Prouroguanyline in <i>E.coli</i> BL21(DE3).....	108
4.8 Sequenzanalyse des humanen Uroguanylin-Gens	110
4.9 Ausblick.....	115
5.1 Zusammenfassung.....	117
5.2 Summary	118
6. Literaturverzeichnis	119
7. Abkürzungsverzeichnis.....	131
Lebenslauf.....	133
Publikationsliste.....	134

1. Einleitung

1.1 Intestinale Sekretion und Resorption - eine Einführung

Im Gastrointestinaltrakt wird die aufgenommene Nahrung in resorbierbare Bestandteile überführt und in den Körper aufgenommen. Dies geschieht durch mechanische (Zerkleinerung, Durchmischung, Transport) und enzymatische Vorgänge (Hydrolyse von Kohlenhydraten, Lipiden und Proteinen) während der Nahrungspassage. Der Gastrointestinaltrakt besteht aus einem durchlaufenden Rohr von der Mundhöhle bis zum Anus und gliedert sich in Oropharynx, Ösophagus, Magen, Dünn- und Dickdarm. In den Gastrointestinaltrakt münden zudem die Ausführgänge der exkretorischen Drüsen (Mundspeicheldrüse, Pankreas und Leber), die einen Teil der enzymatisch wirksamen Verdauungssäfte produzieren (Vaupel & Ewe 1995). Der Dünndarm (*Intestinum tenue*) ist beim Menschen im kontrahierten Zustand etwa 3,5 bis 4 m lang und in drei Unterabschnitte gegliedert: *Duodenum*, *Jejunum* und *Ileum*. Er ist der Hauptort der Nahrungsresorption. Zusätzlich werden Wasser, Elektrolyte, Spurenelemente und Vitamine aus dem Darmlumen über eine hochspezialisierte Mucosa in das Blut oder die Lymphe aufgenommen. Der Dickdarm (*Intestinum crassum*) des Menschen besitzt eine Länge von etwa 1,5 m und ist in vier Abschnitte unterteilbar: *Cecum*, *Colon*, *Rectum* und *Canalis analis*. Der aus dem Dünndarm übertretende Chymus wird durch Resorption von Wasser und Elektrolyten weiter eingedickt und ausgeschieden. Eine Übersicht über die gastrointestinale Flüssigkeitsbilanz des Menschen ist in Tab. 1a wiedergegeben.

	Flüssigkeitseinstrom / 24h	Flüssigkeitsausstrom / 24 h
Mundhöhle	1,5 l Speichel, 1 l Nahrung und Trinken	
Magen	2 l Magensekret	
Duodenum	0,4 l Galle, 1,5 l Pankreassekret	
Jejunum	2 l Jejunumsekret	5 l
Ileum	0,6 l Ileumsekret	2,9 l
Colon		1,0 l
Rektum /Anus		0,1 l Restflüssigkeit in der Fäzes
Bilanz	9 l / 24 h	9 l / 24 h

Tab. 1: Gastrointestinale Flüssigkeitsbilanz des Menschen nach Vaupel und Ewe (1995)

Wie aus der Tabelle ersichtlich, findet über die Dünndarmmucosa der höchste Flüssigkeitsumsatz innerhalb des Gastrointestinaltraktes statt. Diese Verhältnisse spiegeln sich auch in den morphologischen Gegebenheiten wieder. Die Verteilung sekretorischer und resorbierender Zellen in der intestinalen Mucosa ist anatomisch differenziert; sekretorische Zellen finden sich in kurzen, schlauchförmigen Drüsen, den Krypten (*Glandulae intestinalis*), wohingegen resorbierende Zellen im superficialen Oberflächenepithel lokalisiert sind. Letzteres ist im Dünndarm durch zirkuläre Schleimhautfalten (*Plicae circularis*) und durch

etwa 1 mm hohe, fingerartige Ausstülpungen in das Darmlumen, die sog. Dünndarmzotten (*Villi intestinalis*), stark vergrößert. Zusätzlich zu den makroskopischen Strukturen wird durch den Feinbau der Enterozyten eine enorme Oberflächenvergrößerung des Epithels erreicht. Ihre apikale Zellmembran ist von dichtstehenden, protoplasmatischen Fortsätzen, den sog. *Mikrovilli*, besetzt, die in ihrer Gesamtheit den Bürstensaum des Dünndarms bilden. In der Bürstensaummembran sind zahlreiche Exoenzyme lokalisiert, die an der Nahrungshydrolyse beteiligt sind (Drenckhahn & Fleischhauer, 1994). Bei einer durchschnittlichen Länge des humanen Dünndarms von 3,8 m beträgt seine Gesamtoberfläche etwa 200 m². Die passive Permeabilität der Dünndarmmucosa ist hoch, so daß Abweichungen in der Osmolarität des Chymus schnell ausgeglichen werden. Der Chymus im Dünndarm ist plasmaisoton. Die Chloridsekretion durch die Hauptzellen der Dünndarmkrypten erfolgt aktiv. Wasser und Na⁺ strömen hingegen passiv auf parazellulärem Weg in das Darmlumen ein. Die Resorption erfolgt transzellulär über die Enterozyten und parazellulär über die Schlußleiste des Oberflächenepithels unter Ausnutzung des elektrochemischen Gradienten (siehe Abb. 1.1). (Vaupel & Ewe, 1995)

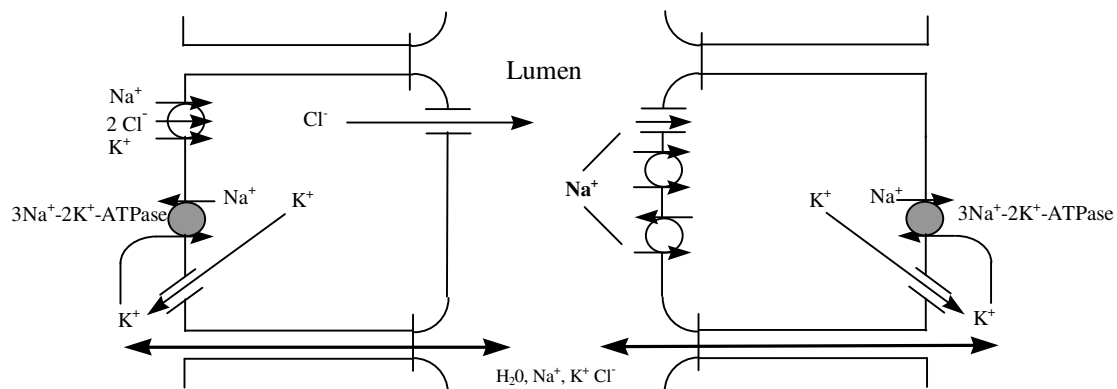


Abb. 1.1 Na⁺, K⁺ und Cl⁻ als Leitonen der intestinalen Sekretion / Resorption im Dünndarm. Durch selektive Verteilung der Ionenpermeabilitäten in der apikalen oder basolateralen Plasmamembran einer Epithelzelle ist festgelegt, ob aktive Sekretion oder aktive Resorption durch die Zelle erfolgt. Links: Vereinfachtes Schema der Chloridsekretion durch eine Hauptzelle der Dünndarmkrypte: Die in der basolateralen Membran lokalisierte 3Na⁺-2K⁺-ATPase hält einen in die Zelle gerichteten, elektrochemischen Na⁺-Gradienten aufrecht. Sekundäraktiv erfolgt die Aufnahme von Chlorid aus dem Interstitium über ebenfalls in der basolateralen Membran lokalisierte Na⁺-Cl⁻-K⁺ - Kotransporter. Chlorid wird über in der apikalen Membran lokalisierte Chloridkanäle in das Darmlumen abgegeben, Kalium über Kanäle in der basolaterale Membran rezirkuliert. Wasser und Natriumionen folgen parazellulär über den Intrazellularspalt und die Schlußleiste. Rechts: Vereinfachtes Schema einer resorbierenden Zelle im Oberflächenepithel des Dünndarms. Analog zur sekretorischen Zelle wird über die 3Na⁺-2K⁺-ATPase in der basolateralen Membran ein in die Zelle gerichteter Natriumgradient aufrecht erhalten. Natrium kann durch spezielle Kanalproteine, Na⁺-Substrat-Symporter oder durch Na⁺-Kationen-Antiporter in die Zelle eintreten. In Abwesenheit von Substraten erfolgt die Rezirkulierung von Na⁺ im Dünndarm überwiegend parazellulär.

Im Dickdarm fehlen sowohl die *Villi intestinalis* als auch die *Plicae circulares*; d. h. die Oberfläche des luminalen Epithels ist, verglichen mit dem Dünndarm, reduziert, und die passive Permeabilität der Mucosa ist gering. Die *Glandulae intestinalis* sind tiefer

eingeschnitten als in der Dünndarmmucosa (Fleischhauer & Drenckhahn, 1994). Zwischen dem Darmlumen und der Schleimhaut wird, im Gegensatz zum Dünndarm, ein osmotischer Gradient aufgebaut, und die Fäzes werden hyperosmolar. Zur Hyperosmolarität tragen mikrobielle Abbauprodukte der Nahrungsinhaltsstoffe bei. Das Colon ist, im Gegensatz zum Dünndarm, zur aktiven Kaliumsekretion und -resorption fähig (Field 1989). Wie auch im Dünndarm sind die sekretorische Zellen in den Krypten, die resorbierenden Zellen im Oberflächenepithel der Mucosa lokalisiert (Vaupel & Ewe 1995).

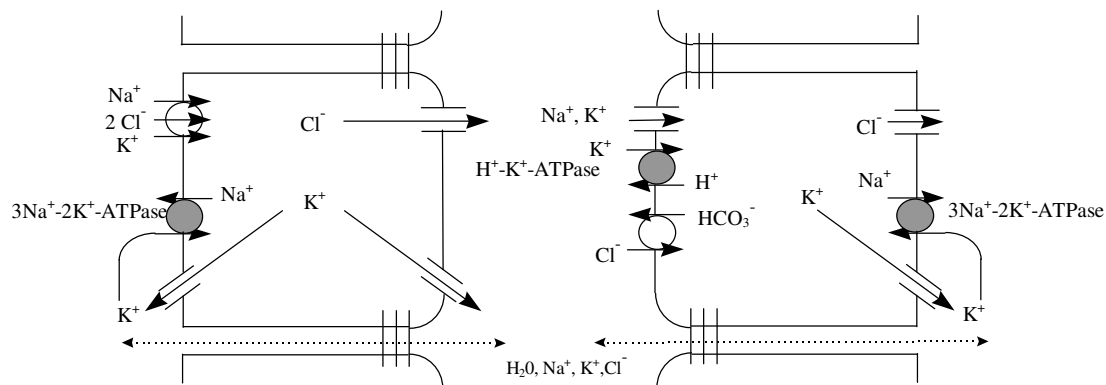


Abb. 1.2 Na^+ , K^+ und Cl^- als Leitonen der intestinalen Sekretion / Resorption im Dickdarm. *Links:* Vereinfachtes Schema der Chloridsekretion durch eine Hauptzelle der Dickdarmkrypte: Die in der basolateralen Membran lokalisierte $3\text{Na}^+-2\text{K}^+-\text{ATPase}$ hält einen in die Zelle gerichteten, elektrochemischen Na^+ -Gradienten aufrecht. Sekundäraktiv erfolgt die Aufnahme von Chlorid aus dem Interstitium über ebenfalls in der basolateralen Membran lokalisierte Na^+-Cl^- -Kotransporter. Chlorid als auch K^+ wird über in der apikalen Membran lokalisierte Kanäle in das Darmlumen abgegeben. Kalium wird teilweise über Kanäle in der basolateralen Membran rezirkuliert. Wasser und Natriumionen folgen parazellulär über den Intrazellularspalt und die Schlußleiste. *Rechts:* Vereinfachtes Schema einer resorbierenden Zelle im Oberflächenepithel des Dickdarms. Analog zur sekretorischen Zelle wird ein in die Zelle gerichteter Natriumgradient aufrecht erhalten. Na^+ und K^+ können über spezielle Kanalproteine in die Zelle eintreten. K^+ kann zusätzlich, insbesondere im distalen Colon, primäraktiv über eine in der apikalen Membran lokalisierte $\text{H}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ resorbiert werden. Die Resorption von Chloridionen erfolgt aktiv über einen Cl^- - HCO_3^- -Symporter in der apikalen Membran, die parazelluläre Resorption ist gering. Chlorid und Kaliumionen werden über Kanalproteine in der basolateralen Membran rezirkularisiert (Field, 1989; Dawson, 1991; Vaupel & Ewe 1995).

1.2 Bakteriell verursachte, sekretorische Diarrhoe

Eine Vielzahl von Mikroorganismen und Viren ist in der Lage, die Sekretions- und Resorptionsvorgänge des intestinalen Epithels in pathologischer Weise zu beeinflussen. Ein besonderes Krankheitsbild bei Säugetieren, das durch die pathogene Modulation des gastrointestinalen Elektrolythaushaltes hervorgerufen wird, ist die bakteriell verursachte, sekretorische Diarrhoe. Sie wird vor allem durch Mikroorganismen der *Enterobacteriaceae*- und *Vibrionaceae*- Familie verursacht. Die pathologischen Veränderungen des intestinalen Ionentransports durch bakterielle Sekretagoga manifestieren sich wie folgt:

1. In allen Dünndarmabschnitten und/oder im Colon wird die aktive Chloridsekretion stimuliert.

2. Im Ileum und/oder im Colon wird die aktive Bicarbonatsekretion stimuliert.

3. Im Colon wird die aktive K^+ -Sekretion stimuliert.

4. Im Dünndarm wird die Na^+ - und Chlorid-Resorption inhibiert.

Einhergehend mit der Veränderung der intestinalen Osmolarität kommt es auf parazellulärem Weg zum passiven Ausstrom von Wasser in das Darmlumen. Im klinischen Bild äußern sich diese Veränderungen durch exzessive, wäßrige Durchfälle. Der sich einstellende, hohe Verlust an Flüssigkeit und Elektrolyten kann, insbesondere bei Kleinkindern und Säuglingen, unbehandelt rasch zum Tod führen (Field & Semrad, 1993).

Die geschilderten Veränderungen des intestinalen Elektrolyttransportes werden durch die Sezernierung bakterieller *Exotoxine* in das Darmlumen verursacht. Im medizinischen Bereich werden diese Toxine, aufgrund der intestinalen Lokalisation der Erreger, als *Enterotoxine* bezeichnet. Die Besiedelung des Epithels erfolgt nichtinvasiv, ohne Einbruch der Erreger in das Epithel, die Lymph- oder Blutbahn des Wirtes. Mit der Besiedelung des Epithels kommt es zur Toxinproduktion und damit zur Schaffung eines für den Erreger günstigen Milieus. So sind beispielsweise Vibrionen, insbesondere *Vibrio cholerae*, mäßig bis ausgeprägt halophil. Die minimalen Na^+ -Konzentrationen, die für ein optimales Wachstum benötigt werden, liegen zwischen 300 und 700 mM. Sie tolerieren zudem alkalische Wachstumsbedingungen bis pH 10. Durch diese ausgeprägte Alkalitoleranz läßt sich die ausschließliche Kolonisierung des intestinalen Epithels durch *Vibrio cholerae* im oberen Dünndarmbereich erklären (Schaal 1988).

Vor ihrer Identifizierung auf molekularer Ebene wurden Enterotoxine anhand ihrer relativen Masse und Hitzestabilität unterschieden. Die erste Toxingruppe umfaßt die sogenannten hitzelablen Enterotoxine, zu denen das durch *Vibrio cholerae* sezernierte Cholera toxin (CT) und ein sowohl in der Struktur als auch in der Wirkung ähnliches, von bestimmten *enterotoxigenen E. coli*-Stämmen gebildetes Enterotoxin (hitzelablen *E. coli* Enterotoxin, LT) gehören. Beide Toxine besitzen eine relative Masse von ca. 87000 Da. Strukturell setzen sie sich aus einer A-Untereinheit (Mr 28000) und fünf B-Untereinheiten (Mr 10000) zusammen. Nach Bindung der B-Untereinheiten an das Gangliosid G_{M1} an der apikalen Zellmembran kommt es zur Translokation der A-Untereinheit in die Enterozyten. Im Anschluß an die intrazelluläre Hydrolyse der A-Untereinheit in die A_1 - (Mr 21000) und A_2 -Peptide (Mr 7000) katalysiert das A_1 -Peptid die ADP-Ribosylierung eines stimulatorischen G-Proteins (G_s). Die hierdurch ausgelöste, permanente Aktivierung der Adenylatcyclase führt zu einem abnormen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration und nachfolgend zu den oben beschriebenen sekretorischen Effekten. Intrazellulär wird dieser Prozess durch die PKA-abhängige Phosphorylierung apikaler Chloridkanäle vermittelt (Chu & Walker, 1993; Field & Semrad, 1993). Die Wirkung des Toxins auf die Enterozyten setzt erst nach einer *lag*-Phase von 30-60

min ein und ist irreversibel. Im *in vivo*-Modell der isolierten Dünndarmschleife kann nach einmaliger Toxinapplikation eine bis zu 48 h anhaltende, sekretorische Wirkung beobachtet werden, wobei der maximale Effekt erst nach 3-4 h erreicht wird. Es wird vermutet, daß die Wirkung des Toxins erst mit der Regeneration des Epithels nachläßt (Carpenter 1972).

Neben der direkten Aktivierung sekretorischer Zellen durch das Cholera-toxin kommt es aus entero-endokrinen Zellen der Mucosa zur toxin-stimulierten, serosalen Freisetzung von Neuromediatoren (Serotonin, Neurotensin). Diese wiederum aktivieren Rezeptoren enteraler Nerven, was letztlich zur vermehrten Ausschüttung körpereigener, sekretorisch wirksamer Botenstoffe, z.B. vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP), führt. VIP seinerseits stimuliert über basolaterale Rezeptoren die Adenylatcyclase in sekretorischen Enterozyten und verstärkt somit den Effekt des Toxins insgesamt (Field & Semrad, 1993).

Die zweite Toxingruppe beinhaltet die sogenannten hitzestabilen Enterotoxine (ST). Hierbei handelt es sich um eine heterologe Gruppe kleiner Peptide mit einer relativen Masse von 2-8 kDa. Im Gegensatz zum Cholera-toxin können hitzestabilen Enterotoxine nicht durch Pasteurisieren der Nahrung inaktiviert werden. Sie sind über einen weiten pH-Bereich (pH 2-8) stabil und werden von Mikroorganismen der *Enterobacteriaceae*- und *Vibrionaceae*-Familien gebildet.

Im Jahr 1978 konnten Field und Mitarbeiter *in vitro* zeigen, daß hitzestabiles *E. coli*-Enterotoxin (STh) eine intestinale, membranständige Guanylatcyclase aktiviert und seine sekretorische Wirkung im Gegensatz zum Cholera-toxin cGMP-vermittelt ist. In der gleichen Untersuchung durchgeführte Fluxmessungen an isolierter, ilealer Mucosa des Kaninchens ergaben, daß sich ein aktiver Chloridtransport nach mucosaler Enterotoxinapplikation von der serosalen zur mucosalen Seite des Epithels einstellte. Die Untersuchungen wurden durch Gianella und Drake 1979 bezüglich der cGMP vermittelten, sekretorischen Toxinwirkung *in vivo* an Jungmäusen bestätigt. In weiteren Untersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe wurde zunächst die Aminosäurezusammensetzung des Toxins (STp) und später seine Primärstruktur ermittelt. Das Toxin besitzt eine Länge von 18 Aminosäuren und enthält 6 Cysteine. Die Untersuchungen wiesen darauf hin, daß innerhalb des Toxins drei für die Bioaktivität essentielle Disulfidbrücken ausgebildet sind. Eine Reduktion des Toxins mit β -Mercaptoethanol oder DTT führt zum vollständigen Verlust der Bioaktivität (Staples *et al.*, 1980; Chan *et al.*, 1981).

Die Charakterisierung weiterer, hitzestabiler Enterotoxine des STa-Typs verschiedener Bakterienstämme zeigte, daß die Position der Cysteine und die ausgebildeten Disulfidbrücken in der C-terminalen, biologisch aktiven Region konserviert sind (siehe Abb. 1.3). Die N-terminale Proteinsequenz der Toxinvorläufer ist hingegen variabel (Gianella 1995).

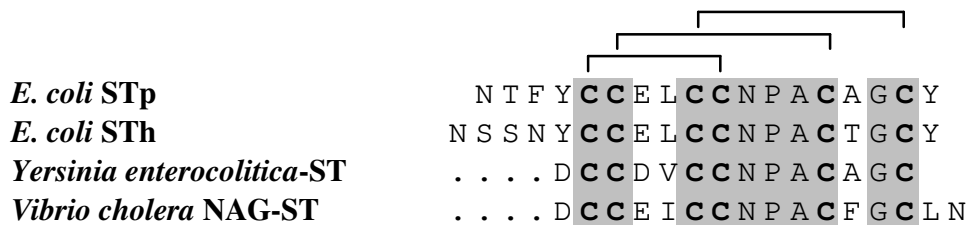


Abb. 1. 3 Hitzestabile Enterotoxine des *E.coli*-STa-Typs (Giannella 1995). Identische Aminosäuren sind grau unterlegt. Die für die biologische Aktivität erforderlichen Disulfidbrücken sind eingezeichnet. Die Aminosäuresequenzen der Toxine wurden aus den aktuellen GenBank-Datenbankeinträgen bezogen. Der Begriff STa wird in der Literatur synonym für die *E. coli*-Enterotoxine STh und STp verwendet (Accession Numbers: *E. coli* STp: J01831, V00612; *E. coli* STh: M18346, M34916; *Yersinia enterocolitica*-ST (Yst): U09235; *Vibrio cholera* NAG-ST: M85198).

Im Gegensatz zum Cholera toxin stellt sich die maximale, STa-vermittelte, sekretorische Wirkung im Modell der isolierten Dünndarmschleife nach einmaliger Toxinapplikation innerhalb weniger Minuten ein und ist ebenfalls innerhalb weniger Minuten vollständig reversibel (Giannella 1995). Die schnelle sekretorische Wirkung wird durch Bindung des Toxins an Oberflächenrezeptoren in der Bürstensaummembran der Enterozyten (Dreyfus *et al.*, 1984; Frantz *et al.*, 1984; Cohen, *et al.*, 1987), der nachfolgenden Aktivierung einer partikulären Guanylatcyklase in dieser Membran (Waldman *et al.*, 1986) und der damit verbundenen intrazellulären Akkumulation von cGMP als second Messenger vermittelt (Field *et al.*, 1978). Erst durch die Klonierung des STa-Rezeptors aus intestinale Gewebe der Ratte konnte gezeigt werden, daß in Analogie zu den Rezeptorguanylatcyclasen der natriuretischen Peptidhormone (GC-A, GC-B) der STa-Rezeptor und die durch STa stimulierte Guanylatcyklase in der Bürstensaummembran des Darms die funktionellen Domänen eines einzigen Moleküls sind. Konsequenterweise wurde der klonierte STa-Rezeptor als Guanylatcyklase C (GC-C) bezeichnet (Schulz *et al.*, 1990).

1.3 Primärstruktur der Guanylatcyklase C

Die von Schulz und Mitarbeitern klonierte GC-C-cDNA der Ratte kodiert für ein 1073 Aminosäuren langes Vorläufermolekül, wobei die aminoternale Region das Signalpeptid (As 1-22) und die extrazelluläre Rezeptordomäne (As 23-433) enthält; es folgt eine Transmembransequenz (As 434-454), der sich cytosolisch die carboxyterminale Region mit der Guanylatcyclasedomäne (As 750-1029) anschließt. Ein Teil der cytosolischen Region (As 493-738) besitzt zudem schwache Homologie mit der Tyrosin-Kinase-Domäne des EGF-Rezeptortyps (*epidermal growth factor*). Im Gegensatz zur GC-A und GC-B, die ähnliche strukturelle Charakteristika besitzen wie die GC-C, schließt sich innerhalb des GC-C-Moleküls carboxyterminal an die katalytische Domäne eine unpolare Aminosäuresequenz an. Es wird vermutet, daß die GC-C über diesen C-terminalen Sequenzbereich am Zytoskelett

verankert ist. Da die GC-C keine Homologie in ihrer extrazellulären Rezeptordomäne mit bis dato bekannten, partikulären Guanylatcyklasen aufwies (siehe Abb.1.4), wurde die Existenz eines von den natriuretischen Peptiden deutlich verschiedenen, endogenen Liganden postuliert (Schulz *et al.*, 1990). Durch die Klonierung der GC-C-cDNAs des Menschen (de Sauvage *et al.*, 1991; Singh *et al.*, 1991) und des Schweines (Wada *et al.*, 1994) aus intestinalem Gewebe zeigte sich, daß die von Schulz und Mitarbeitern beschriebene Primärstruktur dieser neuen Rezeptorguanylatcyklase bei Säugetieren hoch konserviert ist.

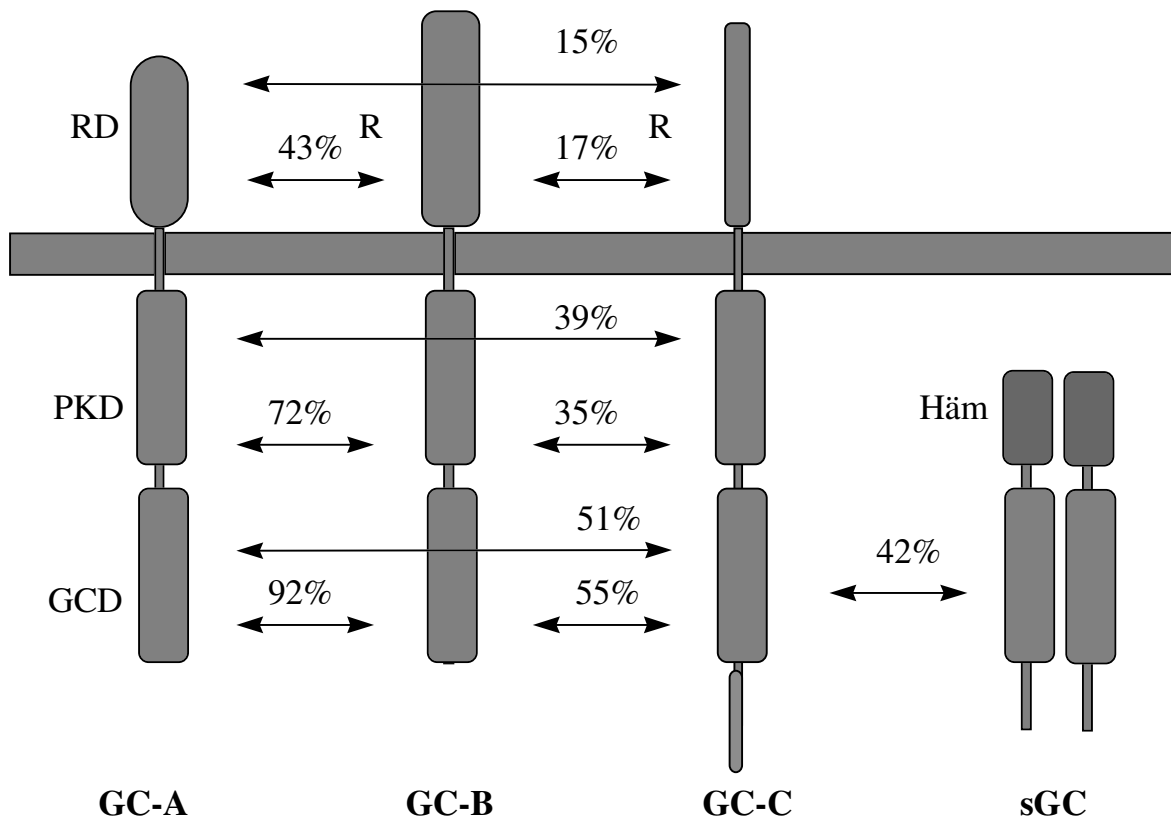


Abb. 1. 4 Modell der partikulären Guanylatcyklase A, B, C und der cytosolischen Guanylatcyklase (sGC). Die relativen Homologien der Aminosäuresequenzen zwischen den Moleküldomänen der Guanylatcyclasen sind angegeben (nach Schulz, 1990). RD = Rezeptordomäne, PKD = Proteinkinase ähnliche Domäne, GCD = Guanylatcyklase Domäne, Häm=Hämgruppe

1.4 Gewebelokalisation und mögliche Regulationsmechanismen der Guanylatcyklase C

Das Expressionsmuster des GC-C Gens im Darm der Ratte ist ausführlich durch verschiedene Arbeitsgruppen untersucht worden. Mittels Northern-Blot-Analysen wurde eine GC-C-mRNA-Synthese im Jejunum, Ileum und Colon der adulten Ratte lokalisiert (Schulz *et al.*, 1990; Laney *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993). *In situ*-Hybridisierungsversuche konnten eine selektive Expression des GC-C-Gens in den Enterozyten des Darmepithels demonstrieren. Im Dünndarm wurde GC-C-mRNA sowohl in Enterozyten der *Villi intestinalis* als auch in den *Glandulae intestinalis* nachgewiesen; im Colon wurden ebenfalls Enterozyten des

Oberflächenepithels und der *Glandulae intestinalis* als Ort der GC-C-Genexpression identifiziert. In Zellen der tiefergelegenen Mucosaschichten ohne Kontakt zum Darmlumen ließ sich keine GC-C-mRNA, wohl aber GC-A- und GC-B-mRNA nachweisen. Durch diesen Beleg, daß die Rezeptorguanylatzyklasen der natriuretischen Peptide offensichtlich nur in Zellen ohne Zugang zum Darmlumen exprimiert werden, konnten frühere Vermutungen, daß diese Rezeptoren an der cGMP vermittelten Wirkung hitzestabiler Enterotoxine beteiligt sind, ausgeschlossen werden (Li *et al.*, 1993).

Eine ähnliche Verteilung der GC-C-Genexpression wurde mittels *In situ*-Hybridisierungen und Northern-Blot-Analysen bei der Maus festgestellt. Enterozyten sowohl des Oberflächenepithels als auch der Krypten zeigten eine deutliche Genexpression im gesamten Darm, nicht aber in Zellen der tieferen Mucosaschichten. Im embryonalen Darm konnte GC-C-mRNA ab Entwicklungstag 12 nachgewiesen werden. Eine wichtige Funktion der GC-C bei der Entwicklung des Darms wird vermutet (Swenson *et al.* 1996).

Der direkte Nachweis und die subzelluläre Lokalisation des GC-C-Proteins mittels immunhistochemischer Methoden wurde am intestinalen Gewebe des Meerschweinchens durchgeführt. Beim Meerschweinchen ist das GC-C Protein ausschließlich im Bürstensaum der Enterozyten lokalisiert. Ein Unterschied bezüglich der Verteilung des GC-C-Proteins zwischen Oberflächenepithel und *Glandulae intestinalis* wurde weder im Dün- noch im Dickdarm festgestellt. Die subzelluläre Lokalisation des GC-C-Proteins in den Mikrovilli der Enterozyten erklärt zudem die ausschließlich luminale Wirkung hitzestabiler Enterotoxine des STa-Typs im Darm der Säuger (Kämpf *et al.*, 1996).

Beim Menschen ist die Verteilung der intestinalen GC-C-Genexpression im Vergleich zur GC-A- und GC-B-Genexpression mittels RT-PCR in mucosalem Biopsiematerial des Ileum, des Colon und des Rektum untersucht worden. In allen Abschnitten konnte eine hohe GC-C-, aber nur eine geringe GC-A-Genexpression detektiert werden. GC-B-mRNA war in keinem Abschnitt nachweisbar. Ebenso ließ sich durch Stimulationsversuche an mucosalen Biopsien nur mittels Enterotoxin STa, nicht aber mit ANF eine Guanylatzyklaseaktivität induzieren (Krause *et al.*, 1994).

Neben diesen eindeutigen Belegen der intestinalen Expression des GC-C Gens bei verschiedenen Spezies wurde zudem eine mäßige Genexpression in fetalem Leber-, Hoden- und Placentagewebe (Laney *et al.*, 1992) sowie in der adulten Nebenniere der Ratte detektiert (Schulz *et al.*, 1992). Bei der Ratte besteht ein zeitlicher Zusammenhang zwischen Geburt und GC-C-Genexpression sowohl im Darm als auch in der Leber. Einen Tag nach der Geburt ist die GC-C-Genexpression in beiden Organen am höchsten und nimmt dann kontinuierlich in den ersten Tagen der postnatalen Phase ab. Im adulten Tier ist die GC-C-Genexpression in der Leber mittels Northern-Blot-Analyse nicht mehr nachweisbar. Da die GC-C-Genexpression in der postnatalen Phase nicht vollständig mit der Bindung von Enterotoxin STa durch die Leber korreliert, wird die Existenz weiterer, GC-C-homologer Proteine vermutet (Laney *et al.*,

1992). Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung der GC-C in der Leber der Ratte wurde durch Untersuchungen der GC-C-Genexpression nach partieller Hepatektomie erhalten. Durch diesen Eingriff läßt sich bei der adulten Ratte eine deutliche GC-C-Genexpression induzieren, die mit der Regeneration des Organs wieder abnimmt. Die Bindungskapazität für STa-Enterotoxin in der adulten Leber ist im Gegensatz zur postnatalen Leber mit der GC-C-Genexpression korreliert (Laney *et al.*, 1994).

Versuche mit rekombinanter GC-C der Ratte (GC-C) aus embryonalen Nierenzellen (HEK293) deuten darauf hin, daß die GC-C im inaktiven Zustand als Homotrimer mit relativ schwachen intermolekularen Wechselwirkungen vorliegt. Es wurde postuliert, daß durch Bindung des Liganden (STa) an die extrazelluläre Domäne des Komplexes die Wechselwirkungen zwischen zwei der drei Monomere durch Konformationsänderungen stabilisiert wird. Intrazellulär führt dies zu einer Dimerisierung der Cyclasedomäne und zum aktiven Zustand des Enzyms. Eine Stabilisierung des aktiven Dimers erfolgt durch ATP-Bindung an die Proteinkinasedomäne der GC-C (Vaandrager *et al.*, 1993a; Vaandrager *et al.*, 1993b; Vaandrager *et al.*, 1994; Drewett & Garbers, 1994). Ein weiterer Regulationsmechanismus der GC-C-Aktivität wird auf Ebene des intrazellulären Membrantransportes vermutet. Urbanski und Mitarbeiter konnten in Studien an der humanen T84-Colon-Karzinom-Zelllinie beobachten, daß nach Bildung des Rezeptor-Liganden-Komplexes aus STa und GC-C, dieser durch Endocytose internalisiert wird. Möglicherweise wird durch die Ligandenbindung die Rezeptordichte in der Bürstensaummembran des Darms verringert (Urbanski *et al.*, 1995). Rezeptorbindungsstudien an mit der GC-C stabil transfizierten COS-7-Zellen führten zu der Beobachtung, daß in den Membranen dieser Zellen STa-Bindungsstellen mit multiplen Affinitäten existieren. Da COS-7-Zellen keine endogenen STa-Bindungsstellen aufweisen, können die in den rekombinanten Zellen vorhandenen Bindungsstellen nur auf die Expression des GC-C-Proteins zurückgeführt werden. Die Autoren vermuten daher, daß die in intestinalen Membranpräparationen bisher nachgewiesenen STa-Bindungsstellen unterschiedlicher Affinitäten nur auf die Expression des GC-C Gens zurückgeführt werden können, und nicht, wie bisher angenommen, ein Indiz für die Existenz GC-C-ähnlicher Genprodukte im intestinalen Bereich darstellen (Deshmane *et al.*, 1995).

Detaillierte Untersuchungen mit rekombinanter, humaner GC-C in stabil transfizierten COS-7-Zellklonen konnten belegen, daß die durch viele Arbeitsgruppen beobachtete Varianz des Molekulargewichtes der STa-Rezeptormoleküle in intestinalen Membranpräparationen (50-140 kDa) sich auf die Biogenese der GC-C im intrazellulären Kompartiment zurückführen läßt. Mit Pulse-Markierung der Proteinsynthese gelang es, die Genese vier unterschiedlicher GC-C-Translationsprodukte (50 kDa, 79 kDa, 120 kDa, 140 kDa) nachzuweisen. Die kleineren Produkte repräsentierten translationelle Abbruchprodukte (50 kDa, 79 kDa)

wohingegen das 120 kDa-Produkt die nichtglykosylierte und das 140 kDa-Produkt die glykosylierte Form des Rezeptors darstellte. Alle vier Proteine besaßen eine metabolische Halbwertszeit von etwa 7 Stunden und waren in ihren relativen Mengen konstant. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die zelluläre Lokalisation der GC-C-Translationsprodukte untersucht. Es zeigte sich, daß die translationellen Abbruchprodukte als auch die nichtglykosylierte Form des Rezeptors im endoplasmatischen Retikulum verbleiben und nur die vollständig glykosylierte Rezeptorform in die Zellmembran inseriert wird (Rudner *et al.*, 1996).

1.5 cGMP stimulierte Chloridsekretion im intestinalen Epithel

Als Modell des vektorialen epithelialen Elektrolyttransportes im Darm wurde eine humane Colon-Karzinom-Zelllinie, nämlich die T84-Zelllinie, etabliert (Darmsathaphorn *et al.*, 1984). T84-Zellen exprimieren konstitutiv die GC-C in ihrer apikalen Membran und sind somit der Initiation der cGMP-Kaskade durch hitzestabile Enterotoxine des STa-Typs zugänglich (de Sauvage *et al.*, 1991). Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben, daß durch STa-Stimulation in T84-Zellen eine kontinuierliche cGMP-abhängige, elektrogene Chloridsekretion über den apikalen Zellpol ausgelöst wird. Dieser Prozeß steigt dosisabhängig an und verläuft im Rahmen einer Sättigungskurve; die intrazelluläre cAMP-Konzentration wird hingegen nicht beeinflusst. Einen ähnlichen Effekt auf die elektrogene Cl⁻-Sekretion in T84-Zellen hat VIP (*vasoactive intestinal polypeptide*), ein Aktivator der cAMP-Kaskade. Im Gegensatz zum Enterotoxin STa, wirkt VIP über in der basolateralen Membran lokalisierte Rezeptoren. Basolaterale VIP-Applikation im T84-Zellmodell führt zu einem dosisabhängigen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration und nachfolgend zum elektrogenen Cl⁻-Transport über die apikale Zellmembran; die intrazelluläre cGMP-Konzentration bleibt unverändert.

Verglichen mit VIP ist der STa vermittelte Effekt in zwei Punkten abweichend:

1. Das Zeitintervall, das zwischen maximaler Stimulation der Zellen und dem Eintreten der maximalen Cl⁻-Nettoflußrate vergeht, ist deutlich länger als für VIP.
2. Die maximale, durch STa induzierte Cl⁻-Nettoflußrate ist niedriger als die durch VIP ausgelöste, maximale Cl⁻-Nettoflußrate.

Der Wirkungen von STa und VIP auf die Chloridsekretion sind trotzdem nicht additiv: Werden T84-Zellen sowohl mit STa als auch mit VIP maximal stimuliert, stellt sich als maximaler Cl⁻-Nettofluß der durch VIP auch alleine erzielte, höhere Endwert ein. Die Autoren vermuten daher, daß sowohl die cAMP als auch die cGMP vermittelten Effekte denselben apikalen Chloridkanal regulieren, vermutlich über eine Proteinkinase (Huott *et al.*, 1988). Diese Untersuchungen wurden durch Forte und Mitarbeiter am gleichen Zellsystem bestätigt.

Sie konnten aus T84-Zellen eine cAMP-abhängige Proteinkinase darstellen, die auch durch hohe cGMP-Konzentrationen stimuliert wird (Forte *et al.*, 1992).

Im Jahr 1988 konnten Baxter und Mitarbeiter in elektrophysiologischen Untersuchungen an intestinalem Biopsiematerial CF-homozygoter (Cystische Fibrose) Patienten zeigen, daß weder das Enterotoxin STa noch das Cholera-toxin einen Cl-Efflux an der luminalen Oberfläche der Mucosa auslöst, also sich weder der cGMP- noch der cAMP-vermittelte sekretorische Effekt einstellt. Das CF-Genprodukt ist ein Chloridkanal (CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) der durch cAMP-abhängige Proteinkinasen über direkte Phosphorylierung als auch über die intrazelluläre ATP-Konzentration reguliert und in der apikalen Zellmembran epithelialer Zellen lokalisiert ist. Bisher charakterisierte Mutationen im CFTR-Gen führen zur Expression eines defizienten Kanals und somit zum Verlust der cAMP-abhängigen Regulation des Chloridhaushaltes verschiedener epithelialer Systeme. In CF-Epithelien sind jedoch Ca^{2+} -regulierte und volumenabhängige Chloridkanäle voll funktionsfähig, so daß eine begrenzte Chloridsekretion erhalten bleibt (Fuller & Benos, 1992; Anderson *et al.*, 1992; Barrett 1993; Riordan, 1993).

In situ-Hybridisierungsexperimente an der Ratte konnten eine hohe CFTR-Gen-Expression in Epithelien des Pankreas, der Speicheldrüse, des Uterus und des Darms nachweisen. In der Lunge wie auch im Hoden ist die CFTR-Gen-Expression deutlich geringer und nicht nur auf die Epithelien beschränkt. Im Dünndarm nimmt die CFTR-Gen-Expression von der Basis der *Glandulae intestinalis* bis zur Spitze der *Villi intestinalis* hin ab. Ebenso nimmt die CFTR-Gen-Expression im Darm von den proximalen Abschnitten ausgehend in Richtung der distalen Abschnitte ab (Trezise *et al.*, 1991). Ähnliche Ergebnisse wurden durch *in situ*-Hybridisierungsexperimente an humanem, intestinalen Gewebe erhalten. Auch hier wurde eine Abnahme der CFTR-Genexpression von der Kryptenbasis bis zur Zottenspitze hin beobachtet; ebenso nimmt die CFTR-Genexpression insgesamt von den proximalen Abschnitten ausgehend in Richtung der distalen Darmabschnitte ab. Die höchste CFTR-Genexpression wurde in allen Darmabschnitten an der Kryptenbasis, also im sekretorischen Kompartiment des Darms lokalisiert. Dieser Befund erklärt, warum bei CF-Patienten eine besonders zähflüssige, intestinale Muzinschicht vorgefunden wird. Es wird vermutet, daß insbesondere im Colon die CFTR-abhängige Chloridsekretion für die Hydratisierung des Muzinfilms essentiell ist (Strong *et al.*, 1991).

Der CFTR-Chloridkanal wird in hohem Maße in T84-Zellen konstitutiv an der apikalen Zellmembran exprimiert, jedoch nicht basolateral (Cohn *et al.*, 1992). Wagner und Mitarbeiter (1992) demonstrierten durch elektrophysiologische Experimente an T84-Zellen, daß der cAMP-abhängige Cl-Efflux ausschließlich von der Expression des CFTR-Gens in diesen Zellen abhängig ist. T84-Zellen, deren CFTR-Gen-Expression durch CFTR-*antisense*-Oligonukleotidbehandlung auf 1/4 der konstitutiven Expressionsrate reduziert wurde, zeigten,

verglichen mit den Kontrollen, einen um 90% reduzierten cAMP-abhängigen Cl⁻-Efflux. Mit einem ähnlichen Versuchsansatz führten Chao und Mitarbeiter den Nachweis, daß die STA induzierte, cGMP-vermittelte Chloridsekretion in den T84-Zellen ebenfalls ausschließlich von der endogenen CFTR-Genexpression dieser Zelllinie abhängig ist. Die cGMP-abhängige Phosphorylierung des CFTR-Proteins wird in T84-Zellen durch Kreuzaktivierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) reguliert (Chao *et al.*, 1994).

Zu der Überlegung, daß die cGMP induzierte, PKA-abhängige Phosphorylierung des CFTR-Proteins möglicherweise ein Artefakt der bisher verwendeten Zellsysteme ist, und nicht der *in vivo* Situation der intestinalen Mukosa entspricht, führte die Klonierung einer neuen cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGKII) aus intestinale Gewebe der Ratte. Im Gegensatz zur cGMP-abhängigen Proteinkinase I ist das aus intestinale Gewebe dargestellte Enzym membranassoziiert (Jarchau *et al.*, 1994). Eine hohe Expression des cGKII-Gens wurde, ähnlich wie für das CFTR und GC-C-Gen, im Darm festgestellt, wobei die Expressionsrate entlang der longitudinalen Achse des Darms nach distal hin abnimmt. Die höchste Genexpressionsrate wurde im Dünndarm detektiert. Im distalen Colon ist die cGKII-mRNA mittels Northern-Blot-Analyse nicht mehr nachweisbar. *In situ*-Hybridisierungen lokalisierten im Dünndarm die höchste Genexpression in Zellen des oberen Kryptenbereich und an der Basis der Zotten; im Caecum dominierte die Genexpression in Zellen des Kryptenepithels, wohingegen im proximalen Colon sowohl Zellen des Oberflächenepithels als auch der Krypten als Ort der Genexpression identifiziert wurden. Eine analoge Verteilung des cGKII-Proteins wurde immunhistochemisch nachgewiesen. Es ist, wie auch das CFTR- und das GC-C-Protein, in den Mikrovilli der Bürstensaummembran des Darms lokalisiert (Markert *et al.*, 1995). Durch die Untersuchung cGKII gendefizienter Mäuse wurde die Bedeutung des Enzyms in der Regulation der intestinalen Sekretion bestätigt. Mit hitzestabilem Enterotoxin läßt sich *in vivo* bei cGKII (-/-)-Mäusen im Darm kein sekretorischer Effekt auslösen, wohingegen die Sensitivität des Gewebes gegenüber Cholera toxin unverändert ist (Pfeifer *et al.*, 1996).

Die vorgestellten Befunde demonstrieren, daß die cGMP-stimulierte Chloridsekretion im intestinalen Bereich im wesentlichen durch das Wechselspiel von drei Komponenten in der Bürstensaummembran des Darms mediiert wird: GC-C, CFTR und cGKII. Der postulierte Signaltransduktionsweg ist in Abb. 1. 5 schematisch dargestellt.

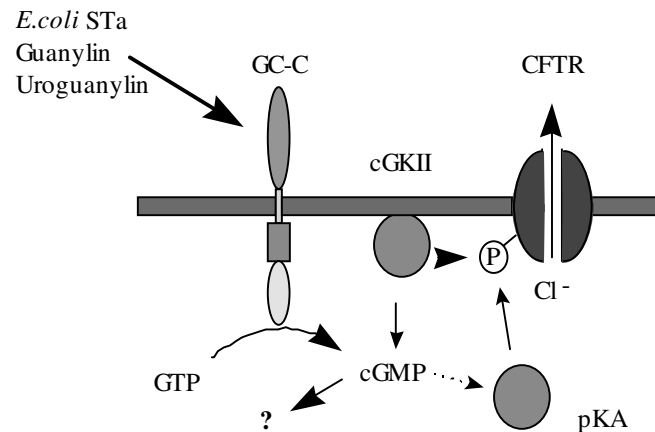


Abb. 1.5 Bisher identifizierte Komponenten der cGMP-stimulierten Chloridsekretion in der intestinalen Bürstensaummembran und ihr vermutetes Wechselspiel. Hitzestabile Enterotoxine des *E.coli* ST-Typs und zwei bisher identifizierte, endogene Peptide (Guanylin, Uroguanylin, s. Abschnitte 1.5, 1.6) lösen durch Bindung an die extrazelluläre Rezeptordomäne die Aktivierung der intrazellulären Cyclasedomäne der GC-C aus. Der intrazelluläre Anstieg der cGMP-Konzentration aktiviert eine ebenfalls membranassoziierte cGMP-abhängige Proteinkinase (cGKII). Durch Phosphorylierung des CFTR-Chloridkanals kommt es zu einem vermehrten Ausstrom von Chlorid über den apikalen Zellpol in das Darmlumen. Durch die enge Nachbarschaft der beteiligten Komponenten in den apikalen Membranstrukturen (Mikrovilli) der Enterozyten ist eine schnelle Reaktion des Systems aufgrund lokaler cGMP-Konzentrationen vorstellbar. Die bisher nur in Zelllinien beobachtete Aktivierung einer cytosolischen, cAMP-abhängigen Proteinkinase durch hohe cGMP-Konzentrationen scheint im intestinalen Epithel *in vivo* keine Rolle zu spielen.

1.6 Guanylin - ein endogener Ligand der Guanylatcyclase C

Mit der Entdeckung der GC-C durch die Arbeitsgruppe von David Garbers stellte sich zugleich auch die Frage nach einem endogenen Liganden für diese neue Rezeptorguanylatcyclase (Schulz *et al.*, 1990). Als ein geeigneter Biomonitor zur Identifizierung Guanylatcyclase-C-aktivierender Peptide (GCAPs) wurde die humane Colon-Karzinom-Zelllinie T84 verwendet. Die T84-Zellen exprimieren konstitutiv die GC-C, (Singh *et al.*, 1991) und reagieren selektiv und sensitiv auf Stimulation durch Enterotoxin STa mit intrazellulärer cGMP-Akkumulation (Huott *et al.*, 1988). Weder bekannte Aktivatoren (ANP, BNP) anderer, partikulärer Guanylatzyklen noch Aktivatoren der cytosolischen Guanylatcyclase haben einen Effekt auf die intrazelluläre cGMP-Konzentration in T84-Zellen. Der intrazelluläre cGMP-Anstieg in T84-Zellen ist somit ein direktes Maß für die Aktivierung der GC-C durch einen extrazellulären Liganden. Mit diesem Zellsystem als Biomonitor gelang es Currie und Mitarbeitern (1992) aus jejunalen Gewebeextrakten der Ratte ein Peptid darzustellen, das spezifisch die Guanylatcyclase C (GC-C) bindet und aktiviert: Guanylin. Das aufgereinigte Peptid besaß eine Länge von 15 Aminosäuren und wies in seiner Primärstruktur Homologie zum hitzestabilen *E.coli* Enterotoxin STa auf (siehe Abb. 1.6).

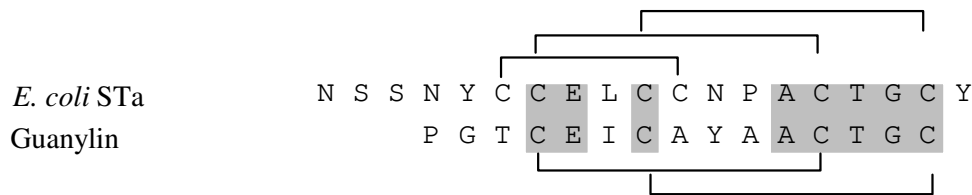


Abb. 1.6 Vergleich der Aminosäuresequenzen von *E.coli* STa und Guanylin. Die für die biologische Aktivität essentielle Verbrückung der Cysteine ist schematisch wiedergegeben. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt.

Analog zum Enterotoxin STa läßt sich in T84-Zellen durch Stimulation mit synthetischem Guanylin ein konzentrationsabhängiger Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration darstellen. In Wettbewerbsassays zeigte sich, daß Guanylin mit STa um die gleichen Bindungsstellen an T84-Zellen konkurriert. Die Potenz von Guanylin ist jedoch, bezogen auf die maximal erreichten cGMP-Konzentrationen und die benötigte Ligandenkonzentration, geringer als die von STa (Currie *et al.*, 1992).

Die Klonierung der Guanylin-cDNAs aus intestinale Gewebe der Ratte (Schulz *et al.*, 1992; Wiegand *et al.*, 1992a), der Maus und des Menschen (De Sauvage *et al.*, 1992; Wiegand *et al.*, 1992b) ergab, daß Guanylin das carboxyterminale Fragment eines 115 (Ratte, Mensch) bzw. 116 (Maus) Aminosäure langen Vorläuferpeptides mit einer relativen Masse von 12,5 kDa ist. Die aus den cDNA-Sequenzen abgeleiteten Prohormone sind einander homolog, wobei der C-Terminus (der biologisch wirksame Teil) am stärksten konserviert ist. Es wurde postuliert, daß Guanylin in das Darmlumen sezerniert wird und parakrin über die GC-C den intestinalen Elektrolythaushalt, insbesondere die Chloridsekretion, moduliert (Currie, *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 1992; Wiegand *et al.*, 1992a,b).

Diese Postulate wurden durch die Wirkung von synthetischem hGuanylin101-115 auf humane intestinale Mucosa *in vitro* zum Teil belegt. In Ussingkammerexperimenten erhöhte Guanylin sowohl an Mucosapräparaten des Jejunums als auch des Colons nach mucosaler Applikation konzentrationsabhängig den Kurzschlußstrom (I_{SC}). In der gleichen Studie durchgeführte Untersuchungen mit hitzestabilem Enterotoxin STa zeigten den selben Effekt auf den I_{SC} wie Guanylin, wobei die Wirkung des Toxins potenter war. Durch basolaterale Applikation von Bumetanid, einem Hemmstoff des $\text{Na}^+\text{-Cl}^-\text{-K}^+$ - Kotransporters (siehe Abb 1.1) wurde der Effekt auf den I_{SC} vollständig aufgehoben. Die Erhöhung des I_{SC} durch Guanylin oder STa kann somit als ein indirektes Maß für den Anstieg der elektrogenen Chloridsekretion durch das Epithel gewertet werden (Kuhn *et al.*, 1994a). Weitere Untersuchungen ergaben, daß im intestinalen Bereich analog zum Enterotoxin STa der durch Guanylin ausgelöste, cGMP-vermittelte sekretorische Effekt durch Phosphorylierung des CFTR-Kanals gesteuert wird (Cuthbert *et al.*, 1994; Chao *et al.*, 1994; Khare *et al.*, 1994).

Northern-Blot-Analysen an Geweben der Ratte und der Maus zeigten, daß Guanylin-mRNA hauptsächlich im intestinalen Gewebe gebildet wird, wobei die detektierte mRNA-Menge vom Duodenum zum Colon hin zunimmt. Eine wesentlich geringere Guanylingenexpression

wurde weiterhin in der Niere, Nebenniere, Uterus und Ovidukt der Ratte sowie in der Niere der Maus nachgewiesen (Schulz *et al.*, 1992; Wiegand *et al.*, 1992a, Kato *et al.*, 1993). *In situ*-Hybridisierungen an intestinalem Gewebe konnten für die Ratte eine hohe Gen-Expression in den Enterozyten an der Spitze der *Villi intestinalis* (Dünndarmzotten) und in den Oberflächenepithelzellen des Colons darstellen. Die Epithelzellen der *Glandulae intestinalis* zeigten hingegen nur eine geringe Genexpression (Lewis *et al.*, 1993; Li & Goy, 1993).

Beim Menschen wurde analog zur Ratte eine hohe Guanylin-Gen-Expression im intestinalen Gewebe nachgewiesen (Wiegand *et al.*, 1992b; De Sauvage *et al.*, 1992). Zusätzlich durchgeführte *in situ*-Hybridisierungen zeigten im Gegensatz zur Ratte eine hohe Genexpression im unteren Bereich der Dünndarmkrypten, insbesondere in den Panethzellen (De Sauvage *et al.*, 1992). Die Panethzellen sind exokrine seröse Drüsenzellen, die durch ihre apikale Granulierung auffallen und in das Darmlumen sezernieren. Sie liegen an der Basis der *Glandulae intestinalis* im Dünndarm des Menschen; dieser Zelltyp existiert jedoch nicht im Colon (Junqueira, 1986). Eine unspezifische Hybridisierung von Ribonukleinsäuren mit Panethzellen, wie sie häufig bei *in situ*-Hybridisierungen auftritt, wird als Ursache dieses Befundes diskutiert (Cetin *et al.*, 1994).

Zur zellulären Lokalisation des Guanylinprohormons im Darm liegen widersprüchliche Daten vor. Bei immunhistochemischen Untersuchungen an Geweben des Meerschweinchens wurde Guanylin-Immunoreaktivität (Guanylin-IR) in verschiedenen Subtypen enterochromaffiner Zellen (EC-Zellen) des GEP (gastro-entero-pankreatische-endokrine System) lokalisiert, nicht aber in Panethzellen. Die Guanylin-IR war im Dünndarm sowohl in EC-Zellen des Zottenepithels als auch des Kryptenepithels nachweisbar. Vereinzelt wurde immunoreaktives Material auch in EC-Zellen des Magens und des Pankreas detektiert. Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen wiesen eine ko-Lokalisation der Guanylin-IR mit den klassischen Markern der EC-Zellen, Serotonin und Chromogranin A, in den polymorphen Sekretgranula nach (Cetin *et al.*, 1994; Kämpf *et al.*, 1996). Bei immunhistochemischen Untersuchungen an humaner, duodener Mucosa konnten ebenfalls EC-Zellen als Ort der Guanylinsynthese identifiziert werden (Hill *et al.*, 1995a).

Enterochromaffine Zellen sind disseminiert im gastrointestinalen Trakt verteilte, neuroendokrine Drüsenzellen. Zwei Grundtypen dieser Zellen existieren im intestinalen Gewebe: Der "offene" Typ, dessen apikale Zelloberfläche mit dem Darmlumen in Verbindung steht, und der "geschlossene" Typ, dessen apikaler Zellpol nicht in das Lumen hineinreicht. Die Granula liegen basal und damit auf der zur *Lamina propria* zugewandten Zellseite. Diese Lokalisation weist darauf hin, daß diese Granula nicht in das Lumen, sondern in die *Lamina propria* abgegeben werden. Bei dem "offenen" Zelltyp wird eine zusätzliche, endoluminale

Sekretion über die apikale Zellmembran diskutiert (Forssmann *et al.*, 1969; Grube & Forssmann, 1994).

Guanylin-IR wurde sowohl in EC-Zellen des "offenen" als auch des "geschlossenen" Typs nachgewiesen und somit ist eine endokrine als auch eine luminale Guanylinsekretion durch EC-Zellen vorstellbar (Cetin *et al.*, 1994). Ein weiterer Beleg für die Guanylin-Synthese in enterochromaffinen Zellen der intestinalen Mucosa wurde durch eine Untersuchung von Kuhn und Mitarbeitern (1995) erbracht: Bei Patienten mit carcinoiden Tumoren wurden signifikant erhöhte Plasma-Guanylin Werte gemessen und Guanylin-Immunoreaktivität in Resektaten der Tumoren detektiert (Kuhn *et al.*, 1995).

Eine andere zelluläre Lokalisation des Guanylin-Prohormons im Darm wurde durch Li und Mitarbeiter (1995) als auch durch Cohen und Mitarbeiter (1995) ermittelt. Bei immunhistochemischen Untersuchungen an intestinalen Geweben der Ratte wurden Becherzellen in der intestinalen Mucosa als Ort der Guanylinsynthese identifiziert. Da Becherzellen zugleich auch Ort der Muzinsynthese und -sekretion sind, wird vermutet, daß Guanylin durch Stimulation der Chloridsekretion die Hydratisierung des intestinalen Muzinfilms beeinflußt (Li *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 1995).

Die zelluläre Prozessierung des Guanylinvorläufers und sein Sekretionsmodus *in vivo* ist ungeklärt. Mit der humanen Guanylin-cDNA transfizierte HEK293-Zellen sezernieren hGuanylin₂₂₋₁₁₅ (M=10,336 kDa), das Prohormon zeigte im GC-C Bioassay jedoch keine Aktivität. Die Bioaktivität stellte sich erst nach tryptischer Hydrolyse des sezernierten Proguanylin ein. Hierbei wird ein aktives, 22 Aminosäuren langes, carboxyterminales Fragment (hGuanylin₉₄₋₁₁₅) vom Prohormon abgespalten (De Sauvage *et al.*, 1992). Aus Hämofiltrat niereninsuffizienter Patienten gelang die Aufreinigung eines GC-C-aktivierenden Peptides, das als hGuanylin₂₂₋₁₁₅ identifiziert wurde. Im Gegensatz zum rekombinanten Prohormon besaß das native Material deutliche Bioaktivität im T84-GC-C Assay. Durch diese Untersuchung wurde zudem der Beleg für eine endokrine Sezernierung des Hormons erbracht. Für die Existenz eines bioaktiven, C-terminalen Fragmentes (hGuanylin₁₀₁₋₁₁₅) im humanen Plasma, wie es bei der Ratte aus jejunalen Extrakten dargestellt werden konnte, fand sich hingegen kein experimenteller Beleg (Kuhn *et al.*, 1993). Der Aufbau eines Radioimmunoassay für hGuanylin₂₂₋₁₁₅ und erste Messungen der Plasmaguanylinwerte bei gesunden Probanden und niereninsuffizienten Patienten zeigten, daß die Niere beim Abbau des zirkulierenden Prohormons möglicherweise eine wichtige Funktion hat: Patienten mit chronischem Nierenversagen haben einen 20fach höheren Guanylinplasmawert als gesunde Probanden (Kuhn *et al.*, 1994b).

Die hier vorgestellten Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen deuten darauf hin, daß Guanylin sowohl einer parakrinen als auch einer endokrinen Sezernierung mit speziesspezifischen Abweichungen unterliegt. Als ein endogener Ligand der GC-C moduliert

Guanylin den intestinalen Elektrolyttransport über cGMP abhängige Phosphorylierung intestinaler CFTR-Chloridkanäle; die endokrine Funktion von Guanylin ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt unverständlich.

1.7 Uroguanylin - ein zweiter endogener Ligand der GC-C?

Der Isolierung von Guanylin folgte die Darstellung von zwei dem Guanylin ähnlichen Peptiden mit jeweils 15 Aminosäuren aus dem Darm und dem Urin des Opossums, die beide *in vitro* die GC-C stimulieren. Eines der Peptide wird als speziesspezifische Guanylin-Isoform (Guanylin-Opossum) diskutiert, wohingegen das andere Peptid, da es aus dem Urin aufgereinigt wurde und deutlich in seiner Aminosäuresequenz vom Guanylin abweicht, als neues Mitglied einer dem Guanylin verwandten Peptidfamilie angesehen wird (Hamara *et al.*, 1993) und die Bezeichnung "Uroguanylin" erhielt. Aus humanem Urin gelang ebenfalls die Isolierung eines 16 Aminosäuren umfassenden, GC-C-stimulierenden Peptides, das vermutlich das humane Äquivalent zum Opossum-Uroguanylin darstellt (siehe Abb. 1.7) (Kita *et al.* 1994).

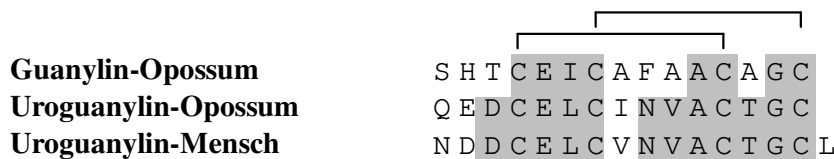


Abb. 1.7 Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanem Uroguanylin mit Opossum-Uroguanylin und Opossum-Guanylin. Die für die biologische Aktivität essentielle Verbrückung der Cysteine ist schematisch wiedergegeben. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt.

Humanes Uroguanylin verdrängt ähnlich wie Guanylin STA in Kompetitionsassays von seinen Bindungsstellen an T84-Zellen. Ebenso erhöht es konzentrationsabhängig in Ussingkammerexperimenten an intestinaler Mucosa der Ratte den I_{SC} nach mucosaler Applikation. Es wurde vermutet, daß als primärer Ort der Uroguanylin-Genexpression die Niere und das intestinale Epithel fungieren (Hamra *et al.*, 1993; Kita *et al.*, 1994). Frühere Studien der gleichen Arbeitsgruppe konnten funktionelle STA-Bindungsstellen in der Niere des Opossums lokalisieren (Forte *et al.*, 1989, Krause *et al.*, 1990). Es wird postuliert, daß Uroguanylin in der Niere parakrin über eine im proximalen Tubulus lokalisierte Rezeptorguanylatzyklase des GC-C Typs agiert und cGMP-abhängig den Elektrolyttransport des renalen Epithels moduliert (Kita *et al.*, 1994).

Aufgabenstellung

Das durch Kita und Mitarbeiter (1994) dargestellte, humane Uroguanylinpeptid legte die Existenz eines zweiten Gens einer neuen Peptidfamilie beim Menschen nahe, deren Mitglieder über GC-C ähnliche Rezeptorguanylatcyclasen cGMP abhängig den epithelialen Elektrolyttransport modulieren. Da humanes Uroguanylin aus Urin isoliert wurde, war es nicht auszuschließen, daß es sich bei dem Peptid um ein Produkt im Urogenitaltrakt ansässiger, mikrobieller Kommensalen handelte. Erst durch die Identifizierung des humanen Gens wäre der Beleg für den endogenen Ursprung dieses Peptides erbracht. Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Charakterisierung des humanen Uroguanylingens mit geeigneten Methoden. Sollte sich die Existenz eines zweiten Gens der Guanylinpeptidfamilie bestätigen, ist es angestrebt, die Gewebeverteilung der Genexpression beider Gene differentiell am Beispiel des Menschen und einer dem Menschen physiologisch sehr ähnlichen Tierart, dem Schwein, darzustellen. Für zukünftige immunhistochemische Arbeiten am Institut wäre die Verfügbarkeit größerer Mengen des Uroguanylinprohormons zur Validierung vorhandener Antiseren und für erste funktionsanalytische Untersuchungen von Vorteil. Es ist daher beabsichtigt, eine Strategie zur heterologen Expression des Prohormons in *E. coli* zu erarbeiten.

2. Material und Methoden

2.1.1 Laborgeräte

Gerät(Bezeichnung)

Agarosegelelektrophorese-Apparatur
 Aminosäuresequencer 470A
 Analytik-Waage AC 120 S
 Bioclav 3.021 001
 DNA-Synthesizer (394 DNA/RNA-Synthesizer)
 DNA-Sequencer (Model 373A)
 DNA-Thermocycler 480
 Druckblotapparat (PosiBlotTM)
 Fraktionssammler, Model 2110 Fraction Collector
 Gelscanner Vilber Lourmat LC 22005
 HPLC System 400
 HPLC Pumpen 420
 HPLC Autosampler
 HPLC Datasystem 450
 HPLC Detector 430
 Hybridisierungsöfen (400 HY)
 Inkubationsschrank B 6030
 Kulturschüttler Innova 4340
 Labormixer 5432
 PCR-Cycler (Gene Amp 9600)
 Pipettierroboter Catalyst 800
 Reinstwasseranlage (Mili-Q^{UF} plus)
 β-Szintillationszähler (2500 TR)
 Speedvac Univapo 150 H
 Spektralphotometer (UVIKon 940)
 Tischzentrifuge (3K10)
 Tischzentrifuge (2K15)
 Tischzentrifuge (2041)
 Tischzentrifuge (1120)
 Tischzentrifuge (2-15)
 Tischzentrifuge Mikroliter 2042
 Thermomixer (5436)
 Sciex AP I III Massenspektrometer
 Spannungsgerät Mikrocomputer E4430264
 Sterilbank 8511
 Ultrazentrifuge (Sorvall OTD-Combi)

Hersteller

Renner/Dannstadt
 ABI/ Weiterstadt
 Sartorius/Göttingen
 Schütt/Göttingen
 ABI/Weiterstadt
 ABI/Weiterstadt
 ABI/Weiterstadt
 Stratagene/Heidelberg
 BioRad / München
 Fröbel/Lindau
 Kontron / Neufahrn
 Kontron / Neufahrn
 Kontron / Neufahrn
 Kontron / Neufahrn
 Kontron / Neufahrn
 Kontron / Neufahrn
 Bachofer/Reutlingen
 Heraeus/Hanau
 New Brunswick Scintific/Cambridge (UK)
 Eppendorf/Hamburg
 Perkin Elmer/Ueberlingen
 ABI/Weiterstadt
 Milipore/Eschborn
 Canberra Packard/Frankfurt a.M.
 Uniequip/Martiensried
 Kontron/Henningen
 Sigma/Deisenhofen
 Sigma/Deisenhofen
 Sigma/Deisenhofen
 Sigma/Deisenhofen
 Sigma/Deisenhofen
 Hettich / Tuttlingen
 Eppendorf/Hamburg
 Perkin Elmer / Überlingen
 Renner/Dannstadt
 Köttermann / Uetze-Hänigsen
 DuPont/Bad Homburg

Vakuumtrockner Speedvav Univapo 150 H
Zentrifuge Centrikon (T-142)

Uniequip/Martinsried
Kontron/Henningen

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) in p.a. Qualität bezogen. Allgemeine Labormaterialien (Reaktionsgefäße, Handschuhe, Pipettenspitzen, Glaswaren usw.) wurden von den Firmen Greiner (Nürtingen), Eppendorf (Hamburg), Nunc (Wiesbaden) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

Chemikalien / Verbrauchsmaterial

Adenosin 5'Triphosphat (ATP)
Agar
Agarose MP (EEO: bis 0,113)
Amberlite
Ammoniumperoxodisulfat
Ampicillin
β-Mercaptoethanol
Bisacrylamid
Borsäure
5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-D-Galactosid
Casein-Hydrolysat, enzymatisch
Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphate (dNTPs)
Dextransulfat, MG 500.000
DTT
Dulbecco MEM Medien (DMEM)
(³²P)-dNTPs
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), reinst
Ethidiumbromid
Fetales Kälberserum (FCS)
Gewebe Kulturschalen (60 mm)
Glycerin
3-Isobutyl-1-Metyl-xanthin (IBMX)
Ham`s F12-Medium
Hefe-Extrakt
Isopropylthiogalactosid
L-Glutamin
Filterpapier
NuSieve GTG Agarose
Nylonmembran Hybond N+
PBS-Puffer Konzentrat

Hersteller

Boehringer / Mannheim
Sigma / Deisenhofen
Applichem / Darmstadt
Sigma / Deisenhofen
Sigma / Deisenhofen
Sigma / Deisenhofen
Applichem / Darmstadt
Sigma / Deisenhofen
Sigma / Deisenhofen
Biomol / Hamburg
Sigma / Deisenhofen
Pharmacia / Freiburg
Sigma / Deisenhofen
Merck / Darmstadt
Gibco BRL / Eggenstein
Hartmann / Braunschweig
Applichem / Darmstadt
Applichem / Darmstadt
Serva / Heidelberg
Becton / Dickinson / Heidelberg
Sigma / Deisenhofen
Serva / Heidelberg
Gibco BRL / Eggenstein
Sigma / Deisenhofen
Biomol / Hamburg
Gibco BRL / Eggenstein
Schleicher u. Schuell / Hannover
Biozym / Hameln
Amersham / Braunschweig
Gibco BRL / Eggenstein

Penicillin / Streptomycin-Lösung	Gibco BRL / Eggenstein
Phenol / Chloroform / Wasser	Applied Biosystems / Weiterstadt
OPC-Säulen	Applied Biosystems / Weiterstadt
Push-Columns	Stratagene / Heidelberg
RNasin Ribonukleaseinhibitor	Promega / Madison, Wisconsin
Röntgenfilme, X-Omat AR5	Kodak / Frankfurt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma / Deisenhofen
Trypsin / EDTA (10 x)	Gibco BRL / Eggenstein
Tris-Base	Appllichem / Darmstadt

2.1.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase	(E.C.3.1.3.1.)	Boehringer / Mannheim
Proteinase K	(E.C. 3.4.21.14.)	Boehringer / Mannheim
RNase A	(E.C. 3.1.27.4.)	Boehringer / Mannheim
SuperscriptII™ Reverse Transcriptase	(E.C.2.7.7.49.)	Gibco BRL / Eggenstein
T4-DNA-Ligase	(E.C. 6.5.1.1.)	Pharmacia / Freiburg
T4-Polynukleotidkinase	(E.C. 3.1.21.1.)	Boehringer / Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	(E.C.2.7.7.7.)	Biomol / Hamburg
Terminale Transferase	(E.C.2.7.7.31.)	Gibco BRL / Egenstein
Trypsin (sequencing grade)	(EC 3.4.21.4)	Boehringer / Mannheim

Sämtliche Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma Gibco BRL (Eggenstein) oder Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

2.1.5 Kits

Double stranded Nested Deletion Kit	Pharmacia / Freiburg
pGEM®-T Vector System I	Serva / Heidelberg
PromoterFinder™ DNA Walking Kit Human	Clontech / Heidelberg
Random Primed DNA Labelling Kit	Boehringer / Mannheim
Sequenase ^R 7-deaza-dGTP Sequencing	KitAmersham / Braunschweig
Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kit, 21M13 Forward	Applied Biosystems/Weiterstadt
Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kit, 13M21 Reverse	Applied Biosystems/Weiterstadt
Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems/Weiterstadt
TIP 20 / TIP 100 Plasmid DNA Kit	Qiagen / Hilden

2.1.6 Plamide

pBSK(+) (Alting-Mees <i>et al.</i> 1989)	Stratagene/ Heidelberg
pGEM-5Zf(+) (GenBank:X65308)	Serva/ Heidelberg
pRSET5D (Schöpfer, 1993)	InvitroGen / Berlin

2.1.7 Mikroorganismen

<u><i>E. coli</i> XL1-Blue</u>	<i>recA</i> ⁻ (<i>recA1</i> , <i>lac</i> ⁻ , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , {F ⁻ proAB, <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> ΔM15, Tn10}) (Bullock <i>et al.</i> 1987)
<u><i>E. coli</i> NM539</u>	<i>supF</i> , <i>hsdR</i> , (P2cox3) (Frischauf <i>et al.</i> 1983)
<u><i>E. coli</i> Y1090r⁻</u>	<i>araD139</i> , <i>hsdR</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺), <i>mcrA</i> ⁻ , <i>rpsL</i> , <i>supF</i> , <i>trpC22::Tn10</i> , Δ <i>lacU169</i> , Δ <i>Ion</i> , (pMC9) (Runge, 1992)
<u><i>E. coli</i> BL21(DE3)</u>	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) (Studier <i>et al.</i> , 1986)

2.1.7 Genbanken

Human Genomic Library in λFix TM II (Nr. 9462039)	Stratagene / Heidelberg
Human Colon cDNA Libray in λgt11 (Nr. HL1034b)	Clontech / Heidelberg

2.1.8 DNA-Größenmarker

Lambda / <i>Hind III</i> :	23,13 kbp, 9,42 kbp, 6,55 kbp, 4,36 kbp, 2,32 kbp, 2,07 kbp, 0,6 kbp, 0,15 kbp
pUC18 / <i>Sau 3 A</i> :	943 bp, 585 bp, 341 bp, 258 bp, 153 bp, 105 bp

2.1.9 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) nach Anleitung des Herstellers. In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Unterstrichene Sequenzbereiche markieren 5'-Modifikationen. Die Position der Oligonukleotide ist den Sequenzabbildungen des Ergebnisteils zu entnehmen.

Material und Methoden

Bezeichnung	Sequenz 5'->3'	Gen/Vektor/Kommentar	
FPN-1	AGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	pBSK+/ pGEM-5Zf(+)	
RPN-2	CAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATG	pBSK+/ pGEM-5Zf(+)	
LGT11S	GACGACTCCTGGAGCCCG	λGT11	
LGT11AS	TGGTAATGGTAGCGACCGGCGC	λGT11	
UNIP-5	CCTCAGCTGCAGCTCGAG(T) ²⁴	Oligo(dT)-Primer	
UNIP-6	CCTCAGCTGCAGCTCGAG	Ankerprimer zu UNIP-5	
β-TUB-1	TTCCCTGGCCAGCTGAANGCNGACCTNCGCA AG	β-Tubulin universal	
β-TUB-2	CATGCCCTCGCCNGTGTACCAGTGNANGAAG GC	β-Tubulin universal	
HGUP-1	<u>CCGAGCTCGTCACCGTGCAGGATGG</u>	Humane Guanylin-cDNA	
HGU-2	CTAGCATCCGGTACAGGCAGCGTAGG		
HGU-3	TTCCCTCCAGCCTCTGAAGTATCTCCTGGGCA TTGGGCTCCTTGCAGAGAGGCT		
HUGU-3	<u>TCTGAGCTC</u> AAYGAYGAYTGYGARYTNTG	Humane Uroguanylin-cDNA	
HUGU-4	<u>TCTGAGCTC</u> TGYGARYTNTGYGTNAA YGT		
HUGU-5	<u>TCTGAGCTC</u> TGYGTNAA YGTNGCNTG		
HUGU-7	<u>CTGCAGCTCGAGTAGAATCTTTATTCAGGAG CTG</u>		
HUGU-8	<u>TCTGAGCTCACCGGCTGCCTCTGAGATAGC</u>		
HUGU-9	<u>CTGCAGCTCGAGGGTGGTGATGACCATGGTG</u>		
HUGU-10	<u>CTGCAGCTCGAGGCCAGGGACCCATCTTGAGC</u>		
HUGU-11	<u>TCTGAGCTCGTGCCACCACCCTGCTCTG</u>		
HUGU-12	<u>TCTGAGCTCACGGCGGGCAGGAGGCTC</u>		
HUGU-13	<u>TCTGAGCTCAGGGAGCGCGATGGGCTG</u>		
HUGU-14	<u>ATAGAAGGTAGAGTCTACATCCAGTACCA</u>		
HUGU-15	<u>TCTGAATTCTCATTAGAGGCAGCCGGTACAC GC</u>		
HISTAG-1	<u>TCTACCATGGTTCATCACCATCACCATCACAT AGAAGGTAGAGTC</u>		pRSET-5D, rekombiante Expression
GUGRS-1	<u>GGTATGCCCGGGTTCGACCACGCGTGACCTG GTCCAGGGGCAGGCACT</u>		Uroguanylin-Gen Promotor- Finder PCR
AP-1	GTAATACGACTCACTATAGGGC		Promotor-Finder PCR-Kit
AP-2	ACTATAGGGCACGCGTGGT	Promotor-Finder PCR-Kit	
ERROR-1	<u>TCTGAGCTCITWIRCRCAIAYTCRCA</u>	porcine Guanylin/Uroguanylin- cDNAs	
ERROR-2	<u>TCTCGAGTIGARWSIKTIAARMARYT</u>	Porcine Guanylin-cDNA	
ERROR-3	<u>RCAICCIYRCAIGC</u>		
OHI-1	<u>TCTGAGCTCGAAGATCTCCTCGGCGT</u>		
OHI-2	<u>TCAAGGACCTCCAGGAGCTCCAGAAGC</u>		
OHI-3	<u>TCTCGAGTCTGGGCAGGTGGAGCTGC</u>		
OHI-4	<u>TCTCGAGTCTAGATTACTAGCATCCCGCGCA GGC</u>		
SDII-1	<u>TCTCCAGCCCATCTGCCAGTC</u>	Porcine Uroguanylin-cDNA	
SDII-2	<u>TCTCCTCAGACTGGCAGATG</u>		
SDII-3	<u>CAGGCCTTGAGGACCATCG</u>		
SDII-4	<u>TCTGAATTCTTATCAGCTGCAGCCGGTACAG GC</u>		
PIGCC-1	CACATTCTCGACCACCATGAC	Porcine GC-C-cDNA	
PIGCC-2	ACGTTCCAGACAGGGCAGCT		
PIGCC-3	CGAGTGCCAGTTCCTGTATG		

2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

2.2.1 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.

2.2.2 Kultivierung von *E.coli*-Stämmen und Klonen

Die Lagerung von *E. coli*-Stämmen und Klonen erfolgte bei -80°C als Glycerinkultur. Zur Anzucht von Bakterien wurde zunächst ein Verdünnungsausstrich aus der entsprechenden Glycerinkultur auf einer Nähragarplatte mit geeigneter Selektion angelegt und aerob bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine einzelne Kolonie mit der Impföse abgenommen und ein geeignetes Flüssigmedium (5-250 ml) damit inokuliert. Diese Flüssigkultur wurde aerob bei 37°C und 180 rpm im Umluftkulturschüttler für 4-16 h kultiviert.

LB-Medium:	1% (w/v) Casein-Hydrolysat 0,5% (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl pH 7,4
LB-Mg-Medium:	LB-Medium mit 10 mM MgSO ₄
LB-Amp-Medium:	LB-Medium mit 70 µg/ml Ampicillin
LB-Agar:	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto-Agar
EXP-Medium:	2% (w/v) Casein 1% (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl 23,1 g / l KH ₂ PO ₄ 125,4 g / l K ₂ HPO ₄ 100 µg/ml Ampicillin

2.2.3 Plasmidschnellpräparation aus *E.coli*-Kulturen

Zur schnellen Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus *E.coli*-Klonen 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 wiedergewonnenen, partikelfreien 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)

P2 200 mM NaOH
 1% (w/v) SDS

P3 2,55 M KaAc, pH 4,8

2.2.4 Präparative Plasmidisolierung aus *E.coli*-Kulturen

Präparative Plasmidisolierungen aus *E.coli*-Zellen für Experimente, die einen besonderen Reinheitsgrad der DNA voraussetzten, wurden mit einem Plasmid-Kit der Firma Diagen durchgeführt. Für Mini-Präparationen wurden 1,5 ml Zellsuspension, für Midi-Präparationen 150 µl Zellsuspension einer auf LB-Amp-Medium gezogenen ÜNK eingesetzt und die DNA-Präparation nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.5 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen erfolgte durch Aufnahme von UV-Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 230-320 nm in einer Quarzglasküvette. Die Berechnung der Konzentration wurde nach folgenden, für eine Schichtdicke von 1 cm geltenden Richtwerten durchgeführt:

1. Doppelstrang-DNA: $c = E_{260} \text{ nm} \times 50 \text{ µg/ml}$
2. Oligodesoxynucleotide: $c = E_{260} \text{ nm} \times 33 \text{ µg/ml}$
3. Ribonukleinsäuren: $c = E_{260} \text{ nm} \times 40 \text{ µg/ml}$

Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde anhand des E_{260}/E_{280} -Quotienten ermittelt. Für reine Nukleinsäurelösungen sollte er zwischen 1,8 und 2,0 betragen.

2.2.7 Fällung von Nukleinsäuren aus wäßriger Lösung

Die Fällung von Nukleinsäuren aus wäßriger Lösung erfolgte durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M NaAc (pH 4,3 für RNA; pH 5,2 oder pH 6,0 für DNA) und 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol (p.A.). Bei sehr geringen Nukleinsäurekonzentrationen (<50 µg/ml) erfolgte eine Kälteinkubation der Lösung für eine Stunde bei -80°C oder für 2 min in flüssigem Stickstoff.

Anschließend wurden die Nukleinsäuren sedimentiert (15000 x g, 15 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Zur Lösung von Salzen wurde das Sediment zweimal mit eiskaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Im Anschluß wurden die Nukleinsäuren im Vakuum getrocknet und in einem gewünschten Volumen H₂O aufgenommen.

2.2.8 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Restriktionshydrolyse oder im Anschluß an PCR-Reaktionen gemäß ihrem relativen Molekulargewicht erfolgte elektrophoretisch in Agarosegelen. Es wurden Flachbettgele mit folgenden Abmessungen, Gelvolumina und durchschnittlichen Elektrophoresespannungen verwendet:

1. Mini-Gele, 90 x 78 x 6 mm, 42 ml, 90V
2. Midi-Gele, 143 x 138 x 5 mm, 98 ml, 120V
3. Maxi-Gele, 181 x 237 x 5 mm, 214 ml, 140V

Sowohl als Puffersystem im Gel als auch als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Je nach Größe der erwarteten DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,7% (w/v) und 2,0% (w/v) verwendet. Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit 0,2 Volumen Probenpuffer vermischt und die DNA im Gel nach beendeter Elektrophorese durch Schwenken des Gels für 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) gefärbt. Alternativ wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg / ml zur Färbung der DNA direkt ins Gel gegeben. Die Ansicht der Gele erfolgte in durchscheinendem UV-Licht bei 260 nm Wellenlänge, und die Dokumentation wurde mittels einer Polaroidkamera oder einer Videokamera (Gelscanner Vilber Lourmat LC 22005, Fa.Fröbel/Lindau) durchgeführt. Die relative Größe von unbekanntem DNA-Fragmenten wurde anhand eines im Gel aufgetrennten DNA-Größenstandards bestimmt.

Für präparative Gele wurde niedrigschmelzende Agarose ("NuSieve GTG" *low melting point* Agarose, Biozym, Hameln) verwendet. Die DNA wurde nach Ethidiumbromidfärbung (s.o.) mittels aufscheinender Beleuchtung durch eine UV-Handlampe (312 nm) im Gel betrachtet und die Gelbereiche mit den gewünschten DNA-Fragmenten ausgeschnitten.

50 x TAE	2 M Tris-Base 1 M Essigsäure 100 mM EDTA	Probenpuffer	50 % (v/v) Glycerin 5 x TAE 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
-----------------	--	---------------------	---

2.2.9 Extraktion von DNA aus Agarosegelen und wäßrigen Lösungen

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 µl äquiliertem Phenol (pH 8,0) extrahiert. Die wäßrige Phase wurde nach einem Zentrifugationsschritt (12000 x g, 30 s, RT) in ein neues Gefäß überführt, und Phenolreste wurden durch zweimalige Chloroformextraktion entfernt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol gefällt (2.2.7).

Zur Extraktion von DNA aus wässrigen Lösungen im Anschluß an enzymatische Reaktionen wurde analog verfahren: Das Volumen der Lösung wurde vor der Phenolextraktion mit H₂O auf 450 µl eingestellt und die oben beschriebenen Arbeitsschritte durchgeführt.

2.2.10 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Bakterielle Restriktionsendonukleasen erkennen und hydrolysieren spezifische Nucleotidsequenzen in dsDNA und können somit für analytische und präparative Zwecke verwendet werden. Die enzymatische Hydrolyse von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen, Plasmid- oder Phagen-DNA wurde routinemäßig in 50-100 µl-Reaktionsansätzen unter den vom Hersteller für das jeweilige Restriktionsenzym empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Die Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen erfolgte durch Phenolextraktion oder alternativ durch Inkubation des Ansatzes für 15 min bei 72°C.

2.2.11 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA

Um inter-oder intramolekulare Ligation der Vektor-DNA während der Ligationsreaktion zu verhindern wurde enzymatisch hydrolysierte Vektor-DNA vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase an den 5'-Enden dephosphoryliert. Zur Durchführung der Dephosphorylierung wurde direkt in den Restriktionsansatz eine Einheit alkalische Phosphatase gegeben und für 20 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Hitzeinkubation des Ansatzes inaktiviert (10 min, 72°C) und die Vektor-DNA über ein präparatives Agarosegel mit anschließender Phenolextraktion dargestellt.

2.2.12 Ligation

Unter ATP-Hydrolyse stellen Ligasen Phosphordiesterbindungen zwischen dsDNA-Fragmenten her. Voraussetzung hierfür sind überhängende, komplementäre Einzelstrangenden (*sticky ends*) oder stumpfe Enden (*blunt ends*) der beteiligten dsDNA. 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 für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 14°C.

Reaktionsgemisch:	50 mM Tris-HCl, pH 7,6
	10 mM MgCl ₂
	1 mM ATP
	1 mM DTT
	5 % (w/v) PEG 6000
	0,05 U T4-DNA-Ligase / μ l

2.2.13 Klonierung von DNA-Fragmenten

Für die Klonierung unbekannter DNA-Fragmente zur Sequenzanalyse wurden die Plasmide pBSK+ und pGEM-5Zf(+) 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 (2.2.10), über ein präparatives Agarosegel mit anschließender Phenolextraktion aufgereinigt (2.2.8, 2.2.9) und ligiert (2.2.12). Vor der Ligation wurde die Vektor-DNA dephosphoryliert (2.2.11). Alternativ zur Verwendung von Restriktionsendonukleasen wurden PCR-Produkte über T/A-Klonierung (T-Vektor) in das Plasmid pGEM-5Zf(+) kloniert (Marchuk *et al.*, 1990). Hierfür wurde ein Kit (pGEM[®]-T Vector System I) der Firma Serva, Heidelberg, verwendet.

Sowohl das Plasmid pBSK+ als auch das Plasmid pGEM-5Zf(+) besitzen ein Resistenzgen für β -Lactamantibiotika (Ampicillin, Penicillin, Carbenicillin), Bindungssequenzen für Sequenzierprimer und eine *lacZ*-Region, die für das sogenannte α -Fragment (N-terminales Fragment) der β -Galactosidase kodiert. 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 Plasmiden-DNA und Kolonien mit nichtrekombinanter Plasmid-DNA nach der Transformation möglich.

E.coli-Stämme des *lacZ* Δ M15-Genotyps exprimieren nur das C-terminale ω -Fragment der β -Galactosidase, das enzymatisch inaktiv ist. Durch Komplementation mit dem durch das Plasmid kodierten α -Fragment kann aber ein enzymatisch aktives Protein rekonstituiert werden. Solche Zellen sind nach Induktion des *lac*-Promotors durch das Lactose-Analogen 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 Nähragarplatten nach der Transformation (s. 2.2.15) ermöglicht somit eine schnelle

Selektion rekombinanter Plasmide in *E.coli*-Klonen aufgrund ihres Phänotyps. Positive (weiße) Kolonien wurden anschließend mittels Kolonie-PCR (2.6.1) überprüft.

2.2.14 Herstellung transformationskompetenter *E.coli* Zellen

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

50 ml Medium A wurden mit 500 µl einer 5 ml *E.coli* XL1-blue oder einer 5 ml *E.coli* BL21(DE3) ÜNK inokuliert und bei 37°C/280 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 Medium B vorsichtig vermischt und in Aliquots zu 100 µl bei -80°C gelagert. Nach 24 h wurde die Transformationseffizienz der jeweiligen Charge bestimmt. Hierbei wurden jeweils 0,1 ng, 1 ng und 10 ng native, superhelicale Vektor-DNA (pBSK+) für die Transformation der Zellen verwendet, die Transformationsplatten ausgezählt und in Kolonien/µg Vektor-DNA umgerechnet.

Medium A: LB-Medium + 10mM MgSO₄ + 0,2% (w/v) Glucose

Medium B: LB-Medium + 12 mM MgSO₄ + 36% (w/v) Glycerin + 12% (w/v) PEG 8000, sterilfiltriert

2.2.15 Transformation

Ein Aliquot der unter 2.10.2 erhaltenen kompetenten *E.coli*-Zellen wurde in Eiswasser aufgetaut und mit 5 µl einer entsprechenden Plasmid DNA-Lösung oder eines Ligationsansatzes vorsichtig vermischt. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert, für 1 min bei 42°C im Wasserbad erwärmt und erneut 1-2 min auf Eis gekühlt. Jeweils 30 µl des Transformationsansatzes wurden anschließend auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert. Für die phänotypische Selektion rekombinanter Plasmide (Blau-weiß-Screening) wurden vor der Plattierung der *E.coli*-Zellen jeweils 40 µl IPTG- und 40 µl X-Gal-Lösung in den Nähragar eingearbeitet. Bei Klonierungen, die aufgrund des Vektorsystems (pRSET5D-Konstrukte) und des verwendeten *E. coli* Stammes (*E. coli* BL21(DE3)) diese Option nicht besaßen, wurde auf diese Zusätze zu den LB-Amp-Agarplatten verzichtet.

Die Transformationsplatten wurden für 16 h bei 37°C inkubiert. Die Insertionsgrößen rekombinanter Zellkolonien wurden mittels Kolonie-PCR oder durch Plasmid-schnellpräparationen mit anschließender Restriktionsanalyse ermittelt.

IPTG-Lösung: 0,1 M in H₂O

X-Gal-Lösung: 2% (w/v) in Dimethylformamid

2.2.16 RNA-Extraktion

Gewebeproben, die für eine RNA-Präparation vorgesehen waren, wurden nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Das Gewebe wurde in einer Reibschale in flüssigem Stickstoff zermahlen, der Stickstoff abgesiedet und das noch tiefkalte Gewebepulver in ein vorgekühltes Gefäß eingewogen. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte in eiskaltem RNA-Lysispuffer (100mg Gewebe/ml Lysispuffer) mit einem Ultraturrax T25 (30s bei 8000 rpm, 30s bei 15000 rpm, 1min bei 24000 rpm). Das Homogenat wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei 50°C aufgetaut und erneut für 1 min bei 24000 rpm mit dem Ultraturrax homogenisiert. 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 so erhaltenen Lösung wurde bis zur RNA-Extraktion bei -80°C gelagert.

Die Isolierung der RNA aus dem Gewebehomogenat erfolgte durch saure Phenolextraktion. Hierfür wurde das Gewebehomogenat mit 0,1 Volumen 3 M NaAc pH 4,3 versetzt und mit gleichem Volumen wassergesättigtem Phenol vermischt. Anschließend wurde die Lösung mit 0,1 Volumen Chloroform vermengt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Phasentrennung (10000 x g, 10 min, 4°C) wurde die wäßrige Phase in ein neues Gefäß überführt und die Phenol- / Chloroformextraktion in den oben beschriebenen Volumenverhältnissen 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 Sediment wurde zweimal mit eiskaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in dem gewünschten Volumen H_2O 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) Sarcosin
 0,7% (w/v) β -Mercaptoethanol

2.2.17 Agarosegelelektrophorese von RNA

Für die Gelelektrophorese wurde die RNA (5-50 μg) aus der wäßrigen Lösung gefällt und abzentrifugiert (10000 x g, 10 min, 4°C). Das Sediment wurde zweimal mit eiskaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in 5 μl H_2O gelöst. Anschließend wurde die RNA-Lösung mit 5 μl DMSO, 8 μl 1 M Glyoxal (pH 5,8) und 2 μl 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,6) versetzt und 1 h bei 50°C denaturiert. Nach Zugabe von 5 μl RNA-Probenpuffer wurde die Elektrophorese in 1,4 % Agarosegelen bei 90 V für 4-6 h in Flachbettgelapparaturen durchgeführt. Als Gel- und Elektrophoresepuffer wurde 10 mM

Natriumphosphatpuffer (pH 6,6) verwendet. Die Gele wurden nach der Elektrophorese für 45 min in 400 ml 50 mM NaOH deglyoxaliert, zweimal für 15 min in 200 ml 50 mM NaAc (pH 4,3) angesäuert und mit einer Ethidiumbromidlösung (10µg / ml) gefärbt.

RNA-Probenpuffer: 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 6,6
 50% (v/v) Glyverin
 0,05 % (w/v) Bromphenolblau

2.2.18 Southern-Blot / Northern-Blot

Als Southern-Blot bezeichnet man den vertikalen Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Southern 1975). In Anlehnung wird der Transfer von RNA im Anschluß an die Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran als Northern-Blot bezeichnet (Thomas 1983). Anstatt der Nitrocellulose kann auch eine Nylonmembran mit positiven Ladungen verwendet werden.

Für den Transfer von Nukleinsäuren aus Agarosegelen wurde eine Druckblotapparatur (Stratagene PosiBlot™) verwendet. Hierbei wurde nach der Elektrophorese eine Transferlösung mit einem angelegten Überdruck von 60-70 mm Hg senkrecht durch das Agarosegel gepreßt. Die Nukleinsäuren wurden dabei durch den Flüssigkeitsstrom auf die darunterliegende positiv geladene Nylonmembran (Hybond N+) transferiert. Die Transferzeit betrug 1-1,5 h. Die Membran wurde anschließend dreimal für 1 min in 500 ml 5x SSC gewaschen und an der Luft getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Nukleinsäuren mittels UV-Licht (UV-Stratalinker 2400) an der Membran fixiert.

DNA-Transferlösung: 0,4 M NaOH
RNA-Transferlösung: 0,05 M NaOH

2.2.19 Herstellung von Gensonden

Als Gensonden wurden humane und porcinen Guanylin- bzw. Uroguanylin-cDNA-Fragmente sowie spezifische Oligonukleotide verwendet. cDNA-Fragmente wurden aus klonierten Sequenzabschnitten mittels PCR amplifiziert und nachfolgend über präparative Agarosegele mit sich anschließender Phenolextraktion dargestellt. Die als Gensonden für die Northern-Blot-Analyse amplifizierten Teilbereiche der cDNAs sind in der untenstehenden Tabelle aufgeführt.

Gen	Primerkombination	Größe des cDNA-Fragmentes	Bereich
Humanes Uroguanylin	HUGU-8/HUGU-9	175 bp	3'-UTR
Humanes Guanylin	HGUP-1/HGU-2	294 bp	translatierte Region
Porcines Uroguanylin	HUGU-14/SDII-4	255 bp	translatierte Region
Porcines Guanylin	OHI-2/OHI-1	141 bp	translatierte Region

2.3 Radioaktive Markierung von DNA

2.3.1 Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten wurde mit einem Random primed labelling-Kit der Firma Boehringer unter Verwendung von [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP nach der von Feinberg und Vogelstein 1983 beschriebenen Methode durchgeführt. Bei dieser Methode wird die zu markierende DNA denaturiert und mit Hexanuklotide zufälliger Basensequenz (random primer) hybridisiert. Die hierbei ausgebildeten Doppelstrangbereiche dienen einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) als Startpunkte für die Synthese. Der neu synthetisierte komplementäre DNA-Strang wird durch den Einbau eines [$\alpha^{32}\text{P}$]-dNTP radioaktiv markiert. Für eine Markierungsreaktion wurden routinemäßig 50-75 ng dsDNA verwendet. Die weitere Durchführung entsprach den Herstellerangaben.

2.3.2 Endmarkierung von Oligonukleotiden mit Polynukleotidkinase

Zur 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden wurde T4-Polynukleotidkinase und [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP verwendet. Dabei wird die γ -Phosphatgruppe des [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP mit der 5'-Hydroxylgruppe des Oligonukleotides vereestert. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Reaktionsgemisch: 25 pmol Oligonukleotid
 2 μl 10x PNK-Puffer
 1,85 Mbq [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP
 1 μl T4 Polynukleotidkinase (10 U)
 mit H_2O auf 20 μl auffüllen

Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und das Enzym anschließend bei 90°C für 5 min hitzeinaktiviert.

10x PNK-Puffer: 0,6 M Tris-Cl, pH 7,8
 0,1 M MgCl_2
 0,15 M 2-Mercaptoethanol

2.3.3 Reinigung radioaktiv markierter DNA

Um nichteingebaute radioaktive Nukleotide im Anschluß an die Makierungsreaktion von der markierten DNA abzutrennen, folgte 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 equilibrierte Säule gedrückt. Anschließend wurde die DNA mit 70 µl STE-Puffer eluiert. Die so gewonnene Probe wurde bei -20°C gelagert.

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

2.3.4 Aktivitätsmessung

Die Messung der ³²P-markierten DNA-Proben fand als Cerenkov-Zählung im Tritiumkanal eines β-Scintillationszählers (Canberra Packard, 2500 TR) statt. Die spezifische Aktivität in dpm/µg DNA wurde (unter Berücksichtigung einer Zählausbeute von 30%) für jede Probe unmittelbar nach der Aufreinigung ermittelt.

2.3.5 Hybridisierungen

Die Hybridisierungen membrangebundener Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten Gensonden wurden in einem temperierbaren Inkubationsofen (Bachofer, 400 HY) in rotierenden Glasröhren durchgeführt. Pro Röhre wurden 20 ml Hybridisierungslösung verwendet. Die optimale Konzentration an markierter Hybridisierprobe in den durchgeführten Experimenten betrug 0,5-2x 10⁶ cpm/ml. Vor Zugabe der Aktivität wurden die Filter für 30 min in der Hybridisierungslösung bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur equilibriert. Doppelsträngige Gensonden wurden unmittelbar vor ihrer Verwendung für 5 min bei 100°C im Wasserbad denaturiert. Die Hybridisierungsdauer betrug 12-16 h. Im Anschluß an die Hybridisierung wurden die Filter zur Entfernung nicht gebundener Aktivität und zur Erhöhung der Stringenz der Signale mit SSC- oder SSPE-Lösungen gewaschen. Sowohl die Salzkonzentration in der Waschlösung als auch die Dauer und die Temperatur der Waschschrte richteten sich dabei nach dem jeweiligen Experiment.

Hybridisierungslösung: 1 M NaCl
 50 mM Tris-Cl pH 8,0
 1 % (w/v) SDS
 10% (w/v) Dextransulfat oder 10% (w/v) PEG (MW 6000)

Waschlösungen:	20x SSC	3 M NaCl 0,3 Tri-Natriumcitrat pH 7,0	20x SSPE	3 M NaCl 0,2 M NaPO ₄ 10 mM EDTA pH 7,4
-----------------------	----------------	---	-----------------	---

2.3.6 Autoradiographie

Die noch feuchten Filter wurden in Polyethylen-Folie eingeschweißt und in einer Röntgenfilmkassette mit einem Kodak-X-Omat AR5 Röntgenfilm exponiert. Die Expositionszeit richtete sich nach der mittels eines Geigerzählers abgeschätzten Aktivität des Filters (Stunden bis Tage). Bei sehr schwacher Aktivität wurden Kassetten mit Verstärkerfolien (Dr. Goos 600S) verwendet. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte gemäß Herstellerangaben.

2.4 Sequenzierung

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz von DNA wurde das von Sanger (1977) beschriebene enzymatische Kettenabbruchverfahren in modifizierter Form verwendet. Die Sequenzierreaktionen wurden unter Verwendung von Ampli-Taq-DNA-Polymerase als Enzym durchgeführt. Durch die Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase kann die Reaktion als sogenanntes Cycle-Sequencing durchgeführt werden. Analog zur PCR setzt sich eine Reaktionsfolge aus Denaturierung, Primerhybridisierung und Extension der Produkte zusammen. Zusätzlich zu den normalen dNTPs werden der Taq-Polymerase Didesoxy-Nucleosid-Triphosphate als Substrat angeboten. Werden diese ddNTPs während der Extension in den neu entstehenden Strang eingebaut, kommt es zur basenspezifischen Termination der Synthese. Da die Reaktionsfolge etliche Male wiederholt wird, reichern sich die Abbruchprodukte an. Im Gegensatz zu anderen enzymatischen Sequenzierungsreaktionen reichen bei dieser Methode geringe DNA-Mengen für eine erfolgreiche Sequenzierung aus. Zur Markierung der Abbruchprodukte werden vier verschiedene Farbstoffe mit unterscheidbaren Fluoreszenzspektren (Smith, L.M. *et al.*, 1986) eingesetzt, so daß die automatisierte Detektion der spezifischen Produkte in nur einer Gelspur während der Elektrophorese möglich ist. Diese Fluoreszenzgruppen sind entweder im Sequenzierprimer lokalisiert oder direkt an die ddNTPs gebunden. Im ersten Fall wird je ddNTP eine eigene Reaktion durchgeführt (A, C, G, oder T -Termination), im zweiten Fall finden alle vier Abbrucharten in einem Reaktionsansatz statt.

2.4.1 Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden

Für die Sequenzierung subklonierter Fragmente wurden fluoreszenzmarkierte Standardsequenzierprimer und Reagentien der Firma Applied Biosystems verwendet:

1. Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kit, -21M13 Best.-Nr. 401119
2. Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kit, 13M21 Reverse Best.-Nr. 401120

Die Sequenzierreaktionen wurden gemäß der beiliegenden Vorschrift angesetzt und in einem Thermocycler (Perkin Elmer Gene Amp 9600) durchgeführt. Als Substrat diente

ausschließlich doppelsträngige Plasmid-DNA. Die vier Ansätze je Sequenzierung wurden nach Reaktionsende vereint (4 x 5µl=20µl gesamt), durch Zugabe von je 3 µl 3M NaAc, pH 5,2 und 80 µl Ethanol (p.a.) bei RT gefällt, sedimentiert (18000 x g, 20 min, 20°C), einmal mit 70%igem eiskalten Ethanol gewaschen (18000 x g, 10 min, 20°C), für 3 min unter Vakuum getrocknet und in 7 µl einer frisch angesetzten Formamid-EDTA-Lösung aufgenommen (Formamid/50 mM EDTA pH 8,0 im Verhältnis 5:1). Unmittelbar vor der Elektrophorese wurden die Proben im Wasserbad für 2 min bei 92°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und je 5 µl der Probe in die Geltasche geladen.

Temperaturprotokoll:

95°C	20s	Denaturierung	
55°C	20s	Annealing	15 Zyklen
70°C	1 min	<u>Extension</u>	
95°C	20s	Denaturierung	
70°C	1 min	<u>Annealing/Extension</u>	20 Zyklen
4°C		Reaktionsende	

2.4.2 Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs

Für die Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs unter Verwendung selbstsynthetisierter Oligonukleotide wurde ebenfalls ein Kit der Firma Applied Biosystems eingesetzt (Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Best.-Nr. 901497). Das beiliegende Herstellerprotokoll für die Sequenzierungsreaktion wurde eingehalten. Im Gegensatz zum Dye-Primer Protokoll ist pro Sequenzierung nur ein Reaktionsansatz nötig. Im Anschluß an die Sequenzierungsreaktion wurden die Ansätze jeweils mit H₂O auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt und zur Entfernung überschüssiger ddNTPs zweimal mit je 100 µl Phenol/H₂O/Chloroform (68:18:14) extrahiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch Zugabe von je 10 µl 3M NaAc pH 5,2 und 300 µl Ethanol (p.a.) bei RT gefällt, sedimentiert (18000 x g, 20 min, 20°C), einmal mit 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen (18000 x g, 20 min, 20°C), für 3 min unter Vakuum getrocknet und wie unter 2.9.1 beschrieben für die Elektrophorese vorbereitet.

Temperaturprotokoll:

96°C	10s	Denaturierung	
52°C	5s	Annealing	25 Zyklen
60°C	4 min	<u>Extension</u>	
4°C		Reaktionsende	

2.4.3 Denaturierende Sequenziergele

Im Anschluß an die DNA-Sequenzierreaktionen war es erforderlich, die dabei entstehenden DNA-Fragmente nach Größe in denaturierter Form aufzutrennen. Hierfür wurden

denaturierende 7%ige Polyacrylamidgele mit 8 M Harnstoff in einem automatischen DNA-Sequenziergerät (Typ 373A; Applied Biosystems) entsprechend der Herstelleranleitung verwendet. Während der Elektrophorese erfolgte eine simultane Detektion der Sequenzierprodukte durch einen im Gerät integrierten Laserscanner. Diese Rohdaten wurden im Anschluß an den Lauf automatisch analysiert und später manuell nachbearbeitet. Vor der eigentlichen Elektrophorese wurde ein Vorlauf des Gels für 30 min mit den gleichen Parametern durchgeführt. Als Puffersystem im Gel und als Laufpuffer während der Elektrophorese wurde 1x TBE verwendet.

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) Ammoniumperoxodisulfatlösung 40 µl TEMED
40 %ige Acrylamid-Lösung:	38 % (w/v) Acrylamid 2 % (w/v) N,N'-Metylenbisacrylamid deionisiert und filtriert (0,2 µm)
10x TBE:	890 mM Tris-HCl, pH 8,3 890 mM Borsäure 20 mM EDTA

2.4.4 Radioaktive Sequenzierung

Für Sanger-Sequenzierungen mit radioaktiver Markierung der Syntheseprodukte wurde das "SequenaseR-7-deaza-dGTP-Kit der Fa. USB und (³⁵S)-dATP nach Herstelleranleitung verwendet. Die Abbruchprodukte der Sequenzierreaktion wurden anschließend in einem 7%-igen, denaturierendem PAA-Gel (s.o.) elektrophoretisch aufgetrennt (1500-2000 V; 50°C). Nach der Elektrophorese wurde das Gel durch Schwenken in 10 % (v/v) Essigsäure für 30 min fixiert, getrocknet (80°C, 1 h) und mit einem Kodak-X-Omat AR5 Röntgenfilm (24-72h) exponiert. Die Sequenz wurde anschließend aus dem resultierenden Autoradiogramm abgelesen.

2.5 Gen-und cDNA-Bank-"Screening"

Für das Durchmustern sowohl der Genbank als auch der cDNA-Bänke wurde das gleiche Arbeitsprotokoll verwendet. Beim Durchmustern der cDNA-Bänke wurde anstelle des *E.coli*-Stammes NM539 der für den Bakteriophagen λGt11 geeignete *E.coli*-Wirt Y1090r verwendet. Im Gegensatz zu genomischen Phagenisolaten wurde die Passagier-DNA der λGt11-Isolate nicht durch Vermehrung der Phagen mit nachfolgender Präparation der DNA dargestellt, sondern aufgrund ihrer geringen Größe mittels PCR amplifiziert und direkt sequenziert.

2.5.1 Bestimmung des Phagentiters

200 µl einer NM539-ÜNK wurden mit 4 ml 50°C warmen Weichagar (Toplayer) vermischt und auf einer LB-Mg-Agarplatte verteilt. Von der Ausgangssuspension unbekanntem Titer wurde eine dekadische Verdünnungsreihe in den Stufen 10^{-1} bis 10^{-10} in SM-Puffer angelegt und jeweils 10 µl der einzelnen Verdünnungen auf zuvor markierte Bereiche der Platte aufgetropft. Nach 12-16 h Inkubation bei 37°C wurde die Plaqueanzahl derjenigen Verdünnungsstufen ermittelt, bei der die Plaques deutlich voneinander getrennt vorlagen und der Titer Ausgangssuspension berechnet.

2.5.2 Plattierung der Phagen

Die Genbank wurde auf 4 große LB-Mg-Agarplatten (Ø 20 cm) wie folgt plattiert: 600 µl einer NM539-ÜNK wurden mit 1×10^5 pfu für 15 min bei 37°C zur Adhäsion der Phagen an die Wirtszellen unbewegt inkubiert, anschließend mit 36 ml 50°C warmem Weichagar vermischt, gleichmäßig auf der Platte verteilt und bei 37°C für 12-16 h inkubiert. Diese "Masterplatten" dienen als Ausgangsmaterial für die Isolierung des Uroguanylin-Genes.

2.5.3 Erstellung von Replikafiltern

Die DNA-Replikafilter von den Phagenplatten wurden mit Hybond N+ Nylonmembranen (Amersham) als Bindungsmatrix angefertigt. Zur Bindung der in den Plaques vorliegenden, freien Phagen-DNA wurden die Filter vorsichtig auf die Phagenplatte aufgelegt, und für eine spätere Zuordnung der Signale die relative Position des Filters zur Oberfläche der Phagenplatte eindeutig markiert. Anschließend wurde die DNA auf der Membran nach Herstellerangaben denaturiert und fixiert. Bis zu ihrem Einsatz in nachfolgenden Hybridisierungsexperimenten wurden die präparierten Membranen bei 4°C aufbewahrt.

Denaturierungs-/ Fixierungslösung:	0,4 M NaOH
Neutralisationslösung:	5x SSC

2.5.4 Isolierung positiver Phagenklone

1. Masterplatten

Die aus den Hybridisierungen hervorgegangenen Autoradiogramme wurden über Markierungspunkte mit den "Masterplatten" auf einem Leuchttisch zur Deckung gebracht und Bereiche positiver Signale auf der Unterseite der Phagenplatte punktförmig markiert. Etwa

1 cm² des umgebenen Agarmaterials wurde anschließend ausgestochen und die Phagen für 2-4 h in 1 ml SM-Puffer ausgeschwemmt.

2. "Nachscreening"

Nach der Titerbestimmung der so erhaltenen Phagensuspensionen wurden je 1000 pfu pro Signal auf je 2 kleine LB-Mg-Agarplatten (Ø 8cm) ausplattiert (wie unter 2.5.2 beschrieben, jedoch nur

200 µl Vorkultur und 4 ml Weichagar). Es folgte ein neuer Zyklus mit Replikafilter, Hybridisierung, Autoradiographie und Vergleich der Signale mit den Ausgangsplatten. Im zweiten Zyklus wurden nur noch 100-300 pfu pro Platte ausgebracht, so daß es nun möglich war, einem einzelnen Plaque ein Signal im Autoradiogramm zuzuordnen. Positive Einzelplaques wurden ausgestochen und die Phagen in 200 µl SM-Puffer ausgeschwemmt.

TM:	10 mM MgSO ₄ 20 mM Tris-Cl pH 7,4	Weichagar:	0,8 % (w/v) Agarose in SM autoklaviert und auf 50°C temperiert
SM:	200 mM NaCl 10 mM MgSO ₄ 20 mM Tris-Cl pH 7,4 0,01 % (w/v) Gelatine 200 mM NaCl		

2.5.5 Minilysate

Die Minilysate dienen der Vorabvermehrung isolierter Phagenklone vor der präparativen Anzucht. Hierfür wurden 200 µl NM539 Vorkultur mit 100 µl der nach der Ausschwemmung einzelner Plaques erhaltenen Phagensuspension vermischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die infizierten Bakterienzellen wurden auf 5 ml LB-Mg-Medium + 0,2% (w/v) Maltose überimpft und bis zur vollständigen Lyse der Kultur bei 37°C/180 rpm im Umluftkulturschüttler kultiviert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation von Zellresten befreit, mit 50 µl Chloroform versetzt und bei 4°C gelagert.

2.5.6 Präparative Lysate

E.coli NM539-Zellen wurden in 800 ml LB-Mg-Medium + 0,2% (w/v) Maltose bis zu einer OD_{578nm} von 0,4 kultiviert, mit 10¹⁰ pfu eines Phagenklons infiziert, für 15 min bei 37°C inkubiert und bis zur vollständigen Lyse der Kultur im Umluftkulturschüttler bei 37°C/180 rpm kultiviert. Nach Zugabe von 3 ml Chloroform wurde die Kultur für weitere 15 min im Kulturschüttler belassen, um restliche Bakterien abzutöten und aufzuschließen. Das Lysat wurde in Zentrifugenbecher überführt, auf 1 M NaCl eingestellt und für 1 h auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zellreste sedimentiert (10000 x g, 15 min, 4°C) und der Überstand bei 4°C aufbewahrt.

2.5.7 PEG-Fällung

Das unter 2.5.6 erhaltene Lysat wurde mit PEG 6000 auf eine Endkonzentration von 10% (w/v) eingestellt und die Phagen für 2 h bei 0°C im Zentrifugenbecher gefällt. Die Phagen wurden sedimentiert (15000 x g, 20 min, 4°C), in 10 ml TM-Puffer resuspendiert und copräzipitiertes PEG durch zweimalige Extraktion mit Chloroform entfernt.

2.5.8 Glycerin-Stufengradient

Zur weiteren Aufreinigung der Phagen wurde ein Glycerinstufengradient in einem 36 ml Kontron-Zentrifugenröhrchen wie folgt präpariert: 9 ml einer 40%igen Glycerinlösung in TM-Puffer wurden vorgelegt und mit 12 ml einer 5%igen Glycerinlösung in TM-Puffer überschichtet. Dieser Gradient wurde mit der unter 2.5.7 erhaltenen Phagensuspension überschichtet und das Röhrchen mit TM-Puffer aufgefüllt. Die Phagen wurden sedimentiert (135000 x g, 3 h, 4°C), in 1 ml TM-Puffer resuspendiert und sofort weiterverarbeitet (s. 2.5.9).

2.5.9 Isolierung der Phagen-DNA

Der unter 2.5.8 erhaltenen Phagensuspension wurden DNaseI und RNaseA bis zu einer Endkonzentration von 5 µg/ml (DNaseI) bzw. 1 µg/ml (RNaseA) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 M EDTA-Lösung bis zu einer Konzentration von 20 mM abgestoppt und die Phagenhülle durch eine Behandlung mit Proteinase K aufgeschlossen. Hierfür wurde die Lösung auf einen SDS-Gehalt von 0,5% (v/v) eingestellt und mit Proteinase K bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml versetzt. Der proteolytische Abbau erfolgte bei 56°C für 1 h. Anschließend wurden Proteine durch Phenolextraktion aus der Lösung entfernt, die Phagen-DNA gefällt und in 100 µl H₂O oder TE-Puffer gelöst.

2.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Technik, die es ermöglicht, aus geringsten DNA-Mengen definierte DNA-Abschnitte in vitro zu vervielfältigen (Saiki *et al.*, 1988). DNA-abhängige DNA-Polymerasen benötigen als Startpunkt für die Synthese des zur Matrize komplementären Stranges kurze, doppelsträngige Sequenzbereiche. Solche doppelsträngigen Bereiche können durch die Verwendung synthetischer Oligonukleotide ("Primer") in einem esDNA-Gemisch erzeugt werden. Für die PCR verwendet man zwei Primer, die jeweils zu

einem der beiden Stränge der Matrizen-DNA komplementär sind und die gewünschte Sequenz (Amplikon) einschließen (Sense- und Antisenseprimer). Ein Zyklus der Polymerase-Kettenreaktion beinhaltet die temperaturgesteuerte Reaktionsfolge von Denaturierung, Annealing und Extension.

Zunächst wird das zu untersuchende DNA-Gemisch ("Template") bei hoher Temperatur (95-99°C) denaturiert und zusammen mit den synthetischen Oligonukleotiden abgekühlt ("Annealing"). Während des Annealings bilden sich Hybride zwischen den Einzelsträngen des Amplikons und den entsprechenden Primern aus. Diese doppelsträngigen DNA-Bereiche dienen einer hitzestabilen, DNA-abhängigen DNA-Polymerase (z.B. Taq-DNA Polymerase) als Startpunkte für die Synthese des komplementären Stranges (Extension). Die Extension der Primer wird bei einer Temperatur durchgeführt, die über der T_M der Primer liegt und den Annealingvorgang beendet (65-75°C). Da das Extensionsprodukt des einen Primers im nächsten Zyklus als Template des anderen dient, wird theoretisch der durch die Primer eingeschlossene DNA-Abschnitt nach n -Zyklen um 2^n vermehrt; es kommt zu einer Kettenreaktion.

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Protokolle wurden durch Variation der Primerkonzentration, der Annealingtemperatur und der Zyklusanzahlen optimiert. Alle Reaktionen wurden im DNA-Thermocycler 480 der Firma Perkin Elmer durchgeführt.

Lösungen und Puffer:

10 x Taq-DNA-Polymerase-Puffer (Biomol): 100 mM Tris-HCl
500 mM KCl
15 mM MgCl₂
pH 8,8

MgCl₂-Lösung: 50 mM
Oligonukleotide: 10 µM
dNTP-MIX: 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10mM dGTP, 10mM dTTP
Taq-DNA-Polymerase (Biomol): 4 U / µl

PCR-Standardansatz: 10 mM Tris-HCl (pH8,8)
50 mM KCl
1,5 mM MgCl₂
0,4 µM jeder Primer
200 µM dNTPs
0,04 U / µl Taq-DNA-Polymerase

PCR-Standardansätze wurden in einem Endvolumen von 50 µl bzw. 100 µl durchgeführt. Die Ansätze wurden unmittelbar vor ihrer Verwendung aus den angegebenen Lösungen erstellt. Um Verdunstungseffekte während der Reaktion zu vermeiden wurden die Ansätze mit 70 µl Mineralöl (Perkin Elmer) überschichtet. Als Template wurden den Reaktionsansätzen DNA-haltige Lösungen im Verhältnis 1:10 oder 1:50 (v/v) beigemischt. Die Zugabe der Taq-DNA Polymerase erfolgte generell in einem geeigneten Volumen (5-10µl) 1x Taq-DNA-Polymerase-Puffer bei 78°C nach einer initialen Denaturierung der PCR-Ansätze von 2 min bei 99°C. Durch diesen sogenannten "Hot-Start" wurde eine unspezifische Hybridisierung der

Primer und ihre Extension durch das Enzym bei niedrigen Temperaturen verhindert. Im letzten Zyklus jeder PCR-Reaktion wurde die Extensionszeit auf 5 Minuten verlängert, um sicherzustellen, daß beginnende Polymerisationen vollständig abgeschlossen werden. Anschließend wurden die Ansätze bis zu ihrer Entnahme aus dem Gerät auf 4°C gekühlt. Für den DNA-Thermocycler 480 wurde folgendes Standard-Temperaturprotokoll verwendet.

Standard-Temperaturprotokoll: (DNA-Thermocycler 480)	99°C	2 min	Initiale Denaturierung	
	78°C	-----	<u>Zugabe von Taq-Pol</u>	
	95°C	20s	Denaturierung	
	37°C-58°C	1-45 s	Annealing	max. 40 Zyklen
	72°C	1 min	<u>Extension</u>	
	72°C	5 min	<u>Extension</u>	
	4°C		Reaktionsende	

In den folgenden PCR-Protokollen sind nur noch die Zyklusanzahl, die Temperatur und Zeitdauer des Annealingschrittes angegeben.

2.6.1 Kolonie-PCR

Mittels der Kolonie-PCR wurden nach der Transformation die in den Bakterienkolonien etablierten Plasmide auf ein Rekombinationsereignis (Vektor mit Insertion) hin untersucht. Für diesen Zweck wurden die Primer FPN-1 und RPN-1 verwendet, die die Polylinkerregion der verwendeten Plasmide pBSK+ und pGEM-5Zf(+) einschließen. Das Amplifikationsprodukt aus einem rekombinanten Plasmid (Vektor mit Passagier-DNA) unterscheidet sich von dem Amplifikationsprodukt des Ausgangsvektors (Plasmid ohne Passagier-DNA) um die Größe der Passagier-DNA.

In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden 20 µl 1x Taq-DNA-Polymerase-Puffer vorgelegt. Mit einem Zahnstocher wurde etwas Zellmaterial von der zu untersuchenden Bakterienkolonie abgenommen und in den vorgelegten Puffer überführt. Anschließend wurde mit dem Zahnstocher ein Impfstrich auf eine Nähragarplatte mit dem für das Plasmid entsprechenden Antibiotikum gezogen und diese Replikaplatte bei 37°C inkubiert. Um einer Degradation der verwendeten Oligonukleotide, dNTPs und der Taq-Polymerase durch bakterielle Enzyme vorzubeugen, wurden diese Reagenzien erst nach einem initialen Denaturierungsschritt von 5 min bei 99°C als Premix zu den Reaktionsansätzen gegeben. Die Ansatzgröße betrug 25 µl. In einer sich anschließenden Gelelektrophorese wurden rekombinante Plasmide anhand der Größe ihrer Kolonie-PCR Produkte identifiziert. Die DNA rekombinanter Plasmide wurde durch Anzucht des entsprechenden *E. coli* Klons von der Replikaplatte mit anschließender Plasmidpräparation dargestellt und die Passagier-DNA somit weiteren Untersuchungen zugänglich gemacht. Der Vorteil dieser Methode liegt, verglichen mit der klassischen Restriktionsanalyse zur Identifizierung eines Rekombinationsereignisses, die eine Plasmid-

DNA-Präparation voraussetzt, in dem hohen Probendurchsatz bei geringem zeitlichen Aufwand.

Primerkombination: FPN/RPN
Annealing: 55°C, 20 s
Zyklusanzahl: 35

Kolonie-PCR-Premix (je Reaktion 5 µl): 0,5 µl 10x Taq-DNA-Polymerase-Puffer
1µl FPN-1
1µl RPN-1
0,5 µl dNTPs
0,25 µl Taq-DNA-Polymerase (4 U/ µl)
add H₂O 5µl

2.6.2 Amplifikation der Phageninsertionen aus λGT11-Isolaten

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, aus zwei kommerziellen cDNA-Bänken der Firma Clontech mittels Plaquehybridisierung eine vollständige Kopie der Uroguanylin-cDNA zu isolieren. Im Anschluß an die Isolierung positiver Phagenklone wurde, alternativ zur präparativen Anzucht der Phagen, die Passagier-DNA mittels Plaque-PCR amplifiziert und nachfolgend durch Sequenzierung charakterisiert. Für diesen Zweck wurden Primer verwendet, die die Passagier-DNA einschließen. Nach Vermehrung des zu untersuchenden Phagenklons wurden 3-4 Plaques aus der Anzuchtplatte mit einer Pasteurpipette ausgestochen und in 100 µl SM-Puffer überführt. Die Phagen wurden für 30 min in 100 µl SM-Puffer ausgeschwemmt und die Phagensuspension durch einen Zentrifugationsschritt von Zell- und Agaroseresten geklärt (15000 x g, 15 min, 4°C). Durch einen Hitzeschritt (5 min, 99°C) wurden die Phagen denaturiert und somit geringe Mengen des Phagen-genoms in Lösung gebracht. Diese Phagen-DNA-Lösung wurde 1:10 (v/v) im Reaktionsansatz der nachfolgenden PCR als Template verdünnt. Die Ansatzgröße betrug 100 µl. Es wurden 35 PCR-Zyklen (Annealing: 55°C, 30 sec) durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden anschließend durch präparative Gelelektrophorese dargestellt und mittels Phenolextraktion aus dem Gel aufgereinigt. Jeweils 150 ng der Amplifikationsprodukte wurden für eine Sequenzierreaktion eingesetzt.

Primerkombination: LGT11S/LGT11AS
Annealing 55°C, 30 s
Zyklusanzahl: 35

2.6.3 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Bei der RT-PCR wird die mRNA eines Gewebes vor der PCR in DNA umgeschrieben. Die aus eukaryontischen Geweben extrahierte Gesamt-RNA wird zunächst mit einem Oligo(dT)-Primer hybridisiert. Hierbei bilden sich zwischen dem Poly(A)-Tail eukaryontischer mRNAs und der Oligo(dT)-Sequenz des Primers doppelsträngige Bereiche aus, die einer RNA-

abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase, RT) unter geeigneten Reaktionsbedingungen als Startpunkt für die Synthese des komplementären Stranges dienen. Das Produkt dieser Reaktion ist ein DNA/RNA-Hybrid, wobei der DNA-Strang eine revers komplementäre Kopie (cDNA) des entsprechenden mRNA-Moleküls ist. Der RNA-Strang des Hybrides wird im Anschluß an die reverse Transkription mit RNase-H abgebaut. Die Produkte der Reaktion (cDNA-Erststrang) repräsentieren somit theoretisch die polyadenylierte mRNA Population einer RNA-Probe. Durch geeignete PCR-Strategien kann anschließend die Genexpression eines Gewebes untersucht oder die mRNA-Sequenz eines neuen Gens durch Amplifikation der entsprechenden cDNA ermittelt werden.

2.6.3.1 cDNA-Erststrangsynthese

cDNA-Erststrangsynthesen wurden routinemäßig mit 5 µg Gesamt-RNA in einem Endvolumen von 50 µ durchgeföhrt. Die RNA wurde gefällt, in 31,5 µl H₂O gelöst, mit 5 µl einer UNIP-5 Primerlösung vermischt (10 µM) und für 10 min bei 70°C denaturiert. Der Ansatz wurde anschließend für eine Minute bei 42°C äquibriert und die Reaktion durch Zugabe von 13,5 µl RT-Premix gestartet. Nach einer Reaktionszeit von 60 min bei 42°C wurde der Ansatz für 10 min bei 70°C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf 50°C äquibriert, 0,5 µl RNaseH (10 U/µl) hinzugegeben und für 10 min bei 50°C inkubiert. Durch eine weitere Inkubation des Ansatzes bei 70°C für 10 min wurde die RNase H inaktiviert. Die so erstellten cDNA-Erststrangsynthese Ansätze wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Als Kontrolle für die cDNA-Erststrangsynthese wurde von jedem cDNA-Erststrang eine PCR mit β-Tubulin spezifischen Primern durchgeföhrt. Die Ansatzgröße betrug 25 µl. Als Template wurde cDNA-Erststrang 1:50 (v/v) im Reaktionsansatz verwendet.

5x RTase-Puffer:	250 mM Tris-HCl (pH 8,3) 375 mM KCl 15 mM MgCl ₂	RT-Premix:	10 µl 5x RTase-Puffer 2,5 µl dNTP-Lösung 1 µl SuperscriptII™ Reverse Transkriptase (200 U / µl)
Primerkombination:	β-TUB-1/β-TUB-2		
Annealing:	58°C, 20 s		
Zyklusanzahl:	30		

2.6.3.2 RT-Stufen-PCR zur relativen Abschätzung der Genexpression

Bei vergleichenden Untersuchungen der Genexpression verschiedener Gene wurde zunächst eine cDNA-Erststrangsynthese (2.6.3.1) mit dem Primer UNIP-5 aus entsprechenden RNA-Proben durchgeföhrt. Für die zu untersuchenden Gene wurden spezifische Oligonukleotide

synthetisiert, die einen Teilbereich der genspezifischen cDNA einschließen, und die cDNA-Fragmente in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Hierfür wurden 120 µl Ansätze verwendet. Als Template wurde cDNA-Erststrang des zu untersuchenden Gewebes 1:50 (v/v) im Reaktionsansatz verwendet. Aus den laufenden PCR-Reaktionen wurden nach 20, 25, 30, 35 und 40 Zyklen jeweils 20 µl Aliquots entnommen und gelelektrophoretisch kontrolliert. Der Sichtkontrolle schloß sich teilweise eine Southern-Blot-Analyse an. Hierfür wurden die PCR-Produkte aus dem Gel auf eine Hybond-N+-Membran geblottet (2.2.18), anschließend mit einem internen Oligonukleotid als Gensonde hybridisiert und das resultierende Autoradiogramm ausgewertet. Anhand der Zunahme spezifischer PCR-Produkte in Abhängigkeit zur Zykluszahl konnte eine Abschätzung der relativen Genexpressionsraten einzelner Gene in einem Gewebe vorgenommen werden. In der folgenden Tabelle sind die untersuchten Gene, die verwendeten Primerkombinationen, die Annealingtemperatur sowie die relative Größe des amplifizierten cDNA-Fragmentes angegeben.

Gen	Primerkombination	Annealing	Größe des cDNA-Fragmentes	Gensonde
Humanes Uroguanylin	HUGU-11/HUGU-9	56°C, 20 s	262 bp	HUGU-8
Humanes Guanylin	HGUP-1/HGU-2	56°C, 20 s	294 bp	HGU-3
Porcines Uroguanylin	SDII-5/SDII-4	58°C, 20 s	370 bp	SDII-1
Porcines Guanylin	OHI-1/OHI-3	58°C, 20s	295 bp	OHI-2
Porcine GC-C	PIGCC-1/PIGCC-2	58°C, 20s	805 bp	PIGCC-3

2.6.4 RACE-PCR

Bei der RACE (rapid amplification of unknown cDNA ends) wird ein kleiner, bekannter Sequenzabschnitt innerhalb eines Gens genutzt, um die 3'-und 5'-Enden einer cDNA zu amplifizieren. 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 (Frohman *et al.* 1988, Ohara *et al.*, 1989). 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.

2.6.4.1 3'-RACE-PCR

Für die Amplifikation des 3'-Endes der humanen und porcinen Uroguanylin sowie der porcinen Guanylin-cDNA wurden cDNA-Erststrangsynthesen aus Gesamt-RNA-Präparationen verschiedener Gewebe mit dem Oligo(dT)-Primer UNIP-5 durchgeführt. Am 5'-Ende dieses Primers (siehe 2.6.3) ist eine 18 Nukleotide lange Adaptersequenz enthalten, so daß nachfolgende Amplifikationen mit dem für diese Sequenz spezifischen Primer UNIP-6 anstelle des Oligo(dT)-Primers durchgeführt werden konnten.

Amplifikation des 3'-Terminus der humanen Uroguanylin-cDNA

Die Amplifikation des 3'-Terminus der humanen Uroguanylin-cDNA wurde aus cDNA-Erststrängen verschiedener Gewebe versucht. Es wurden folgende Primerkombinationen in den 3'-RACE-PCR-Experimenten eingesetzt: HUGU-3/UNIP-6, HUGU-4/UNIP-6, HUGU-5/UNIP-6. Aus den PCR-Reaktionen mit der Primerkombination HUGU-3/UNIP-6 wurden Nachverstärkungen mit der Primerkombination HUGU-5/UNIP-6 durchgeführt. Die Zykluszahl und die Annealingbedingungen wurden variiert.

Amplifikation des 3'-Terminus der porcinen Guanylin-cDNA

Für die Amplifikation des 3'-Endes der porcinen Guanylin-cDNA wurde cDNA-Erstrang aus porcinem Jejunum 1:50 (v/v) als Template im ersten Reaktionsansatz verwendet. Die Amplifikation des 3'-Endes wurde durch sequentielle Nachverstärkungen mit der Primerkombination OHI-2/UNIP-6 durchgeführt. Dabei wurde die erste PCR-Reaktion nach 20, 25, 30, 35 und 40 Zyklen unterbrochen. Hierfür wurde die Temperatur auf 78°C erhöht, jeweils 5 µl entnommen und in einen auf 78°C äquilibrierten, neuen Reaktionsansatz mit der gleichen Primerkombination überführt. Nachfolgend wurden PCR-Reaktionen mit 40 Zyklen durchgeführt.

Primerkombination:	OHI-2/UNIP-6
Annealing:	58°C, 20 s
Zyklusanzahl:	20+40; 25+40; 30+40; 35+40

Amplifikation des 3'-Terminus der porcinen Uroguanylin-cDNA

Als Template wurde ebenfalls cDNA-Erstrang aus porcinem Jejunum 1:50 (v/v) im ersten Reaktionsansatz verwendet und sequentielle Nachverstärkungen mit den Primerkombinationen SDII-1/UNIP-6 und SDII-3/UNIP-6 durchgeführt. Dabei wurde initial

eine PCR-Reaktion mit der Primerkombination SDII-1/UNIP-6 durchgeführt, nach 20, 25, 30 und 35 Zyklen unterbrochen, jeweils 5 µl entnommen, in einen auf 78°C äquilibrierten, neuen Reaktionsansatz mit der Primerkombination SDII-3/UNIP-6 überführt und eine Nachverstärkung mit 35 Zyklen durchgeführt.

Primerkombinationen:	SDII-1/UNIP-6+SDII-3/UNIP-6
Annealing	58°C, 20 s
Zyklusanzahl:	20+35; 25+35; 30+35; 35+35

2.6.4.2 5'-RACE

Für die 5'-RACE der humanen Uroguanylin, der porcinen Uroguanylin und der porcinen Guanylin-cDNA wurden anstatt eines Oligo(dT)-Primers ein für die jeweils gesuchte Sequenz spezifisches *antisense*-Oligonukleotid (*GSP-1*, Genspezifischer Primer-1) in der Erststrangsynthese (2.6.3.1) verwendet. Die Syntheseansätze wurden anschließend mit Glassmax™ Silicaeinwegsäulen (Fa. Gibco) nach Herstellerangaben gereinigt und die Erststrangprodukte mit 50 µl H₂O eluiert. Bei dieser Aufreinigung wurden Salz, Protein, Primerreste und kleinere Syntheseprodukte entfernt. Im nachfolgenden Schritt wurde ein 3'-*Tailing* der entstandenen cDNA-Erststrangprodukte mit dATP unter Verwendung des Enzyms *Terminale Desoxynukleotidyltransferase* (TdT) durchgeführt. Die Tailingreaktionen wurden in einem Endvolumen von 25 µl durchgeführt. Vor der Zugabe der TdT wurden die Ansätze für 2 min bei 94°C denaturiert. Die Reaktionsansätze wurden anschließend für 2 min auf 37°C äquilibriert, die TdT hinzugegeben und nach einer Reaktionszeit von 10 min durch eine Hitzeinkubation für 10 min bei 70°C inaktiviert. Das prinzipielle Vorgehen ist in der nachstehenden Abbildung illustriert.

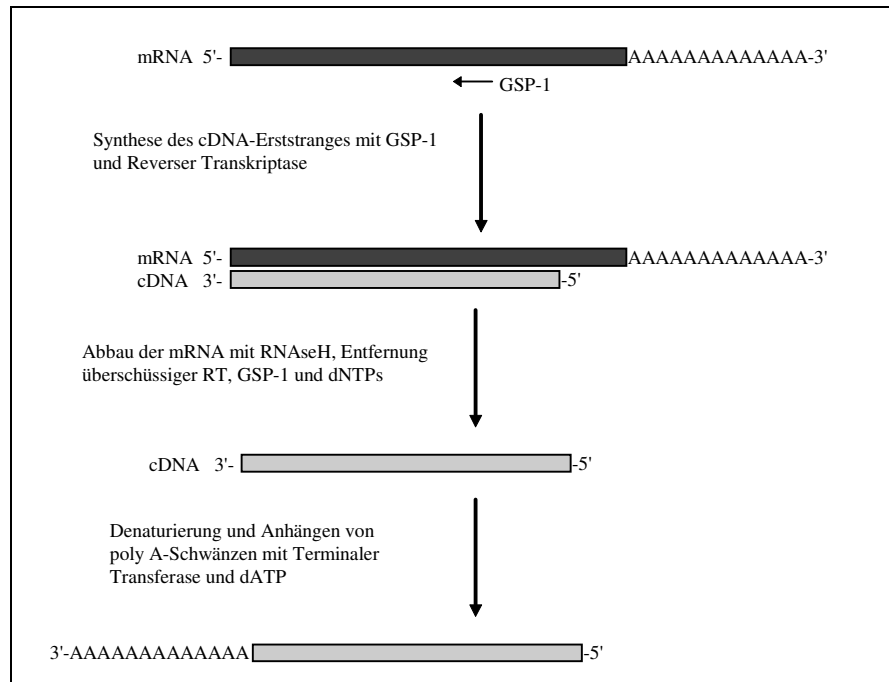


Abb. 8 5'-RACE: Spezifische cDNA-Erststrangsynthese und d(A)-Tailing der Produkte. Erläuterungen siehe Text.

Für die nachfolgenden PCR-Amplifikationen wurden für jede cDNA zwei weiter zum 5'-Bereich gelegene spezifische *antisense* Primer (GSP-2, GSP-3; Gensspezifischer Primers 2 und 3) synthetisiert. Initial wurde eine PCR-Reaktion für 10 Zyklen mit dem Oligo(dT₂₄)-Primer UNIP-5 in Kombination mit dem zweiten spezifischen Primer GSP-2 durchgeführt. Für diese PCR wurde ein spezielles Temperaturprotokoll entwickelt. Es wurden jeweils 5 µl der Tailingansätze als Template verwendet (s.u.). Aus diesem PCR-Ansatz wurden nach Reaktionsende sequentielle Nachverstärkungen mit den Primerkombinationen GSP-2/UNIP-6 und GSP-3/UNIP-6 durchgeführt. Die relative Lage der Primer zum spezifischen Erststrang und das Muster der Nachverstärkungen ist in der nachfolgenden Abbildung illustriert. Es wurden jeweils 5 µl eines PCR-Ansatzes als Template in den Nachverstärkungen verwendet.

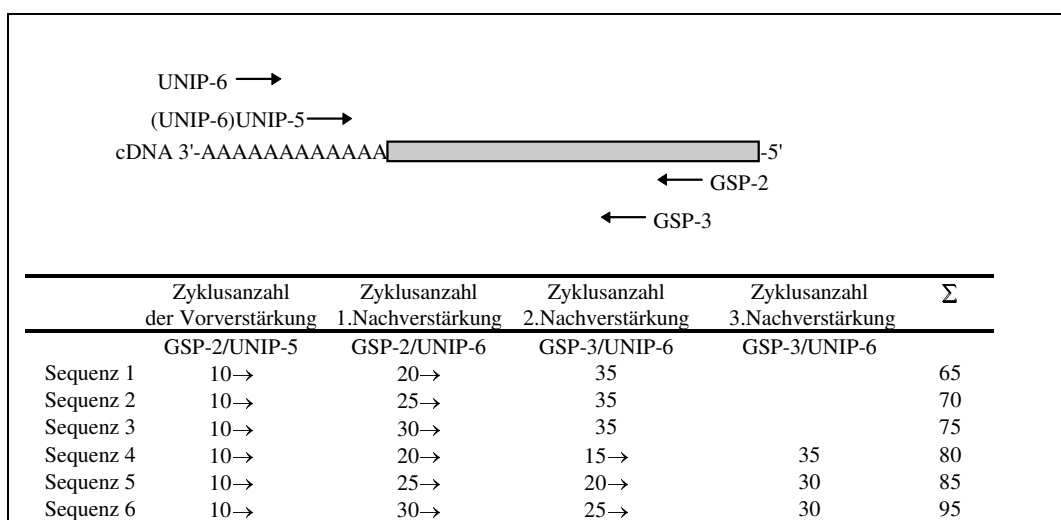


Abb. 9 Amplifikation des 5'-Terminus. Für die Amplifikation des 5'-Terminus der untersuchten cDNA-Sequenzen erwies sich eine sequentielle PCR-Protokolle als optimale Strategie. Aufgrund der homopolymeren Sequenzbereiche ist die Amplifikationseffizienz spezifischer Produkte gering, so daß eine insgesamt hohe Zyklusanzahl verwendet werden mußte. Da die notwendige Zyklusanzahl nicht abschätzbar ist, wurden sequentielle Amplifikationsprotokolle mit variabler Zyklusanzahl in den Nachverstärkungssegmenten durchgeführt.

In der folgenden Tabelle sind die für die speziellen 5'-RACE-Experimente verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

	RNA-Quelle	GSP-1	GSP-2	GSP-3
HSUGUA-cDNA	Colon	HUGU-7	HUGU-9	HUGU-10
SSDGUA-cDNA	Jejunum	OHI-4	OHI-3	OHI-1
SSDUGUA-cDNA	Jejunum	ERROR-3	HUGU-15	SDII-2

Tab. 2.6.1 für die 5'-RACE-Experimente verwendete Primer und RNA-Proben. HSUGUA=Humane Uroguanylin-cDNA, SSDGUA=Porcine Guanylin-cDNA, SSDUGUA=Porcine Uroguanylin-cDNA

- 5x Tailing-Puffer:** 50 mM Tris-HCl (pH 8,4)
125 mM KCl
5 mM MgCl₂
- Reaktionsansatz:** 5 µl 5x Tailing-Puffer
2,5 µl 2 mM dATP
10 µl genspezifischer cDNA-Erststrang
6,5 µl H₂O
1 µl TdT (10 U / µl)

Temperaturprotokoll (GSP-2/UNIP-5):

99°C	2 min	Denaturierung	
78°C	-----	Zugabe von Taq-Pol	
95°C	20s	Denaturierung	
50°C	20s	Annealing	5 Zyklen
70°C	1 min	Extension	
95°C	20s	Denaturierung	
44°C	20s	Annealing	4 Zyklen
70°C	1 min	Extension	
95°C	20s	Denaturierung	
44°C	20s	Annealing	1 Zyklus
70°C	3 min	Extension	
78°C		Reaktionsende	

2.6.5 Amplifikation des humanen Uroguanylin-Gen Promotors

Die Promotorregion des humanen Uroguanylin-Gens wurde nach der Methode von Siebert und Mitarbeitern (1995) mit einem Kit der Firma Clontech (PromoterFinder™ DNA walking kit human; Clontech, Palo Alto, USA) amplifiziert. Aus der experimentell ermittelten, partiellen Gensequenz wurden zwei spezifische *antisense* Oligonukleotide (HUGU-12; GUGRS-1) abgeleitet, synthetisiert und in den PCR-Reaktionen verwendet. Die Sequenzen der genomischen Adapterprimer des Kits (AP-1, AP-2) sind aufgeführt. Das vom Hersteller empfohlene Protokoll wurde modifiziert. Die PCR-Reaktionen wurden ohne den *Tth*-Antikörper und zum Teil mit drei statt zwei Temperatursegmenten je Zyklus durchgeführt.

Temperaturprotokoll der Vorverstärkung (HUGU-12/AP-1):

94°C	25s	Denaturierung	
<u>72°C</u>	<u>4 min</u>	<u>Annealing/Extension</u>	7 Zyklen
94°C	25s	Denaturierung	
55°C	10s	Annealing	32 Zyklen
<u>67°C</u>	<u>4 min</u>	<u>Extension</u>	
4°C		Reaktionsende	

Temperaturprotokoll der Nachverstärkung(GUGRS-1/AP-2)

94°C	25s	Denaturierung	
<u>72°C</u>	<u>4 min</u>	<u>Annealing/Extension</u>	5 Zyklen
94°C	25s	Denaturierung	
55°C	10s	Annealing	24 Zyklen
<u>67°C</u>	<u>4 min</u>	<u>Extension</u>	
4°C		Reaktionsende	

2.7 Primer-Extension

Den Transkriptionsstartpunkt eines Gens kann durch Primer Extension-Analyse ermittelt werden. Bei dieser Technik wird Gesamt- bzw. Poly A+-mRNA eines Gewebes, in dem eine hohe Expressionrate des zu untersuchenden Gens experimentell ermittelt wurde, mit einem radioaktiv markierten, genspezifischen *antisense* Oligonukleotid hybridisiert, gefolgt von einer reversen Transkription. Hierbei soll, soweit die reverse Transkription nicht aufgrund von Sekundärstrukturen abbricht, die Synthese des komplementären Gegenstranges bis zum 5'-Terminus der mRNA erfolgen, der dem Transkriptionsstartpunkt im korrespondierenden Gen entspricht. Ein Aliquot des Versuchsansatzes wird anschließend in einem denaturierenden Polyacrylamid (PAA)-Gel aufgetrennt und danach eine Autoradiographie des Gels durchgeführt. Die Detektion des mit dem Transkriptionsstartpunkt korrelierenden Nukleotides erfolgt durch Vergleich einer radioaktiven Sequenzierung eines klonierten genomischen Fragmentes mit demselben Oligonukleotid, das für die reverse Transkription verwendet wurde.

Für die Durchführung der Primer-Extension-Analyse des humanen Uroguanylin-Gens ist das Protokoll nach Sambrook *et al.* (1989) befolgt worden. Aus der experimentell ermittelten

Gensequenz wurde das Oligonukleotid GUG-7 abgeleitet und synthetisiert. Anschließend wurde das Oligonukleotid radioaktiv markiert (2.3.2) und 10^5 - 10^6 cpm des Markierungsansatzes mit 25 µg Gesamt-RNA verschiedener Gewebe gefällt (2.2.7). Die Hybridisierung des Primers an seine Zielsequenz erfolgte nach einem Denaturierungsschritt (85°C, 10 min) bei 30°C für 16 h in 30 µl Hybridisierungspuffer. Die Nukleinsäuren wurden erneut gefällt (2.2.1), das Sediment in 20 µl RTase-Puffer aufgenommen und die reverse Transkription durch Zugabe von 100 U RTase gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37°C wurde das Enzym inaktiviert (72°C, 10 min) und die RNA durch Zugabe von DNase-freier RNase bei 52°C für 10 min hydrolysiert. Der Reaktionsansatz wurde durch Phenolextraktion von Proteinen gereinigt und die DNA erneut gefällt. Das Sediment wurde schließlich in 5 µl Probenauftragspuffer gelöst und auf ein 8 %-iges, denaturierendes PAA-Gel aufgetragen. Das Einlaufen der Proben erfolgte bei 600 V für 15 min und 50°C, anschließend wurde die Elektrophorese bei 1600 V für weitere 60 min durchgeführt und das Gel nach der Elektrophorese autoradiographiert.

Probenauftragspuffer:	80 % Formamid (v/v) 10 mM EDTA (pH 8,0) 1 mg / ml Xylen Cyanol FF 1 mg / ml Bromphenolblau
RTase-Puffer:	50 mM Tris / HCL (pH 7,6) 60 mM KCL 10 mM MgCl ₂ 1 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP 1 mM Dithiothreitol 1 U RNase Inhibitor 50 µg / ml Actinomycin D
Hybridisierungspuffer:	40 mM PIPES (pH 6,4) 1 mM EDTA (pH 8,0) 0,4 M NaCl 80 % Formamid (v/v)

2.8 Heterologe Expression der Uroguanylin-Prohormone in *E. coli*

2.8.1 Genkonstrukte

Für die heterologe Expression des humanen und porcinen Prouroguanylins wurde ein T7-RNA-Polymerase-System verwendet. Als Vektor diente das Plasmid pRSET5D (Schöpfer, 1993). Für die Konstruktionen wurde zunächst ein Teilbereich der kodierenden Sequenz der cDNAs amplifiziert. Der amplifizierte Bereich entsprach der translatierten Region der cDNA, jedoch ohne die eukaryontische Signalpeptidsequenz. Durch entsprechend konstruierte Primer (s.u.) wurden der Prohormonsequenz N-terminal ein Histidinhomopolymer aus sechs Histidinen (His-tag) vorgeschaltet. Zwischen dem His-tag und der Prohormonsequenz wurde

die Erkennungssequenz für die Protease Faktor Xa eingefügt, um die N-terminale Modifikation später proteolytisch entfernen zu können. Durch die Anfügung eines Histidinhomopolymers an das Protein wurden die Voraussetzungen für eine schnelle Aufreinigung mittels Nickelchelataffinitäts-Chromatographie geschaffen. Das Genkonstrukt wurden unter Kontrolle des T7-RNA-Polymerase Promotors als *NcoI* / *EcoRI* Kasette in das Plasmid pRSET5D kloniert. Als Wirt für die Expression der Genkonstrukte diente der *E. coli* Stamm BL21(DE3), der genomisch eine Kopie des T7-RNA-Polymerasegens unter Kontrolle des *LacUv*-Promotors besitzen.

	HSUGUA	SSDUGUA	
Vorverstärkung:	HUGU-14/HUGU-15 As27-112	HUGU-14/SDII-4 As28-113	25 Zyklen
Nachverstärkung:	HISTAG-1/HUGU-15	HISTAG-1/SDII-4	25 Zyklen
Klonierung über:	<i>NcoI/EcoRI</i> in pRSET5D	<i>NcoI/EcoRI</i> in pRSET5D	
Theoretische Masse des rekombinanten Produktes	10998 Da	10869 Da	

Tab. 2.8.1 Daten zur Klonierungsstrategie der Genkonstrukte. Die Primerkombinationen, die Aminosäurepositionen des verwendeten Präprohormons und die Masse des durch die N-terminal eingeführten Modifikationen resultierenden, theoretischen Translationsproduktes sind angegeben. HSUGUA=Humanes Uroguanylin; SSDUGUA=porcines Uroguanylin

	<i>NcoI</i>
	M V H H H H H I E G R V
HISTAG-1	<u>TCTACCATGGTTCATCACCATCACCATCACATAGAAGGTAGAGTC</u>
	I E G R V
HUGU-14	<u>ATAGAAGGTAGAGTCTACATCCAGTACCA</u>
	<i>EcoRI</i>
HUGU-15	<u>TCTGAATTCTCATTAGAGGCAGCCGGTACACGC</u> (antisense)
SDII-4	<u>TCTGAATTCTTATCAGCTGCAGCCGGTACAGGC</u> (antisense)

Verwendete PCR-Primer für die Amplifikation des Genkonstruktes. Die unterstrichenen Bereiche markieren die für die Klonierung der Konstrukte notwendigen 5'-Modifikationen .

2.8.2 Kulturbedingungen

Die Expression der rekombinanten Proteine wurde im Labormaßstab in 500 ml Kulturen durchgeführt. Zunächst wurde von einer Einzelkolonie eines entsprechenden *E. coli* Klons eine 5 ml ÜNK-Kultur auf LB-Amp-Medium gezogen (37°C/180rpm/12 h). Die Zellen wurden abzentrifugiert (6000 x g, 5 min, RT) und einmal mit 5 ml PBS gewaschen, um im Medium befindliche β -Lactamase zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend auf 500 ml EXP-Medium überimpft und die Kultur bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,7 im Umluftkulturschüttler bei 37°C / 280 rpm inkubiert. Zur Produktion des rekombinanten Proteins wurde die Transkription des T7-RNA-Polymerasegens im *E.coli*-Wirt durch Zugabe

von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die vom Wirt gebildete T7-RNA-Polymerase ihrerseits transkribiert das auf dem Expressionsplasmid codierte Genkonstrukt. Nach der Induktion wurde die Inkubation der Kultur für weitere 2,5-3 h bis zum Erreichen eines konstanten OD_{600nm} -Wertes fortgesetzt und die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Der Verlauf der Produktion des rekombinanten Proteins wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Hierfür wurden alle 30 min jeweils ein OD_{600nm} -Äquivalent von ca. 1,0 der Kultur entnommen, die Zellen sedimentiert und in 100 μ l 1x SDS-Probenpuffer aufgeschlossen (10 min, 95°C). Jeweils 15 μ l des Zellaufschlusses wurden im SDS-PAGE pro Spur aufgetragen (2.8.5).

2.8.3 Nickelchelataffinitäts-Chromatographie

Rekombinantes His-Prouroguanylin wurde über Nickelchelataffinitäts-Chromatographie aus dem Bakterienlysat induzierter *E. coli* Kulturen gereinigt. Die *E. coli*-Zellen wurden sedimentiert (6000x g, 15 min, 4°C), einmal in eiskaltem PBS-Puffer gewaschen, je 5 g Zellsediment in 50 ml PE-Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Das gefrorenen Zellsediment wurde mit 35 ml Lysispuffer überschichtet und mit Ultraschall aufgeschlossen. Hierfür wurde eine Nadelsonde verwendet. Die Beschallung erfolgte für 5 min in 2 sec Intervallen mit 3 sec Pausen bei 50W Leistung. Anschließend wurde der Zellaufschluß für eine Stunde bei 4°C inkubiert und erneut beschallt. Unlösliche Bestandteile wurden durch einen Zentrifugationschritt (10000 x g, 15 min, 4°C) sedimentiert und der Überstand in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß dekantiert. Der Aufschluß wurde je 5 g Zelläquivalent mit 2,5 ml in Aufschlußpuffer äquilibrierter ProBond™ Nickelchelataragose versetzt und zur Bindung des rekombinanten Proteins an das Chromatographiematerial für eine Stunde unter Bewegung bei 4°C inkubiert. Das Chromatographiematerial wurde sedimentiert (900 x g, 5 min, 4°C) und der Überstand dekantiert. Anschließend wurde das Chromatographiematerial je zweimal mit zehnfachem Volumen der unten angegebenen Puffer gewaschen. Durch den Abfall des pH-Wertes in den einzelnen Waschschrritten wurden die mit niedriger Affinität an das Nickelchelatomaterial gebundenen Proteine des Wirtes entfernt. Während des letzten Waschschrittes wurde die Nickelchelataragose aufgeschwemmt und in eine Chromatographiesäule überführt. Nachdem sich das Chromatographiematerial abgesetzt und ein Säulenbett gebildet hatte, wurde Auslaß der Säule geöffnet und der restliche Waschpuffer konnte ablaufen. Anschließend wurde das rekombinante Protein mit fünffachem Säulenbettvolumen Elutionspuffer eluiert und das Eluat in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Die Elution des rekombinanten Proteins wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm abgeschätzt. Fraktionen mit zunehmender Absorption bei 280 nm wurden gelelektrophoretisch auf rekombinantes Protein hin überprüft.

Lysispuffer: 6 M Guanidiniumhydrochlorid
20 mM NaPO₄
0,5 M NaCl
pH 7,0

Waschpuffer 1: 6 M Harnstoff
20 mM NaPO₄
0,5 M NaCl
pH 7,0

Waschpuffer 2: 6 M Harnstoff
20 mM NaPO₄
0,5 M NaCl
pH 6,0

Waschpuffer 3: 6 M Harnstoff
20 mM NaPO₄
0,5 M NaCl
pH 5,3

Elutionspuffer : 6 M Harnstoff
20 mM NaPO₄
0,5 M NaCl
pH 4,0

2.8.4 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen in Lösungen wurden nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Diese Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 an Proteine in Lösung. Der gebildete farbige Komplex wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm quantifiziert. Eine direkte Proportionalität zwischen der Extinktion und der Proteinkonzentration liegt nur im Bereich von 1-20 µg Protein/ml Lösung vor. Der Assay wurde als Fertiglösung von der Firma BioRad bezogen. Die Kalibrierung des Assays wurde mit Rinderserumalbuminlösungen (BSA) bekannter Konzentrationen durchgeführt.

2.8.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem apparenten Molekulargewicht wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele unter reduzierenden Bedingungen (Laemmli 1970) in vertikale Gelapparaturen der Firma Phase (Hamburg) verwendet. Die Gele hatten eine Dimension von 10 x 15 x 0,1 cm. Acrylamid wurde als Stammlösung, die 30 % Acrylamid und 0,8 % Bisacrylamid enthielt, von der Firma Roth bezogen. Fertige Gellösungen wurden vor dem Polymerisationsstart für 15 min im Vakuum entgast.

Zunächst wurde das Trenngel in die Gelkammer eingegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von 1h wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel auf die Trenngelschicht gegossen und für eine weitere Stunde polymerisiert. Das Sammelgel hatte eine Länge von 2 cm, das Trenngel eine Länge von 8 cm. Typischerweise wurden zwischen 5-20 µg Gesamtprotein je Spur aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS Laufpuffer bei 180 V für 3-4 h.

15 % iges Trenngel: 15% (w/v) Acrylamid
0,4%(w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
330 mM Tris-HCl pH 8,9
0,1 % (w/v) SDS
Polymerisationsstart mit: 0,1 % (w/v) APS
0,1 % (v/v) TEMED

5 % iges Sammelgel:	5% (w/v) Acrylamid 0,13 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid 125 mM Tris-HCl pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS
Polymerisationsstart mit:	0,1 % (w/v) APS 0,1 % (v/v) TEMED
10x SDS-Laufpuffer:	500 mM Tris-Base 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS
APS:	Ammoniumperoxidisulfat
TEMED:	Tetramethylethylen-diamin

Probenvorbereitung für SDS-PAGE

Proteinlösungen wurden im Verhältnis 1:1 (v/v) mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 100°C denaturiert und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert. *E.coli*-Sedimente und lyophilisierte Proteinproben wurden in 1x Probenpuffer aufgenommen.

2x SDS-Probenpuffer:	50 mM Tris-HCl, pH 6,8 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol 10 % (v/v) Glycerin 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
-----------------------------	---

2.8.6 Färbung der Proteine in Polyacrylamidgelen

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine im Gel mit einer Mischung der Farbstoffe Coomassie brilliant blue G250 und Coomassie brilliant blue R250 angefärbt. Die Färbelösung diente gleichzeitig zum Fixieren der Proteine im Gel. Die Proteingele wurden für 30 min in der Färbelösung geschwenkt. Zur Entfernung überschüssigen Farbstoffes wurden die Gele anschließend dreimal für 30 min in 100 ml Entfärbelösung gewaschen. Anschließend wurden die Gele, bis zum Erreichen eines klaren Hintergrundes, bei 4°C in 500 ml 10% (v/v) Essigsäure entfärbt und fotografisch dokumentiert.

Färbelösung:	40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure 0,1% (w/v) Coomassie brilliant blue G250 0,1% (w/v) Coomassie brilliant blue R250
Entfärbelösung:	40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure

2.8.7 Western-Blot und Immunfärbung

Der Transfer und die Immobilisierung von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Membranen wird als Western-Blot bezeichnet. Diese Methode ermöglicht den spezifischen Nachweis von Proteinen mit monoklonalen oder polyklonalen Antiseren im Anschluß an die SDS-Page innerhalb eines bereits nach Größe getrennten komplexen Proteingemisches.

Für den Elektrotransfer von Proteinen aus PAGE-Gelen auf PVDF-Membranen (Fluorotrans, Fa. Pall, Dreieich) wurde eine Semi-Dry-Blotapparatur der Firma Phase (Hamburg) verwendet. Der Transfer wurde bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA pro Quadratcentimeter Membranfläche für 90 min mit dem unten angegebenen Puffer durchgeführt.

Transferpuffer: 25 mM Tris-HCl pH 8,3
 192 mM Glycin
 20 % (v/v) Methanol

Alle im folgenden beschriebenen Inkubationsschritte wurden auf einem Schwenktisch durchgeführt. Nach Abschluß des Transfers wurde die Membran zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen in TBST-Puffer mit 0,5% (w/v) Caseinhydrolysat für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde zweimal mit TBST-Puffer abgespült und über Nacht bei 4°C mit einer Verdünnung des für humanes Uroguanylin spezifischen Antiserums K174 (Hess *et al*, 1995) in TBST-Puffer [1:1000 (v/v)] inkubiert. Vor der Zugabe des zweiten Antikörpers wurde die Membran dreimal in 100 ml TBST-Puffer gewaschen. Das Anti-Kaninchen-IgG Alkalische Phosphatase Konjugat (Serva) wurde in einer Verdünnung von 1:30000 (v/v) in TBST eingesetzt und mit der Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (jeweils 5 min) mit 100 ml TBST-Puffer wurde die Membran einmal in 100 ml TBS-Puffer gewaschen (5 min) und zur Umpufferung zweimal in 100 ml AP-Puffer gespült. Anschließend wurde die Substratlösung zugegeben und bis zum Erscheinen der Banden im Dunkeln entwickelt. Die enzymatische Reaktion wurde durch Spülen der Membran in Wasser beendet.

TBS-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
 150 mM NaCl

TBST-Puffer: TBS-Puffer + 0,05% (v/v) Tween 20

AP-Puffer: 100 mM Tris/HCl, pH 9,5
 100 mM NaCl
 5 mM MgCl₂

Substratlösung: 66 µl NBT
 330 µl BCIP
 in 10 ml AP-Puffer

Substrate: NBT: 1% (w/v) Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid in Wasser
BCIP 2,5% (w/v) 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat in N,N-Dimethylformamid

2.8.8 Reverse Phase-HPLC

Fraktionen aus der NiCh-Affinitätschromatographie, die nach gelelektrophoretischer Kontrolle quantitativ rekombinantes Protein enthielten, wurden vereinigt, mit Laufmittel A 1:20 (v/v) langsam unter Rühren verdünnt, durch einen 0,2 µm Celluloseacetatfilter filtriert und auf eine RP-HPLC-Säule (10 mm x 125 mm, SOURCE RPC15, Pharmacia) aufgetragen. Die Säule wurde für 30 min mit Laufmittel A gespült und absorbierte Proteine mit dem unten aufgeführten Gradienten bei einer Flußrate von 3 ml/min eluiert. Die Absorbtionwerte des Eluats bei 214 nm und 280 nm wurden kontinuierlich aufgezeichnet. Das Eluat wurde in 3 ml Fraktionen aufgefangen, lyophilisiert und massenspektrometrisch analysiert.

Säule: 10 mm x 120 mm SOURCE RPC15 (Pharmacia)
Flußrate: 3 ml/min
Laufmittel **A:** 0,1% (v/v) TFA
 B: 0,1 % (v/v) TFA
 80% (v/v) Acetonitril
Gradient: 0 bis 20% B in 5 min
 20 bis 60% B in 40 min
 60 bis 100% B in 10 min

2.8.9 Massenspektrometrie

Die Bestimmung der Molekülmasse des rekombinanten Proteins wurde mit einem Sciex Api III Quadrupol-Massenspektrometer (Perkin Elmer, Langen) durchgeführt. Die Ionisation des Peptids aus der Flüssigphase heraus erfolgte bei 5000 V Ionisationsspannung. Bestimmt wurden unter diesen Bedingungen nur positiv geladene Ionen. Zur Messung wurden lyophilisierte, salzfreie Proteinproben in 50 % Acetonitril, 0,5 % Essigsäure gelöst und mit einer Flußrate von 5 µl/min in das Ionspray gefördert. Die Messung erfolgte über den Bereich von 400 bis 2400 Da in 0,5 Da Stufen, Messdauer jeweils 1 msec. Die Datenaufnahme erfolgte durch das Programm Tune (Perkin Elmer) und die Auswertung über das Programm MacSpec (Version 3.3, Perkin Elmer) auf einem Apple Macintosh Performa 475. Die Masse (m) der Proteine wurde aus den gemessenen Massen der mehrfach geladenen Ionen (m/z) errechnet.

HPLC-MS-Kopplung: Die Analyse der Molekülmassen komplexer Peptidgemische wurde durch Microbore-HPLC-MS-Kopplung bestimmt. Die zu untersuchende Probe wurde auf eine analytische AQS 1,0 mm x 250 mm RP C18-Säule (YMC, Schernbeck) aufgetragen, ausreichend lange mit Laufmittel A gespült und absorbierte Proteine mit dem unten aufgeführten Gradienten eluiert. Das Säuleneluat wurde direkt dem Elektrospray des Sciex

Api III Quadrupol-Massenspektrometers zugeführt. Während der Chromatographie wurden alle 7 s einzelne Massenscans von 400 bis 2400 Da durchgeführt und kontinuierlich aufgezeichnet.

Säule:	100 x 1 mm AQS RP C18 (YMC)
Flußrate:	20 µl/min
Laufmittel:	A: 0,06 % (v/v) TFA
	B: 0,05 % (v/v) TFA
	80% (v/v) Acetonitril
Gradient:	10 bis 60% B in 100 min
	60 bis 80% B in 5 min
	80 bis 10% B in 3 min

2.8.10 Aminosäuren-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von Proteinen erfolgte auf der Grundlage des Edman-Abbaus in einem Gasphasensequenator ABI 470A (Applied Biosystems, Weiterstadt). Für die Messungen wurden 20 bis 500 pmol Peptid auf eine mit Bio-BreneTM beschichtete Glasfaser-Membran (Applied Biosystems) aufgetragen. Die Analyse der gebildeten Phenylthiohydantoin-(PTH) Aminosäure-Derivate erfolgte mit einem Reversed-Phase-Gradientensystem (C18 Säule, 2,1 x 250 mm) nach einem Standard-Programm der Firma Applied Biosystems. Durch Vergleich mit dem Elutionsprofil eines PTH-Aminosäurestandard-Gemisches wurden die PTH-Derivate der einzelnen Abbauschritte identifiziert.

2.8.11 T84 Bioassay

Zur Detektierung der Bioaktivität des rekombinanten Proteins wurden T84-Zellen (ATCC, Rockville, MD, USA) verwendet. T84-Zellen exprimieren endogen die GC-C, nicht aber andere, bisher bekannte Guanylatcyclasen. Die Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration in diesen Zellen ist somit ein direktes Maß für die Stimulation der GC-C.

Die Zellen wurden bis zum konfluenten Wachstum in 24-Loch Platten (Nunclon delta, Nunc, Dänemark) bei 37°C / 5%CO₂ kultiviert. Für die Versuche wurden T84-Zellen unterschiedlicher Passagen verwendet. Als Nährmedium wurde eine 1:1 (v/v) Mischung aus Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) und Ham's F-12 Medium (1:1 (v/v)) mit 10 % hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin verwendet (Gibco BRL, Eggenstein). Während der Versuche wurde serum- und antibiotikafreies Medium verwendet.

Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen zweimal mit 500 µl Medium gewaschen. Danach wurden die Zellen für 10 Minuten mit dem Phosphodiesterasehemmstoff 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) im Medium (1 mM) bei 37°C vorbehandelt. Das Präinkubationsmedium wurde abgesaugt; die zu untersuchenden Proben wurden in 500 µl IBMX-Medium gelöst und für 60 Minuten zusammen mit den Zellen bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 100 µl 70 % (v/v) Ethanol aufgeschlossen. Um einen vollständigen Aufschluß sicherzustellen, wurden die Platten bei -80°C eingefroren. Die ethanolische Lösung wurde danach bei 55°C im Trockenschrank abgedampft und das intrazellulär gebildete cGMP in 1 ml Natriumacetatlösung (50 mM, pH 6,0) aufgenommen. Aus dieser Lösung wurden Aliquots entnommen und die cGMP-Konzentration mittels eines spezifischen Radioimmunoassays bestimmt (Kaeffer & Resch, 1985).

2.8.12 cGMP-Radioimmunoassay

200 µl der cGMP-haltigen Natriumacetatlösung wurden zur Acetylierung mit 6,7 µl eines Essigsäureanhydrid/Triethylamin-Gemisches bei Raumtemperatur umgesetzt. Zu 50 µl dieser Lösung wurden 100 µl einer 0,15 %igen γ -Globulin-Lösung mit spezifischem Antikörper (1:5.000 verdünnt) und 50 µl cGMP-Tracer (10000 cpm) pipettiert. Nach Inkubation über Nacht wurden die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe durch Zugabe von 100 µl 0,8 %igem γ -Globulin und 750 µl einer 15 %igen PEG-Lösung für 20 Minuten bei 4°C gefällt und abzentrifugiert (2500 x g, 20 min, RT). Der Überstand wurde abgesaugt und die im Präzipitat verbliebene Radioaktivität in einem γ -Szintillationszähler gemessen. Die Auswertung erfolgte durch die geräteeigene Software (MultiCalc Protocol, RIACalc Wiz, Programmversion 2.20) unter Einbeziehung einer Kalibrationskurve mit cGMP-Konzentrationen von 3,9 fmol bis 1000 fmol. Alle Werte wurden als Doppelwerte gemessen.

Essigsäureanhydrid/Triethylamin-Gemisch:	2:1 (v/v)
Fällungspuffer:	10 mM Tris-HCl, pH 7,4
0,8% (w/v) γ-Globulin:	in Fällungspuffer
15 % (w/v) PEG 6000:	in Fällungspuffer

Ergebnisse

3.1 Klonierung der humanen Uroguanylin-cDNA

3.1.1 Amplifikation eines 3'-terminalen Fragments der humanen Uroguanylin-cDNA

Gemäß 2.2.16 wurden Gesamt-RNA-Präparationen aus zehn verschiedenen humanen Geweben durchgeführt und die Qualität der RNA gelelektrophoretisch überprüft (2.2.17). Es wurde jeweils ein Gramm Gewebe zur Präparation der RNA verwendet. In Tabelle 3.1.1 sind die Gewebeproben, die Ausbeuten und das Ergebnis der Gelkontrolle aufgeführt.

Gewebe	RNA-Menge (µg)	E ₂₆₀ /E ₂₈₀	Gelkontrolle
Tonsillen	650	1,77	intakt
Parotis	740	1,82	"
Herz-Aurikel	310	2,0	"
Magen	590	1,75	"
Pancreas	920	1,85	"
Leber	850	1,85	"
Colon	710	1,78	"
Niere	630	1,85	"
Nebenniere	650	1,84	"
Harnblase	350	1,6	degradiert

Tab. 3.1 Ergebnis der Gesamt-RNA-Präparation aus 10 verschiedenen humanen Gewebeproben. Eine RNA-Probe wurde in der gelelektrophoretischen Kontrolle als intakt angesehen, wenn im Gelbild die 28 S und 18 S rRNA als distinkte Banden erkennbar waren.

Aus der publizierten Aminosäuresequenz des humanen Uroguanylins wurden drei Oligonukleotide abgeleitet und synthetisiert, die alle Kodierungsmöglichkeiten des ausgesuchten Sequenzbereiches abdeckten.

HUGU-3 (256)						>	HUGU-4 (512)						>	HUGU-5 (256)						>
2	2	2	2	2	6	2	4	2	4	4	2	4	4	2	4					
AAY	GAY	GAY	TGY	GAR	YTN	TGY	GTN	AAV	GTN	GCN	TGY	ACN	GGN	TGY	YTN					
N	D	D	C	E	L	C	V	N	V	A	C	T	G	C	L					

Abb. 3.1 Sense Primer für die 3'-RACE der humanen Uroguanylin-cDNA. Über der Peptidsequenz sind die Anzahl der möglichen Kodons und die DNA-Kodierung für die jeweilige Aminosäure angegeben. Die Position der synthetisierten Primer und die Anzahl der Sequenzvariationen ist angegeben.

In den 5'-Terminus der Oligonukleotide wurden die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *SstI* (HUGU-3, HUGU-4, HUGU-5) und *XhoI* (UNIP-6) zur späteren Klonierung potentieller Amplifikationsprodukte in den Vektor pBSK+ integriert. Aus

den unter 3.1.1 aufgeführten RNA-Präparationen wurden cDNA-Erststrangsynthesen (2.6.3.1) mit dem Oligo(dT₂₄)-Primer UNIP-5 durchgeführt und 1:50 (v/v) als Template in den PCR-Reaktionen verwendet. Die folgenden Primerkombinationen fanden in den 3'-RACE-PCR-Experimenten Verwendung: HUGU-3/UNIP-6, HUGU-4/UNIP-6, HUGU-5/UNIP-6. Lediglich mit der Primerkombination HUGU-5/UNIP-6 konnte, nach Verringerung der Annealingtemperatur von 45°C auf 37°C, aus humaner Colon-cDNA ein ca. 280 bp großes cDNA-Fragment amplifiziert werden. In Abbildung 3.2 ist das Ergebnis der präparativen RT-PCR dargestellt.

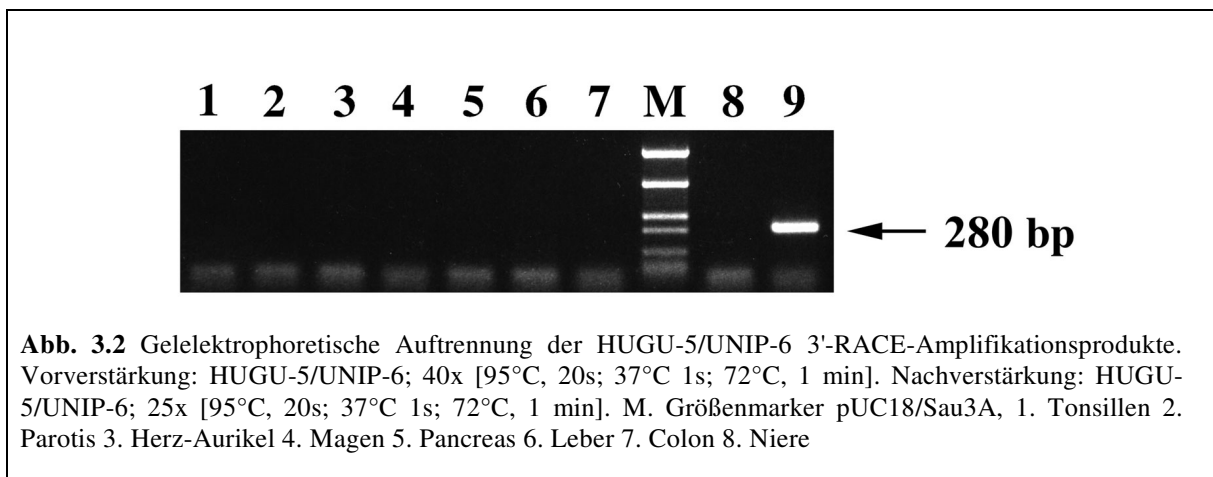


Abb. 3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der HUGU-5/UNIP-6 3'-RACE-Amplifikationsprodukte. Vorverstärkung: HUGU-5/UNIP-6; 40x [95°C, 20s; 37°C 1s; 72°C, 1 min]. Nachverstärkung: HUGU-5/UNIP-6; 25x [95°C, 20s; 37°C 1s; 72°C, 1 min]. M. Größenmarker pUC18/Sau3A, 1. Tonsillen 2. Parotis 3. Herz-Aurikel 4. Magen 5. Pancreas 6. Leber 7. Colon 8. Niere

Das HUGU-5/UNIP-6 PCR-Produkt wurde präparativ dargestellt (2.2.9) und als *SstI/XhoI*-Kassette in den Vektor pBSK+ kloniert (2.2.13). Durch die Sequenzierung (2.4) von 6 unabhängigen Kopien des PCR-Produktes aus den Plasmiden mit der Bezeichnung p31H5U6 - p36H5U6 konnte die Nukleotidsequenz des PCR-Produktes ermittelt werden. Die ersten Nukleotide des klonierten cDNA-Fragmentes kodierten im Leseraster des Primers HUGU-5 für die Aminosäuren T, G, C und L, gefolgt von einem Terminationssignal. Diese Aminosäuren entsprachen exakt der C-terminalen Sequenz des humanen Uroguanylins (siehe Abb. 3.1). Im 3'-Bereich der Sequenz konnte ein potentielles, eukaryontisches Polyadenylierungssignal (AATAAA) identifiziert werden. Aus diesem Ergebnis ließ sich vermuten, daß es sich bei der ermittelten Sequenz um den 3'-Terminus der cDNA des humanen Uroguanylins oder eines eng verwandten Peptides handelte. Für nachfolgende RT-PCR-Experimente wurden die Oligonukleotide HUGU-7, HUGU-8, HUGU-9 und HUGU-10 aus der Sequenz abgeleitet und synthetisiert. Die Sequenz des Amplifikationsproduktes und die Position der synthetisierten Oligonukleotide ist in Abb. 3.3 dargestellt.

```

-----HUGU-5----->-----HUGU-8----->
SstI  C V N V A C *T G C L TER
GAGCTCTGTGTGAACGTTGCGTGTACCGGCTGCCTCTGAgatagccctgggtaccctgag      60

cccaccagggacacctcgcccttcagcccaccacctggcaggcttccatccccgtccat      120
<-----HUGU-10-----<-----HUGU-9-----
gctcaagatgggtccctggccaccatggtcatcaccaccttccagggcctgagcagctg      180

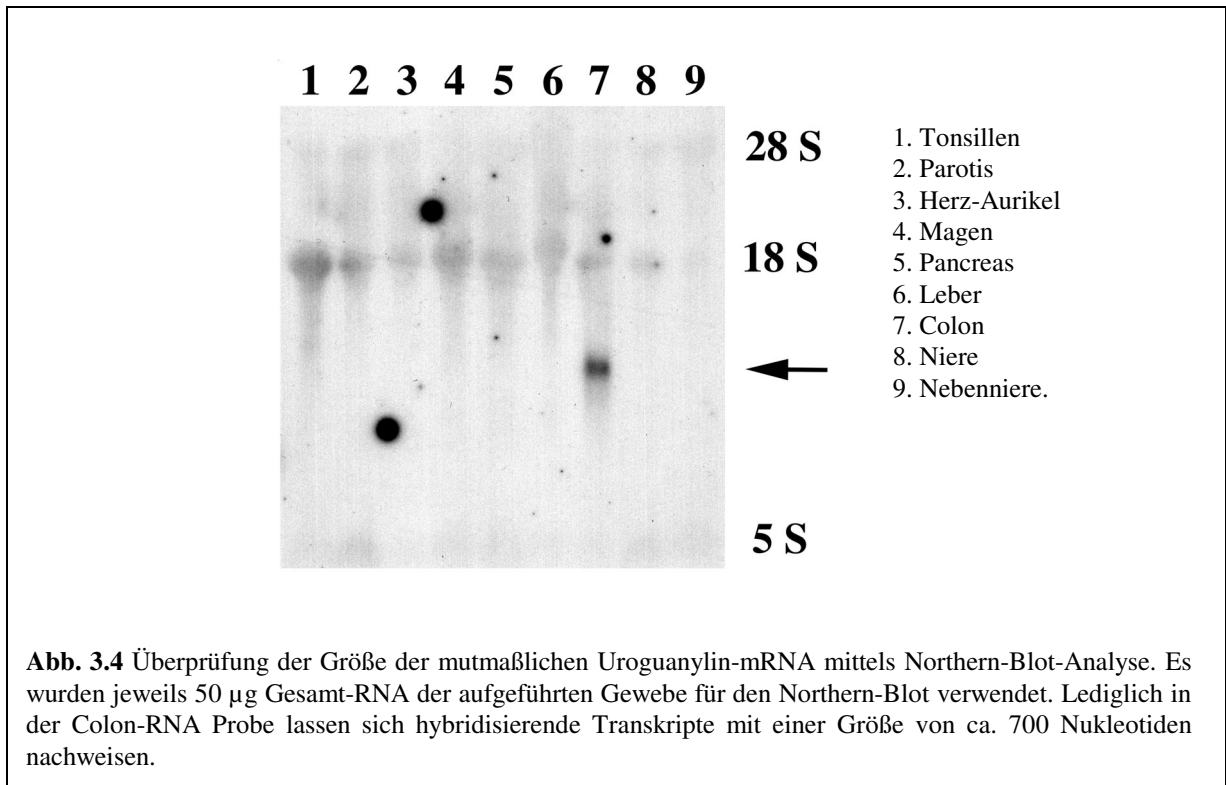
                                                                <---
gatctggtacaaagcaatcggacatagagttggagggggaggccctgaggcagcccagc      240

-----HUGU-7-----                                XhoI
tcctgAATAAAgattctacaacAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAG      292
    
```

Abb. 3.3 Sequenz des HUGU-5/UNIP-6-Amplifikationsproduktes. Der Übergang am 5'-Terminus zwischen der Sequenz des Primers HUGU-5 und der cDNA-Sequenz ist durch ein Sternchen markiert. Die Nukleotide des Primers HUGU-5 und der Poly(A)-Schwanz sind unterstrichen, die für die Klonierung verwendeten Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *SstI* und *XhoI* sind kursiv dargestellt. Die ersten 4 Kodons im Leseraster des Primers HUGU-5 kodieren für die Aminosäuren T, G, C und L, gefolgt von einem Terminationssignal. Ein potentielles eukaryontisches Polyadenylierungssignal (AATAAA) im 3'-Bereich der Sequenz ist hervorgehoben. Die Position der aus dieser Sequenz abgeleiteten Oligonukleotide HUGU-7, HUGU-8, HUGU-9 und HUGU-10, die in den nachfolgenden Experimenten verwendet wurden, ist eingezeichnet.

3.1.2 Größenbestimmung der vermutlichen Uroguanylin-mRNA mittels Northern-Blot-Analyse

Aus dem Plasmid p31H5U6 wurde ein 139 bp großes Teilfragment des potentiellen Uroguanylin-cDNA-Fragmentes mit der Primernkombination HUGU-8/HUGU-9 amplifiziert, präparativ dargestellt (2.2.9), radioaktiv markiert (2.3.1) und als Gensonde in einer ersten Northernanalyse verwendet (2.2.18). Die Hybridisierung des Northern-Blots mit der Gensonde wurde bei 60°C für 16 h mit 1,5 x 10⁶ cpm / ml Hybridisierungslösung (2.3.5) durchgeführt. Die Entfernung unspezifischer Aktivität erfolgte nach der Hybridisierung durch Waschen der Filter unter hochstringenten Bedingungen (letzter Waschschritt: 0,1x SSC+0,1% (w/v) SDS bei 60°C für 30 min). Das nach einer Expositionszeit von 72 h erhaltene Autoradiogramm ist in Abb. 3.4 dargestellt.

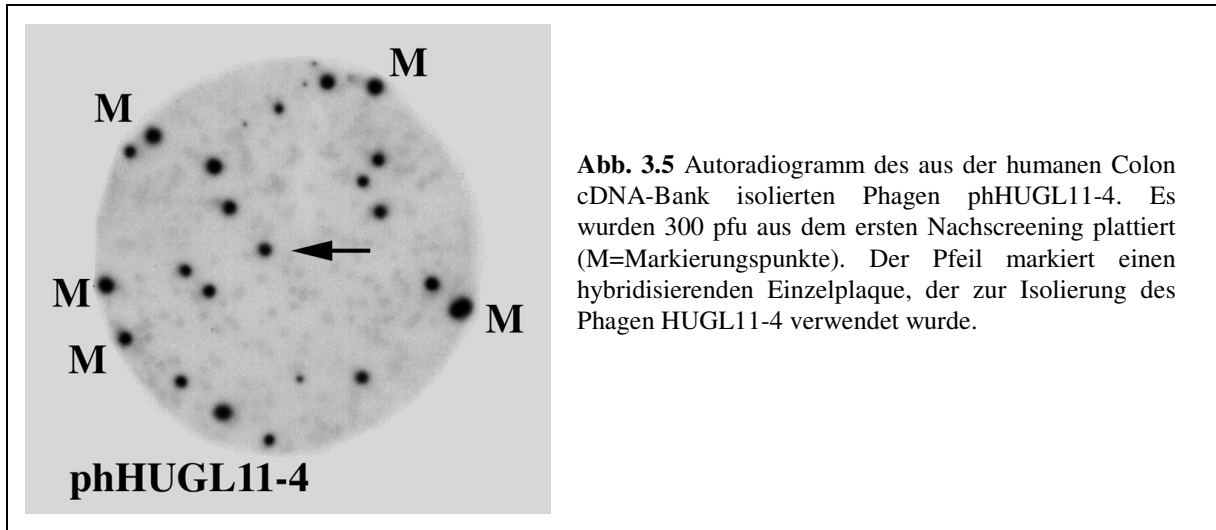


Neben der bedingt durch den hohen Massenanteil unspezifischen Hybridisierung der 18S rRNA mit der Gensonde aus verschiedenen Geweben konnte lediglich aus Colon-RNA ein intensives Signal hybridisierender Transkripte nachgewiesen werden. Keine der anderen RNA-Proben, auch nicht die RNA aus der Niere, hybridisierte mit der Gensonde. Basierend auf der Position der 28S, 18S und 5 S rRNA wurde die Größe der Uroguanylin-mRNA mit ca. 700 Nukleotiden berechnet. Diese Ergebnis zeigte, das es sich bei der klonierten cDNA um das 3'-terminale Fragment eines größeren Transkriptes handeln mußte. Unter der Annahme, daß eukaryontische mRNAs einen Poly(A)-Schwanz von durchschnittlich 150-200 nt Länge besitzen, ließ sich der 5'-gelegene, fehlende Sequenzbereich der potentiellen Uroguanylin-cDNA mit ca. 350-400 nt Länge abschätzen.

3.1.3 cDNA-Bank-Screening

Um die Teilsequenz der potentiellen Uroguanylin-cDNA zu vervollständigen, wurde, basierend auf der Information des Ortes der Genexpression, eine humane Colon-cDNA-Bank durchmustert (2.5). Als Gensonde wurde in diesen Experimenten das vorab beschriebene HUGU-8/HUGU-9 PCR-Produkt verwendet. Alle Hybridisierungen wurden bei 65°C mit $1,3 \times 10^6$ cpm / ml Hybridisierungslösung durchgeführt (2.3.5). Aus 8×10^5 pfu der Colon-cDNA-Bank konnten im ersten Screening 6 primäre Signale hybridisierender Phagenplaques identifiziert werden. Im ersten Nachscreening (2.5.4) ließen sich zwei der sechs Signale bestätigen. Es konnten letztlich zwei Phagenklone isoliert werden (pHUGL11-1 und

phHUGL11-4), die unter stringenten Bedingungen mit der Gensonde hybridisierten. In Abb. 3.5 ist ein repräsentatives Autoradiogramm aus dem zweiten Nachscreening, das zur Isolierung des Phagen phHUGL11-4 führte, gezeigt.



Die Passagier-DNA der Phagen wurden mittels Plaque-PCR (2.6.2) amplifiziert, präparativ dargestellt (2.2.9) und mit den Primern LGT11S und LGT11AS direkt sequenziert. Keine der erhaltenen Sequenzen zeigte eine Übereinstimmung mit der Teilsequenz der humanen Uroguanylin-cDNA. Aus den erhaltenen Ergebnissen ließ sich folgern, daß die humane Uroguanylin-cDNA nicht in der untersuchten cDNA-Bank repräsentiert war.

3.1.4 Amplifikation des 5'-Terminus der humanen Uroguanylin-cDNA

Da die Durchmusterung der humanen Colon-cDNA-Bank nicht zur Isolierung einer spezifischen, im 5'-Terminus elongierten cDNA geführt hatte, wurden aus der Colon RNA-Probe, die in der Northern-Blot-Analyse ein intensives Signal hybridisierender Transkripte mit dem HUGU-8/HUGU-9 cDNA-Fragment gegeben hatte, 5'-RACE-Experimente durchgeführt. Die Verwendung des unter 2.6.4.2 beschriebenen 5'-RACE-PCR-Protokolls resultierte, wie in Abb. 3.6 dargestellt, in der Amplifikation eines ca. 500 bp großen PCR-Produktes.

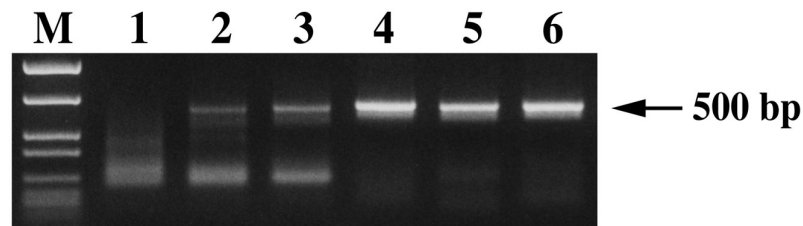


Abb. 3.6 Gelelektrophoretische Auftrennung der mit der Primerkombination HUGU-10/UNIP-6 erhaltenen 5'-RACE Amplifikationsprodukte. Deutlich kann die Zunahme eines ca. 500 bp großen Produktes während der sequentiellen PCR beobachtet werden. Vorverstärkung: HUGU-9/UNIP-5; 5x [95°C, 20s; 50°C 20s; 70°C, 1 min]; HUGU-9/UNIP-5; 5x [95°C, 20s; 44°C 20s; 70°C, 1 min]. Erste Nachverstärkung: HUGU-9/UNIP-6; [95°C, 20s; 56°C 20s; 72°C, 1 min]. Zweite und dritte Nachverstärkung HUGU-10/UNIP-6; [95°C, 20s; 58°C 20s; 72°C, 1 min]. In der Tabelle sind die Gelbelegung und die mit der jeweiligen Primerkombination durchgeführte Zyklusanzahl aufgeführt. Marker(M): pUC18/Sau3A

	Zyklusanzahl der Vorverstärkung	Zyklusanzahl 1. Nachverstärkung	Zyklusanzahl 2. Nachverstärkung	Zyklusanzahl 3. Nachverstärkung
Primerkombination:	HUGU-9/UNIP-5	HUGU-9/UNIP-6	HUGU-10/UNIP-6	HUGU-10/UNIP-6
Spur 1	10	20	35	
Spur 2	10	25	35	
Spur 3	10	30	35	
Spur 4	10	20	15	35
Spur 5	10	25	20	35
Spur 6	10	30	25	35

3.1.5 cDNA-Sequenz und Primärstruktur des Uroguanylin-Prohormons

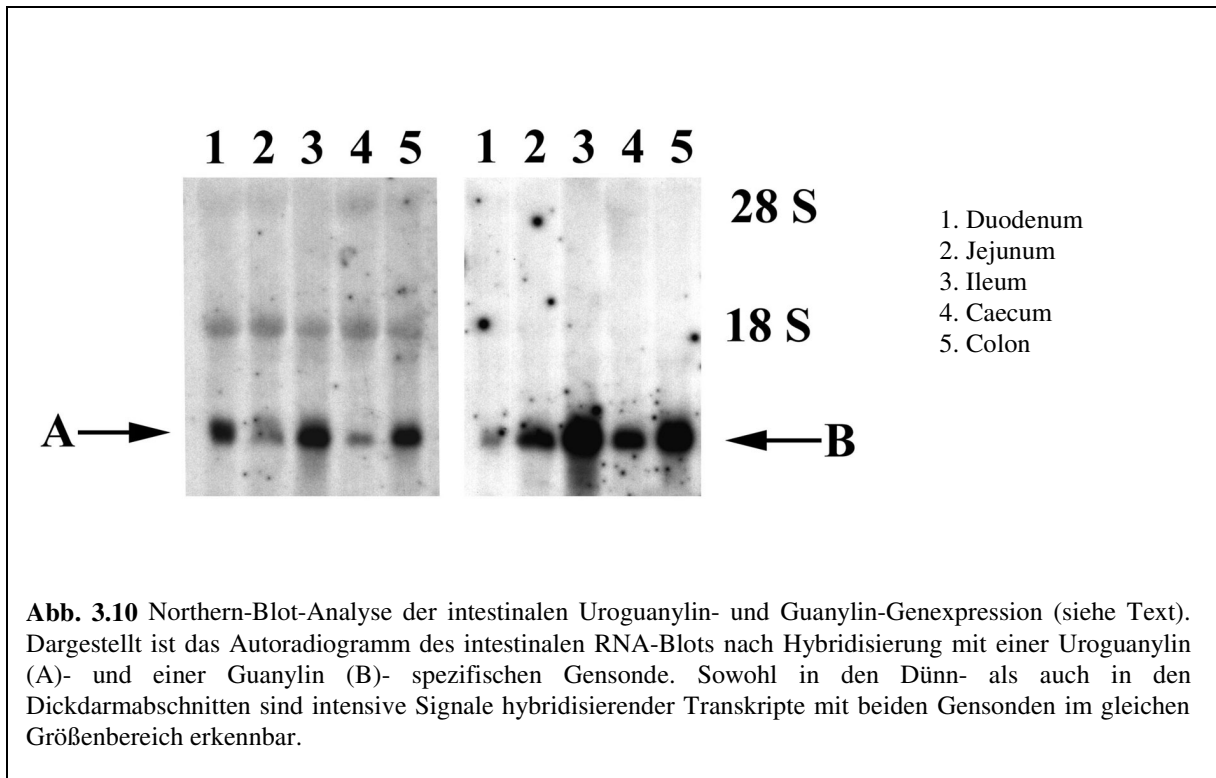
Durch die Direktsequenzierung des präparativ (2.8.9) dargestellten HUGU-10/UNIP-6 PCR-Produktes konnte die Amplifikation eines Uroguanylin-spezifischen cDNA-Fragmentes bestätigt werden. Zur weiteren Sequenzanalyse wurde das aufgereinigte PCR-Produkt (2.2.9) in einen pGEM-5Zf(+) T-Vektor kloniert (2.2.13). Es wurden 4 unabhängige Kopien des Amplifikationsproduktes aus den als p15H10U6, p18H10U6, p19H10U6 und p21H10U6 bezeichneten Plasmiden sequenziert (2.4.1). Die erhaltenen cDNA Sequenzen waren bis auf den 5'-Bereich identisch. In der in dem Plasmid p19H10U6 klonierten Kopie des cDNA-Fragmentes war der 5'-Terminus verglichen mit den Plasmiden p15H10U6, p18H10U6 und p21H10U6 um 21 Nukleotide elongiert. Durch überlappende Bereiche mit der bereits experimentell ermittelten Teilsequenz (Abb. 3.3) konnte eine 604 Nukleotide umfassende cDNA-Sequenz zusammengestellt werden. Die in Abb. 3.7 dargestellte Sequenz kodiert im ersten offenen Leseraster (ORF) für ein 112 Aminosäuren langes Polypeptid ($M_r=12064$). Der C-terminale Sequenzbereich dieses Polypeptides stimmt vollständig mit der publizierten humanen Uroguanylinsequenz (Kita *et al.*, 1994) überein. Die ersten 25 Aminosäuren des Uroguanylin-Propeptides sind hydrophob und weisen in ihrer Abfolge typische

3.2 Untersuchungen zum Expressionsmuster des humanen Uroguanylin-Gens

3.2.1 Northern-Blot-Analyse

Die Untersuchungen zur humanen Gewebeverteilung der Uroguanylin-Genexpression erfolgten im Vergleich mit der Guanylin-Genexpression. Zu diesem Zweck wurde aus OP-Sektionsmaterial verschiedener humaner Gewebe (Magen-Corpus, Gallenblase, Pancreas, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon, Lunge und Niere) Gesamt-RNA präpariert (2.2.16, 2.2.17) und jeweils 50 µg Gesamt-RNA der Gewebeproben für eine Northern-Blot-Analyse verwendet (2.2.18). Die intestinalen RNA-Proben wurden aufgrund der erwarteten hohen Expressionsrate gesondert bearbeitet. Die Filter wurden zunächst mit einer Uroguanylin-spezifischen Gensonde (HUGU-8/HUGU-9 PCR-Produkt), wie unter 3.1.2 beschrieben, hybridisiert, unter hochstringenten Bedingungen gewaschen (letzter Waschschrift: 0,1x SSC+0,1% (w/v) SDS bei 60°C für 30 min) und für 7 Tage mit einem Kodak XAR-5 Film exponiert (Abb. 3.10 A). Anschließend wurde die Uroguanylin-Gensonde durch Waschen der Filter für 3 h bei 72°C in 0,1 % (w/v) SDS entfernt. In den resultierenden Kontrollautoradiogrammen (Expositionszeit: 7 Tage) konnte keine spezifische Aktivität der Filter mehr festgestellt werden.

Der Nachweis Guanylin spezifischer Transkripte erfolgte mit einem 294 bp großen Fragment (2.2.19) des translatierten Bereichs der humanen Guanylin-cDNA als Gensonde. 50 ng des cDNA-Fragmentes wurden mit $\alpha(^{32}\text{P})\text{dCTP}$ markiert (2.3.1) und für die Hybridisierung der Filter verwendet (2.3.5). Nach Abschluß der Hybridisierung wurden die Filter unter hochstringenten Bedingungen gewaschen (letzter Waschschrift: 0,1x SSC+0,1% (w/v) SDS bei 60°C für 30 min). Aufgrund der mittels eines Geigerzählers ermittelten, relativ hohen Aktivität erfolgte die Exposition der Filter mit den intestinalen RNA-Proben nur für 72 h. (Abb. 3.10 B). Mit beiden Gensonden ließen sich nur in den intestinalen Geweben Signale hybridisierender Transkripte nachweisen. Auch nach einer Verlängerung der Expositionszeit auf 14 Tage ließen sich in den extraintestinalen RNA-Proben keine spezifischen Signale detektieren.



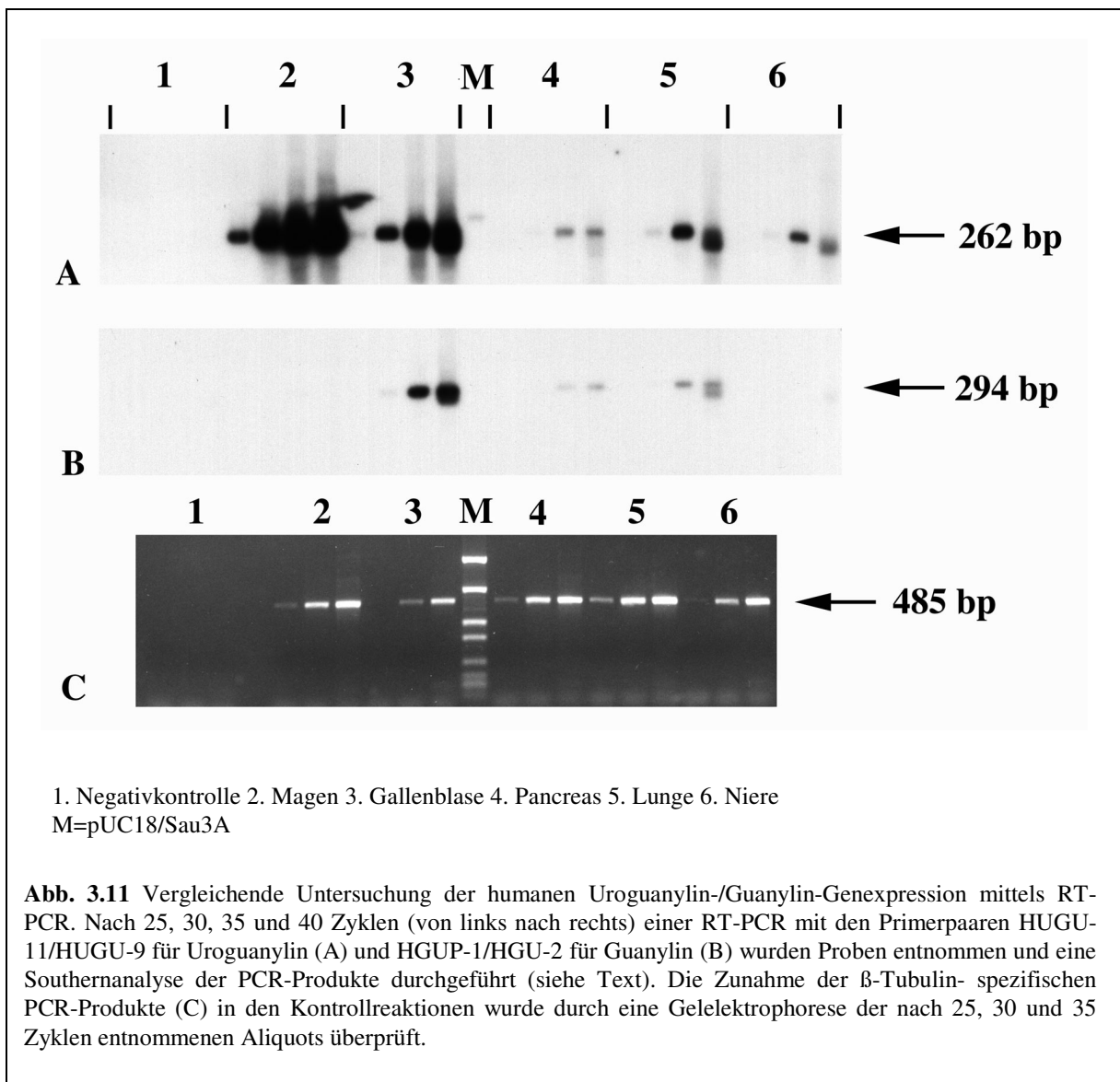
3.2.2 RT-Stufen-PCR

Aus den Geweben (Magen-Corpus, Gallenblase, Pancreas, Lunge und Niere), die in der Northern-Blot-Analyse weder ein Signal mit der Uroguanylin- noch mit der Guanylin Gensonde ergeben hatten, erfolgte der Nachweis der Guanylin- bzw. Uroguanylin-Genexpression mittels RT-Stufen-PCR (2.6.3.2). Für die Amplifikation der humanen Uroguanylin-cDNA wurde die Primerkombination HUGU-11/HUGU-9, für die Amplifikation der humanen Guanylin-cDNA die Primerkombination HGUP-1/HGU-2 verwendet. Den PCR-Reaktionen wurde nach 25, 30, 35 und 40 Zyklen jeweils 20 µl-Aliquots entnommen, je 10 µl gelelektrophoretisch in einem 2 %-igen Agarosegel aufgetrennt und nach der Elektrophorese ein Southern-Blot-Analyse der PCR-Produkte (2.2.18) durchgeführt. Als Gensonde für die Uroguanylin-cDNA fand das Oligonukleotid HUGU-8, als Gensonde für die Guanylin-cDNA das Oligonukleotid HGU-3 Verwendung. Die Hybridisierungen erfolgten wie unter 2.3.5 beschrieben für 12 h bei 62°C. Die nach 6 h Expositionszeit erhaltenen Autoradiogramme sind in Abb. 3.11 dargestellt.

Eine Überprüfung der Zunahme der β-Tubulin spezifischen PCR-Produkte in den Kontrollreaktionen erfolgte durch eine Gelelektrophorese der nach 25, 30 und 35 Zyklen entnommenen Aliquots.

Wie in Abb. 3.11 dargestellt, sind mit dieser Methode geringe Mengen Guanylin sowie Uroguanylin-mRNA in der Niere, in der Lunge und im Pancreas detektierbar. Beide Gene werden zudem deutlich in der Gallenblase exprimiert. Der auffälligste Unterschied zwischen

den Genen liegt im Magen-Corpus vor. In diesem Gewebe ist eine Expression des Uroguanylin-, nicht aber des Guanylin-Gens nachweisbar.



3.3 Klonierung der porcinen Guanylin- und der porcinen Uroguanylin-cDNA

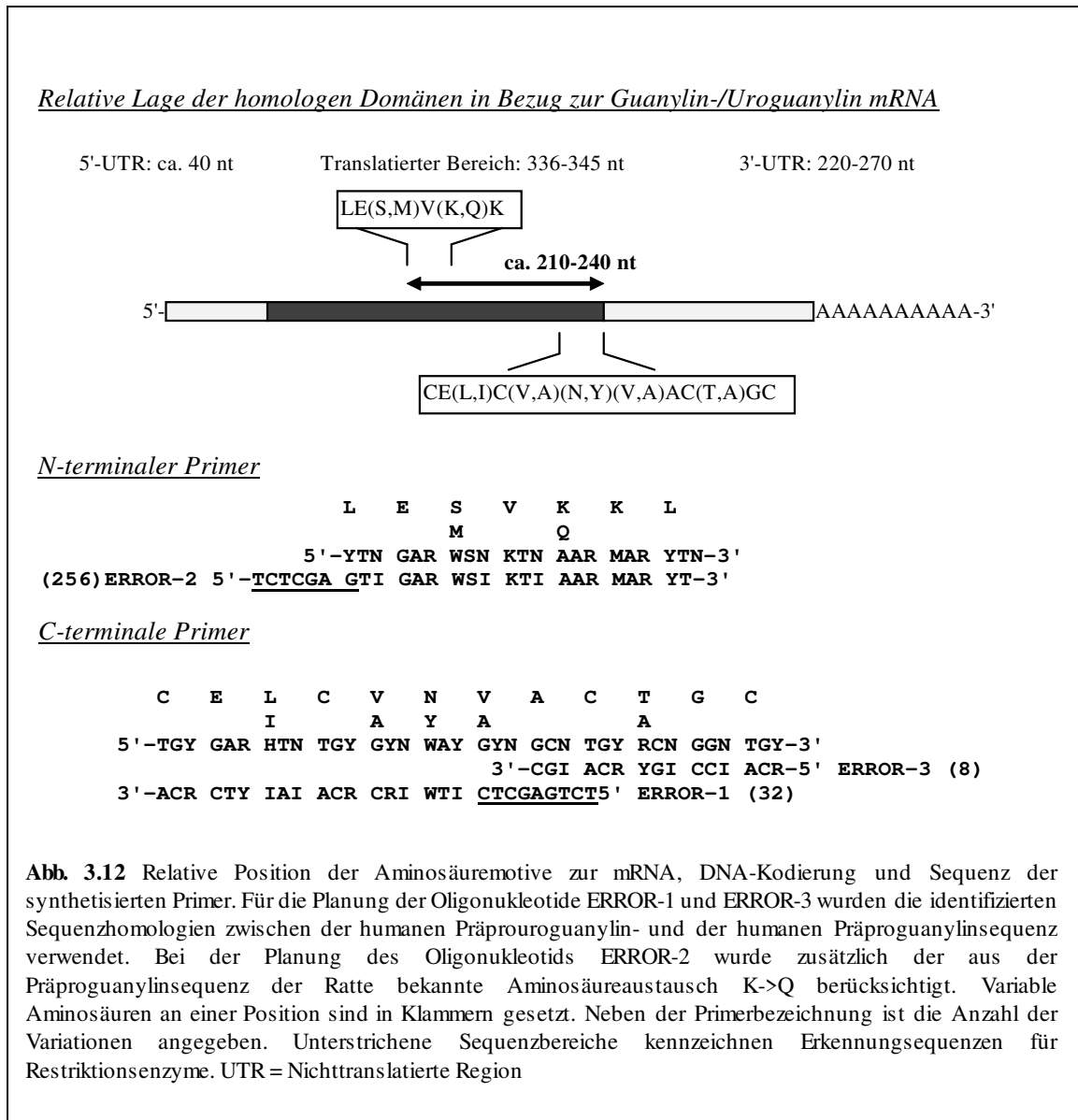
Für die Amplifikation der porcinen cDNAs der Guanylinpeptidfamilie erfolgte zunächst eine Gesamt-RNA Präparation (2.2.16, 2.2.17) aus verschiedenen Geweben des Hausschweins (*Sus scrofa domestica*). Das Gewebe entstammte vier gesunden, adulten Tieren (2 Weibchen, 2 Männchen). Es wurden jeweils 1,5 g Gewebe für die RNA-Präparation verwendet. In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der RNA-Präparation aufgelistet.

Ergebnisse

Gewebe	RNA-Menge (μg)	E_{260}/E_{280}	Gelkontrolle
Ohrspeicheldrüse	532	1,75	intakt
Oesophagus (Mucosa)	303	1,66	"
Magen-Cardia (Mucosa)	428	1,66	"
Magen-Fundus (Mucosa)	652	1,75	"
Magen-Corpus (Mucosa)	909	1,77	"
Magen-Antrum (Mucosa)	572	1,74	"
Magen-Pars pylorica (Mucosa)	912	1,73	"
Duodenum	606	1,76	partiell degradiert
Jejunum	803	1,77	intakt
Ileum	750	1,78	"
Caecum	630	1,75	"
Colon transversum	810	1,78	"
Colon descendens	730	1,73	"
Lunge	430	1,77	"
Niere	650	1,78	"

Tab. 3.2 Ergebnis der Gesamt-RNA-Präparation aus 15 verschiedenen porcinen Gewebeproben. In der gelelektrophoretischen Kontrolle zeigte die RNA-Probe aus dem Duodenum Degradationserscheinungen. Eine RNA-Probe wurde als intakt angesehen, wenn im Gelbild die 28S und 18S deutlich erkennbar waren.

Durch die Klonierung der humanen Uroguanylin-cDNA konnte, neben dem C-terminalen Homologiebereich zwischen dem Uroguanylin- und dem Guanylin-Propeptid im N-terminalen Bereich der Prohormonsequenzen ein weiterer, konservierter Sequenzabschnitt identifiziert werden, so daß ausreichend Information für die Synthese spezifischer, degenerierter Oligonukleotide zur Verfügung stand. Aus der C-terminalen Homologiedomäne der Prohormone wurden zwei spezifische *antisense*-Oligonukleotide (ERROR-1, ERROR-3) abgeleitet, die revers komplementär zum DNA-Kode des Aminosäuremotives waren. Für die N-terminale Proteindomäne erfolgte entsprechend die Synthese eines *sense*-Oligonukleotides (ERROR-2). Durch Verwendung der universalen Base Inosin an Positionen mit drei- oder vierfacher Degeneration des genetischen Kodes war es möglich, die Anzahl der Sequenzvarianten in den Primergemischen zu reduzieren. Aufgrund der relativen Lage der PCR-Primer in Bezug zur Guanylin- bzw. Uroguanylin-mRNA lassen sich unter Annahme einer ausreichenden Homologie der porcinen mRNAs zu den humanen Sequenzen Amplifikationsprodukte in der Größe von 210-240 bp erwarten (siehe Abb. 3.12).



Da durch die Untersuchungen zur Genexpression sowohl für das humane Uroguanylin- als auch das humane Guanylin-Gen eine hohe Expressionsrate im proximalen Dünndarm nachgewiesen worden war, wurden die Amplifikationsversuche zur Darstellung der porcinen Sequenzen aus Gesamt-RNA des porcinen Jejunums durchgeführt. Zunächst wurde jeweils ein inneres Fragment der cDNAs mit den degenerierten Oligonukleotiden amplifiziert und kloniert. Die experimentell ermittelten Teilsequenzen dienten zur Ableitung spezifischer Oligonukleotide und die Sequenzen wurden in nachfolgenden RACE-PCR-Experimenten (2.6.4) vervollständigt. Im Falle des porcinen Uroguanylins wurde für die Amplifikation des inneren cDNA-Fragmentes zusätzlich ein *sense*-Primer (HUGU-11) aus der humanen Uroguanylin-cDNA in der PCR-Reaktion verwendet. In der nachfolgenden Abbildung ist der Ablauf der durchgeführten Experimente dargestellt.

**I. Spezifische Erststrangsynthese mit dem Primer ERROR-3 aus Jejunum
Gesamt-RNA des Schweines**

- mRNAs mit dem Aminosäuremotiv AC(A/T)GC werden revers transkribiert und damit sämtliche Gene erfaßt, die für GC-C-stimulierende Peptide kodieren.

II. Amplifikation eines inneren Fragmentes der porcinen Guanylin- und der porcinen Uroguanylin-cDNA

	SSDGUA cDNA	SSDUGUA cDNA
Primerkombination	ERROR-2/ERROR-1	ERROR-2/HUGU-11/ERROR-3
PCR-Bedingungen	5x [95°C, 20s; 46°C, 20s; 70°C, 90s] 5x [95°C, 20s; 42°C, 20s; 70°C, 90s] 28x [95°C, 20s; 37°C, 1 s; 70°C, 90s]	5x [95°C, 20s; 46°C, 20s; 70°C, 90s] 5x [95°C, 20s; 40°C, 20s; 70°C, 90s] 34x [95°C, 20s; 37°C, 1 s; 70°C, 90s]
Produktgröße	ca. 200 bp	ca. 150 bp
Klone	pJE2/E1-1, pJE2/E1-2, pJE2/E1-3	pH11E3-1, pH11E3-2 , pH11E3-3

- Sequenzanalyse der klonierten PCR-Produkte
-Ableitung spezifischer Primer für die RACE-PCR-Experimente zur Vervollständigung der Sequenzen

III. Amplifikation der 3'- und 5'-Termini der cDNAs mittels RACE-PCR

3'-RACE

	SSDGUA cDNA	SSDUGUA cDNA
Primerkombination	s. Abschnitt 2.6.4.1	s. Abschnitt 2.6.4.1
PCR-Bedingungen	"	"
Produktgröße	ca. 400 bp	ca. 150 bp
Klone	pJE2/E1-1, pJE2/E1-2, pJE2/E1-3	pH11E3-1, pH11E3-2 , pH11E3-3

5'-RACE

	SSDGUA cDNA	SSDUGUA cDNA
Primerkombination	s. Abschnitt 2.6.4.2	s. Abschnitt 2.6.4.2
PCR-Bedingungen	"	"
Produktgröße	ca. 350-500 bp	ca. 350-500 bp
Klone	pJEO1/U6-1, pJEO1/U6-2, pJEO1/U6-3	pS2U6-1, pS2U6-1 , pS2U6-1

Abb. 3.13 Klonierung der porcinen Guanylin- und Uroguanylin-cDNAs. SSDGUA cDNA=Porcine Guanylin cDNA; SSDUGUA=porcine Uroguanylin cDNA. Die Amplifikationsbedingungen die zur Darstellung der inneren cDNA-Fragmente führten, sind angegeben. Die für die RACE-PCR-erarbeitete Methodik ist unter Abschnitt 2.6.4 aufgeführt. Alle PCR-Produkte wurden nach präparativer Darstellung der PCR-Produkte (2.2.9) in den T-Vektor pGEM-5Zf(+) kloniert (2.2.13). RACE-PCR-Produkte wurden zusätzlich direkt sequenziert.

3.3.1 cDNA-Sequenz und Primärstruktur des porcinen Guanylin Prohormons

Aus den Sequenzdaten der RACE-Produkte konnte eine 555 Nukleotide umfassende cDNA-Sequenz des porcinen Guanylins zusammengestellt werden. Die in Abb. 3.14 aufgeführte Sequenz kodiert im ersten offenen Leseraster für ein 109 Aminosäuren langes Polypeptid

Charakteristika eines sekretorischen Signalpeptides auf (von Heijne, 1983). Eine potentielle Prozessierung nach Ser27 des porcinen Propeptides ist mit der vermutlichen Prozessierung nach Ser26 des humanen Propeptides vergleichbar. Sowohl bei dem humanen als auch bei dem porcinen Propeptid würde eine Prozessierung an dieser Position in einem 86 Aminosäuren langen Prouroguanylin (Mr=9359) resultieren. Im 3'-terminalen Bereich der Sequenz konnte ein potentielles, eukaryontisches Polyadenylierungssignal (AATAAA) identifiziert werden.

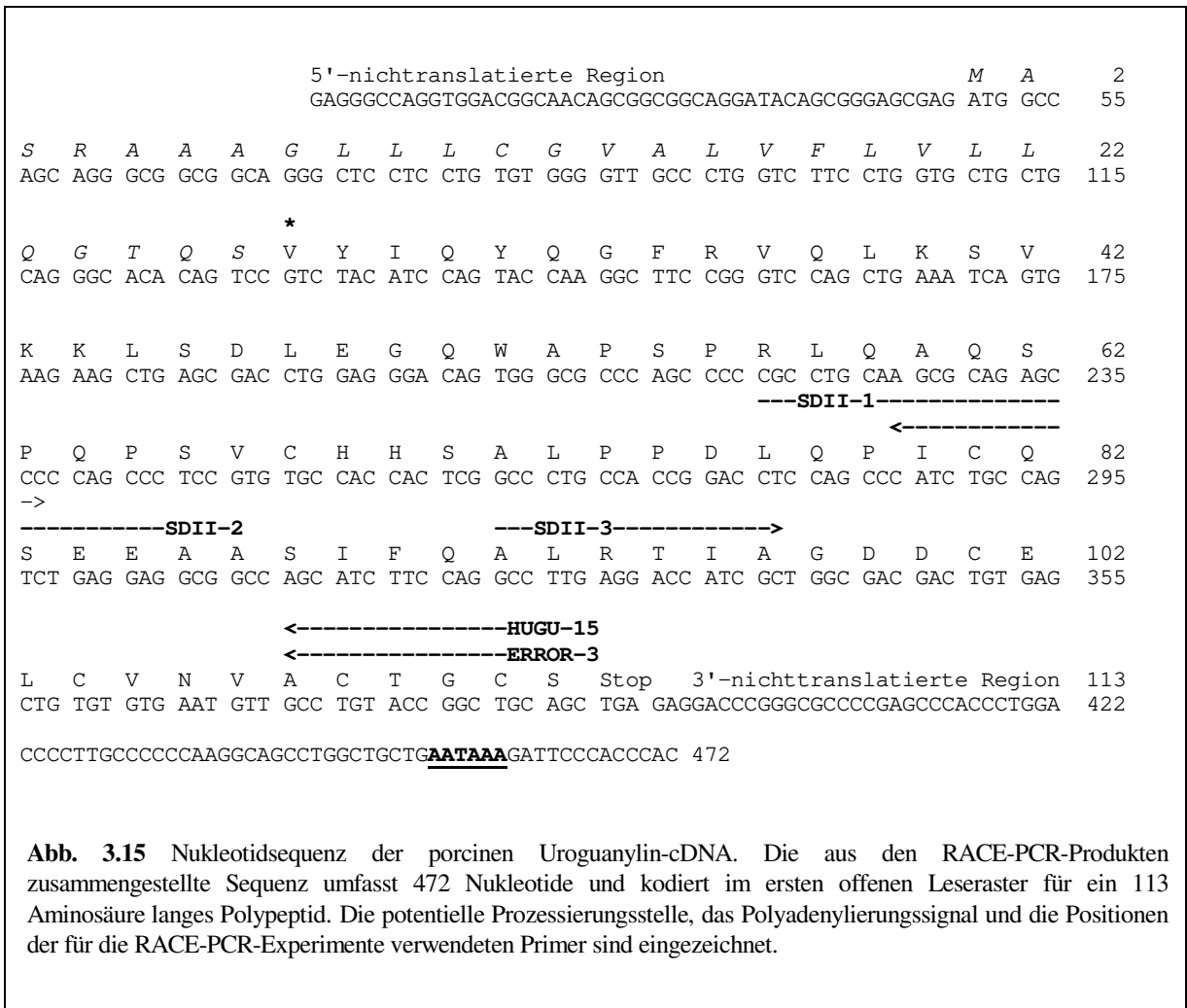


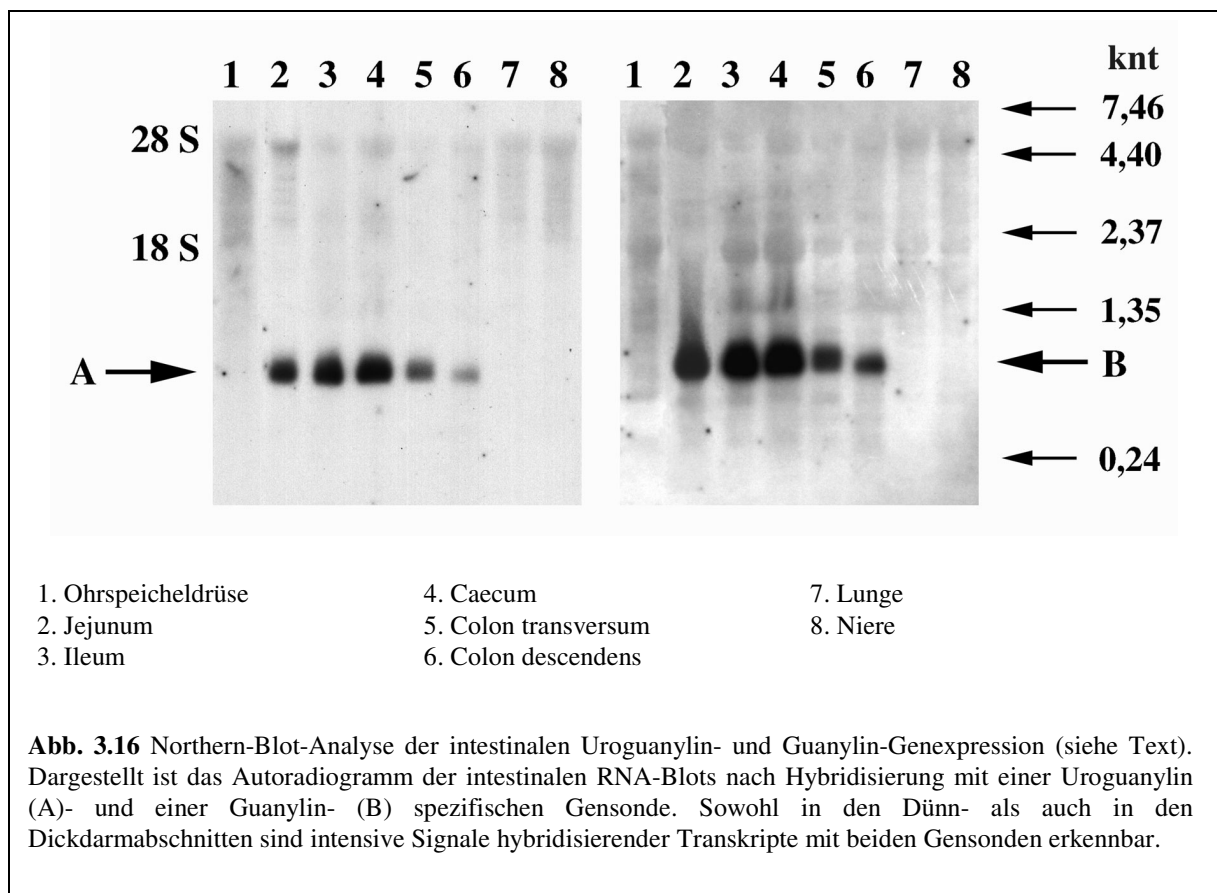
Abb. 3.15 Nukleotidsequenz der porcinen Uroguanylin-cDNA. Die aus den RACE-PCR-Produkten zusammengestellte Sequenz umfasst 472 Nukleotide und kodiert im ersten offenen Leseraster für ein 113 Aminosäure langes Polypeptid. Die potentielle Prozessierungsstelle, das Polyadenylierungssignal und die Positionen der für die RACE-PCR-Experimente verwendeten Primer sind eingezeichnet.

3.4 Untersuchungen zum Expressionsmuster des porcinen Uroguanylin- und Guanylin-Gens

3.4.1 Northern-Blot-Analyse

Mit den in Tabelle 3.2 aufgeführten porcinen RNA-Proben wurden Northern-Blots erstellt (2.2.18) und zunächst mit einer Uroguanylin-spezifischen Gensonde aus dem translatierten

Bereich der cDNA (HUGU-14/SDII-4 PCR-Produkt) hybridisiert (s. 2.2.19), unter hochstringenten Bedingungen gewaschen (letzter Waschschrift: 0,1x SSC+0,1% (w/v) SDS bei 60°C für 30 min) und für eine Woche mit einem Kodak XAR-5 Film exponiert. Die RNA-Proben der Magenabschnitte wurden gesondert bearbeitet und der Filter nach der Hybridisierung für zehn Tage exponiert. In den resultierenden Autoradiogrammen konnten nur in den intestinalen RNA-Proben intensive Signale hybridisierender Transkripte mit einer relativen Größe von 600 Nukleotiden detektiert werden. Das Autoradiogramm für den Nachweis der Uroguanylin-mRNA in den intestinalen Gewebeabschnitten ist in Abb. 3.16 A dargestellt. Anschließend wurde die Uroguanylin-Gensonde durch Waschen der Filter für 3h bei 72°C in 0,1 % (w/v) SDS entfernt und nach einer Kontrollexposition mit einer Guanylin-spezifischen Gensonde (OHI-1/OHI-2 PCR-Produkt der porcinen cDNA) hybridisiert (2.2.19). Die Filter wurden unter hochstringenten Bedingungen gewaschen. Der Filter mit den intestinalen Proben wurde aufgrund der hohen Aktivität nur für 48 h exponiert. Der Filter mit den RNA-Proben aus dem Magen wurde, wie bei der Hybridisierung mit der Uroguanylin-spezifischen Sonde, zehn Tage exponiert. In den resultierenden Autoradiogrammen konnte nur in den intestinalen RNA-Proben intensive Signale mit einer relativen Größe von 600 Nukleotiden detektiert werden (Abb. 3.16 B).



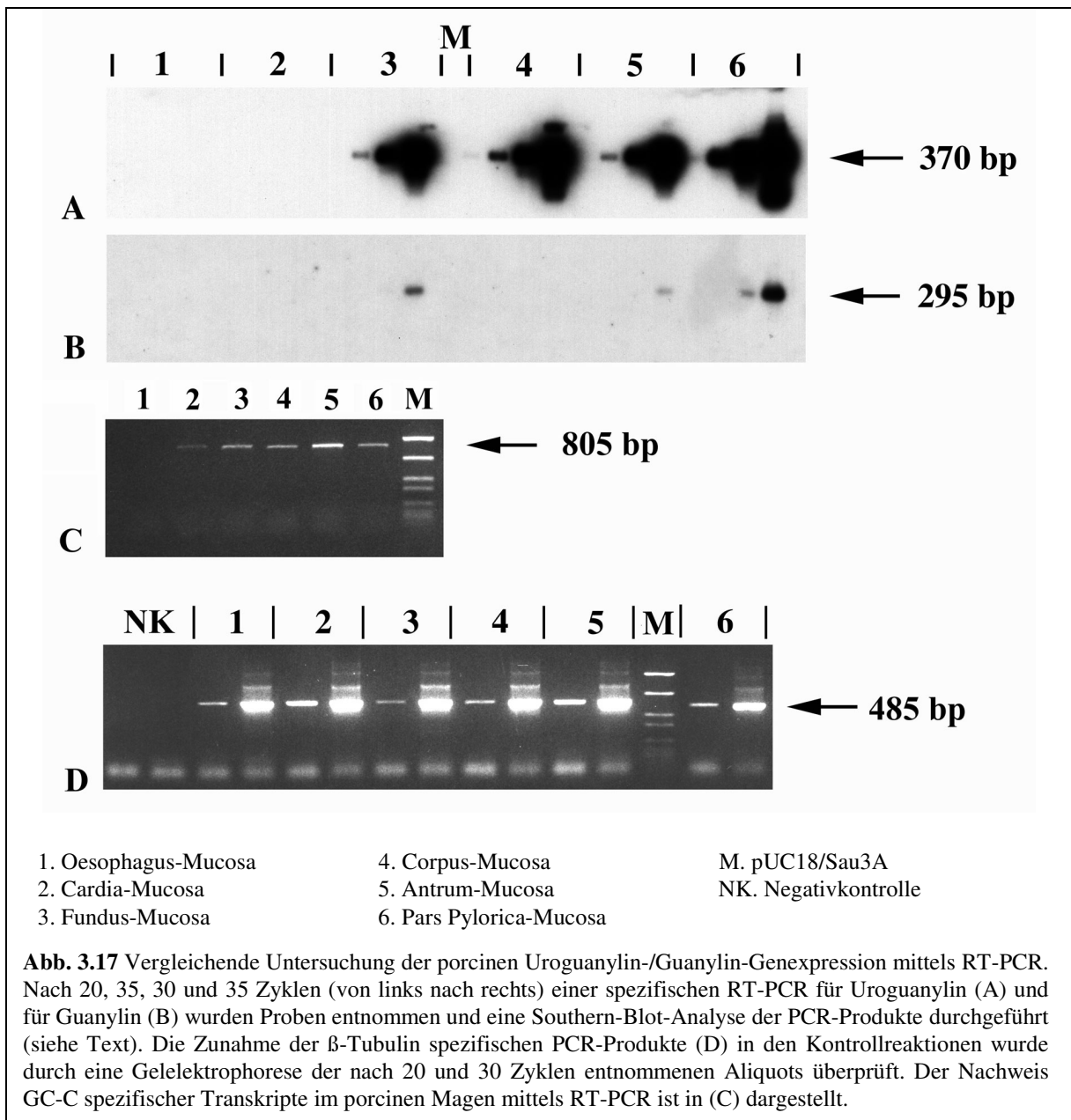
3.4.2 RT-Stufen-PCR

Die Genexpression in der Magenmucosa wurde mittels RT-Stufen-PCR untersucht (2.6.3.2). Als Negativkontrolle diente RNA der Oesophagus-Mucosa. Für die Amplifikation der Uroguanylin-cDNA fand die Primerkombination SD-II-5/SDII-4, für die Amplifikation der porcinen Guanylin-cDNA die Primerkombination OHI-2/OHI-3 Verwendung. Alle PCR-Reaktionen wurden parallel durchgeführt. Den PCR-Reaktionen wurde nach 20, 25, 30 und 35 Zyklen jeweils 20 µl-Aliquots entnommen, je 10 µl gelelektrophoretisch in einem 2 %-igen Agarosegel aufgetrennt und nach der Elektrophorese ein Southern-Blot-Analyse (2.2.18) der PCR-Produkte durchgeführt. Als Gensonde für die Uroguanylin-cDNA wurde das Oligonukleotid SDII-2, als Gensonde für die Guanylin-cDNA das Oligonukleotid OHI-1 verwendet (2.2.19, 2.3). Die Hybridisierungen (2.3.5) erfolgten für 12 h bei 62°C mit 1×10^5 cpm / ml Hybridisierungslösung. Nach der Hybridisierung wurden die Filter hochstringent gewaschen und für 6 h mit einem Kodak XAR-5 Film exponiert.

Die Zunahme der β -Tubulin spezifischen RT-PCR-Produkte in den Kontrollreaktionen erfolgte durch eine Gelelektrophorese der nach 20 und 30 Zyklen entnommenen Aliquots. Aus allen cDNA-Erststrangsynthesen war bereits nach 20 Zyklen (Abb. 3.17 D) ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe (485 bp) erkennbar.

Wie in Abb. 3.17 dargestellt, sind mit dieser Methode geringe Mengen Guanylin-mRNA in der Mucosa des *Fundus*, des *Antrum* und des *Pars pylorica* detektierbar, nicht aber aus der Mucosa des *Corpus*. Im Gegensatz dazu ist eine deutliche Expressionsrate des Uroguanylin-Gens in der Mucosa des *Fundus*, des *Corpus*, des *Antrum* und der *Pars pylorica* feststellbar. In der Mucosa des *Oesophagus* und der *Cardia* ist weder Guanylin- noch Uroguanylin-Genexpression nachweisbar.

Um die Bedeutung diese Befundes zu verifizieren, wurden aus der publizierte cDNA-Sequenz der porcinen GC-C zwei spezifische Oligonukleotide abgeleitet, synthetisiert (PIGCC-1; PIGCC-2) und mittels RT-PCR (35 Zyklen) die RNA-Proben auf GC-C-Genexpression hin untersucht. In allen RNA-Proben der Magenmucosa konnte nach 35 Zyklen ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe (805 bp) amplifiziert werden (Abb. 3.17 C).



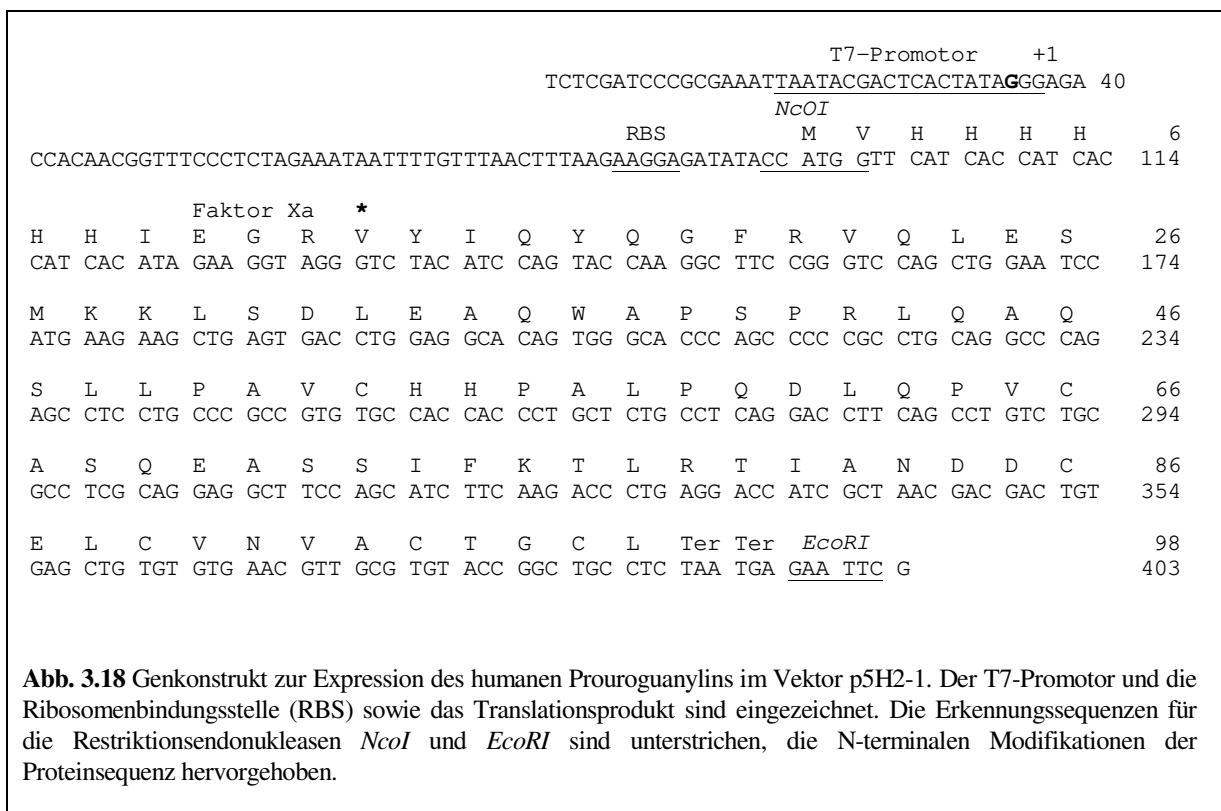
3.5 Expression der Uroguanylin-Prohormone in *E.coli* BL21(DE3)

Die Expressionversuche verfolgten das Ziel, eine ausreichende Menge des humanen und des porcinen Uroguanylin-Prohormons für erste Studien zur Bioaktivität und als Referenzsubstanz für immunhistochemische Untersuchungen zur Verfügung zu stellen. Am Beispiel des humanen Prouroguanylins werden im folgenden die Klonierungsstrategie und die Charakterisierung des rekombinanten Proteins dargestellt.

3.5.1 Expression des humanen His-Prouroguanylins in *E.coli* BL21 (DE3)

Wie unter 2.8.1 beschrieben, wurde ein Fragment der humanen cDNA, kodierend für die Aminosäuren 27-112 des Uroguanylin-Propeptides, mit der Primerkombination HUGU-14/HUGU-15 aus humanem Ileum-cDNA-Erststrang amplifiziert, im 5'-Bereich durch einen überlappenden PCR-Primer in einer Nachverstärkung mit der Primerkombination HISTAG-1/HUGU-15 modifiziert und in den Vektor pRSET5D inkloniert. Die korrekte Insertion und Kodierung des Genkonstruktes wurde in dem resultierenden Plasmid p5H2-1 durch Sequenzierung verifiziert. In Abb. 3.18 sind die Insertion des Plasmides und das Translationsprodukt dargestellt.

Wie geplant, sind in dem Translationsprodukt N-terminal an die Propeptidsequenz eine Erkennungssequenz für die Protease Faktor Xa und ein Homopolymer aus sechs Histidinen angefügt. Die theoretische Masse des rekombinanten Produktes beträgt 10998.



Das Plasmid p5H2-1 wurde nach seiner Überprüfung zur Expression des His-Prouroguanylins in *E.coli* BL21(DE3) Zellen propagiert (2.2.15). Die Produktion des rekombinanten Proteins erfolgte unter den 2.8.2 beschriebenen Kulturbedingungen. Bei den Induktionsexperimenten wurden 250 ml Kulturen bei einer OD_{600nm} von 0.7 mit 1 mM IPTG induziert und das Wachstum weiter kontrolliert. Wie in Abb. 3.19 A repräsentativ dargestellt, konnte nach Induktion mit 1 mM IPTG die Zunahme eines 11 kDA-Proteins in der SDS-PAGE (2.8.5)

beobachtet werden. Das induzierte Protein wies bei der Western-Blot-Analyse (2.8.7) der Proben mit einem gegen den C-Terminus des Uroguanylin-Prohormons gerichteten, polyklonalen Antiserum eine deutliche Immunreaktivität auf (Abb. 3.19 B). Die Western-Blotanalyse zeigte weiterhin, daß in der Kultur bereits ohne Induktion durch IPTG eine basale Expression des rekombinanten Proteins stattfand. Durch diese Versuche konnte die Funktionalität des Expressionssystems eindeutig verifiziert werden.

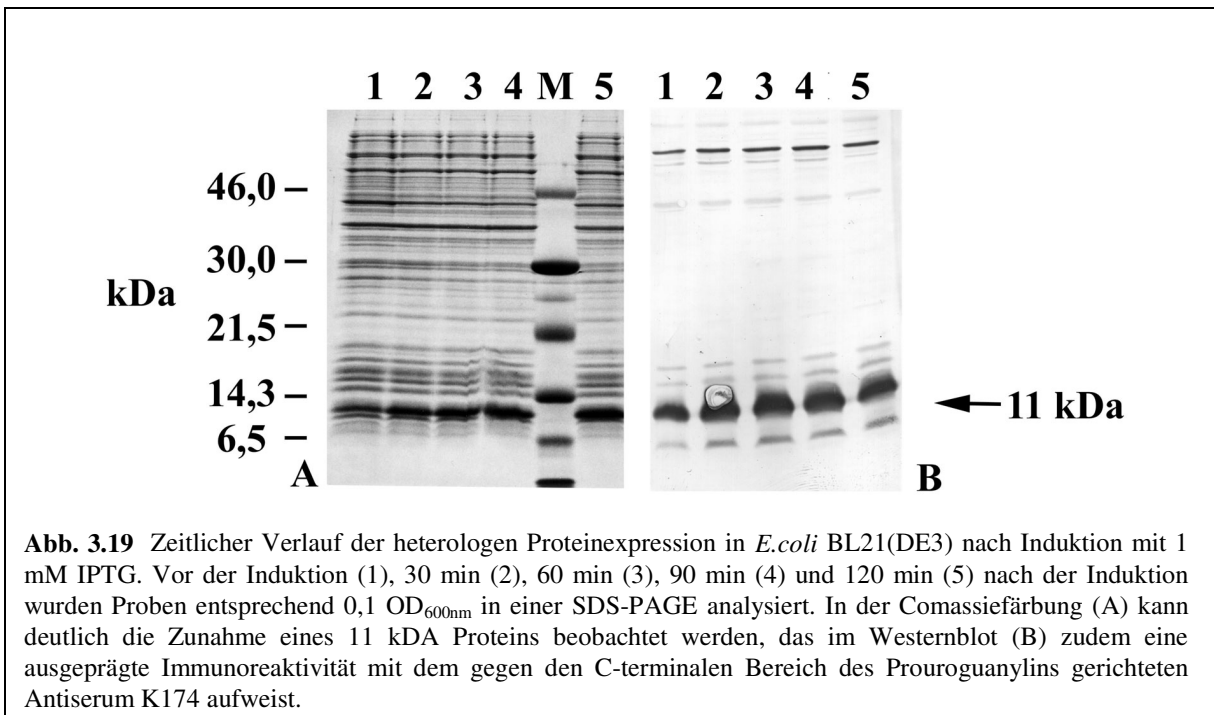


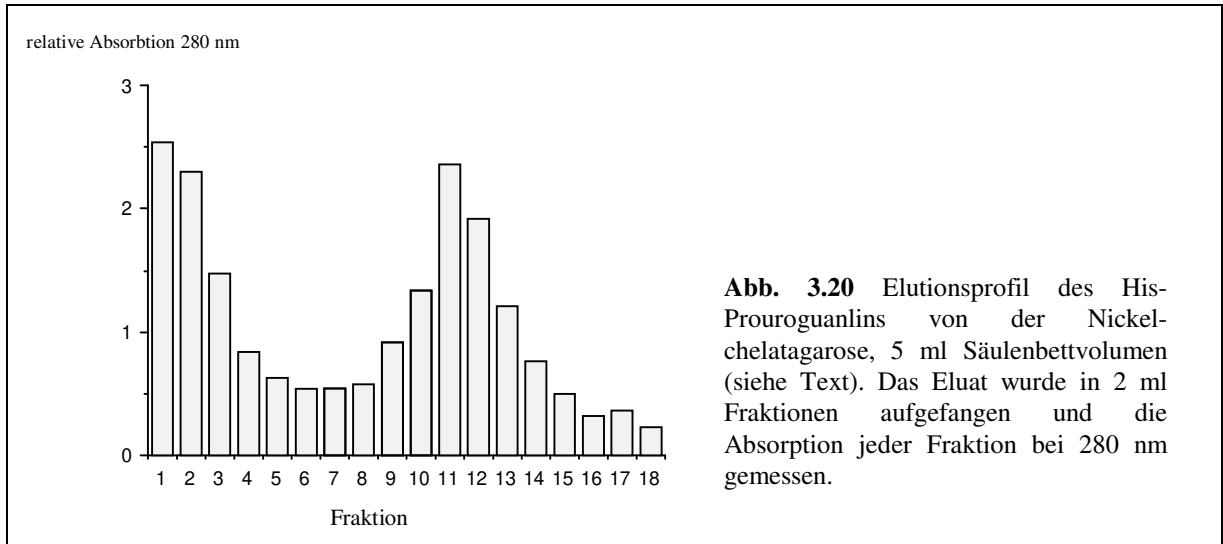
Abb. 3.19 Zeitlicher Verlauf der heterologen Proteinexpression in *E.coli* BL21(DE3) nach Induktion mit 1 mM IPTG. Vor der Induktion (1), 30 min (2), 60 min (3), 90 min (4) und 120 min (5) nach der Induktion wurden Proben entsprechend 0,1 OD_{600nm} in einer SDS-PAGE analysiert. In der Comassiefärbung (A) kann deutlich die Zunahme eines 11 kDa Proteins beobachtet werden, das im Westernblot (B) zudem eine ausgeprägte Immunreaktivität mit dem gegen den C-terminalen Bereich des Prouroguanylins gerichteten Antiserum K174 aufweist.

Typischerweise erreichten induzierte Kulturen ihre stationäre Phase nach zwei Stunden bei einer OD_{600nm} von 1,5 bis 1,7. Der relative Anteil des rekombinanten Proteins, bezogen auf das Gesamtprotein in *E. coli* BL21(DE3) betrug zwischen 10-15%.

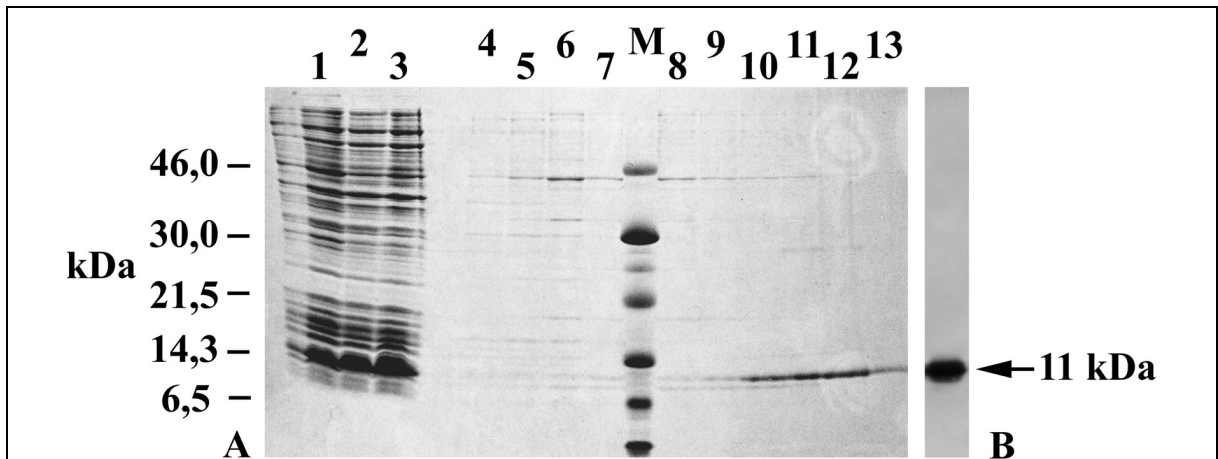
3.5.2 Aufreinigung und Analyse des humanen His-Prouroguanylins aus *E.coli* BL21(DE3)

Da das rekombinante His-Prouroguanylin quantitativ in Form unlöslicher Einschlusskörper akkumulierte, erfolgte die Aufreinigung aus induzierten *E.coli* BL21(DE3)-Zellen unter denaturierenden Bedingungen nach dem unter 2.8.3 beschriebenen Protokoll. Für die Analyse des Expressionsproduktes wurden 5 g induzierte *E.coli* BL21(DE3) Zellen aufgearbeitet (Induktionszeit: 2h). Die Bindung des His-Prouroguanylins wurde mit 5 ml Nickelchelatarose für 1 h bei 4°C auf durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift bei pH 5,3 wurde das Chromatographiematerial in eine Standsäule überführt und nachdem sich ein Säulenbett gebildet hatte, der restliche Waschpuffer abgelassen. Anschließend wurde das

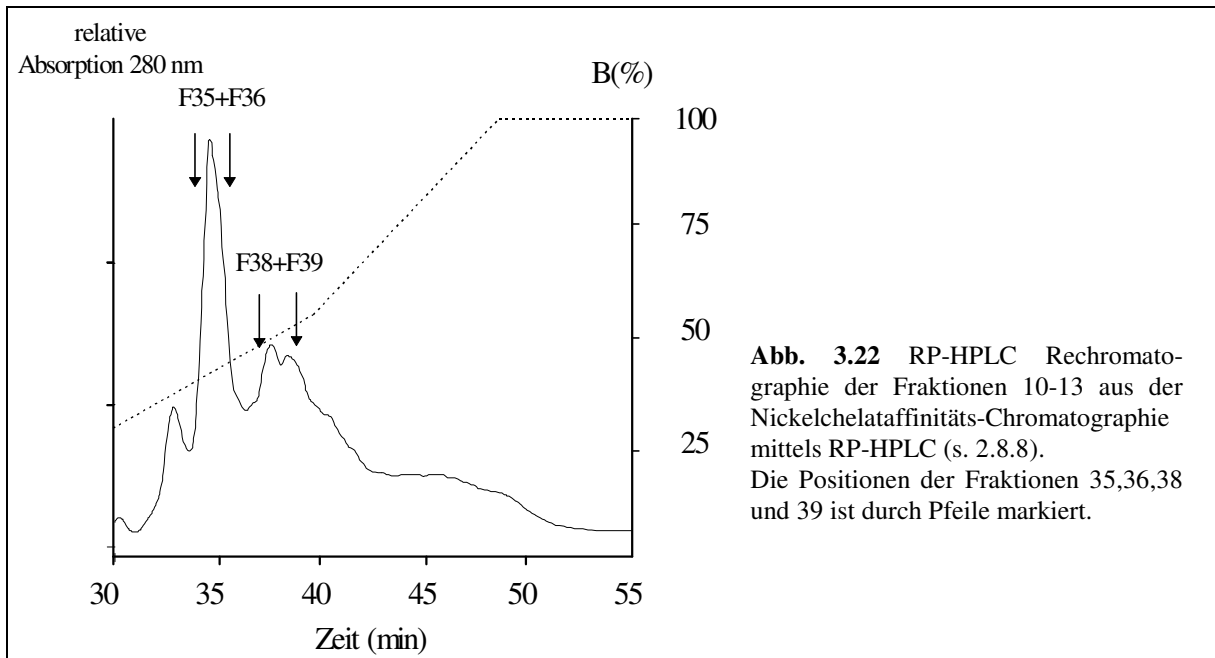
Säulenbett mit Elutionspuffer (pH 4,0) überschichtet und gebundene Proteine durch den sich aufbauenden pH-Gradienten eluiert. Das Eluat wurde in 2 ml Fraktionen aufgefangen und die Absorption jeder Fraktion bei 280 nm gemessen. Wie in Abb. 3.20 dargestellt, sinkt der Absorptionswert zunächst ab um etwa ab dem vierten Säulenvolumen (Fraktion 9) wieder anzusteigen.



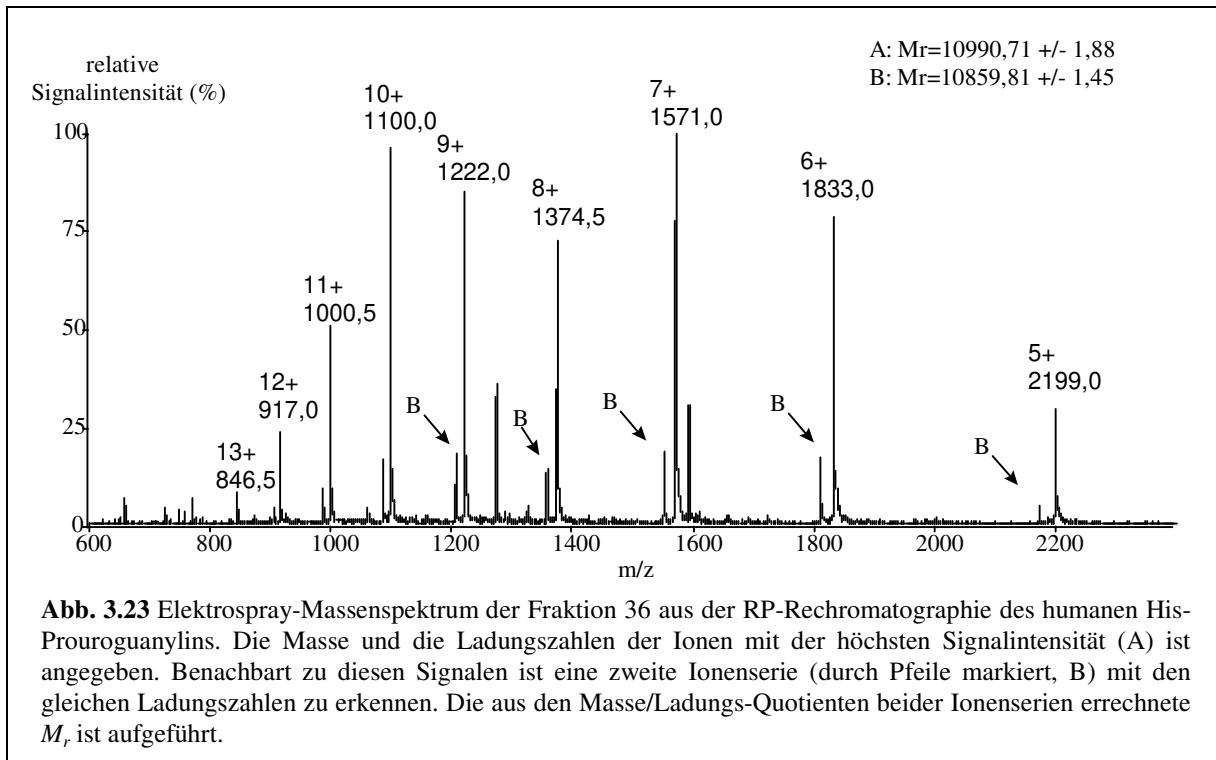
Von jeder Fraktion wurden ein 1µl-Aliquot in einer SDS-PAGE untersucht. Wie durch Abb. 3.21 dokumentiert, korrelierte der Anstieg des Absorptionswertes bei 280 nm mit der quantitativen Elution des His-Prouroguanylins vom Chromatographiematerial.



Die Fraktionen 10-13 wurden vereint und wie unter 2.8.8 beschrieben, mittels RP-HPLC rechromatographiert (Abb. 3.22). Das Eluat wurde in 1 min Fraktionen abgesammelt und massenspektrometrisch analysiert (2.8.9).



In den Fraktionen mit den höchsten Absorptionswerten (Fraktion 35+36) bei 280 nm konnte aus einer Serie von 9 Ionen eine Masse von $M_r=10990,71\pm 1,88$ bestimmt werden. Benachbart zu diesen Signalen war eine zweite Ionenserie mit sehr viel geringerer Signalintensität, aus der eine Masse von $M_r=10859,81\pm 1,45$ berechnet wurde. Die erste Masse entspricht der theoretischen Masse des oxidierten His-Prouroguanylins ($M_r=10992$), die zweite Masse entspricht der des oxidierten His-Prouroguanylins minus der Masse des N-terminalen Methionins (130 Da). In den Fraktionen 38 und 39 ließ sich aus einer Serie von 11 Ionen eine Masse von $21982,43\pm 2,4$ berechnen. Diese Masse entspricht der theoretischen Masse eines oxidierten His-Prouroguanylin Dimers ($M_r=21984$). In Abb. 3.23 ist repräsentativ das ES-Massenspektrum der Fraktion 36 dargestellt.



Die Fraktion 36 enthielt 1,4 mg His-Prouroguanylin. In einer SDS-PAGE (2.8.5) wurde ein Aliquot der Fraktion 36 (entsprechend 5 μ g Protein) auf Verunreinigungen hin überprüft. In dem Commassie gefärbten Gel (Abb. 3.21 B) waren, wie auch im Massenspektrum, keine hochmolekularen Verunreinigungen detektierbar. In einer Edman-Sequenzierung (2.8.10) konnten die ersten 30 Aminosäurepositionen des N-Terminus des rekombinanten Proteins verifiziert werden.

Durch die vorgestellten Analysen ließ sich das rekombiante, humane His-Uroguanylin in seiner Primärstruktur bestätigen. Bei der Aufreinigung entsteht sowohl ein monomeres als auch dimeres, vollständig oxidiertes Produkt. Da die Expression intrazellulär in *E.coli* durchgeführt wurde, sind die Oxidationsprodukte als Resultat der Aufreinigungsprozedur zu betrachten.

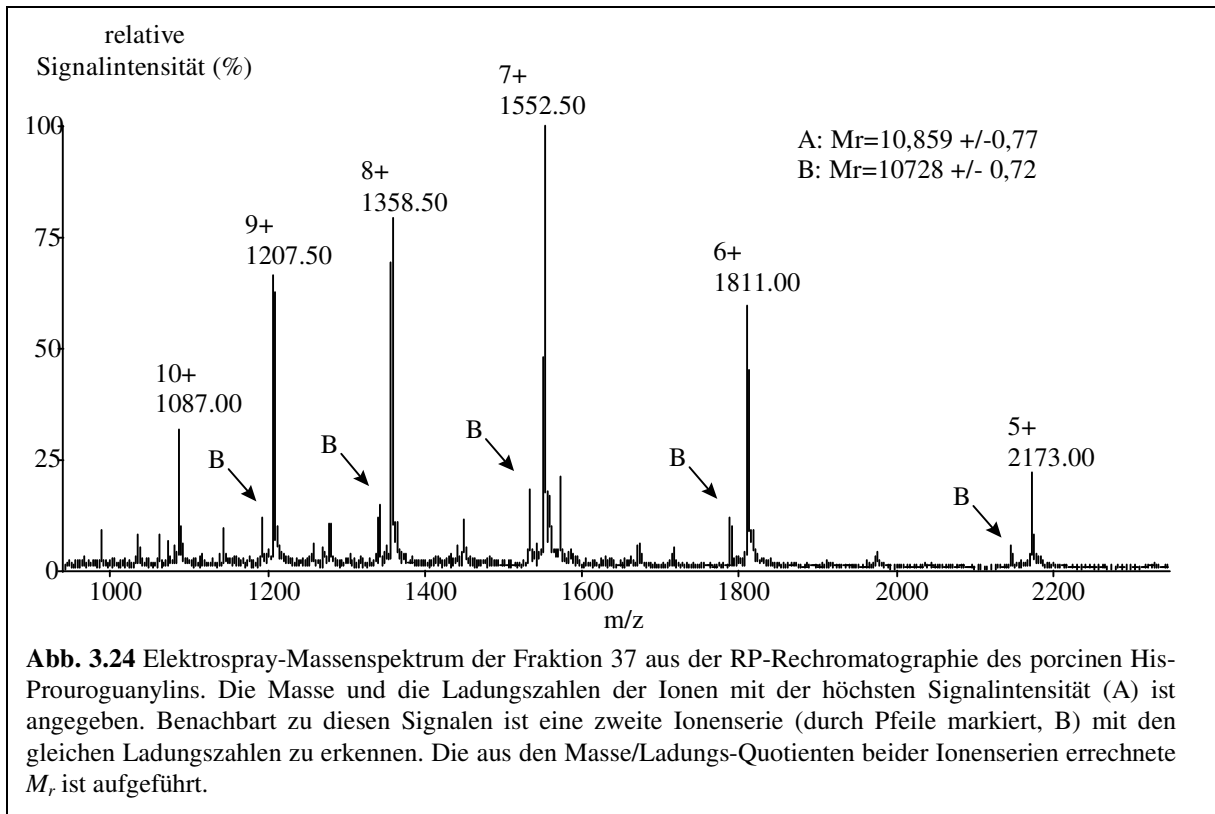
3.5.3 Expression des porcinen Uroguanylin-Prohormons in *E. coli* BL21(DE3)

Die Expression des porcinen Uroguanylin-Prohormons erfolgte mit der gleichen Strategie und Methodik, die für die Expression des humanen Proteins etabliert wurde. Da die porcine Prouroguanylinsequenz N-terminal mit der humanen Sequenz übereinstimmte, konnte für die Amplifikation des für die Expression benötigten cDNA-Fragmentes als *sense*-Primer das Oligonukleotid HUGU-14 verwendet werden. Zunächst wurde ein Fragment der porcinen cDNA (kodierend für die Aminosäuren 28-113) aus cDNA-Erststrang des Jejunums mit der

Primerkombination HUGU-14/SDII-4 amplifiziert (2.8.1.), mit der Primerkombination HISTAG-1/SDII-4 reamplifiziert und in den Vektor pRSET5D als *NcoI/EcoRI*-Kassette inkloniert (2.2.13). Die korrekte Insertion und das Leseraster des Genkonstruktes wurde durch Sequenzierung in einem der resultierenden Plasmide (p5S2-1) verifiziert. Die theoretische Masse des porcinen, rekombinanten Proteins beträgt 10869 Da. Nachdem das Plasmid p5S2-1 in *E.coli* BL21(DE3) propagiert worden war (2.2.15) erfolgte die Expression des porcinen His-Prouroguanylins unter den bereits für das humane Protein verwendeten Kulturbedingungen (2.8.2). Nach einer Induktion der Kulturen über zwei Stunden betrug der relative Anteil des rekombinanten Proteins bezogen auf das zelluläre Gesamtprotein wie in einer Gelkontrolle ermittelt ca. 10-15 %. Die Kulturen erreichten 2,5-3,0 h nach der Induktion die stationäre Phase bei einer OD_{600nm} von 1,3-1,5.

Da das porcine His-Prouroguanylin ebenfalls in Form unlöslicher, intrazellulärer Einschlußkörper in den *E. coli*-Zellen akkumulierte, erfolgte die Affinitäts-Aufreinigung über die Nickelchelatarose unter denaturierenden Bedingungen (2.8.3) aus 5 g über 2 h induzierter *E. coli* BL21(DE3) Zellen.

Das Eluat aus der RP-Rechromatographie (2.8.8) wurde in 1 min Fraktionen gesammelt und massenspektrometrisch analysiert (2.2.9). Wie auch bei der Expression des humane His-Prouroguanylins konnte die Masse des oxidierten Mono- und Dimers in definierten Fraktionen nachgewiesen werden. In der Fraktion 37 der RP-Rechromatographie wurde die oxidierte, monomere Masse des porcinen His-Prouroguanylin detektiert. Ebenso war, wie auch beim humanen His-Prouroguanylin, die Masse des N-terminal um das Methionin verkürzten Produktes nachweisbar.



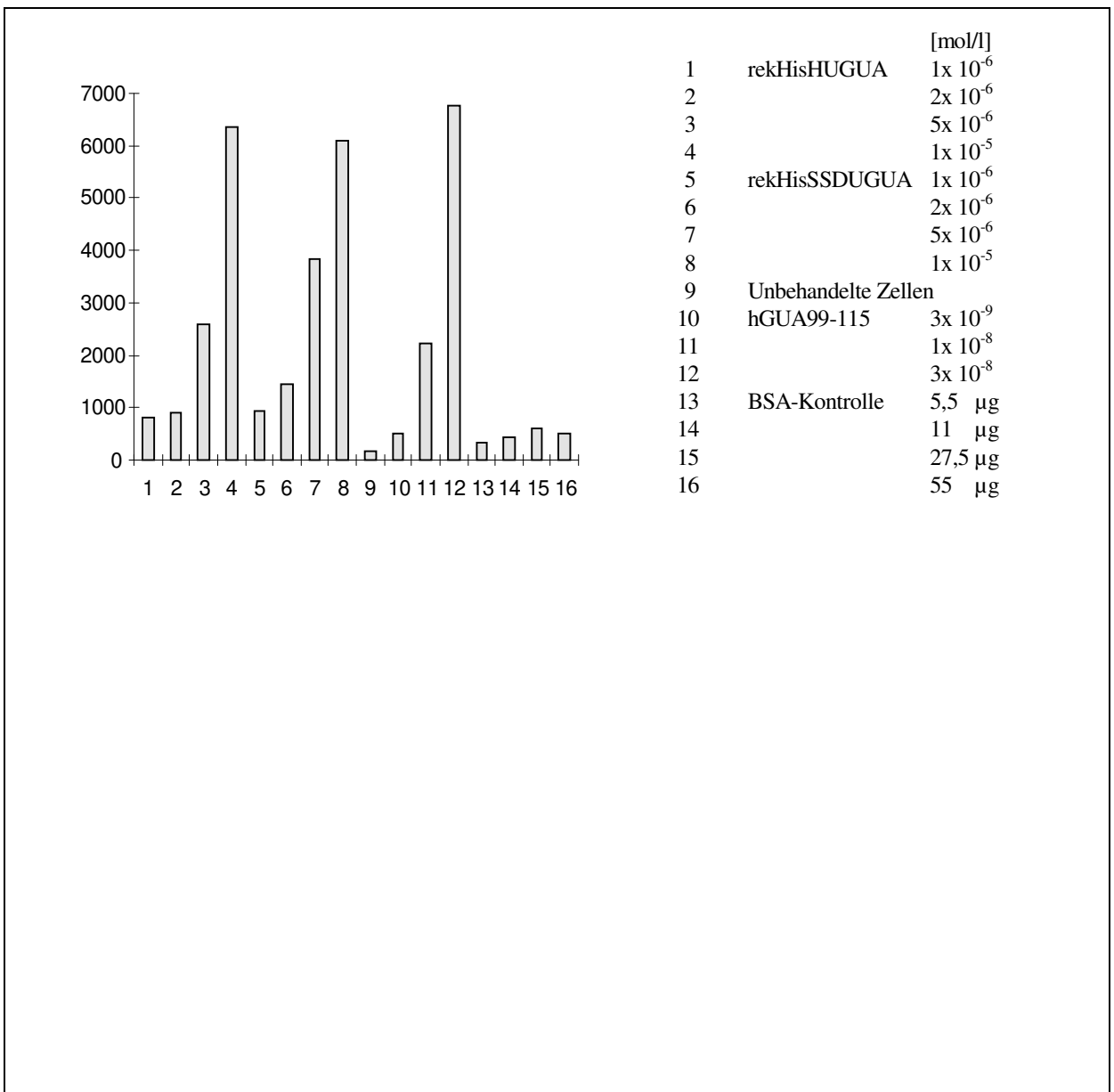
Die Fraktion 37 wurde lyophilisiert und ausgewogen. Es konnten 4,5 mg porcines His-Prouroguanylin dargestellt werden. In einer SDS-PAGE des rekombinanten Proteins waren wie auch im ES-MS Spektrum keine hochmolekularen Verunreinigungen detektierbar. Durch eine Ansequenzierung des Proteins (2.8.10) wurden die ersten 27 N-terminalen Aminosäuren des porcinen His-Prouroguanylins verifiziert.

3.5.4 Untersuchungen zur Bioaktivität der rekombinanten Proteine

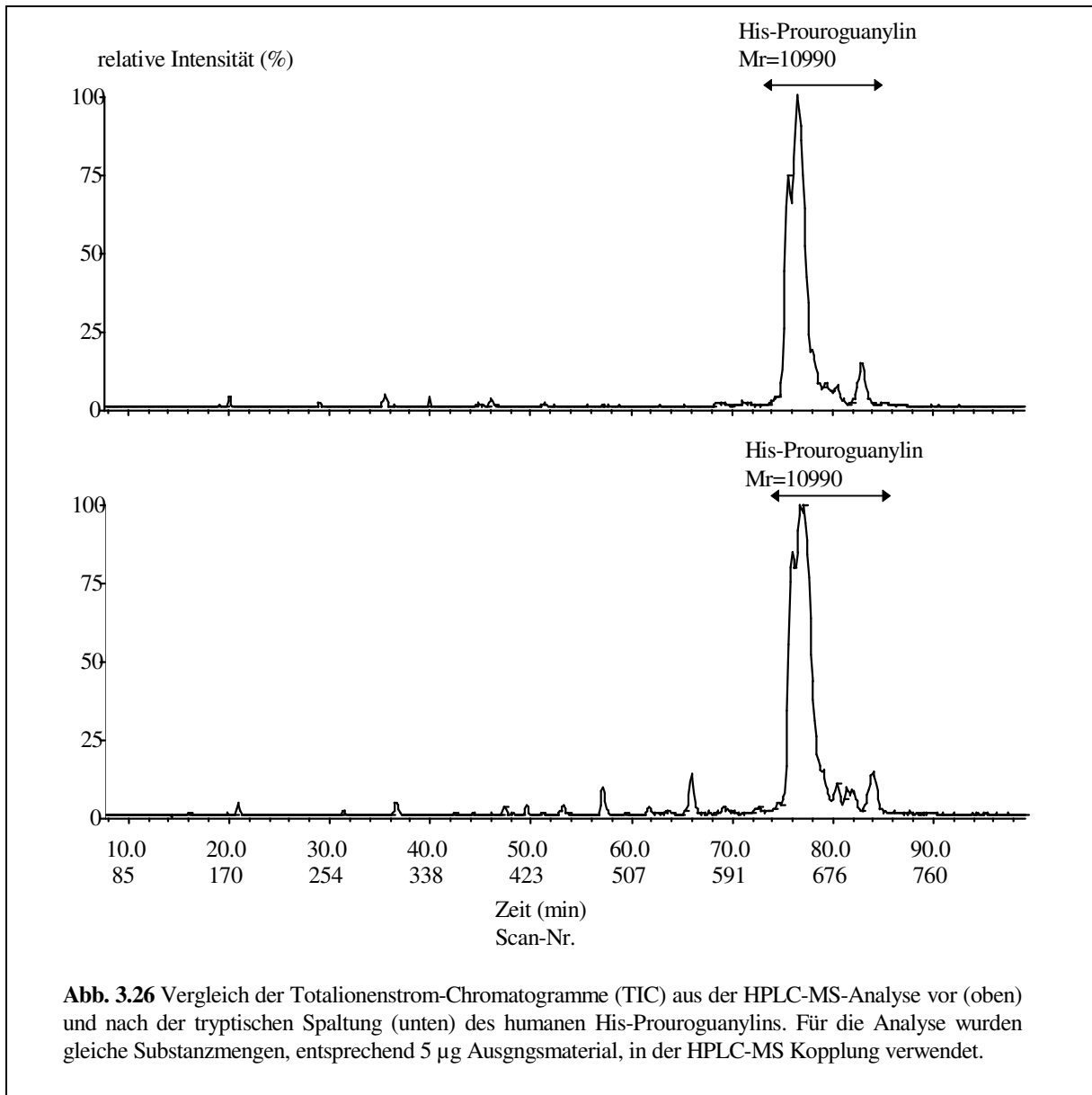
Zur Überprüfung der Bioaktivität der rekombinanten Proteine wurden jeweils 200 μg humanes und porcines His-Prouroguanylin im Verhältnis 1:30 (w/w) mit Trypsin umgesetzt (37°C / 24 h / 40 mM Ammoniumcarbonat, pH 8,0). Bei einer vollständigen tryptischen Hydrolyse der Peptide würde bei beiden Proteinen, bedingt durch ein im C-Terminus lokalisiertes Arginin, theoretisch ein 19 Aminosäuren umfassendes, C-terminales Fragment freigesetzt, das die GC-C-aktivierende Domäne des Moleküls beinhaltet.

Die Induktion der cGMP-Produktion der tryptisch gespaltenen Materials wurde mit den ungespaltenen His-Prouroguanylinen im T84-Bioassay verglichen. Die Stimulation der Zellen erfolgte wie unter 2.8.11 beschrieben über eine Stunde in Gegenwart des Phosphodiesterasehemmers IBMX. Für den Versuch fanden konfluent mit T84-Zellen bewachsene 24-Lochplatten Verwendung (ca. 1×10^5 Zellen/well). Als Kontrollen dienten chemisch synthetisiertes, hGuanylin99-115 und mit Trypsin behandeltes Rinderserumalbumin

(BSA) in den Versuchen. Die Experimente wurden zeitgleich durchgeführt. Die Messung des intrazellulär akkumulierte cGMP erfolgte anschließend mittels eines spezifischen RIAs (2.8.12). Jede Probe wurde vierfach gemessen. Eine Bioaktivität ließ sich generell erst durch hohe Konzentrationen der rekombinanten Proteine im Assay detektieren. Es zeigte sich, daß bereits die ungespaltenen His-Prouroguanyline einen konzentrationsabhängigen, geringen Anstieg der intrazellulären cGMP-Generierungen induzierten. Durch die tryptische Spaltung ließ sich die Aktivität des rekombinanten Materials etwa zehnfach steigern. Eine unspezifische GC-C-Aktivierung durch die hohen Proteinkonzentrationen im Assay oder durch Trypsin konnte durch die verwendeten Kontrollen ausgeschlossen werden. In Abb. 3.25 ist der Mittelwert der cGMP-Messung für jede Probe graphisch dargestellt.



Die Kontrolle der tryptische Hydrolyse der rekombinanten Proteine erfolgte mittels HPLC-MS-Kopplung (2.8.9). In dem Vergleich der Totalionenstrom-Chromatogramme zeigte sich, daß nur ein geringer Anteil der Prohormone mit Trypsin umgesetzt worden war, wie in Abb. 3.26 beispielhaft für das humane His-Prouroguanylin dargestellt ist. Die Proben enthielten quantitativ das ungespaltene Ausgangsmaterial.



Bei der Auswertung der HPLC-MS-Läufe des tryptisch umgesetzten Materials konnten zwei Massen identifiziert werden, die mit möglichen, bioaktiven Fragmenten der Prohormone korrelierten (s. Tab 3.3). Als mögliche, GC-C-aktivierende Fragmente kommen beim gegenwärtigen Kenntnisstand nur Fragmente der Prohormone in Betracht, die das C-terminale Peptidmotiv mit den vier Cysteinen in korrekter Verbrückung (s. Abb 1.7) enthalten.

	gemessene Mr	theoretische Mr (red.)	Position in der natürlichen Sequenz
rekHSUGUA 43-98	5930±1,49	5937	57-112 (s. Abb. 3.7)
rekHSUGUA 80-98	1951±0,6	1957	94-112
rekSSDUGUA 43- 98	5847±1,3	5854	58-113 (s. Abb. 3.15)
rekSSDUGUA 80-98	1869±0,2	1873	95-113

Tab. 3.3 Im Totalionenstrom-Chromatogramm der tryptischen Fragmentierung detektierte Massen, die mit C-terminalen Fragmenten der Porhormone korrelieren. Die relative Position innerhalb des rekombinanten und des natürlichen Proteins sowie die theoretische Masse (im reduzierten Zustand des Moleküls) sind angegeben. (rekHSUGUA=rekombinantes, humanes His-Prouroguanylin; rekSSDUGUA=rekombinantes, porcines His-Prouroguanylin).

Die vorgestellte Analysen zeigten, daß die intrazellulär in *E.coli* expremierten Proteine prinzipiell für eine qualitative Analyse der Bioaktivität geeignet sind. Für die quantitative Gewinnung von bioaktivem Material müssen geeignete Rückfaltungs- und Oxidationsstrategien entwickelt werden.

3.6 Klonierung und Sequenzierung des humanen Uroguanylin-Gens

Bei den Versuchen zur Gewebeverteilung der Uroguanylin- und Guanylin-Genexpression konnte eine Koexpression der Gene im intestinalen Gewebe festgestellt werden. Im Hinblick auf vergleichende Studien zur Genregulation sind die Gensequenz und die Promotorlokalisierung des Uroguanylin-Gens von besonderem Interesse.

Die Klonierung des Uroguanylin-Gens erfolgte aus einer humanen Genbank wie im Abschnitt 2.5 beschrieben. Als Gensonde wurde das unter 3.1.3 beschriebene HUGU-9/HUGU-8 PCR-Produkt der humanen cDNA verwendet. Die Hybridisierungen wurden unter den gleichen Bedingungen wie beim Durchmustern der Colon-cDNA-Bank (3.1.3) durchgeführt. Aus 5×10^4 pfu der Genbank konnten im initialen Screening 5 Signale identifiziert werden, von denen sich im zweiten Nachscreening nur eines in der Hybridisierung als positiv bestätigte. Im zweiten Nachscreening des Signals 3.1 konnte aus einem Monoplaque der Phage pHUG3-1 isoliert, in einem präparativen Lysat vermehrt (2.5.6) und die Phagen-DNA dargestellt werden (2.5.7-2.5.9). Anschließend wurden 40 µg der Phagen-DNA mit der Restriktionsendonukleasen *SstI* hydrolysiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und eine Southern-Blot-Analyse (2.2.18) mit der Gensonde durchgeführt. In Abb. 3.27 ist der letzte Screeningschritt und die Southern-Blot-Analyse der Phagen-DNA dargestellt.

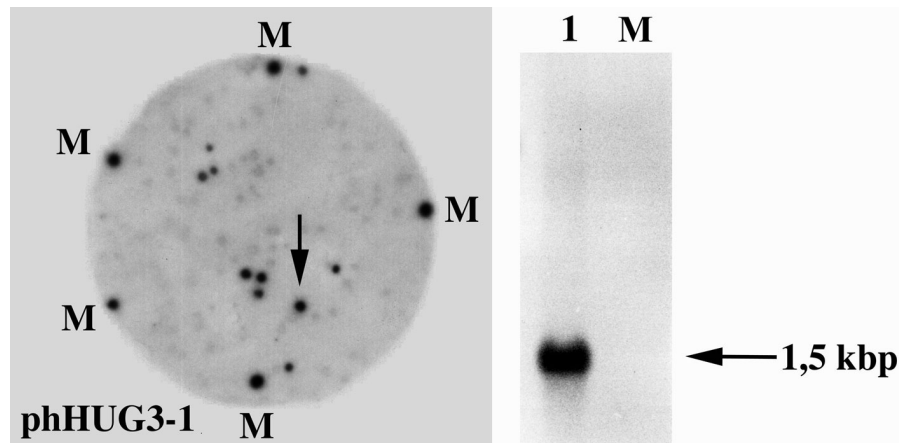


Abb. 3.27 Klonierung des humanen Uroguanylin-Gens. Links: Autoradiogramm des aus der humanen Gen-Bank isolierten Phagen phHUG3-1. Es wurden 300 pfu aus dem ersten Nachscreening des Signals 3.1 plattiert. M=Markierungspunkte. Der Pfeil markiert einen hybridisierenden Einzelplaque, der zur Isolierung des Phagen phHUG3.1 verwendet wurde. Rechts: Autoradiogramm der Restriktionsanalyse des Phagen phHUG3.1. Nach *SstI*-Hydrolyse der Phagen-DNA konnte ein 1,5 kbp großes *SstI*-Fragment identifiziert werden, das unter hochstringenten Bedingungen mit der Gensonde hybridisierte (Spur 1: phHUG3-1 / *Sst I*, M=Größenmarker Lambda / *Hind III*).

Es konnten ein 1,5 kbp großes *SstI*-Fragment identifiziert werden, das mit der verwendeten Gensonde unter hochstringenten Bedingungen hybridisierte. Das Fragment wurde präparativ dargestellt (2.2.9) und in den Vektor pBSK+ kloniert (2.2.13). Die Sequenzierung des *SstI*-Fragmentes erfolgte aus dem Subklon pHUG1.5Sst mittels "Primer-walking". Dabei werden aus erhaltenen Teilsequenzen jeweils neue Sequenzierprimer abgeleitet und damit in weiteren Sequenzierungen die Sequenz erweitert. Durch überlappende Bereiche in den Teilsequenzen konnte die Sequenz des 1,5 kbp großen *SstI*-Fragmentes vollständig aufgeklärt werden. Ein anschließender Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der humanen Uroguanylin-cDNA zeigte, daß nur ein Teilbereich des Gens in dem klonierten *SstI*-Fragment repräsentiert war. Es konnten zwei Exons und ein Intron sowie der 3'-Terminus des Gens identifiziert werden. Die Exons kodierten für die Aminosäuren 31-92 und 93-113 des humanen Uroguanylins. Der 5'-terminal gelegene Sequenzabschnitt repräsentierte somit ein weiteres, unvollständiges Intron. Die Teilsequenz dieses Introns innerhalb des klonierten *SstI*-Fragmentes wurde im 5'-Bereich durch die Phagenpolylinkersequenz, in der sich auch die *SstI*-Erkennungssequenz befand, flankiert. Hieraus konnte geschlossen werden, daß der isolierte Phagenklon nur eine im 5'-Bereich trunkierte Kopie des humanen Uroguanylin-Gens enthielt. Alle weiteren *SstI*-Fragmente der Phageninsertion waren somit der 3'-flankierenden Region des Gens zuzurechnen.

Alternativ zu einer erneuten Durchmusterung der Genbank erfolgte die Klonierung des 5'-Bereich des Gens mittels Promoter-Finder-PCR (Siebert *et al.*, 1995). Als genspezifische Primer wurden die *antisense* Oligonukleotide HUGU-12 und GUGRS-1 verwendet. Der

Primer HUGU-12 fand bereits für die Sequenzierung der Uroguanylin-cDNA Verwendung; der Primer GURS-1 war zuvor aus der Teilsequenz des 5'-gelegenen, partiellen Introns abgeleitet worden. Mittels des unter 2.6.5 aufgeführten PCR-Protokolls konnte aus der DL-1 Fraktion (*EcoRV*-Fragmente) des verwendeten Kits ein 2,3 kbp großes DNA-Fragment in der Nachverstärkung mit der Primerkombination GUGRS-1/AP-2 amplifiziert werden. Eine Direktsequenzierung des aufgereinigten PCR-Produktes mit den Primern HUGU-13 und GUGRS-1 bestätigte die Amplifikation des 5'-Bereiches des humanen Uroguanylin-Gens. Für die Klonierung wurde das PCR-Produkt zunächst mit *SmaI* hydrolysiert. Hierbei entstanden, bedingt durch eine interne *SmaI* Erkennungssequenz, zwei Fragmente mit einer Größe von 1,3 und 1,0 kbp. Die resultierenden Restriktionsfragmente wurden präparativ dargestellt (2.2.9) und mit *Sall* hydrolysiert, dessen Erkennungssequenz in den 5'-Bereich der verwendeten PCR-Primer integriert worden war. Beide Restriktionsfragmente wurden in den Vektor pBSK+ kloniert (2.2.13) und mittels Primer-walking jeweils drei Kopien des PCR-Produktes aus den Subklonen pHUG1.3sma1, pHUG1.3sma2, pHUG1.3sma3 sowie pHGU1.0sma1, pHGU1.0sma2 und pHGU1.0sma3 sequenziert. Die direkte Abfolge der *SmaI* Hydrolyseprodukte konnte durch eine Sequenzierung des originären PCR-Produktes mit zwei zur *SmaI*-Schnittstelle flankierend orientierten Primern verifiziert werden. Aus den erhaltenen Sequenzdaten des Promotor-Amplifikationsproduktes und des 1,5 kbp *SstI*-Fragmentes des Phagen pHUG3-1 konnte eine 3600 bp umfassende Sequenz des humanen Uroguanylin-Gens zusammengestellt werden.

3.7 Sequenzanalyse des humanen Uroguanylin-Gens

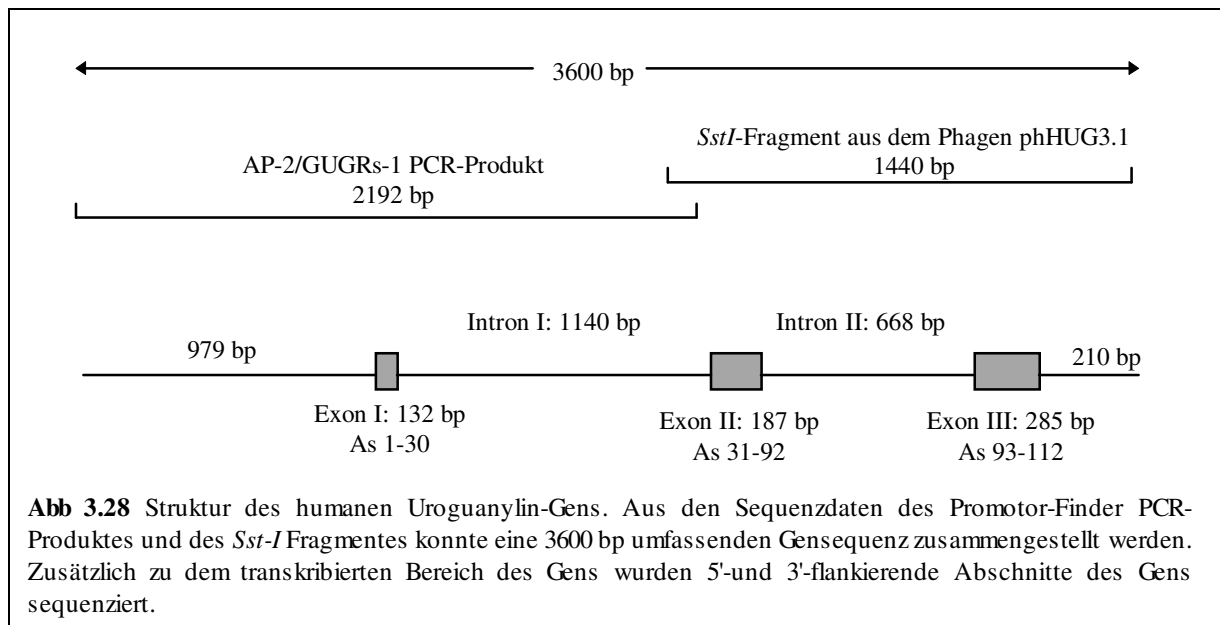
3.7.1 Exon-/ Intronübergänge

Durch einen Vergleich der Gensequenz mit der Uroguanylin-cDNA wurde die Exon/Intronverteilung des Gens bestimmt. Das Uroguanylin-Gen setzt sich, wie auch das Guanylin-Gen, aus 3 Exons und 2 Introns zusammen. Es wurden keine Abweichungen zwischen der cDNA und den Exonsequenzen des Gens festgestellt. In der untenstehenden Tabelle sind die Exon-/Intronübergänge aufgeführt. Die 3'-und 5'-terminalen Basen der Exon- ("Splicing-Donor/Splicing-Akzeptor") sind hervorgehoben und die Position innerhalb der Gensequenz angegeben. Die ersten beiden Basen des Intronanfangs bzw. -endes sind kursiv dargestellt. Zusätzlich ist der Polypyrimidintrakt des Intronendes aufgeführt. Die Nummerierung der Donor- bzw. Akzeptorbase bezieht sich auf die unter 3.7.4 aufgeführte Gensequenz.

Splicing-Donor	5'-Ende-Intron	3'-Ende Intron	Splicing-Akzeptor
1110 Exon I 3'-Ende: CCAG	--1140 bp-- <i>GTGAGT-Intron I-TCCCCTGTCTGTAG</i>		2250 TACC Exon II 5'-Ende
2437 Exon II 3'-Ende: CTAG	--668 bp-- <i>GTAAGT-Intron II-CTCTCCCTGCCAG</i>		3116 GGAC Exon III 5'-Ende

Tab. 3.4 Exon-/Intronübergänge des Uroguanylin-Gens

Die Struktur des Uroguanylin-Gens ist in der nachfolgenden Abbildung wiedergegeben. Interessanterweise findet sich ähnlich dem Guanylin-Gen auch im Uroguanylin-Gen eine Relation zwischen der Exon-/Intronstruktur des Gens und den funktionellen Domänen des Prärohormons. Die Aminosäuren des Signalpeptidbereiches (AS 1-30) werden durch das Exon I, die Aminosäuren des Prouroguanylins durch das Exon II (As 31-92) und die Aminosäuren der bioaktiven, C-terminalen Domäne (As 93-112) durch das Exon III des Gens kodiert.

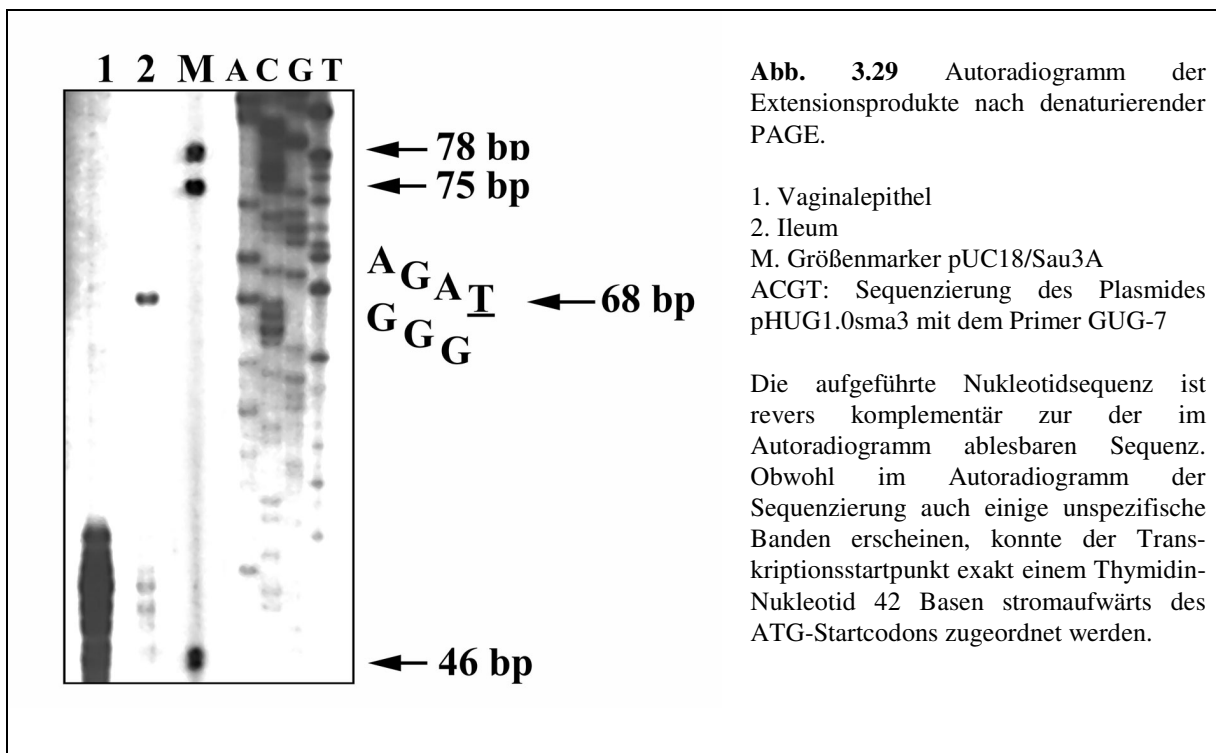


3.7.2 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des humanen Uroguanylin-Gens

Die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des humanen Uroguanylin-Gens erfolgte mittels Primer-Extension-Analyse (2.7). Aus dem Exon I des Gens wurde das *antisense* Oligonukleotid GUG-7 abgeleitet, mit ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP radioaktiv markiert (2.3) und $2,6 \times 10^5$ cpm dieser Sonde mit jeweils 25 μg Gesamt-RNA aus humanem Ileum und Vaginal-Epithel (Negativkontrolle) hybridisiert. Die reverse Transkription und die Aufarbeitung der Extensionsprodukte erfolgte wie unter 2.7 beschrieben. Die Position des Primers GUG-7 ist in der unter 3.7.4 dargestellten Gensequenz eingezeichnet.

Als Referenz wurde eine radioaktive Sequenzierung (2.4.4) mit dem Primer GUG-7 aus dem Plasmid pHUG1.0sma3 durchgeführt. Vorab erfolgte eine Phosphorylierung des Primers mit

nichtradioaktivem ATP um eine einheitliche Migration der Proben in der nachfolgenden Elektrophorese zu gewährleisten. Die Proben aus der Primerextension und der radioaktiven Sequenzierung wurden anschließend mittels denaturierender PAGE gemeinsam untersucht. In der Abb 3.29 ist das nach 12 h Expositionzeit erhaltene Autoradiogramm des Gels dargestellt. Durch die Primerextension konnte ein Thymidinrest 42 Basen stromaufwärts des ATG-Startcodons als Ort des Transkriptionsstartes identifiziert werden. Stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes befindet sich ein schwaches TATA-Box-Motiv (TATAAGG), dessen Zentrum, das zweite Thymidin, sich in Position -27 befindet.



3.7.3 Potentielle Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren in der 5'-flankierenden Region des Uroguanylin-Gens

Durch die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes konnten 978 bp der ermittelten Gensequenz als Promotor-Region identifiziert werden. Mittels des Programms "MatInspector, Version 2.1" (Quandt *et al.*, 1995) wurde dieser Sequenzbereich nach potentiellen Bindungsstellen für bereits bekannte Transkriptionsfaktoren untersucht. In der folgenden Tabelle fanden nur Sequenzmotive Berücksichtigung, deren Kern-Konsensussequenzen (Core) vollständig repräsentiert waren und eine minimale Matrixhomologie von 90% zu bereits charakterisierten Bindungssequenzen des entsprechenden Transkriptionsfaktors (TF) aufwiesen. Die Qualität der verwendeten Matrixbeschreibungen ist in dem re-Wert (random expectation) wiedergegeben. Er gibt die Anzahl der zufällig identifizierten Sequenzen mit hoher Matrixhomologie (>85%) pro 1000 bp untersuchter Sequenz an. Für die Analyse

wurden nur Matrixbeschreibungen mit einem re-Wert $\leq 0,5$ verwendet. Zusätzlich wurde die Promotorsequenz nach Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktoren hin untersucht, die GC-reiche Sequenzmotive binden. Hierfür fand die von Faist und Meyer erstellte Übersicht (1992) und das Programm Interpret der Firma Softgene (Berlin) Verwendung.

TF	Sequenzmotiv	Position	Matrixhomologie	Matrix re-Wert
AP-4	caCAGCTGca	226 (+)	96,6	0,5
	tgCAGCTGtg	226 (-)	91,2	
	ccCAGCTGgc	905 (+)	97,0	
	gcCAGCTGgg	905 (-)	94,2	
CRE-BP1	tgTGACgtatcc	207 (+)	93,5	0,09
E47	gctGCAGctgtgtga	223 (-)	93,0	0,11
E47	ccagcCAGGtgtcctt	595 (-)	90,0	
E47	ccacaCAGGtgtcttg	714 (+)	91,0	
MyoD	gcaCAGGtgga	367 (+)	90,8	0,21
MyoD	acaCAGGtgtct	716 (+)	93,4	
AP-2	CCCCGGCC	121 (-)		
	CCCAACCC	842 (+)		
	CCCCACCC	899 (+)		
	CCCACCCC	900 (+)		
	CCCCTGCC	997 (-)		
GCF	CCGGCCC	120 (-)		
	CCGGGGC	123 (+)		
	CCGGGGC	865 (-)		
SP-1	GAGGCTGGT	537 (-)		
	GGGGCGAGG	835 (-)		
	GGGGCTGGT	861 (-)		

Tab. 3.4 Potentielle Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren in der 5'-flankierenden Region des Uroguanylin-Gens. Die Positionsangabe bezieht sich auf das 5'-terminale Nukleotid der TF-Erkennungssequenz. Die Nummerierung folgt der unter 3.4.3 dargestellten Nukleotidsequenz. (+)= *sense*-Strang; (-)= *antisense*-Strang. Referenzen: AP-2 (Imagawa *et al.*, 1987); AP-4 (Hu *et al.*, 1990); E47 (Sloan *et al.*, 1996; Dear *et al.* 1997), GCF (Kageyama *et al.*, 1989), CRE-BP1 (Sassone-Corsi, 1992; Benbrook & Jones, 1994; Kim & Struhl, 1995); MyoD (Lassar *et al.*, 1991), SP-1 (Sun *et al.*, 1992).

3.7.4 Nukleotidsequenz des humanen Uroguanylin-Gens

Nachfolgend ist der (+)-Strang des humanen Uroguanylin-Gens aufgelistet. Der Transkriptionsstartpunkt ist durch einen Pfeil markiert; Exonsequenzen sind durch Kapitälchen hervorgehoben und die Aminosäuresequenz des humanen Uroguanylin-Prohormons über den entsprechenden Kodons dargestellt. Die Position der für die Amplifikation der Promotorregion und für die Primer-Extension verwendeten *antisense*-Primer (HUGU-12, GUG-7, GURGS-1) ist eingezeichnet.

Ergebnisse

<p>ttctctctgacccaaccttcaaccactggg ctgtaagattcaggggctgctatggatgca ggccggggccctcacagcaaccttacgaga gaaaactaagattccattagaattgatgtg actaggatttgaatgcggggtcaatctgcct attaggctattggcttctgaaagcacagac accagggcacaggtgggagatggcaagcag gtctgaaagatagtcgttaaatagcaactga ggggagtgggggtcttgagaacctgaaatc gcctctctgtctgtatccttccccagaga acctggctggagccccttctctgacattaa ccctcctgagcctcacttttctgtctgta gggtgtcttgaggagtgaatgatgggtgtgct gcaggcactcggattcaagcactgtgttc</p>	<p>gcagtaggttatgcattgcctagaaggcaa 60 ttaccaagagataagggcaacctcaggtg 120 ggggttgatcatgccatttgatggaaga 180 acgtatcctaaatcacacagctgcagcagg 240 ccaacactactgccttttctccatgctgg 300 aggtgagatgggtcaaacatggcctgaagc 360 aggcaggttcaaacgtggggccaggactg 420 ggagaggagtgagagagatgtgggtcttg 480 agcagtgtctgccactttgccctggacca 540 agggaccatgggctgacctgggccaaggac 600 ctagctccgtgacctggggaaagccacct 660 aatggcctccccgtcatcacaccacaca 720 ccaaggcccccattggagagcccagcacatg 780 ccatagactttgggctcctgcctcctcgc 840</p>
<p>ccccaacccccttcttaggaaccagccccg</p>	<p>gcttgtcagagagccagctagctgtcaacc 900</p>
<p>ccaccccagctggccagttaatgagtgacc ↓ gctaggcagggacacagaTGGGAGACGGTG ——GUG-7——</p>	<p style="text-align: center;">*****</p> <p>aggactcctgagcctgaccTATAAggaggt 960 < GACAGCGGCAGGGGAACCCAGGGAGCGCG 1020 ProGlyValAlaValValLeuLeuLeuLeu 1080 CCAGGAGTGGCCGTGGTCTCTCTGCTGCTG</p>
<p>LeuGlnSerThrGlnSerValTyrIleGln CTGCAGAGCACACAGTCTACATCCAG tgaagggcccatgggtgggaggctaggctg ccgggggagcacggggccggggctcagcc agctgggtgggtgggggagccagatgtttg aactgattcagcgtgctcccctcaaaggc acagaaggctcctccttgcatgggaggagg tcccacagttccgtatattcaccacatgt ttcctgagaagtaacccttgagctggcatt atgatggggaaactgttccaggccaagggg tatgggggttccagtgcccttccaggggg ggcctgtctgccacgtcacaggggatgctg gtggccctgggtgtcacatccctgactctg gtcccagagaggggtgcaggagacttggcc tacttggggctgccatcactctgcatgtg gtgcctggtagcagccgggtcatgggcagagg aaagcctcgaaccgctgtgctccacagccc gcggctcttccagtggtgccctggacttc</p>	<p>Intron I —> gtgagtccttggccagcgttccctttgcc 1140 gagaggggtgactgggaattcagaggggca 1200 caacaccatcacagccaaagaccaaggc 1260 atggcagtgatgatggcaatgacaacacca 1320 ccgtgctggtcacagaggtcagggtgtgga 1380 ccagaaaggaaggagacacctgttatgc 1440 aggtggaggaggacaggctccagaaaaatt 1500 gcaagatgaacaggaggttgccagacacag 1560 cacagcatgtgcaaagaccagatagaagac 1620 atgggagagtggcagtagtcgtcacagcag 1680 ctggcctcgccagcatagcagagacgtct 1740 ggcatggtctccttgggaagaacaaagtgg 1800 tccccaacagccctggcctcagagaccagc 1860 agctcaggcaggcgtactcagttagtatt 1920 gtcagatgagggaaactgaggctgagtgagg 1980 tgggatttgaaccagggttctgtctctct 2040 cgtgcttcttctcctcacacctctcaccgca 2100 ccatagagacggggaaggctctggaggatc 2160</p>
<p>tgcagggtttgagcaaccctgggtgtcatg</p>	<p style="text-align: center;"><——GUGRS-1——></p> <p>gaagtgcctgccctggaccaggtcttgac 2220</p>
<p>ctgctcctatctcctctcccctgtctgtag</p>	<p style="text-align: center;">Exon II —></p> <p>TyrGlnGlyPheArgValGlnLeuGluSer TACCAAGGCTTCCGGGTCCAGCTGGAATCC 2280 < TrpAlaProSerProArgLeuGlnAlaGln TGGGCACCCAGCCCCGCCTGCAGGCCACG 2340</p>
<p>——HUGU-12—— SerLeuLeuProAlaValCysHisHisPro AGCCTCCTGCCCGCCGTGTGCCACCACCCT</p>	<p>AlaLeuProGlnAspLeuGlnProValCys GCTCTGCCTCAGGACCTTCAGCCTGTCTGC 2400</p>
<p>AlaSerGlnGluAlaSerSerIlePheLys GCCTCGCAGGAGGCTTCCAGCATCTTCAAG aacctcgctctgtctcctcccagcccagg cccagcggctgaggatggggagattcaagt actccccggtttgggcaactgtgagttaggc</p>	<p>ThrLeuA Intron II —> ACCCTGAgtaagtgccccgctccctgcag 2460 ctcctccacctgggttgtttctcttaagca 2520 aactcaggccctgtcccactggctcccagg 2580 atgctggaacctgcttctccccttagtc 2640</p>

Ergebnisse

cacgccaggcacagacccatcaacagacaa	tggctgctggagcagagaggagagctggc	2700
tgacatctgcatgggacaggggtgtgaaa	ggcttccaagaggaggtgtcagccaagctg	2760
aaacctgagggatcgtgcagagccaggcac	gagaatgtagcaactagctagcacttactg	2820
agcacctactgtgtgccgggacttgtcggg	cctgcattatctcctcacagtgaccctgtc	2880
catttagcaacaagaaatctcaggcacag	ggagtgtgagtgacttgcccagtggccgct	2940
aggaaggagagcatctgggacttgaaccca	agccctcactccacctctagacgttcctgc	3000
tcccagtctgtggaagatgccgccattcc	caagaagacctcttcttctgctggccaaa	3060
	rgThrIleAlaAsnA	
gagggcccaggttcaggtcaactgaccagt	tctctccctgccagGGACCATCGCTAACG	3120
spAspCysGluLeuCysValAsnValAlaC	ysThrGlyCysLeuSTOP	
ACGACTGTGAGCTGTGTGTGAACGTTGCGT	GTACCGGCTGCCTCIGAGATAGCCCTGGGT	3180
ACCCTGAGCCCACCAGGGACACCTCGCCCT	TCAGCCCACCACCCTGGCAGGCTTCCATCC	3240
CCGTCCATGCTCAAGATGGGTCCCTGGCCA	CCATGGTCATCACCACCCTTCCAGGGCCTG	3300
AGCAGCTGGATCTGGTACAAAGCAATCGGA	CATAGAGTTGGAGGGGGAGGCCCTGAGGC	3360
Poly(A) Signal		
AGCCCAGCTCCTGAATAAAGATTCTACAAC	acacgagtccacgtgtcctttgttcatccc	3420
caggagccatgggaggagcttctggagaag	aagtgtgattgaggagaaagacgggacta	3480
aaaataaccaggcaggaatcttctgaagtt	ttcaaggcccggggagttgattgaaccca	3540
tcccgaatatgagggagttgaggctcggag	caggaatgaggcatccaggatcacagagct	3600

4. Diskussion

Ausgehend von 16 Aminosäuren Sequenzinformation des durch Kita und Mitarbeiter (1994) aus Urin dargestellten Peptides wurde versucht, durch präparative RT-PCR Experimente den 3'-Bereich der potentiellen Uroguanylin-cDNA zu amplifizieren.

Hierfür wurde aus einer Auswahl an Organen Gesamt-RNA präpariert, in denen sich eine Expression des Uroguanylin-Gens vermuten ließ. Als wahrscheinlichster Ort der primären Uroguanylin-Genexpression wurde die Niere und das intestinale Epithel vermutet. Grundlage für diese Annahme war einerseits die Isolierung des humanen Peptides aus Urin (Kita *et al.*, 1994) und andererseits die Darstellung zweier GC-C-aktivierender Peptide aus der intestinalen Mucosa und dem Urin des Opossums. Das als Opossum-Guanylin bezeichnete Peptid wurde sowohl aus intestinaler Mucosa als auch aus Urin isoliert, wohingegen das zweite Peptid (Opossum-Uroguanylin) nur aus dem Urin aufgereinigt werden konnte. Die Präparationsversuche aus der intestinalen Mucosa des Tieres wiesen jedoch auf die Existenz eines zweiten Peptides im Darm hin, das GC-C-stimulierende Aktivität besaß (Hamra *et al.*, 1993).

Ein weiterer Hinweis auf die intestinale Expression eines dem Guanylin ähnlichen Proteins wurde durch die Arbeit von Cetin und Mitarbeitern (1994) erbracht. Durch immunhistochemische Untersuchungen an gastrointestinalem Gewebe des Meerschweinchens konnten enterochromaffine Zellen (EC-Zellen) als Ort der Guanylinsynthese identifiziert werden. Neben EC-Zellen, die sowohl mit gegen den N- und den C-Terminus des Proguanylins gerichteten Antiseren identifiziert wurden, waren auch vereinzelte, enteroendokrine Zellen detektierbar, die lediglich mit dem C-terminalen Antiserum reagierten, einem Bereich hoher Homologie zwischen dem Guanylin- und dem Uroguanylinpeptid. Es lag nahe, ein Kreuzreaktivität des verwendeten Antiserums mit einem verwandten Peptid, möglicherweise Uroguanylin, zu vermuten.

4.1 Klonierung der humanen Uroguanylin-cDNA

Für die präparative 3'-RACE-RT-PCR der humanen Uroguanylin-cDNA wurden degenerierte Oligonukleotide synthetisiert, die alle Kodierungsmöglichkeiten des ausgesuchten Peptidabschnittes beinhalteten (s. Abb. 3.1; Abb. 4.1). Bei der Konstruktion der Oligonukleotide mußte insbesondere die C-terminale Homologie zwischen Guanylin und Uroguanylin berücksichtigt werden, so daß im Hinblick auf die Degeneration einzelner Kodons nur eine begrenzte Auswahl an geeigneten Positionierungen zur Verfügung stand.

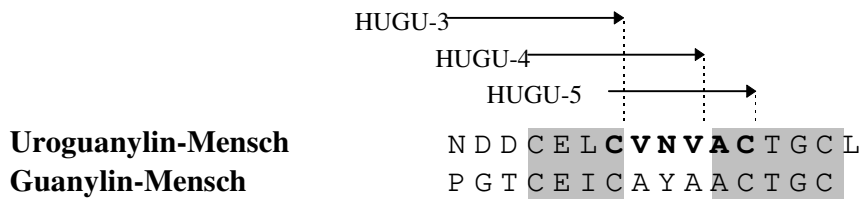


Abb. 4.1 Relative Position der verwendeten Oligonukleotide zur Peptidsequenz des humanen Uroguanylins. Die Homologie zum C-terminus des Guanylin-Vorläufers ist dargestellt.

Da die Existenz eines endogenen, humanen Uroguanylin-Gens allein durch Aufreinigung eines GC-C-aktivierenden Peptides aus Urin noch nicht gesichert war; mußten Ausschlusskriterien für die amplifizierten PCR-Produkte definiert werden. Unter der Annahme, daß Uroguanylin das C-terminale Fragment eines größeren *endogenen* Vorläufers repräsentiert und das dieser durch ein in der Struktur der Guanylin-mRNA ähnliches Transkript kodiert wird, wurde die Größe der 3'-nichttranslatierten Region einer potentiellen Uroguanylin-cDNA mit 220-300 Nukleotiden kalkuliert. Erste Amplifikationsversuche mit der Primerkombination HUGU-3/UNIP-6 führten aus verschiedenen cDNA-Erststrängen zu uneindeutigen Ergebnissen. Zwar konnten in der Southern-Blot-Analyse der PCR-Produkte mit dem Primer HUGU-5 als Gensonde schwache Signale in dem erwarteten Größenbereich detektiert werden, aber die Amplifikationsprodukte waren, wie die Sequenzanalyse einiger Subklone ergab, heterogen und unspezifisch. Hierbei wurden 15 von 20 sequenzierten PCR-Produkten als Teilbereiche repetitiver Alu-Sequenzen identifiziert. Nachverstärkungen mit den weiter innen liegenden Primern HUGU-4 und HUGU-5 führten ebenfalls nicht zur Amplifikation eines spezifischen Produktes.

Prinzipiell ist die Amplifikation von DNA-Sequenzen mit homopolymeren Bereichen, wie es auch bei der 3'-RACE der Fall ist, problematisch, da diese Sequenzbereiche zu Bildung thermostabiler Triple-Helices neigen (Thomas, 1993; Howard *et al.*, 1995).

Weiterhin muß bei der Verwendung von degenerierten Primern bedacht werden, daß Primervarianten aus dem Gemisch, die mit dem 5'-Terminus, nicht aber mit dem 3'-Terminus an die Zielsequenz hybridisieren, ebenfalls inhibitorisch durch Verringerung der für die spezifische Primervariante zugänglichen Hybridisierungsmöglichkeiten wirken.

Die PCR-Bedingungen müssen in Hinblick auf die Zykluszahl und Hybridisierungsbedingungen individuell für jedes Primergemisch optimiert werden. Mit der Primerkombination HUGU-5/UNIP-6 konnte erst durch die Erhöhung der Zyklusanzahl (65 Zyklen insgesamt) und Verringerung der Annealingtemperatur auf 37°C aus Colon-cDNA-Erststrang ein ca. 280 bp großes, homogenes DNA-Fragment amplifiziert werden (Abb. 3.2).

Die Sequenzanalyse identifizierte das Amplifikationsprodukt als 3'-terminales cDNA-Fragment einer mRNA, die für Uroguanylin oder ein eng verwandtes Protein kodiert (Abb. 3.3). In einer ersten Northern-Blot-Analyse mit einem Teilbereich der potentiellen Uroguanylin-cDNA als Gensonde wurde eine hohe Expression des korrespondierenden Gens

im Colon detektiert und die relative Größe der hybridisierenden mRNA mit ca. 700 Nukleotiden bestimmt (Abb. 3.4). Bei einer durchschnittlichen Länge der 3'-terminalen Poly(A)-Sequenz eukaryontischer mRNAs von 150 Nukleotiden konnte der im 5'-Bereich fehlende Sequenzabschnitt der klonierten cDNA mit 400-500 bp kalkuliert werden.

Trotz der detektierten hohen Expressionsrate des potentiellen Uroguanylin-Gens im Colon führte die Durchmusterung einer humanen Colon-cDNA-Bank mit einem Teilfragment der potentiellen Uroguanylin-cDNA als Gensonde nicht zur Isolierung eines spezifischen Phagenklons (3.1.3). Da in parallelen Experimenten mit der gleichen Gensonde aus einer humane Genbank die erfolgreiche Isolierung eines genomischen Phagenklons gelang (Abb. 3.27), konnte aus den Versuchen geschlossen werden, daß die gesuchte Sequenz nicht in der untersuchten cDNA-Bank repräsentiert war. Prinzipiell besteht die Möglichkeit, daß eine hohe Expression des potentiellen Uroguanylin-Gens nur unter bestimmten physiologischen Zuständen stattfindet. Aus diesem Grund wurden 5'-RACE-Experimente aus der Colon-RNA-Probe durchgeführt, die in der Northern-Blot-Analyse ein eindeutiges Signal zeigte. In der Northern-Blot-Analyse wurden zudem keine Degradationserscheinungen der gesuchten mRNA festgestellt, was eine wichtige Voraussetzung für die 5'-RACE darstellt (Schaefer, 1995).

Auch bei den 5'-RACE-Experimenten führte erst eine insgesamt relativ hohe Zyklusanzahl und mehrere Nachverstärkungen zur Amplifikation eines cDNA-Produktes im erwarteten Größenbereich (Abb. 3.6). Die Sequenzanalyse identifizierte das amplifizierte Produkt als 5'-terminale Anschlußsequenz des klonierten cDNA-Fragmentes. Aus den Sequenzen der 5'- und der 3'-RACE-PCR-Produkte konnte eine 603 Nukleotide umfassende cDNA-Sequenz zusammengestellt werden (Abb. 3.7).

4.2 Analyse der humanen cDNA-Sequenz und Primärstruktur des Uroguanylin-Vorläufers

Die ermittelte cDNA-Sequenz kodiert im ersten offenen Leseraster für ein Polypeptid von 112 Aminosäuren ($M_r=12071$), dessen 16 C-terminalen Aminosäuren vollständig mit der publizierten humanen Uroguanylin-Peptidsequenz übereinstimmen. Durch diesen Nachweis einer für Uroguanylin kodierenden, eukaryontischen mRNA wurde ein weiteres Indiz für den endogenen Ursprung des Peptides erbracht. Die endgültige Verifizierung erfolgte durch die spätere Klonierung des Uroguanylin-Gens aus einer humanen Genbank (3.7).

Die flankierenden Nukleotide des Startkodons (CGCGATGG) des Uroguanylin-Leserasters stimmen mit der für Vertebraten typischen Translations-Initiations-Konsensussequenz [(CC)RCCATGG] bis auf eine Nukleotidposition überein (Kozak; 1991). Der 5'-nichttranslatierte Bereich der durch die 5'-RACE-PCR dargestellten cDNA besitzt eine Länge von 41 Nukleotide. Durch die spätere Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des

humanen Uroguanylin-Gens (s. 3.7.2) konnte die 5'-nichttranslatierte Region der cDNA verifiziert werden. Auffällig ist der hohe GC-Gehalt (73%) innerhalb dieses Sequenzabschnittes. Ähnlich hohe GC-Anteile innerhalb der 5'-nichttranslatierten Region wurden bei Genen gefunden, deren Proteine nur in geringen Mengen vorkommen (Wachstumsfaktoren, Oncoproteine, Komponenten der Signaltransduktion) und wichtige regulatorische Funktionen übernehmen. Eine Regulation der Translation dieser mRNAs durch 5'-terminale Sekundärstrukturen wird vermutet (Kozak, 1992).

Die 3'-nichttranslatierte Region der humanen Uroguanylin-cDNA umfaßt 223 Nukleotide und ist durch ein hochkonserviertes, eukaryontisches Polyadenylierungssignal (AATAAA) gekennzeichnet (Abb. 3.7). Das Polyadenylierungssignal AAUAAA ist in 98% der mRNAs höherer Eukaryonten anzutreffen und tritt 11-30 Nukleotide stromaufwärts des Poly-A-Tails auf (Lewis *et al.*, 1995). Aus den vorgestellten Daten ließ sich folgern, daß die ermittelte Sequenz eine vollständige cDNA der humanen Uroguanylin-mRNA repräsentiert und somit das theoretische Translationsprodukt dem Präprouroguanylin entspricht.

Innerhalb der Präprouroguanylin-Sequenz ist die bioaktive Domäne wie auch beim Präproguanylin C-terminal lokalisiert. Das von Kita und Mitarbeitern aufgereinigte Uroguanylinpeptid entspricht der Aminosäureposition 97-112 der Präprosequenz. Die N-terminalen 25 Aminosäuren des theoretischen Translationsproduktes sind hydrophob (Abb. 3.8) und weisen typische Charakteristika eines eukaryontischen Signalpeptides auf. Aufgrund des Aminosäuremusters der Sequenz (von Heijne, 1983) läßt sich eine Prozessierung des Vorläufers nach Ser26 postulieren. Eine Prozessierung an dieser Position würde in einem Uroguanylinpropeptid von 86 Aminosäuren ($M_r=9489$) resultieren. Neben der Prozessierung des Signalpeptides finden die häufigsten internen Prozessierungen von Prohormonen C-terminal von einzelnen oder zwei benachbarten basischen Aminosäuren statt. Im Prouroguanylin sind diese potentiellen Prozessierungsstellen die benachbarten basischen Aminosäuren Lys42-Lys43 und die einzelnen basischen Aminosäuren Arg35, Arg56, Lys90 und Arg93. Da die meisten monobasischen Prozessierungen nach Argininen mit einem N-terminal benachbarten Prolin stattfinden, ist als wahrscheinlichste Position einer monobasischen Prozessierung des Uroguanylin-Vorläufers die Position Arg56 anzusehen (Schwartz, 1986; Devi, 1991).

Parallel zur Charakterisierung des Uroguanylin-Gens erfolgte am IPF die Isolierung eines weiteren GC-C-aktivierenden Peptides aus humanem Hämofiltrat (Hess *et al.*, 1995). Das isolierte Peptid besaß eine Länge von 24 Aminosäuren und entsprach den Aminosäurepositionen 89-112 des Uroguanylin-Vorläufers. In Anlehnung an die Bezeichnung des zirkulierenden, humanen Proguanylins (hGuanylin22-115, GCAP-I) wurde die zirkulierende Form des Uroguanylins GCAP-II benannt (Guanylate Cyclase C Activating Peptide II).

Aus der Primärstruktur des Vorläufers lassen sich weder hUroguanylin₉₇₋₁₁₂ noch GCAP-II (hUroguanylin₈₉₋₁₁₂) als spezifische Prozessierungsprodukte ableiten, so daß es sich in beiden Fällen wahrscheinlich um proteolytische Abbauprodukte einer noch nicht identifizierten, größeren zirkulierenden Form handeln könnte.

Wie in Abb. 3.9 dargestellt ist die Sequenzhomologie zwischen dem humanen Uroguanylin- und dem Guanylin-Propeptid sehr gering. Neben der C-terminalen, bioaktiven Region wurde ein weiterer, konservierter Sequenzbereich in der N-terminalen Region der Propeptide identifiziert. Die biologische Funktion dieses 10 Aminosäuren umfassende Sequenzmotives ist unbekannt; es beinhaltet jedoch interessanterweise die potentielle, dibasische Prozessierungsstelle (Uroguanylin: Lys₄₂-Lys₄₃; Guanylin: Lys₃₇-Lys₃₈). Weiterhin sind die relativen Positionen der sechs Cysteine innerhalb der Sequenzen konserviert, so daß trotz der geringen Sequenzidentität strukturelle Ähnlichkeiten der Propeptide vorstellbar sind (Hill *et al.*, 1995b).

4.3 Gewebeverteilung der humanen Uroguanylin-/Guanylin-Genexpression und mögliche Funktionen des Peptides

Die Untersuchungen zur Gewebeverteilung der Genexpression verfolgten das Ziel, die Orte der Prohormonsynthese zu identifizieren. Bereits in der ersten Northern-Blot-Analyse (Abb. 3.5) konnte eine hohe Expressionsrate des Uroguanylin-Gens in der Niere, wie sie Kita und Mitarbeiter postulierten (1994), ausgeschlossen werden. Auch in den anderen untersuchten Organen (Tonsillen, Herz-Aurikel, Magen-Korpus, Pancreas, Leber und Nebenniere) war mit dieser Methode keine Uroguanylin-mRNA detektierbar. Die deutliche Signalintensität der hybridisierenden Transkripte in der Colon-RNA ließen vielmehr den Schluß zu, daß das Uroguanylin-Gen, wie auch das Guanylin-Gen, im intestinalen Gewebe hoch exprimiert wird (Hill *et al.*, 1995b). In einer Northern-Blot-Analyse wurde das Expressionsmuster beider Gene in den einzelnen Darmabschnitte (Duodenum, Jejunum, Ileum Caecum, Colon) miteinander verglichen. Mit beiden Gensonden wurden aus allen Darmabschnitten intensive Signale hybridisierender Transkripte im gleichen Größenbereich nachgewiesen (Abb. 3.8).

Das intestinale Gewebe ist demnach ein Hauptort der Guanylin- und Uroguanylinsynthese beim Menschen. Im Hinblick auf den immunhistochemischen Nachweis des Guanylin- (Cetin *et al.*, 1994, Hill *et al.*, 1995a) und des Uroguanylinpeptides (Hess *et al.*, 1995) in entero-endokrinen Zellen des geschlossenen und des offenen Typs läßt sich sowohl eine endokrine als auch eine parakrine Sekretion beider Hormone im Darm postulieren.

Erste Untersuchungen an humaner, intestinaler Mucosa *in vitro* konnten eine bidirektionale Sekretion beider Peptide demonstrieren, wobei die luminale Sekretionsrate dominiert. Elektrophysiologische Untersuchungen in der Ussing-Kammer an intestinaler Mucosa *in vitro* zeigten, daß hGuanylin₁₀₁₋₁₁₅ und hUroguanylin₈₉₋₁₁₂ in allen Darmsegmenten den

elektrogenen Elektrolyttransport ausschließlich nach apikaler Zugabe stimulierten. Eine Applikation der Peptide in das serosale Reservoir hatte keine Wirkung (Kuhn *et al.*, 1996). Offensichtlich besitzen Guanylin und Uroguanylin eine überlappende, parakrine Funktion im intestinalen Epithel über die in der apikalen Membran der Enterozyten lokalisierte GC-C. Neben der Chloridsekretion wird auch die elektrogene Bicarbonatsekretion im intestinalen Epithel durch Guanylin und das Enterotoxin STa stimuliert. Dies wurde durch Untersuchungen an duodenaler Mucosa der Ratte *in vitro* belegt. Die Versuche weisen darauf hin, daß die Guanylin/STa-stimulierte Bicarbonatsekretion *direkt* über den CFTR-Kanal vermittelt wird (Guba *et al.*, 1996). Frühere Studien hatten bereits eine Bicarbonatleitfähigkeit des CFTR-Proteins *in vitro* belegt (Poulsen *et al.*, 1994). Eine Modulation der Bicarbonatsekretion durch Guanylin/Uroguanylin über den CFTR-Kanal im Colon ist ebenfalls prinzipiell vorstellbar. So konnte Tantisira 1990 am Modell der isoliert perfundierten Darmschlinge nach intraluminaler Infusion von Enterotoxin STa einen Anstieg des pH-Wertes im Sekret beobachten - ein Effekt der auf die Stimulation der Bicarbonatsekretion zurückgeführt wurde (Tantisira *et al.*, 1990). Die Bicarbonatsekretion im proximalen Dünndarm und im Colon ist ein wichtiger Mechanismus zur Protektion der Mucosa bei einem Abfall des luminalen pH-Wertes, wie er durch den Eintritt des Chymus aus dem Magen in das Duodenum und durch den obligat anaeroben, bakteriellen Abbau von Nahrungsinhaltstoffen im Colon stattfindet.

Für die Darstellung des Expressionsmusters beider Gene außerhalb des Darms reichte die Sensitivität der Northern-Blot-Analyse, die mit Gesamt-RNA durchgeführt wurden, nicht aus. Daher erfolgte der Nachweis der Guanylin- bzw. Uroguanylin-mRNA in einer Auswahl extraintestinaler Gewebe (Magen-Corpus, Gallenblase, Pancreas, Niere und Lunge) mittels der sensitiveren Methode der RT-PCR (Abb. 3.10).

Spezifische Amplifikationsprodukte wurden durch Hybridisierung mit einer internen Oligonukleotidsonde in einer Southern-Blot-Analyse identifiziert. Das relative Expressionsniveau der Gene wurde nach Abgleich der Amplifikationseffizienz der einzelnen cDNA-Proben durch eine Kontroll-PCR mit β -Tubulin-spezifischen Primern miteinander verglichen. Unter Berücksichtigung der Zyklusanzahl konnte das Expressionsmuster beider Gene in den untersuchten Geweben bestimmt werden. Demnach findet eine Koexpression des Guanylin- und Uroguanylin-Gens in der Gallenblase, dem Pancreas, der Lunge und der Niere statt, wobei die Expressionrate in den letzten drei genannten Geweben sehr gering ist. Eine höhere Expressionsrate beider Gene ist in der Gallenblase feststellbar. Interessanterweise konnte im Magen-Korpus eine mit der Gallenblase vergleichbare Expression des Uroguanylin-Gens, aber keine Expression des Guanylin-Gens detektiert werden (Hill *et al.*, 1995c, 1996).

Die einzige bis jetzt bekannte Funktion der Guanylin / Uroguanylin-Peptide ist die parakrine, cGMP-abhängige Modulation des Elektrolyttransportes im intestinalen Epithel. Über potentielle Wirkungen in anderen Organen können zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur Vermutungen geäußert werden:

Gallenblase

Im Epithel der Gallenblase konnten in der apikalen Membran funktionelle Bindungsstellen für hitzestabiles Enterotoxin STa nachgewiesen werden (Krause *et al.*, 1990), ein indirekter Beleg für die Expression der GC-C oder eines verwandten Rezeptors. Ebenso exprimiert das Gallenblasenepithel das CFTR-Protein in apikaler Orientierung (Dray-Charier *et al.*, 1995). Aufgrund der Lokalisation eines GC-C-ähnlichen Rezeptors und des CFTR-Kanals auf der apikalen Seite läßt sich eine cGMP-abhängige Modulation der Chlorid- oder Bicarbonatsekretion im Epithel der Gallenblase vermuten.

Pancreas

Im Pancreas wurde bereits bei verschiedenen Spezies eine Expression des CFTR-Gens nachgewiesen (Fiedler *et al.*, 1992; Trezise *et al.* 1992; Kopelman *et al.*, 1995). Immunhistochemische Untersuchungen lokalisierten das CFTR-Protein in den apikalen Membranen der Epithelzellen der exokrinen Canniculi (Crawford *et al.*, 1991). Der CFTR-Kanal in den Gangzellen spielt eine Schlüsselrolle bei der Bicarbonatsekretion des Pancreas. Durch die Bereitstellung von luminalem Chlorid wird sekundäraktiv die Funktion des Chlorid/Bicarbonat-Austauschers gewährleistet (Winpenny *et al.*, 1995). In eben diesen Zellen wurde in ersten Untersuchungen auch das GC-C-Protein in der apikalen Membran nachgewiesen, so daß sich hier ebenfalls eine parakrine Wirkung von Guanylin / Uroguanylin vermuten läßt (persönliche Mitteilung, Prof. Cetin).

Auf andere Mechanismen der Guanylin/Uroguanylin-Wirkung verweist eine am IPF durchgeführte Studie an INS-1-Zellen, einer humanen Insulinoma-Zelllinie. An dieser Zelllinie konnten eine Guanylin-vermittelte, cGMP-abhängige Stimulation der Insulinsekretion nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde dieser Effekt erst nach einer sehr langen Inkubationszeit der Zellen mit Guanylin (24 h) erzielt. INS-1-Zellen exprimieren endogen die GC-C und die cGKI (cytosolische, cGMP-abhängige Proteinkinase Typ-1), nicht aber die cGKII (membranständige, cGMP-abhängige Proteinkinase Typ-2) (Meyer *et al.*, 1996). Möglicherweise beeinflussen Guanylin / Uroguanylin die Genexpression in INS-1 Zellen durch die cGKI. Für den *fos*-Promotor konnte unlängst *in vitro* eine cGMP-abhängige Transaktivierung durch die cGKI demonstriert werden. Der Effekt wurde durch cGKI-abhängige Phosphorylierung CRE-bindender Proteine vermittelt (Gudi *et al.*, 1996). Da CRE-Elemente auch die Aktivität des Insulin-Gens steuern (Philippe & Missotten, 1990), wäre eine

mögliche Erklärung für den beobachteten Effekt die cGKI-abhängige Aktivierung des Insulingens.

Lunge

In der Lunge des Meerschweinchens wurde Guanylin-Immunoreaktivität in den sekretorischen Granula der Clarazellen des distalen Bronchialepithels detektiert. Dieser Befund führte zu der These, daß Guanylin in den terminalen Bronchioli die Sekretionsvorgänge benachbarter Epithelzellen (Cetin *et al.*, 1995) moduliert.

Niere

Bisher wurde eine cGMP-Generation nur in Membranpräparationen der Opossum-Niere durch das Enterotoxin STa beschrieben (White *et al.*, 1989). Fest steht, daß die Niere beim Menschen an der Elimination der zirkulierenden Guanylin/Uroguanylin-Peptide beteiligt ist (Forssmann *et al.*, 1995; Kuhn *et al.*; 1994b; Nakazato *et al.*, 1994). Bisher liegen noch keine Untersuchungen zur Lokalisation der GC-C in der Niere plazentaler Säugetiere vor.

Magen

Im humanen Magen wurde ebenfalls die Expression des CFTR-Gens im Oberflächenepithel nachgewiesen (Crawford *et al.*, 1991, Strong *et al.*, 1994). Immunhistochemische Untersuchungen am IPF konnten das hUroguanylin₈₇₋₁₁₂ in entero-endokrinen D-Zellen der Magenschleimhaut lokalisieren. Die Uroguanylin-IR war in den sekretorischen Granula der D-Zellen mit Somatostatin-IR ko-lokalisiert (Hess, 1997). Möglicherweise reguliert Uroguanylin, sofern die GC-C apikal lokalisiert ist, parakrin die CFTR-medierte Bicarbonatsekretion des Oberflächenepithels. Durch die Bicarbonatsekretion des Oberflächenepithels wird ein protektiver pH-Gradient innerhalb der Muzinschicht zwischen dem Magenlumen und der Epitheloberfläche aufrechterhalten (Wallace & Granger, 1996). Uroguanylin könnte damit eine lumenokrine Ergänzung der Somatostatin-vermittelten Wirkung darstellen, die ihrerseits zu einer Inhibierung der Gastrinfreisetzung aus den G-Zellen des Magens und damit zu einer Minderung der Säuresekretion führt (Vaupel & Ewe, 1995).

4.4 Analyse der cDNA-Sequenzen für porcines Guanylin/Uroguanylin

Durch die Identifizierung des Uroguanylins als ein potentielles, gastro-intestinales Hormon beim Menschen ergab sich die Frage nach einem Modellorganismus für weiterführende Untersuchungen. Besonders geeignet erschien hierfür, aufgrund seiner ähnlichen, gastrointestinalen Physiologie und der leichten Organverfügbarkeit, das Hausschwein. Ziel der Untersuchungen war die Klonierung der porcinen Guanylin- und der porcinen Uroguanylin-

cDNA. Nachfolgend war es angestrebt, das Expressionsmuster beider Gene in den funktionellen Abschnitten des Darms und des Magens zu charakterisieren.

Durch die Klonierung der humanen Uroguanylin-cDNA (Hill *et al.*, 1995b) wurde neben der C-terminalen Homologiedomäne ein weiterer, konservierter Sequenzabschnitt im N-Terminus der Uroguanylin/Guanylin-Prohormonsequenzen identifiziert. Für diese Sequenzabschnitte wurden degenerierte Oligonukleotide synthetisiert, die sowohl für die Amplifikation der Guanylin als auch der Uroguanylin-cDNA geeignet waren. Durch Verwendung der universalen Base Inosin in Positionen mit hoher Varianz wurde die Komplexität der synthetisierten PCR-Primer reduziert (Abb. 3.12).

Mit der erarbeiteten RT-PCR-Strategie (Abb. 3.13) erfolgte die Amplifikation von zwei cDNA-Fragmenten aus Gesamt-RNA des Jejunums, die aufgrund ihrer hohen Homologie zu den humanen Sequenzen als Teilbereiche der porcinen Guanylin- bzw. Uroguanylin-cDNA identifiziert wurden. Beide Sequenzen wurden durch nachfolgende 5'- und 3'-RACE-PCR-Experimente vervollständigt. Für die porcine Guanylin-cDNA konnte eine 555 Nukleotide und für die porcine Uroguanylin-cDNA eine 472 Nukleotide umfassende cDNA dargestellt werden (Abb. 3.14; 3.15). Die in einer Northern-Blot-Analyse intestinaler RNA-Proben (Abb. 3.16) ermittelten, relativen Transkriptgrößen (600 nt) korrelieren mit der Länge der dargestellten cDNA Sequenzen. Sowohl in der porcinen Guanylin- als auch in der porcinen Uroguanylin-cDNA beginnen die offenen Leseraster für die Präpropeptidsequenzen mit dem ersten ATG innerhalb der Sequenz. In den klonierten 5'-RACE-PCR Produkten konnte keine Längenvariation der 5'-nichttranslatierten Regionen festgestellt werden. Lediglich die Länge der experimentell eingeführten Homopolymersequenz variierte. Es wurden bis zu 70 Nukleotide lange, homopolymere Sequenzbereiche detektiert. Im 3'-Bereich beider cDNA-Sequenzen konnte ein hochkonserviertes, eukaryontisches Polyadenylierungssignal (AATAAA) stromaufwärts der in den 3'-RACE Produkten enthaltenen Poly(A)-Sequenz identifiziert werden. Aus diesen Ergebnissen läßt sich postulieren, daß die translatierten Regionen der porcinen Guanylin- und Uroguanylin-mRNAs in den dargestellten cDNA-Sequenzen vollständig repräsentiert sind.

4.5 Sequenzanalyse der porcinen Prohormonsequenzen

Die porcine Guanylin-cDNA kodiert im ersten offenen Leseraster für ein 109 Aminosäure umfassendes Polypeptid (Mr=11938) (s. Abb. 3.14). Die Peptidsequenz weist mit 71 % die bisher höchste Homologie unter den bekannten Präproguanylinen zur humanen Sequenz auf. Die charakteristischen Positionen der sechs Cysteine innerhalb der Primärsequenz sind konserviert und die vermutlich bioaktive Domäne ist C-terminal lokalisiert (s. Abb. 4.2). Vom Hydrophobizitätsmuster der ersten 21 Aminosäuren ausgehend läßt sich eine Prozessierung

des Signalpeptides nach Gly21 postulieren (von Heijne, 1983). Eine Prozessierung an dieser Position wurde durch die Isolierung der speziesspezifischen Guanylin-Prohormone beim Menschen (Kuhn, *et al.* 1993) und bei der Ratte belegt (Yamaguchi *et al.*, 1995). Innerhalb der C-terminalen, bioaktiven Domäne ist ein Threonin gegen ein Alanin ausgetauscht, eine Variation des GC-C-aktivierenden Motivs, die bereits in den Enterotoxin-Sequenzen und in der Opossum-Guanylin Sequenz identifiziert wurde (s. Abb. 1.3; Abb 1.7).

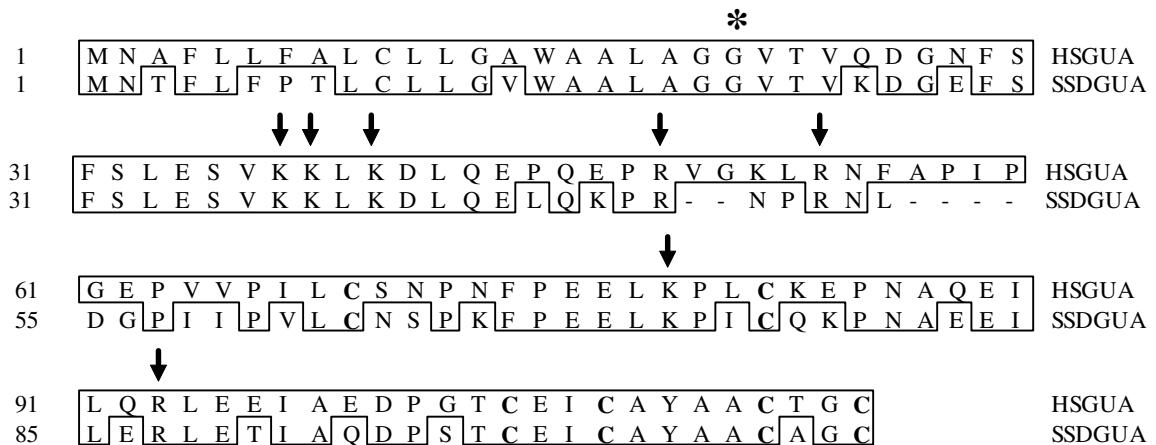


Abb. 4.2 Vergleich der porcinen und der humanen Präproguanylinsequenz. HSGUA=Humanes Präproguanylin (nach Wiegand *et al.*, 1992); SSDGUA=Porcines Präproguanylin. Die vermutliche Prozessierungsstelle des Signalpeptides ist durch einen Stern und die sechs Cysteine sind durch Fettdruck markiert. Identische Aminosäuren sind umrandet. Innerhalb der porcinen Sequenz sind verglichen mit der humanen Proguanylinsequenz sechs Aminosäuren deletiert. Arginin und Lysinpositionen innerhalb der Sequenzen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Als mögliche, dibasische Prozessierungsstelle kommt ähnlich dem humanen Guanylin die konservierte Aminosäurefolge Lys37-Lys38 in Betracht. In der nachfolgenden Sequenz sind weitere Arginine und Lysine enthalten, an denen proteolytische Modifikationen möglich sind. Die bioaktive, C-terminale Region wird durch ein Arginin in Position 87 flankiert, so daß ein weiterer, proteolytischer Abbau nach der Sekretion an dieser Position ähnlich der humanen Proguanylin-Sequenz in einem 22 Aminosäuren langen, C-terminale Fragment resultieren würde.

Versuche mit rekombinantem, humanen Proguanylin konnten für die möglichen, proteolytischen Fragmente mit intaktem C-Terminus (hGuanylin94-115, hGuanylin84-115 und hGuanylin53-115) eine Bioaktivität nachweisen, wobei die Aktivität mit zunehmender Molekülgröße abnahm (Garcia *et al.*, 1993).

Prinzipiell ist somit eine Steuerung der Guanylin-Bioaktivität durch proteolytische Modifikationen entweder im Rahmen der intrazellulären Prozessierung oder durch extrazelluläre Proteasen am Wirkort denkbar.

Als minimale, GC-C-aktivierende Struktur konnten Hidaka und Mitarbeiter die C-terminalen 13 Aminosäuren des Prohormons identifizieren. Eine Deletion des dem ersten Cysteins der bioaktiven Domäne vorgelagerten Threonins führt zu einem vollständigen Verlust der Rezeptorbindung (Hidaka, *et al.* 1993). Die Position dieses Threonins ist bei allen bisher bekannten Guanylinen konserviert und findet sich auch in der vorgestellten porcinen Sequenz wieder. Eine biologische Aktivität des porcinen Guanylins₉₅₋₁₀₉ konnte nach chemischer Synthese mittlerweile im T84-Bioassay nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung, Dr. Adermann).

Die porcine Uroguanylin-cDNA kodiert im ersten offenen Leseraster für ein 113 Aminosäuren großes Polypeptid (Mr=12045). Die Sequenzhomologie zur humanen Präpropeptidsequenz beträgt 82 %, und aufgrund des Hydrophobizitätsmusters läßt sich eine Prozessierung des porcinen Präpropeptides nach Ser₂₇ postulieren (von Heinje, 1983). Innerhalb der Präpropeptidsequenz sind, als gemeinsames Merkmal zu den Präproguanylinen, die relativen Positionen der sechs Cysteine und die möglichen dibasische Prozessierungsstellen (Lys₄₃-Lys₄₄) konserviert. Eine monobasische Prozessierung an Arg₅₇ der porcinen Sequenz würde ähnlich dem humanen Propeptid in einem 56 Aminosäuren umfassenden Peptid (Mr=5854) resultieren.

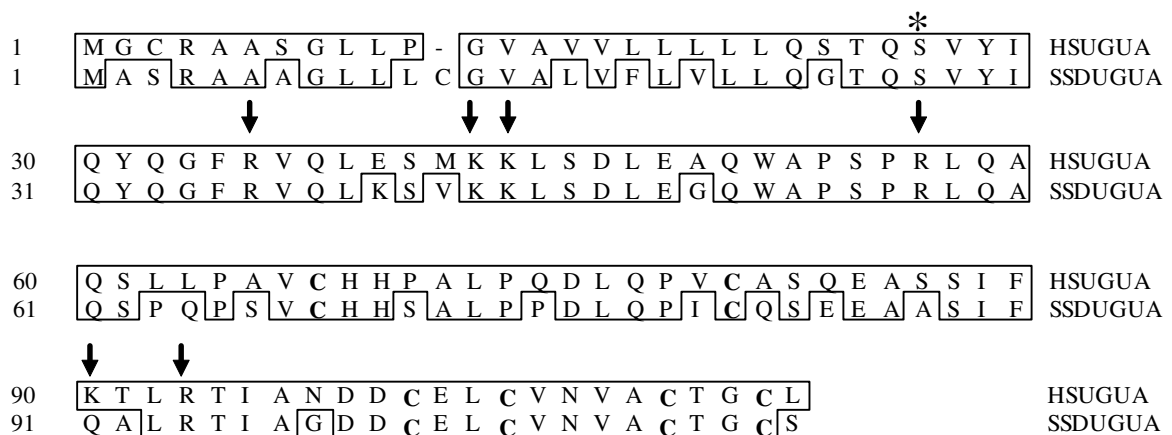


Abb. 4.3 Vergleich der porcinen und der humanen Präprouroguanylinsequenz. HSUGUA=Humanes Präprouroguanylin, SSDUGUA=Porcines Präproguanylin. Die vermutliche Prozessierungsstelle des Signalpeptides ist durch einen Sternchen und die sechs Cysteine sind durch Fettdruck markiert. Identische Aminosäuren sind umrandet, Arginin und Lysinpositionen innerhalb der Sequenzen durch Pfeile markiert.

Im Gegensatz zu den Guanylin-Prohormonsequenzen ist die GC-C-aktivierende Domäne des porcinen Prouroguanylins C-terminal um ein Serin, die des humanen Prohormons um ein Leucin verlängert (s. Abb.4.3). Die für die biologische Aktivität notwendigen Verbrückung der vier C-terminalen Cysteine in 1-3, 2-4 Konfiguration lassen für Guanylin und Uroguanylin prinzipiell zwei Topoisomere zu, wie in Abb. 4.4 dargestellt ist. Hierbei können die Aminosäuren zwischen den Cysteinpositionen 2 und 3 entweder ober- oder unterhalb der

Ebene aus den Disulfidbrücken zum Liegen kommen. Für synthetisches hGuanylin103-115 wurden im wässrigen Medium durch NMR-Messungen beide Konformationen im Verhältnis 1:1 nachgewiesen (Skelton *et al.*, 1994).

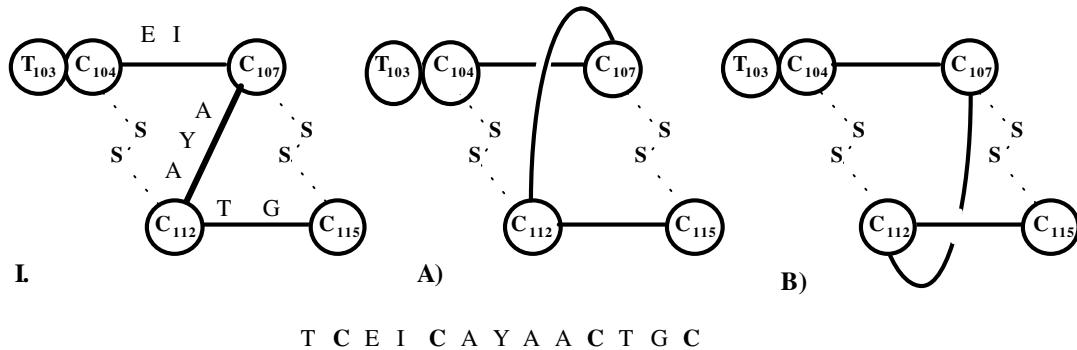


Abb. 4.4 Schematische Darstellung des verbrückten Guanylins in planarer Form (I) und die Darstellung der beiden topologischen Isoformen des hGuanylins103-115 (A, B) nach Skelton. (Skelton *et al.* 1994). Die Aminosäuresequenz des Peptides ist angegeben. In der Darstellung der planaren Form ist die Position der Aminosäuren innerhalb der Zeichnungen dargestellt.

Eine chromatographische Trennung der Topoisomere war nicht möglich, da sich das Gleichgewicht zwischen der A- und B-Form (s. Abb. 4.4) rasch wieder einstellte. Interessanterweise entspricht die räumliche Konfiguration der A-Form der des hitzestabilen Enterotoxins STa, dessen Struktur durch eine zusätzliche Disulfidbrücke stabilisiert wird. Der genaue Mechanismus der Umwandlung von der A- in die B-Form des Guanylins ist unbekannt (Skelton *et al.*, 1994). Bei synthetischem hUroguanylin97-112 mit 1-3, 2-4 Verbrückung der Cysteine bilden sich ebenfalls zwei Isomere aus, die im Gegensatz zu synthetischem hGuanylin101-115 chromatographisch getrennt werden konnten und nur eine langsame Umwandlung ineinander zeigten. Nur eines der durch RP-Chromatographie gereinigten Isomere war im T84-Bioassay aktiv, es liegen jedoch noch keine Strukturdaten vor. Für die Stabilisierung der Isomere scheint das C-terminale Leucin eine wichtige Funktion auszuüben: Nach der Deletion des Leucins konnten die Isomere, ähnlich dem Guanylin101-115 nur noch bei sehr niedrigen Temperaturen chromatographisch getrennt werden. (Chino *et al.*, 1996). Untersuchungen am IPF wiesen einen ähnlichen Effekt bei synthetischem humanen Uroguanylin89-112 (GCAP-II) nach (persönliche Mitteilung, Dr. Adermann). Ob das C-terminale Serin des porcinen Uroguanylins einen ähnlichen stabilisierenden Einfluß auf die möglichen Topoisomere besitzt, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Die biologische Funktion dieses Phänomens ist unbekannt.

4.6 Expressionsmuster des Guanylin- und des Uroguanylin-Gens in gastrointestinalen Geweben des Schweins

In den Northern-Blot-Analysen wurde eine dominante Expression beider Gene im intestinalen Gewebe des Schweins nachgewiesen. Sowohl in den proximalen (Jejunum, Ileum,) als auch in den distalen Darmabschnitten (Caecum, Colon transversum, Colon descendens) waren intensive Signale hybridisierender Transkripte im erwarteten Größenbereich (600 nt) detektierbar (Abb. 3.16). In den Gesamt-RNA-Präparationen der untersuchten extraintestinalen Geweben (Ohrspeicheldrüse, Oesophagus, Magen, Lunge, Niere) wurde in den Northern-Blot-Analysen keine Signale erhalten. Damit ist auch beim Schwein das intestinale Gewebe der primäre Ort der Guanylin- und Uroguanylin-Genexpression.

Für eine differenziertere Analyse der Guanylin-/ Uroguanylin-Genexpression im porcinen Magen wurde Gesamt-RNA aus der Mucosa der funktionellen Magenabschnitte präpariert (Fundus, Corpus, Antrum, Pars pylorica) und mittels RT-PCR-Analyse untersucht. Ebenso wurde RNA aus der Mucosa des Oesophagus direkt oberhalb des Magens und aus der Mucosa des Mageneingangs (Cardia) präpariert. Für beide Gene konnte in der Southern-Blot-Analyse der PCR-Produkte eine Expression in der Mucosa des Oesophagus und der Cardia ausgeschlossen werden. In den anderen Magenabschnitten dominierte die Expression des Uroguanylin-Gens; bereits nach 20 PCR-Zyklen sind deutliche Signale in der Southern-Blot-Analyse erkennbar. Eine schwache Expression des Guanylin-Gens wurde nach Verlängerung der Expositionszeit in der Mucosa des Fundus (35 Zyklen), des Antrum (35 Zyklen) und des Pars Pylorica (30 Zyklen) detektiert. In der Corpus-Mucosa war keine Expression des Guanylin-Gens nachweisbar. Dem Ergebnis der RT-PCR-Analyse folgend, findet eine topologisch differenzierte Expression des Guanylin- und des Uroguanylin-Gens im Magen des Schweins statt. Mittels RT-PCR konnte zudem GC-C-mRNA in allen Mucosapräparaten des Magens, nicht aber im Oesophagus nachgewiesen werden, wobei die Art des Experiments keine Aussage über das Expressionsniveau des GC-C Gens zulässt und nur als qualitativer Nachweis zu werten ist (Abb. 3.17). Es lässt sich wie bei der Interpretation der Ergebnisse aus den humanen RT-PCR-Experimenten, eine parakrine Modulation des mucosalen Elektrolythaushaltes, insbesondere der Bicarbonatsekretion, im Oberflächenepithel des Magens durch Uroguanylin vermuten. In Hinblick auf die differentielle Expression von Prohormon-Konvertasen im Corpus und Antrum des Magens (Macro *et al.*, 1996) lässt sich vermuten, daß Prouroguanylin einer topologisch differenzierten Prozessierung in der Mucosa des Magens unterliegen könnte. Eine Isolierung der Peptide aus der Mucosa der einzelnen Magenabschnitte sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.7 Rekombinante Expression der Prouroguanyline in *E.coli* BL21(DE3)

Die Expression des humanen und des porcinen Prouroguanylins verfolgten das Ziel, ausreichende Mengen der Prohormone für weiterführende, funktionsanalytische Untersuchungen am IPF zur Verfügung zu stellen. Das verwendete Verfahren sollte eine möglichst einfache Gewinnung des linearen Proteins und eine nachfolgend schnelle Charakterisierung ermöglichen. Da in den Prohormonsequenzen keine Konsensussequenzen für N-Glykosylierungen vorhanden sind, wurde eine heterologe, intrazelluläre Expression in *E.coli* durchgeführt. Als Vektor wurde das Plasmid pRSET5D (Schöpfer, 1993) verwendet. Dieses Plasmid besitzt den Vorteil, das sich das Startcodon des rekombinanten Gens direkt innerhalb einer Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *NcoI* befindet ($C\downarrow CATGG$) und damit die Planung eines Proteins mit geringem Fusionsanteil ermöglicht. Aufgrund der innerhalb der Vektorsequenz dem ATG benachbarten Guaninbase kommen in Position 2 des Translationsproduktes nur Aminosäuren (A, D, E, G, V) in Betracht, die bei einer posttranslationalen Abspaltung des Initiator-methionins eine intrazelluläre Halbwertszeit des resultierenden Proteins > 10 h garantieren (Tobias, *et al.*, 1991; Varshavsky, 1992). Die erstellten Genkonstrukte kodierten an dieser Position für Valin (Abb. 3.18). Mittels der unter 2.8.1 dargestellten PCR-Strategie wurde den ausgesuchten, kodierenden Bereichen der porcinen und der humanen cDNA (human: As 27-112; porcine: As 28-113) 5'-terminal eine synthetische DNA-Sequenz angefügt und die resultierenden DNA-Konstrukte in den Vektor pRSET5D als *NcoII/EcoRI*-Kassette inkloniert. Die Expression der Prouroguanyline erfolgte mit einem sogenannten "His-Tag" aus 6 Histidinen als N-terminalem Fusionsanteil, wie in Abb. 3.18 für das humane Prouroguanylin dargestellt. Damit wurden die Voraussetzungen für eine primäre Aufreinigung der Proteine über Nickelchelataffinitäts-Chromatographie geschaffen (Hochuli *et al.*, 1988). Die Genkonstrukte befanden sich innerhalb der erstellten Expressionsvektoren unter Kontrolle des Bakteriophagen T7-Promotors. Als Wirt für die Expression wurde der Stamm *E.coli* BL21(DE3) verwendet, der genomisch eine Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors besitzt (Studier & Moffatt, 1986). Die Expression der plasmidkodierten Genkonstrukte wurde somit indirekt durch die Kontrolle des T7-RNA Polymerase-Gens gesteuert.

Die Funktionalität des verwendeten Expressionssystems wurde wie in Abb. 3.19 für das humane His-Uroguanylin dargestellt verifiziert. Nach Induktion des T7-RNA Polymerase-Gens durch das Lactoseanalogon IPTG ließ sich die zeitliche Zunahme der Konzentration eines 11 kDa Proteins in den mit dem Plasmid p5H2-1 transformierten *E.coli* BL21(DE3)-Zellen beobachten. Eine Western-Blot-Analyse mit einem gegen den C-Terminus des humanen Prouroguanylins gerichteten Antiserum ergab, daß bereits nichtinduzierte *E.coli*-Zellen das rekombinante Protein exprimierten. Dieser Effekt wurde auch bei der Expression des porcinen His-Uroguanylins beobachtet und ist wahrscheinlich auf die basale Expression

des T7-RNA-Polymerase-Gens in dem verwendeten Wirt und die hohe Prozessivität des viralen Enzyms zurückzuführen.

Die rekombinanten Proteine wurden wie häufig bei der intrazellulären Expression von Proteinen in *E. coli* beobachtet (Mitraki & King, 1988) in Form unlöslicher, intrazellulärer Einschlußkörper akkumuliert, so daß die weitere Aufarbeitung unter denaturierenden Bedingungen erfolgte. Bereits im ersten Aufreinigungsschritt der rekombinanten Proteine über die Nickelchelataffinitäts-Chromatographie konnte durch die pH-Stufenelution eine quantitative Abtrennung der Wirtsproteine vom rekombinanten Protein erzielt werden (Abb. 3.20; Abb. 3.21). Die Verwendung einer RP-Chromatographie im zweiten Aufreinigungsschritt besaß den Vorteil, daß die rekombinanten Proteine salzfrei eluierten und somit eine direkte Analyse der HPLC-Fraktionen mittels Elektrospray-Massenspektrometrie möglich war. Hierbei wurde für beide Proteine in definierten Fraktionen der Rechromatographie die Masse des oxidierten Mono- und Dimers detektiert (3.5.2; 3.5.3). Da die Expression der Proteine intrazellulär in *E. coli*, also in einem reduzierenden Milieu (Mitraki & King, 1988) erfolgte, sind die Disulfidbrücken auf die Luftoxidation des Materials während der Aufarbeitung zurückzuführen. Zusätzlich wurden N-terminal um das Initiator-methionin verkürzte Produkte nachgewiesen. Eine Abspaltung des Initiator-methionins findet in *E. coli* durch die Methionyl-Amino-peptidase als posttranslationelle Modifikation der neusynthetisierten Polypeptidkette statt (Hirel *et al.*, 1989). Aus 5 g Biomasse wurde durch zwei Aufreinigungsschritte 1,4 mg (human) bzw. 5 mg (porcin) monomeres His-Uroguanylin dargestellt. Der N-Terminus der rekombinanten Proteine konnte durch Edman-Sequenzierung verifiziert werden. Die dargestellten Proteine wurden somit in ihrer Primärstruktur verifiziert und besaßen für die Analyse vorhandener Guanylin- bzw. Uroguanylin-Antiseren eine ausreichende Reinheit: Weder in der SDS-PAGE Kontrolle noch in der HPLC-MS-Kopplung waren hochmolekulare Verunreinigungen detektierbar. Die Ausbeute der rekombinanten Proteine über die vorgestellte Aufreinigung ist, gemessen an der mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse abgeschätzten intrazellulär vorliegenden Menge des rekombinanten Proteins, relativ gering, so daß das Aufreinigungsprotokoll eine weiteren Optimierung in nachfolgenden Untersuchungen bedarf. Prinzipiell konnte aber ein einfacher Weg der Proteingewinnung für eine primäre Analyse vorgestellt werden. Alternativ zu der Aufreinigung über Nickelchelataragrose als ersten Schritt könnten zunächst die intrazellulären Einschlußkörper aufgearbeitet werden, um in anschließenden Rückfaltungs- und Oxidations-/Reduktionsversuchen größere Mengen der Proteine darzustellen (Rudolph & Lilie; 1996).

Beide monomeren His-Uroguanyline wurden im T84-Bioassay auf GC-C stimulierende Aktivität hin untersucht. Sowohl für das porcine als auch für das humane His-Prouroguanylin Monomer konnte bei sehr hohen Konzentrationen eine geringe Bioaktivität beobachtet werden (Abb. 3.25). Diese Aktivität ließ sich durch tryptische Behandlung der rekombinanten Proteine etwa zehnfach steigern. Bei sechs Cysteinen und drei ausgebildeten,

intramolekularen Disulfidbrücken ergeben sich für das Monomer rechnerisch 15 Möglichkeiten der spontanen Verbrückung. Es war daher zu erwarten, daß nur ein geringer Anteil des rekombinanten Proteins die für die Bioaktivität notwendige, C-terminale Struktur aufwies. Bei einer vollständigen tryptischen Hydrolyse werden theoretisch aus den rekombinanten Proteinen C-terminale Fragmente abgespalten, die dem hUroguanylin94-112 bzw. dem pUroguanylin95-113 entsprechen (s. Abb. 4.3). Beide Fragmente wurden durch die Identifizierung ihrer Molekülmassen in der HPLC-MS-Chromatographie der Hydrolyseprodukten detektiert. Da für die Aktivierung der GC-C im T84-Bioassay eine charakteristische Verbrückung der C-terminalen Cysteine notwendig ist (s. Abb 1.7), muß zumindest ein Teil der rekombinanten monomeren His-Uroguanyline in 1-2, 3-5, 4-6-Verbrückung vorliegen.

Trotz der verwendeten, hohen Enzymmenge (1:30 (w/w)) wurde stets nur ein geringer Anteil der His-Prohormone hydrolysiert (Abb. 3.26). Es läßt sich vermuten, daß durch die Ausbildung von drei Disulfidbrücken im oxidierten Monomer der Zugang zu den in der Sequenz vorhandenen Arginin- und Lysinpositionen sterisch behindert ist. Ein ähnlicher Effekt wurde bei Proteinen der gastrointestinalen *Trefoil*-Peptid-Familie beobachtet, die durch die Ausbildung von drei intramolekularen Disulfidbrücken resistent gegenüber Trypsin oder Chymotrypsineinwirkung sind (Sands & Podolsky, 1996).

Die Versuche zur Bioaktivität der rekombinanten Uroguanyline, wenn auch vor dem Hintergrund der intrazellulären Expression in *E. coli* und der damit unkontrollierten Oxidation kritisch zu betrachten, können als ein indirekter Hinweis auf die Bioaktivität der 19 Aminosäuren umfassenden, C-terminalen Domäne der porcinen und der humanen Uroguanylinsequenz interpretiert werden. Es läßt sich vermuten, daß eine GC-C-stimulierende Aktivität erst durch Proteolyse der in das Darmlumen sezernierten Prohormone und der damit verbundenen Freisetzung der C-terminalen Domäne entsteht.

Die rekombinanten Proteine bieten die Möglichkeit erste Struktur/Funktionsbeziehungen der Moleküle in weiterführenden Untersuchungen zu ermitteln. So könnten beispielsweise durch Verwendung anderer Proteasen (z. B. Lys-C) und der anschließenden Rechromatographie der Hydrolyseprodukte in Verbindung mit dem T84-Bioassay weitere bioaktive Fragmente der Prohormone dargestellt werden.

4.8 Sequenzanalyse des humanen Uroguanylin-Gens

Parallel zu der Durchmusterung der Colon-cDNA-Bank wurde mit der gleichen Gensonde eine humane Genbank durchmustert. Aus fünf initialen Hybridisierungssignalen wurde durch weitere Vereinzlungsschritte der Phage phHUG3-1 isoliert. In einer Southern-Blot-Analyse der Phageninsertion nach *Sst*-I-Hydrolyse gab ein 1,5 kbp großes *Sst*-I-Fragment eine intensives Hybridisierungssignal (Abb. 3.27). Die Sequenzanalyse des Fragmentes bestätigte

die Klonierung eines Teilfragmentes des humanen Uroguanylin-Gens. Durch die Sequenzierung konnte die Phagenpolylinkersequenz in der gleichen Orientierung wie der (+)-Strang des Gens innerhalb des subklonierten *Sst-I*-Fragmentes lokalisiert werden. Der Phagenpolylinker flankierte einen Teilbereich eines Intron des Gens, wie durch einen Vergleich mit der humanen cDNA ermittelt wurde. Hieraus konnte geschlossen werden, daß der isolierte Phagenklon nur eine im 5'-Bereich trunkeierte Kopie des humanen Uroguanylin-Gens enthielt. Alle weiteren *Sst-I*-Restriktionsfragmente der Phageninsertion waren somit der 3'-flankierenden Region des Gens zuzurechnen.

Alternativ zur erneuten Durchmusterung einer Genbank wurde die fehlende 5'-Region des Gens mittels einer speziellen PCR-Methode (Siebert *et al.*, 1995) amplifiziert. Um Sequenzfehler, die durch den Fehleinbau von Nukleotiden durch die verwendete *Tth*-DNA-Polymerase während der Reaktion entstehen können, auszuschließen, wurde die Sequenz des PCR-Produktes durch direkte Sequenzierung des aufgereinigten Produktes wie auch durch Sequenzierung mehrerer unabhängiger Subklone ermittelt (3.6). Zusammen mit der Sequenz des subklonierten *Sst*-Fragmentes des Phagen pHGU3-1 konnte eine 3600 Nukleotide umfassende genomische Sequenz ermittelt werden, in der der transkribierte Bereich des Gens vollständig repräsentiert ist.

Die durch den Vergleich mit der cDNA-Sequenz (Hill *et al.*, 1995) ermittelten Exon/Intron-Übergänge (s. Tab. 3.4) entsprechen dem für Eukaryonten ermittelten Consensus Exon|GTRAG--Intron--AG|Exon (Mount, 1982), wonach ein Intron am 5'-Terminus immer mit der Sequenz GT<Purin>AG beginnt und mit einem AG am 3'-Terminus endet. Die Splicing-Donor- und die Splicing-Akzeptor-Base der Exons sind variabel, gehäuft treten jedoch Purine auf (Padgett, 1986). Das humane Uroguanylin-Gen setzt sich aus drei Exons zusammen. Es konnte keine Abweichung der cDNA von den Exonsequenzen des Gens festgestellt werden. Dadurch wurde zusätzlich die Primärsequenz des Uroguanylin-Vorläufers bestätigt.

Das humane Uroguanylin-Gen besitzt eine auffällige, strukturelle Homologie zum humanen Guanylin-Gen (Hill *et al.*, 1995a) sowohl bezüglich der Exon/Intron-Verteilung in Hinblick auf die funktionellen Komponenten des Prouroguanylins als auch in Hinblick auf die Introngrößen, wie in der nachfolgenden Abbildung illustriert ist.

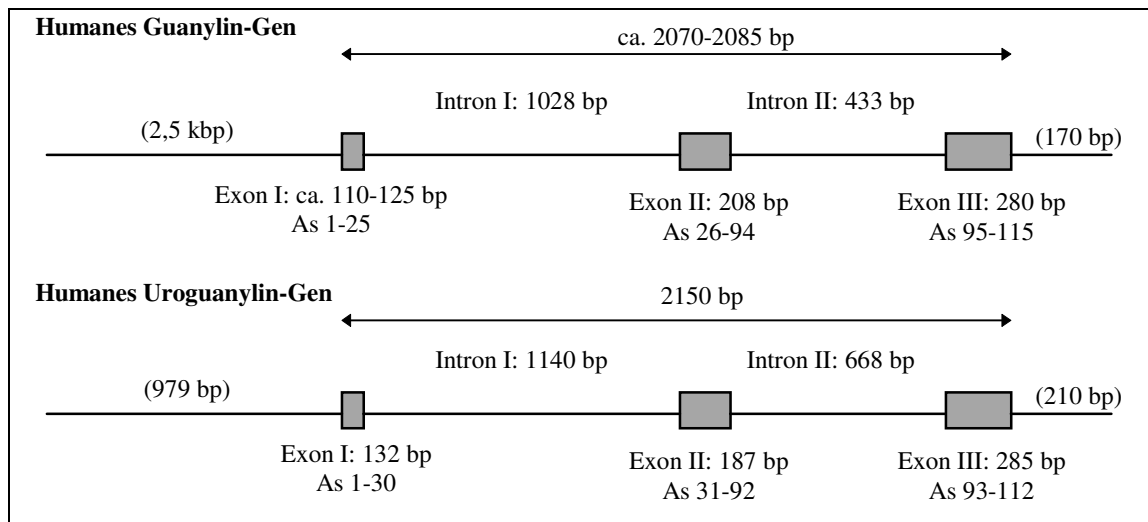


Abb. 4.5 Strukturvergleich der humanen Gene für Guanylin und Uroguanylin. Die Exon- und Introngrößen sowie die durch die Exons kodierte Aminosäuren der jeweiligen Vorläufer sind angegeben. Die Größe des transkribierten Bereichs ist angegeben und die zusätzlich verfügbare Sequenzinformation der 5'- und der 3'-flankierenden Regionen aus den Datenbankeintragungen der Gene sind in Klammern gesetzt. Im Falle des Guanylin-Gens konnte der Transkriptionsstartpunkt durch RT-PCR-Experimente nur auf einen Bereich von 20 Nukleotiden eingegrenzt werden (Hill *et al.*, 1995a).

Die Diskussion, ob Exons generell für funktionelle oder strukturelle Komponenten eines Proteins kodieren, wird kontrovers geführt (Traut, 1988; Teller *et al.*, 1994; Long *et al.*, 1995). Im Falle des humanen Guanylin- und Uroguanylin-Gens ist es jedoch auffallend, daß die vermutlichen Prozessierungsstellen der Signalpeptide im Exon I und der GC-C-aktivierende Teil der Hormone im Exon III lokalisiert sind. Das gleiche Exon/Intronmuster findet sich im Guanylin-Gen der Maus wieder (Sciaky *et al.*, 1994).

Trotz der strukturellen Übereinstimmungen ist die Sequenzhomologie zwischen beiden Genen insgesamt sehr gering (<22 %). Ein individueller Vergleich der Exon- und Intronsequenzen konnte ebenfalls keine größeren, konservierten Sequenzabschnitte identifizieren.

Zur Identifizierung der Promotorsequenz wurde eine Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes mittels Primer-Extension aus Ileum-Gesamt-RNA durchgeführt (Abb. 3.29). Vorab durchgeführte Northern-Blot-Analysen hatten eine hohe Expression des Uroguanylin-Gens im Ileum des Menschen gezeigt. In dem Autoradiogramm der Primer Extension-Analyse korrelierte ein Thymidinrest 42 Nukleotide stromaufwärts des ATG-Startkodons mit dem aus der Ileum-RNA erhaltenen Signal, was in Übereinstimmung mit aus den 5'-RACE-Experimenten erhaltenen cDNA-Fragmenten ist. Der längste durch die RACE-Experimente ermittelte, 5'-nichttranslatierte Sequenzabschnitt der Uroguanylin-cDNA endet ein Nukleotid vor dem Transkriptionsstartpunkt. Aus den Ergebnissen der Primer-Extension und der RACE-PCR läßt sich folgern, daß der klonierte Sequenzbereich stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes den Promotor des Uroguanylin-Gens repräsentiert. Diese 976 Nukleotide umfassende Region ermöglicht eine funktionelle Charakterisierung des Promotors in nachfolgenden Untersuchungen. Innerhalb des Uroguanylin-Promotors ist an Position -30

ein Sequenzmotiv (TATAAGG) mit Ähnlichkeit zur eukaryontischen TATA-Box-Konsensussequenz lokalisiert. Typischerweise befindet sich bei eukaryontischen Typ-II Promotoren die TATA-Box 25 bis 35 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartes. Weiterhin besitzt die Region -60 bis -100 des Uroguanylin-Gen Promotors einen hohen GC-Gehalt, ein weiteres Merkmal für Typ-II Promotoren eukaryontischer Gene (Nikolov & Burley, 1997).

An diese GC-reichen Sequenzmotive (GC-Boxen) binden Transkriptionsfaktoren, die die Bindung des RNA-Polymerase-II Initiationskomplexes an die DNA stabilisieren. Innerhalb dieser Region wurden durch eine computergestützten Analyse Erkennungssequenzen für bereits charakterisierte, GC-Box-bindende Transkriptionsfaktoren identifiziert: SP-1 (Kadonaga, 1987), GCF (Kageyama *et al.*, 1989) und AP-2 (Mitchell *et al.*, 1987). Weiterhin konnten in der Promotorsequenz des Uroguanylin-Gens potentielle CREB- (Sassone-Corsi, 1992; Benbrook & Jones, 1994; Kim & Struhl, 1995), E47- (Sloan *et al.*, 1996; Dear *et al.* 1997) und MyoD-Bindungsstellen (Lassar *et al.*, 1991) identifiziert werden (Tab. 3.5).

Die Relevanz der beschriebenen Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive im Uroguanylin-Promotor muß durch weiterführende Untersuchungen verifiziert werden. Im Kontext des intestinalen Expressionsmusters des Gens können jedoch, basierend auf den vermutlichen Bindungsmotiven, einige grundlegende Mechanismen der möglichen Genexpression erörtert werden:

Das Vorkommen potentieller CREB-Bindungsstellen im proximalen Promotorbereich (s. Tab 3.5) weist auf eine cAMP-abhängige Regulation des Uroguanylin-Gens durch CREs (*cAMP-responsive-elements*) hin. Alle bisher bekannten CRE-bindende Proteine (CRE-BPs), sind Mitglieder der Familie der basischen Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren (Sassone-Corsi, 1992). Mit Hilfe der bZIP-Domänen können die Mitglieder der CRE-BP-Familie dimerisieren, so daß abhängig vom zellulären Kontext der exprimierten CRE-BPs Einfluß auf die Genregulation genommen wird (Lee & Masson, 1993). Die Bindungsaffinitäten der CRE-BP werden durch pKA-vermittelte Phosphorylierungen gesteuert. Da hohe cGMP-Konzentrationen auch die pKA aktivieren (Chao *et al.*, 1994) und interessanterweise vor kurzem die cGMP-abhängige Modulation von CRE-BP durch die cytosolische, cGMP-abhängige Proteinkinase (cGKI) nachgewiesen wurde (Gudi *et al.*, 1996), könnte das Uroguanylin-Gen im intestinalen Epithel einer autokrinen Kontrolle unterliegen.

In der Promotorsequenz befinden sich weiterhin potentielle Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor E47, der durch das E2A-Gen kodiert werden. Ursprünglich wurde E47 als ein Protein identifiziert, daß regulatorische Elemente im Promotorbereich der Immunglobulin-Gene und des Insulingens bindet. E47 gehört zur Klasse der basischen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren (bHLH-Proteine) und wird in einer Vielzahl von Geweben konstitutiv exprimiert. Eine *gewebespezifische* Aktivierung bestimmter Genen durch das E47-Protein wird über die Dimerisierung mit zellspezifischen Mitgliedern der bHLH-Familie

erreicht. Eine zentrale Rolle der bHLH-Genfamilie an zellulären Differenzierungsprozessen wird vermutet (Aronheim *et al.*, 1993; Sloan *et al.*, 1996, Dear *et al.*, 1997). In diesem Zusammenhang muß bedacht werden, daß das intestinale Epithel sich durch eine besonders hohe Regenerationsrate mit kurzen Zellzykluszeiten auszeichnet, wobei die Epithelzellen durch Proliferation an der Basis der Krypten lokalisierter Stammzellen ständig erneuert werden. Die mitotische Aktivität nimmt von der Basis der Krypte zum Oberflächenepithel hin ab. Zellen des Oberflächenepithels sind terminal differenziert und besitzen keine mitotische Aktivität. Aus diesen Stammzellen gehen vier prinzipielle Zelllinien des intestinalen Epithels hervor: die absorptiven, polarisierten Enterozyten, die schleimproduzierenden Becherzellen, die Paneth- und die entero-endokrinen Zellen. Entlang der Kryptenachse findet demnach eine topologisch gesteuerte Genexpression statt, die die Differenzierungsprozesse in die jeweiligen Zelltypen steuert. (Gordon, 1989; Potten & Loeffler, 1990; Gordon, 1993; Traber&Silberg, 1996).

Kürzlich wurde durch die Arbeitsgruppe von Mutoh (1997) ein bHLH-Protein charakterisiert (BETA-2), das durch Heterodimerisierung mit E47 die zellspezifische Expression des Sekretin-Gens der Ratte in entero-endokrinen Zellen des intestinalen Epithels steuert. Sekretin wird in den sogenannten S-Zellen des Gastro-entero-pancreatischen Systems (GEP) gebildet (Forssmann, 1969; Grube & Forssmann, 1994) und wirkt inhibitorisch auf die HCl-Sekretion des Magens. Zudem stimuliert Sekretin cAMP-abhängig die Bicarbonatsekretion des Pankreas (Mutt, 1988; Vaupel & Ewe, 1995). Hauptort der Sekretin-Genexpression bei der Ratte ist der Dünndarm, und für die zellspezifische Expression ist ein kurzer, GC-reicher Sequenzabschnitt oberhalb des Transkriptionsstartpunktes (-53 bis -174) ausreichend. In diesem Sequenzbereich ist das E47/BETA-2-Bindungsmotiv lokalisiert (Wheeler *et al.*, 1992), das die zellspezifische Expression steuert. Im Uroguanylin-Genpromotor befinden sich ebenfalls vier Sequenzmotive mit der für das Sekretin ermittelten E47/BETA-2-Bindungssequenz (CAGCTG), wobei eines dieser Sequenzmotive ähnlich dem Sekretin in dem GC-reichen Sequenzabschnitt des Promotors nahe dem Transkriptionsstartpunkt in Position -117 bis -112 lokalisiert ist.

Da das Uroguanylin-Peptid mittels immunhistochemischer Untersuchungen ebenfalls in entero-endokrinen Zellen der intestinalen Mucosa lokalisiert wurde (Hess *et al.* 1995) und sich in der vorliegenden Arbeit eine hohe Expression des Gens in den proximalen Abschnitten des Darms nachweisen ließ, könnten die im Promotorbereich detektierten Bindungsmotive für bHLH-Transkriptionsfaktoren (AP-4, E47, MyoD) eine wichtige Rolle bei der Regulation der zellspezifischen Expression des Uroguanylin-Gens, insbesondere in den entero-endokrinen Zellen, einnehmen.

Überraschenderweise ist die Homologie zwischen den Promotorsequenzen des humanen Guanylin- und Uroguanylin-Gens gering (<20%), obwohl beide Gene im intestinalen Epithel koexprimiert werden. In der Promotorregion beider Gene befinden sich jedoch Bindungsmotive für bHLH-Proteine der E2A-Familie. Eine vergleichende Untersuchung des

transkriptionellen Aktivierungspotentials beider Promotorsequenzen in intestinalen Zelllinien, die unterschiedlichen Differenzierungsgrade repräsentieren, könnte somit zur Identifizierung der individuellen *intestinalen* Kontrollelemente der Gene und zellspezifischer Transkriptionsfaktoren führen.

Beispielsweise wurde für den Promotor des Guanylin-Gens im Reporter-Gen-Assay bereits eine Aktivierung in der T84-Colon-Karzinom-Zelllinie nachgewiesen (Pardigol *et al.*, 1996). Zuvor war eine geringe Expression des Guanylin-Gens in diesen Zellen detektiert worden. T84-Zellen exprimieren endogen das GC-C-Gen und sind für die Identifizierung der bisher bekannten Peptide der Guanylin-Familie verwendet worden (Currie *et al.*, 1992, Kuhn *et al.*, 1993; Hamra *et al.*, 1993; Kita *et al.*, 1994; Hess *et al.*, 1995).

In neueren Untersuchungen konnte auch eine Funktionalität des Uroguanylin-Promotors im Reporter-Gen-Assay mit T84-Zellen nachgewiesen werden, wobei die gemessene Aktivität im Vergleich zum Guanylin-Promotor jedoch deutlich geringer war (persönliche Mitteilung, Dr. Mägert).

Da T84-Zellen nach ihren zytologischen Charakteristika Enterozyten des Oberflächenepithels bzw. der oberen Kryptenregion, nicht aber entero-endokrine Zellen repräsentieren, existieren für das Uroguanylin- wie auch für das Guanylin-Gen im intestinalen Epithel möglicherweise zwei Lokalisationen der zellulären Expression: Entero-endokrine Zellen, die die Prohormone in sekretorischen Granula speichern und die Genexpression entsprechend regulieren und Enterozyten des Oberflächenepithels, die eine kontinuierliche mRNA-Produktion für die konstitutive Sekretion der Proteine in das Darmlumen benötigen. Eine differenzierte Analyse des zellulären Ortes der Genexpression durch den Nachweis der mRNA mittels *in situ*-Hybridisierung scheint hier sinnvoll.

4.9 Ausblick

Guanylin und Uroguanylin sind die ersten *endogenen* Mitglieder einer neuen, *gastro-intestinalen* Peptidfamilie, die spezifisch die Guanylatzyklase-C binden und aktivieren. Die bioaktiven Domänen der Prohormone sind in den C-Termini lokalisiert und werden wahrscheinlich durch Proteolyse der Prohormone im Darmlumen freigesetzt. Die genaue Prozessierung der Peptide ist jedoch unbekannt. Über die GC-C wird im intestinalen Epithel luminokrin der Elektrolythaushalt moduliert. Auffallend ist, daß die bisher identifizierten Komponenten (GC-C, CFTR, CGK-II; s. Abb. 1.5) des intestinalen Signaltransduktionsweges in der apikalen Zellmembran der Enterozyten kolokalisiert sind. Es läßt sich vermuten, daß dieses System in der apikalen Membranstruktur der Enterozyten, den Mikrovilli, ein schnelles Reaktionssystem darstellt, das auf lokale Reize an der apikalen Zelloberfläche reagiert. Neben der membranständigen Proteinkinase (CGKII) als Verstärker der cGMP-Antwort müssen auch andere, intrazelluläre oder membranständige cGMP-Rezeptorproteine in zukünftige

Untersuchungen miteinbezogen werden, beispielsweise cGMP-abhängige Ionenkanäle oder cGMP-abhängig regulierte Phosphodiesterasen. Weiterhin ist die endokrine Funktion der Peptide unbekannt. Bisherige Untersuchungen haben die GC-C nur in bezüglich der Zirkulation unzugänglichen Regionen detektiert. Es besteht die Möglichkeit, daß proteolytische Fragmente der Prohormone bisher noch unentdeckte Funktionen besitzen. In den Untersuchungen zur Isolierung der Peptide wurde stets der T84-Bioassay verwendet. Potentielle, zirkulierende Fragmente der Prohormone ohne Bioaktivität im T84-Assay werden hierbei nicht erfasst. Für die Detektion solcher Fragmente wäre die Generation geeigneter Antiseren, die das mögliche Proteolysemuster der Prohormone berücksichtigen, von Vorteil. Die Kenntnis der Primärstruktur des Präprouroguanylins und des Präproguanylins des Menschen und des Schweins ermöglicht in diesem Zusammenhang weiterführende Untersuchungen.

5. 1 Zusammenfassung

Schlagwörter: Guanylin, Uroguanylin, Guanylyl-Cyclase-C

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des humanen Uroguanylin-Gens. Ausgehend von der durch Kita *et al.* (1994) publizierten, 16 Aminosäuren umfassenden Peptidesequenz wurden zunächst 3'-RACE-Experimente aus Gesamt-RNA-Präparationen verschiedener humaner Gewebe durchgeführt. Hierbei wurde aus Colon-Gesamt-RNA das 3'-terminale Fragment einer cDNA kloniert, die für Uroguanylin oder ein homologes Protein kodierte. Durch nachfolgende 5'-RACE-Experimente wurde die Sequenz vervollständigt und als humane Uroguanylin-cDNA identifiziert. Die dargestellte cDNA kodiert ein 112 Aminosäuren langes Vorläuferprotein, in dessen C-Terminus die Uroguanylin-Peptidsequenz lokalisiert ist. Trotz der geringen Sequenzidentität zwischen der Guanylin- und Uroguanylin-Prohormonsequenz sind die relativen Positionen der sechs Cysteine, ein zehn Aminosäuren umfassendes Sequenzmotiv mit einer potentiellen, dibasischen Prozessierungsstelle und die GC-C-aktivierende Domäne konserviert.

Durch die Kenntnis der humanen Uroguanylin-cDNA konnte eine RACE-PCR-Strategie erstellt werden, die zur Aufklärung der porcinen Guanylin- und Uroguanylin-cDNA-Sequenzen führte. Die porcinen Präpropeptidsequenzen weisen eine Sequenzidentität von 73% (Guanylin) und 80% (Uroguanylin) zu den humanen Sequenzen auf.

In nachfolgenden Northern-Blot- und RT-PCR-Analysen wurde die Uroguanylin- und Guanylin-Genexpression verglichen. Beide Gene werden in hohem Maß im intestinalen Gewebe koexprimiert. Erste Untersuchungen an Mucosa-Präparationen des porcinen Magens deuten auf eine topologisch differenzierte Expression der Gene im Magen hin, wobei die Uroguanylin-Genexpression dominiert.

Zur Überprüfung vorhandener Antiseren und für erste funktionelle Untersuchungen wurde eine heterologe Expression des humanen und des porcinen Prouroguanylins mit einem Histidin-Hexamer als N-terminalem Fusionsanteil in *E.coli* BL21(DE3) durchgeführt. Die durch Nickelchelat- und RP-Chromatographie aufgereinigten Proteine wurden in ihrer Primärstruktur verifiziert. Im T84-Bioassay wiesen die rekombinanten Proteine nach tryptischer Hydrolyse eine cGMP-stimulierende Aktivität auf.

Das humane Uroguanylin-Gen wurde kloniert und sequenziert. In der dargestellten Sequenz von 3600 Basenpaaren ist die transkribierte Region des Gens, die sich aus drei Exons und zwei Introns zusammensetzt, vollständig repräsentiert. Die Uroguanylin-cDNA stimmt vollständig mit den Exonsequenzen des Gens überein. Durch die Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes des Gens wurden 976 Nukleotide der dargestellten Sequenz als Promotorregion identifiziert. Obwohl das Uroguanylin-Gen dem Guanylin-Gen strukturell in Bezug auf Exon/Intronverteilung und -größe homolog ist, konnten keine signifikant konservierten Sequenzbereiche zwischen den Genen identifiziert werden.

5. 2 Summary

Keywords: Guanylin, Uroguanylin, Guanylyl-Cyclase-C

The primary goal of this work was to characterize the human uroguanylin gene. Starting from the peptide sequence published by Kita et al. (1994) that comprised 16 amino acids, at first 3'-RACE experiments from total RNA preparations of various human tissues were carried out. In that process the 3'-terminal fragment of a cDNA which coded for uroguanylin or a homologous protein was cloned from colon total RNA. By later 5'-RACE experiments, the sequence was completed and identified as human uroguanylin cDNA. The shown cDNA codes a 112 amino acids long precursor protein in the C-terminus of which the uroguanylin peptide sequence is situated. In spite of the low sequence identity between the guanylin and uroguanylin prohormone sequences the relative positions of the six cysteins, a 10 amino acids comprising sequence motive with a potential, dibasic processing position, and the GC-C-activating domain were conserved. Knowing the human uroguanylin cDNA a RACE-PCR strategy could be defined that lead to clarifying the porcine guanylin and uroguanylin cDNA sequences. The porcine pre-propeptide sequences show a sequence identity of 73 percent (guanylin) and 80 percent (uroguanylin) in relation to the human sequences. In later Northern-Blot and RT-PCR analysis the uroguanylin and guanylin gene expressions were compared. Both genes are coexpressed to a large extent in the intestinal tissue. First investigations with mucosa preparations of the porcine stomach indicate a topologically differentiated expression of the genes in the stomach. Here the uroguanylin gene expression is dominant. For checking existing antisera and for first functional investigations a heterologous expression of human and porcine pro-uroguanylin was made with a histidin hexameter as an N-terminal fusion portion in *E.coli* BL21 (DE3). The proteins cleansed by nickel chelate and RP chromatography were verified in their primary structure. In the T84 bioassay the recombinant proteins showed a cGMP-stimulant activity after tryptic hydrolysis. The human uroguanylin gene was cloned and sequenced. In the shown sequence of 3600 base pairs the transcribed gene region that is composed of three exons and two introns is completely represented. The uroguanylin cDNA correlates completely with the exon sequences of the gene. By identifying the transcriptional starting point of the gene 976 nucleotides of the shown sequence were identified as promoter region. Although the uroguanylin gene is structurally homologous to the guanylin gene with regard to exon-intron distribution and size no significantly conserved sequence areas between the genes could be identified.

6. Literaturverzeichnis

- Alting-Mees, M.A. & Short, J.M. (1989). pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids. Res.* **17** (22), 9494
- Anderson, M.P., Sheppard, D.N., Berger, H.A. & Welsh, M.J. (1992). Chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis airway and intestinal epithelia. *Am. J. Physiol.* **263**, L1-14.
- Aronheim, A., Shiran, R., Rosen, A. & Walker, M.D. (1993). Cell-specific expression of helix-loop-helix transcription factors encoded by the E2A gene. *Nucleic Acids. Res.* **21**, 1601-1606.
- Barrett, K.E. (1993). Positive and negative regulation of chloride secretion in T84 cells. *Am. J. Physiol.* **265**, C859-C868.
- Baxter, P.S., Goldhill, J., Hardcastle, J., Hardcastle, P.T., & Taylor, C.J. (1988). Accounting for cystic fibrosis. *Nature* **335**, 211
- Benbrook, D.M. & Jones, N.C. (1994). Different binding specificities and transactivation of variant CRE's by CREB complexes. *Nucleic Acids. Res.* **22**, 1463-1469.
- Benton, W.D. & Davis, R.W. (1977). Screening lambda recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* **196**, 180-182.
- Berg, J.M. (1992). Sp1 and the subfamily of zinc finger proteins with guanine-rich binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 11109-11110.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* Strain with β -Galactosidase selection. *Biotechniques*, **5**, 4: 376-379
- Carpenter, C.C. (1972). Cholera and other enterotoxin-related diarrheal diseases. *J. Infect. Dis.* **126**, 551-564.
- Cetin, Y., Kuhn, M., Kulaksiz, H., Adermann, K., Bargsten, G., Grube, D. & Forssmann, W.G. (1994). Enterochromaffin cells of the digestive system: cellular source of guanylin, a guanylate cyclase-activating peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 2935-2939.
- Cetin, Y., Kulaksiz, H., Redecker, P., Bargsten, G., Adermann, K., Grube, D. & Forssmann, W.G. (1995). Bronchiolar nonciliated secretory (Clara) cells: source of guanylin in the mammalian lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5925-5929.
- Chan, S.K. & Giannella, R.A. (1981). Amino acid sequence of heat-stable enterotoxin produced by *Escherichia coli* pathogenic for man. *J. Biol. Chem.* **256**, 7744-7746.
- Chao, A.C., de Sauvage, F.J., Dong, Y.J., Wagner, J.A., Goeddel, D.V. & Gardner, P. (1994). Activation of intestinal CFTR Cl⁻ channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J.* **13**, 1065-1072.

- Chino, N., Kubo, S., Miyazato, M., Nakazato, M., Kangawa, K. & Sakakibara, S. (1996). Generation of two isomers with the same disulfide connectivity during disulfide bond formation of human uroguanylin. *Lett. Pep. Sci.*, **3**, 45-52
- Chu, S.H. & Walker, W.A. (1993). Bacterial toxin interaction with the developing intestine. *Gastroenterology* **104**, 916-925.
- Cohen, M.B., Thompson, M.R., Overmann, G.J. & Giannella, R.A. (1987). Association and dissociation of Escherichia coli heat-stable enterotoxin from rat brush border membrane receptors. *Infect. Immun.* **55**, 329-334.
- Cohen, M.B., Witte, D.P., Hawkins, J.A. & Currie, M.G. (1995). Immunohistochemical localization of guanylin in the rat small intestine and colon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 803-808.
- Cohn, J.A., Nairn, A.C., Marino, C.R., Melhus, O. & Kole, J. (1992). Characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in a colonocyte cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 2340-2344.
- Crawford, I., Maloney, P.C., Zeitlin, P.L., Guggino, W.B., Hyde, S.C., Turley, H., Gatter, K.C., Harris, A. & Higgins, C.F. (1991). Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 9262-9266.
- Currie, M.G., Fok, K.F., Kato, J., Moore, R.J., Hamra, F.K., Duffin, K.L. & Smith, C.E. (1992). Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 947-951.
- Cuthbert, A.W., Hickman, M.E., MacVinish, L.J., Evans, M.J., Colledge, W.H., Ratcliff, R., Seale, P.W. & Humphrey, P.P. (1994). Chloride secretion in response to guanylin in colonic epithelial from normal and transgenic cystic fibrosis mice. *Br. J. Pharmacol.* **112**, 31-36.
- Dawson, D.C. & Richards, N.W. (1990). Basolateral K conductance: role in regulation of NaCl absorption and secretion. *Am. J. Physiol.* **259**, C181-C195.
- de Sauvage, F.J., Camerato, T.R. & Goeddel, D.V. (1991). Primary structure and functional expression of the human receptor for Escherichia coli heat-stable enterotoxin. *J. Biol. Chem.* **266**, 17912-17918.
- de Sauvage, F.J., Keshav, S., Kuang, W.J., Gillett, N., Henzel, W. & Goeddel, D.V. (1992). Precursor structure, expression, and tissue distribution of human guanylin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 9089-9093.
- Dear, T.N., Hainzl, T., Follo, M., Nehls, M., Wilmore, H., Matena, K. & Boehm, T. (1997). Identification of interaction partners for the basic-helix-loop-helix protein E47. *Oncogene* **14**, 891-898.
- Deshmane, S.P., Carrithers, S.L., Parkinson, S.J., Crupper, S.S., Robertson, D.C. & Waldman, S.A. (1995). Rat guanylyl cyclase C expressed in COS-7 cells exhibits multiple affinities for Escherichia coli heat-stable enterotoxin. *Biochemistry* **34**, 9095-9102.

- Devi, L. (1991). Consensus sequence for processing of peptide precursors at monobasic sites. *FEBS Lett.* **280**, 189-194.
- Dray-Charier, N., Paul, A., Veissiere, D., Mergey, M., Scoazec, J.Y., Capeau, J., Brahim-Horn, C. & Housset, C. (1995). Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human gallbladder epithelial cells. *Lab. Invest.* **73**, 828-836.
- Drenckhahn, D. & Fleischhauer, K. (1994). Dünndarm. *Benninghoff; Anatomie: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*. 15. Auflage, Band 1, S867-885. Verlag Urban&Schwarzenberg München; Wien; Baltimore (ISBN 3-541-00245-X)
- Drewett, J.G. & Garbers, D.L. (1994). The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands. *Endocr. Rev.* **15**, 135-162.
- Dreyfus, L.A. & Robertson, D.C. (1984). Solubilization and partial characterization of the intestinal receptor for Escherichia coli heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.* **46**, 537-543.
- Faisst, S. & Meyer, S. (1992). Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic. Acids. Res.* **20**, 3-26.
- Fiedler, M.A., Nemezc, Z.K. & Shull, G.E. (1992). Cloning and sequence analysis of rat cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am. J. Physiol.* **262**, L779-L784.
- Field, M. & Semrad, C.E. (1993). Toxicogenic diarrheas, congenital diarrheas, and cystic fibrosis: disorders of intestinal ion transport. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 631-655.
- Field, M., Graf, L.H., Jr., Laird, W.J. & Smith, P.L. (1978). Heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: in vitro effects onn guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 2800-2804.
- Field, M., Rao, M.C. & Chang, E.B. (1989). Intestinal electrolyte transport and diarrheal disease (2). *N. Engl. J. Med.* **321**, 879-883.
- Fleischhauer, K. & Drenckhahn, D.(1994). Dickdarm. *Benninghoff; Anatomie: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*. 15. Auflage, Band 1, S886-900. Verlag Urban&Schwarzenberg München; Wien; Baltimore (ISBN 3-541-00245-X)
- Forssmann, W.G., Cetin, Y., Hill, O., Mägert, H.J., Kuhn, M., Kulaksiz, H. & Rechkemmer G. (1995). Review: guanylin is a new gastrointestinal hormone regulating water-electrolyte transport in the gut. In: *Symposium on gastrointestinal tract and endocrine system* (editors Singer, M.V. & Ziegler, R.), Falk Symposium **77**, 279-292, MTP Press, Lancaster UK.
- Forssmann, W.G., Orci, L., Pictet, R., Renold, A.E. & Rouiller, C. (1969). The endocrine cells in the epithelium of the gastrointestinal mucosa of the rat. An electron microscope study. *J. Cell Biol.* **40**, 692-715.
- Forte, L.R., Krause, W.J. & Freeman, R.H. (1989). Escherichia coli enterotoxin receptors: localization in opossum kidney, intestine, and testis. *Am. J. Physiol.* **257**, F874-F881.

- Forte, L.R., Thorne, P.K., Eber, S.L., Krause, W.J., Freeman, R.H., Francis, S.H. & Corbin, J.D. (1992). Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am. J. Physiol.* **263**, C607-C615.
- Frantz, J.C., Jaso-Friedman, L. & Robertson, D.C. (1984). Binding of Escherichia coli heat-stable enterotoxin to rat intestinal cells and brush border membranes. *Infect. Immun.* **43**, 622-630.
- Frischauf, A.M., Lehrach, H., Poustka, A. & Murray, N. (1983). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Biol. Chem.* **263**, 16682-16687
- Frohman, M.A., Dush, M.K. & Martin, G.R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 8998-9002.
- Fuller, C.M. & Benos, D.J. (1992). CFTR!. *Am. J. Physiol.* **263**, C267-C286.
- Garcia, K.C., de Sauvage, F.J., Struble, M., Henzel, W., Reilly, D. & Goeddel, D.V. (1993). Processing and characterization of human proguanylin expressed in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **268**, 22397-22401.
- Giannella, R.A. & Drake, K.W. (1979). Effect of purified Escherichia coli heat-stable enterotoxin on intestinal cyclic nucleotide metabolism and fluid secretion. *Infect. Immun.* **24**, 19-23.
- Giannella, R.A. (1995). Escherichia coli heat-stable enterotoxins, guanylin, and their receptors: what are they and what do they do?. *J. Lab. Clin. Med.* **125**, 173-181.
- Gordon, J.I. (1989). Intestinal epithelial differentiation: new insights from chimeric and transgenic mice. *J. Cell Biol.* **108**, 1187-1194.
- Gordon, J.I. (1993). Understanding gastrointestinal epithelial cell biology: lessons from mice with help from worms and flies. *Gastroenterology* **105**, 315-324.
- Grube, R. & Forssmann, W.G. (1994). Die disseminierten endokrinen Zellen. *Benninghoff; Anatomie: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*. 15. Auflage, Band 1, S209-217. Verlag Urban&Schwarzenberg München; Wien; Baltimore (ISBN 3-541-00245-X)
- Guba, M., Kuhn, M., Forssmann, W.G., Classen, M., Gregor, M. & Seidler, U. (1996). Guanylin strongly stimulates rat duodenal HCO₃⁻ secretion: proposed mechanism and comparison with other secretagogues. *Gastroenterology* **111**, 1558-1568.
- Gudi, T., Huvar, I., Meinecke, M., Lohmann, S.M., Boss, G.R. & Pilz, R.B. (1996). Regulation of gene expression by cGMP-dependent protein kinase. Transactivation of the c-fos promoter. *J. Biol. Chem.* **271**, 4597-4600.
- Hamra, F.K., Forte, L.R., Eber, S.L., Pidhorodeckyj, N.V., Krause, W.J., Freeman, R.H., Chin, D.T., Tompkins, J.A., Fok, K.F., Smith, C.E. & et al (1993). Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10464-10468.

- Hess, R. (1997). Isolierung und Charakterisierung eines Guanylatcyclase aktivierenden Peptides (GCAP-II, Uroguanylin). Dissertation, Universität Hannover.
- Hess, R., Kuhn, M., Schulz Knappe, P., Raida, M., Fuchs, M., Klodt, J., Adermann, K., Kaever, V., Cetin, Y. & Forssmann, W.G. (1995). GCAP-II: isolation and characterization of the circulating form of human uroguanylin. *FEBS Lett.* **374**, 34-38.
- Hidaka, Y., Wada, A., Idomoto, M., Hasegawa, M., Hirayama, T., Karasawa, T., Takeda, Y., & Shimonishi, Y. (1993). Synthesis and biological properties of guanylin and its analogs. In Yanaihara, N., ed., *Peptide chemistry 1993*, 347-349, ESCOM, Leiden
- Hill, O., Kuhn, M., Zucht, H.D., Cetin, Y., Kulaksiz, H., Adermann, K., Klock, G., Rechkemmer, G., Forssmann, W.G. & Magert, H.J. (1995a). Analysis of the human guanylin gene and the processing and cellular localization of the peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 2046-2050.
- Hill, O., Cetin, Y., Cieslak, A., Magert, H.J. & Forssmann, W.G. (1995b). A new human guanylate cyclase-activating peptide (GCAP-II, uroguanylin): precursor cDNA and colonic expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1253**, 146-149.
- Hill, O., Cieslak, A., Cetin, Y., Mägert, H.J. & Forssmann, W.G. (1996a). cDNA sequence and tissue distribution of guanylyl cyclase activating peptide II (GCAP-II, uroguanylin). *FASEB J.* **10**, A380.
- Hill, O., Cieslak, A., Fuchs, M., Forssmann, W.G. & Mägert, H.J. (1996b). Structure and expression pattern of the human guanylyl cyclase activating peptide II gene (GCAP-II, uroguanylin). *Regul. Pept. Suppl.* **64**, 68.
- Hill, O., Pardigol, A., Heß, R., Kuhn, M., Zucht, H.D., Mägert, H.J. & Forssmann, W.G. (1995c). Molecular biological characterization of guanylyl cyclase C-stimulating peptides with special reference to novel peptide hormones of the intestine. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **376**, 106.
- Hirel, P.H., Schmitter, M.J., Dessen, P., Fayat, G. & Blanquet, S. (1989). Extent of N-terminal methionine excision from Escherichia coli proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 8247-8251
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R. & Stüber, D. (1988). Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Biotechnology (N. Y.)* **6**, 1321-1325.
- Howard, F.B., Miles, H.T. & Ross, P.D. (1995). The poly(dT).2poly(dA) triple helix. *Biochemistry* **34**, 7135-7144.
- Hu, Y.F., Luscher, B., Admon, A., Mermod, N. & Tjian, R. (1990). Transcription factor AP-4 contains multiple dimerization domains that regulate dimer specificity. *Genes Dev.* **4**, 1741-1752.
- Huott, P.A., Liu, W., McRoberts, J.A., Giannella, R.A. & Dharmasathaphorn, K. (1988). Mechanism of action of Escherichia coli heat stable enterotoxin in a human colonic cell line. *J. Clin. Invest.* **82**, 514-523.

- Imagawa, M., Chiu, R. & Karin, M. (1987). Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal- transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* **51**, 251-260.
- Jarchau, T., Hausler, C., Markert, T., Pohler, D., Vanderkerckhove, J., de Jonge, H.R., Lohmann, S.M. & Walter, U. (1994). Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 9426-9430.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J (1986). *Histologie*, Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen. 2te Auflage, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg
- Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R. & Tjian, R. (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* **51**, 1079-1090.
- Kageyama, R. & Pastan, I. (1989). Molecular cloning and characterization of a human DNA binding factor that represses transcription. *Cell* **59**, 815-825.
- Kämpf, U., Kruhøffer, M., Bargsten, G., Grube, D. & Forssmann, W.G. (1996). Guanylin and its receptor (guanylyl cyclase C): expression and cell specific localization in the gastrointestinal tract. *Regul. Pept. Suppl.* **64**, 85.
- Kato, J., Wiegand, R.C. & Currie, M.G. (1993). Characterization of the structure of preproguanylin. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **28**, 139-142.
- Khare, S., Wilson, D., Wali, R.K., Tien, X.Y., Bissonnette, M., Niedziela, S.M., Bolt, M.J., Sitrin, M.D. & Brasitus, T.A. (1994). Guanylin activates rat colonic particulate guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 1432-1437.
- Kim, J. & Struhl, K. (1995). Determinants of half-site spacing preferences that distinguish AP-1 and ATF/CREB bZIP domains. *Nucleic. Acids. Res.* **23**, 2531-2537.
- Kita, T., Smith, C.E., Fok, K.F., Duffin, K.L., Moore, W.M., Karabatsos, P.J., Kachur, J.F., Hamra, F.K., Pidhorodeckyj, N.V., Forte, L.R. & et al (1994). Characterization of human uroguanylin: a member of the guanylin peptide family. *Am. J. Physiol.* **266**, F342-F348.
- Kopelman, H., Ferretti, E., Gauthier, C. & Goodyer, P.R. (1995). Rabbit pancreatic acini express CFTR as a cAMP-activated chloride efflux pathway. *Am. J. Physiol.* **269**, C626-C631.
- Kozak, M. (1991). An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.* **115**, 887-903.
- Kozak, M. (1992). Regulation of translation in eukaryotic systems. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 197-225.
- Krause, G., Bayerl, A., Heim, J.M., Singh, S. & Gerzer, R. (1994). Distribution of membrane bound guanylyl cyclases in human intestine. *Gut* **35**, 1250-1257.
- Krause, W.J., Freeman, R.H. & Fort, L.R. (1990). Autoradiographic demonstration of specific binding sites for E. coli enterotoxin in various epithelia of the North American opossum. *Cell Tissue Res.* **260**, 387-394.

- Kuhn, M., Adermann, K., Jahne, J., Forssmann, W.G. & Rechkemmer, G. (1994a). Segmental differences in the effects of guanylin and Escherichia coli heat-stable enterotoxin on Cl⁻ secretion in human gut. *J. Physiol.* **479**, 433-440.
- Kuhn, M., Hess, R., Martin, S., Adermann, K. & Forssmann, W.G. (1996). Peptide Ligands of the Particulate Guanylate Cyclase C: Luminocrine Modulators of the Electrolyte Transporte in Human Intestine. *Regul. Pept. Suppl.* **64**, 100.
- Kuhn, M., Kulaksiz, H., Adermann, K., Rechkemmer, G. & Forssmann, W.G. (1994b). Radioimmunoassay for circulating human guanylin. *FEBS Lett.* **341**, 218-222.
- Kuhn, M., Kulaksiz, H., Cetin, Y., Frank, M., Nold, R., Arnold, R., Boker, K., Bischoff, S.C., Manns, M.P. & Forssmann, W.G. (1995). Circulating and tissue guanylin immunoreactivity in intestinal secretory diarrhoea. *Eur. J. Clin. Invest.* **25**, 899-905.
- Kuhn, M., Raida, M., Adermann, K., Schulz Knappe, P., Gerzer, R., Heim, J.M. & Forssmann, W.G. (1993). The circulating bioactive form of human guanylin is a high molecular weight peptide (10.3 kDa). *FEBS Lett.* **318**, 205-209.
- Laney, D.W., Jr., Bezerra, J.A., Kosiba, J.L., Degen, S.J. & Cohen, M.B. (1994). Upregulation of Escherichia coli heat-stable enterotoxin receptor in regenerating rat liver. *Am. J. Physiol.* **266**, G899-G906.
- Laney, D.W., Jr., Mann, E.A., Dellon, S.C., Perkins, D.R., Giannella, R.A. & Cohen, M.B. (1992). Novel sites for expression of an Escherichia coli heat-stable enterotoxin receptor in the developing rat. *Am. J. Physiol.* **263**, G816-G821.
- Lassar, A.B., Davis, R.L., Wright, W.E., Kadesch, T., Murre, C., Voronova, A., Baltimore, D. & Weintraub, H. (1991). Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* **66**, 305-315.
- Lee, K.A. & Masson, N. (1993). Transcriptional regulation by CREB and its relatives. *Biochim. Biophys. Acta* **1174**, 221-233.
- Lewis, J.D., Gunderson, S.I. & Mattaj, I.W. (1995). The influence of 5' and 3' end structures on pre-mRNA metabolism. *J. Cell Sci. Suppl.* **19**, 13-19.
- Lewis, L.G., Witte, D.P., Laney, D.W., Currie, M.G. & Cohen, M.B. (1993). Guanylin mRNA is expressed in villous enterocytes of the rat small intestine and superficial epithelia of the rat colon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 553-560.
- Li, Z. & Goy, M.F. (1993). Peptide-regulated guanylate cyclase pathways in rat colon: in situ localization of GCA, GCC, and guanylin mRNA. *Am. J. Physiol.* **265**, G394-G402.
- Li, Z., Taylor Blake, B., Light, A.R. & Goy, M.F. (1995). Guanylin, an endogenous ligand for C-type guanylate cyclase, is produced by goblet cells in the rat intestine [comment]. *Gastroenterology* **109**, 1863-1875
- Long, M., Rosenberg, C. & Gilbert, W. (1995). Intron phase correlations and the evolution of the intron/exon structure of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 12495-12499.

- Macro, J.A., Dimaline, R. & Dockray, G.J. (1996). Identification and expression of prohormone-converting enzymes in the rat stomach. *Am. J. Physiol.* **270**, G87-G93.
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. & Collins, F.S. (1990). Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic. Acids. Res.* **19**, 1154
- Markert, T., Vaandrager, A.B., Gambaryan, S., Pohler, D., Hausler, C., Walter, U., de Jonge, H.R., Jarchau, T. & Lohmann, S.M. (1995). Endogenous expression of type II cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestine. Implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Clin. Invest.* **96**, 822-830.
- Meyer, M., Kruhøffer, M., Laffranchi, R., Reinecke, M. & Forssmann, W.G. (1996). GCAP-I as a paracrine peptide in pancreatic islets modulates insulin release from B-cells. *Regul. Pept. Suppl.* **64**, 124.
- Mitchell, P.J., Wang, C. & Tjian, R. (1987). Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell* **50**, 847-861.
- Mitraki, A. & King, J. (1989). Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Biotechnology (N. Y.)* **7**, 690-697.
- Mount, S.M. (1982). A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic. Acids. Res.* **10**, 459-472
- Mutoh, H., Fung, B.P., Naya, F.J., Tsai, M.J., Nishitani, J. & Leiter, A.B. (1997). The basic helix-loop-helix transcription factor BETA2/NeuroD is expressed in mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 3560-3564.
- Mutt, V. (1988). Secretin and Cholecystokinin. *Adv. Metab. Disorders* **11**, 251-303
- Nakazato, M., Yamaguchi, H., Shiomi, K., Date, Y., Fujimoto, S., Kangawa, K., Matsuo, H. & Matsukura, S. (1994). Identification of 10-kDa proguanylin as a major guanylin molecule in human intestine and plasma and its increase in renal insufficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 1966-1975.
- Nikolov, D.B. & Burley, S.K. (1997). RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 15-22.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y. & Sugino, Y. (1990). A rapid highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli*-cells. *Nucleic. Acids. Res.* **18**, 6169
- Ohara, O., Dorit, R.L. & Gilbert, W. (1989). One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 5673-5677.
- Padgett, R.A., Grabowski, P.J., Konarska, M.M., Seilers, S., Sharp, P.A. (1986). Splicing of messenger RNA Precursors. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 1119-1150
- Pardigol, A., Magert, H.J., Hill, O. & Forssmann, W.G. (1996). Functional analysis of the human guanylin gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **224**, 638-644.

- Pfeifer, A., Aszodi, A., Seidler, U., Ruth, P., Hofmann, F. & Fassler, R. (1996). Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science* **274**, 2082-2086.
- Philippe, J. & Missotten, M. (1990). Functional characterization of a cAMP-responsive element of the rat insulin I gene. *J. Biol. Chem.* **265**, 1465-1469.
- Potten, C.S. & Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**, 1001-1020.
- Poulsen, J.H., Fischer, H., Illek, B. & Machen, T.E. (1994). Bicarbonate conductance and pH regulatory capability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 5340-5344.
- 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.
- Riordan, J.R. (1993). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 609-630.
- Rudner, X.L., Nichitta, C. & Almenoff, J.S. (1996). Biogenesis, cellular localization, and functional activation of the heat-stable enterotoxin receptor (guanylyl cyclase C). *Biochemistry* **35**, 10680-10686.
- Rudolph, R. & Lilie, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* **10**, 49-56.
- 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
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sands, B.E. & Podolsky, D.K. (1996). The trefoil peptide family. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 253-273.
- Sanger, F., Nickler, 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.
- Schaal, K.P. (1988) Die Familie der Vibionaceae. *Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie*. 8. Auflage, S 359-369. Verlag Gustav Fischer, Stuttgart; New York (ISBN 3-437-00483-2)
- Schaefer, B.C. (1995). Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal. Biochem.* **227**, 255-273.

- Schoepfer, R. (1993). The pRSET family of T7 promoter expression vectors for Escherichia coli. *Gene* **124**, 83-85.
- Schulz, S., Chrisman, T.D. & Garbers, D.L. (1992). Cloning and expression of guanylin. Its existence in various mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* **267**, 16019-16021.
- Schulz, S., Green, C.K., Yuen, P.S. & Garbers, D.L. (1990). Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* **63**, 941-948.
- Schwartz, T.W. (1986). The processing of peptide precursors. 'Proline-directed arginyl cleavage' and other monobasic processing mechanisms. *FEBS Lett.* **200**, 1-10.
- Sciaky, D., Kosiba, J.L. & Cohen, M.B. (1994). Genomic sequence of the murine guanylin gene. *Genomics* **24**, 583-587.
- Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A. & Lukyanov, S.A. (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic. Acids. Res.* **23**, 1087-1088.
- Singh, S., Singh, G., Heim, J.M. & Gerzer, R. (1991). Isolation and expression of a guanylate cyclase-coupled heat stable enterotoxin receptor cDNA from a human colonic cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 1455-1463.
- Skelton, N.J., Garcia, K.C., Goeddel, D.V., Quan, C. & Burnier, J.P. (1994). Determination of the solution structure of the peptide hormone guanylin: observation of a novel form of topological stereoisomerism. *Biochemistry* **33**, 13581-13592.
- Sloan, S.R., Shen, C.P., McCarrick-Walmsley, R. & Kadesch, T. (1996). Phosphorylation of E47 as a potential determinant of B-cell-specific activity. *Mol. Cell Biol.* **16**, 6900-6908.
- Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B.H. & Hood, L.E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature (London)* **321**, 674-679
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517
- Staples, S.J., Asher, S.E. & Giannella, R.A. (1980). Purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by a strain of E. coli pathogenic for man. *J. Biol. Chem.* **255**, 4716-4721.
- Strong, T.V., Boehm, K. & Collins, F.S. (1994). Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA in the human gastrointestinal tract by in situ hybridization. *J. Clin. Invest.* **93**, 347-354.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
- Swenson, E.S., Mann, E.A., Jump, M.L., Witte, D.P. & Giannella, R.A. (1996). The guanylin/STa receptor is expressed in crypts and apical epithelium throughout the mouse intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**, 1009-1014.

- Tantisira, M.H., Jodal, M. & Lundgren, O. (1990). Effects of heat-stable Escherichia coli enterotoxin on intestinal alkaline secretion and transepithelial potential difference in the rat intestines in vivo. *Scand. J. Gastroenterol.* **25**, 19-28.
- Teller, J.K., Baker, P.J., Britton, K.L., Engel, P.C., Rice, D.W. & Stillman, T.J. (1995). Correlation of intron-exon organisation with the three-dimensional structure in glutamate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **1247**, 231-238.
- Thomas, P.S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 5201-5205.
- Thomas, T. & Thomas, T.J. (1993). Selectivity of polyamines in triplex DNA stabilization. *Biochemistry* **32**, 14068-14074.
- Tobias, J.W., Shrader, T.E., Rocap, G. & Varshavsky, A. (1991). The N-end rule in bacteria. *Science* **254**, 1374-1377.
- Traber, P.G. & Silberg, D.G. (1996). Intestine-specific gene transcription. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 275-297.
- Traut, T.W. (1988). Do exons code for structural or functional units in proteins?. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 2944-2948.
- Trezise, A.E. & Buchwald, M. (1991). In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* **353**, 434-437.
- Trezise, A.E., Romano, P.R., Gill, D.R., Hyde, S.C., Sepulveda, F.V., Buchwald, M. & Higgins, C.F. (1992). The multidrug resistance and cystic fibrosis genes have complementary patterns of epithelial expression. *EMBO J.* **11**, 4291-4303.
- Urbanski, R., Carrithers, S.L. & Waldman, S.A. (1995). Internalization of E. coli ST mediated by guanylyl cyclase C in T84 human colon carcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1245**, 29-36.
- Vaandrager, A.B., Schulz, S., de Jonge, H.R. & Garbers, D.L. (1993a). Guanylyl cyclase C is an N-linked glycoprotein receptor that accounts for multiple heat-stable enterotoxin-binding proteins in the intestine. *J. Biol. Chem.* **268**, 2174-2179.
- Vaandrager, A.B., van der Wiel, E. & de Jonge, H.R. (1993b). Heat-stable enterotoxin activation of immunopurified guanylyl cyclase C. Modulation by adenine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **268**, 19598-19603.
- Vaandrager, A.B., van der Wiel, E., Hom, M.L., Luthjens, L.H. & de Jonge, H.R. (1994). Heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C is an oligomer consisting of functionally distinct subunits, which are non-covalently linked in the intestine. *J. Biol. Chem.* **269**, 16409-16415.
- Varshavsky, A. (1992). The N-end rule. *Cell* **69**, 725-735.

- Vaupel, P. & Ewe, K. (1995). Funktionen des Magen-Darm-Kanals. *Physiologie des Menschen: mit Tabellen / Robert F. Schmidt; Gerhard Thews (Hrsg.)*. 26. Auflage, S806-848. Springer-Verlag Berlin; Heidelberg; New York (ISBN 3-540-58034-4).
- von Heijne, G. (1983). Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* **133**, 17-21.
- Wada, A., Hirayama, T., Kitao, S., Fujisawa, J., Hidaka, Y. & Shimonishi, Y. (1994). Pig intestinal membrane-bound receptor (guanylyl cyclase) for heat-stable enterotoxin: cDNA cloning, functional expression, and characterization. *Microbiol. Immunol.* **38**, 535-541.
- Wagner, J.A., McDonald, T.V., Nghiem, P.T., Lowe, A.W., Schulman, H., Gruenert, D.C., Stryer, L. & Gardner, P. (1992). Antisense oligodeoxynucleotides to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibit cAMP-activated but not calcium-activated chloride currents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 6785-6789.
- Waldman, S.A., Kuno, T., Kamisaki, Y., Chang, L.Y., Gariepy, J., O'Hanley, P., Schoolnik, G. & Murad, F. (1986). Intestinal receptor for heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* is tightly coupled to a novel form of particulate guanylate cyclase. *Infect. Immun.* **51**, 320-326.
- Wallace, J.L. & Granger, D.N. (1996). The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB J.* **10**, 731-740.
- Wheeler, M.B., Nishitani, J., Buchan, A.M., Kopin, A.S., Chey, W.Y., Chang, T.M. & Leiter, A.B. (1992). Identification of a transcriptional enhancer important for enteroendocrine and pancreatic islet cell-specific expression of the secretin gene. *Mol. Cell Biol.* **12**, 3531-3539.
- White, A.A., Krause, W.J., Turner, J.T. & Forte, L.R. (1989). Opossum kidney contains a functional receptor for the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 363-367.
- Wiegand, R.C., Kato, J. & Currie, M.G. (1992a). Rat guanylin cDNA: characterization of the precursor of an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 812-817.
- Wiegand, R.C., Kato, J., Huang, M.D., Fok, K.F., Kachur, J.F. & Currie, M.G. (1992b). Human guanylin: cDNA isolation, structure, and activity. *FEBS Lett.* **311**, 150-154.
- Winpenny, J.P., McAlroy, H.L., Gray, M.A. & Argent, B.E. (1995). Protein kinase C regulates the magnitude and stability of CFTR currents in pancreatic duct cells. *Am. J. Physiol.* **268**, C823-C828.
- Yamaguchi, H., Nakazato, M., Miyazato, M., Kangawa, K., Matsuo, H. & Matsukura, S. (1995). Two novel rat guanylin molecules, guanylin-94 and guanylin-16, do not increase cyclic GMP production in T84 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**, 1204-1210.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A _{260/280/578}	Absorption bei 260/280/578 nm
Abb.	Abbildung
Amp.	Ampere
Amp	Ampicillin
ANF	Atrial Natriuretic Peptide
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	3',5'-cyclo-Adenosin-monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cytosolisch)
cGKII	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ II (membranständig)
cGMP	3',5'-cyclo-Guanosin-monophosphat
cpm	Counts per minute (Zerfälle pro Minute)
cDNA	copy (komplementäre) DNA
d	Tag
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
E. coli	Escherichia coli
ES-MS	Elektrospray-Massenspektrometrie
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec ²)
GC-C	Guanylat-Cyclase-C
h	Stunde
H ₂ O	Wasser (Aqua bidest)
hGuanylin	humanes Guanylin
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
hUroguanylin	humanes Uroguanylin
IAA	Isoamylalkohol
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IPTG	Isopropyl-β-D-galactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani Vollmedium
LM	low melting (niedrig schmelzend)
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	millimolar
mm	Millimeter

Abkürzungsverzeichnis

Mr	relatives Molekulargewicht
MS	Massenspektometrie
μM	mikromolar
μm	Mikrometer
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
N	Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin
NaAc	Natriumacetat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
p	Plasmid
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
p.A.	pro Analysis
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
pmol	Picomol
R	Purine
RACE	Rapid amplification of unknown cDNA ends
RE	Restriktionsendonuklease
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rounds Per Minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S.	Seite
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
sGC	lösliche Guanylatcyclase (cytosolisch)
ss	einzelsträngig
SSC	Standard Saline Citrate
SSDGUA	<i>Sus scrofa domestica</i> guanylin
SSDUGUA	<i>Sus scrofa domestica</i> uroguanylin
STa	hitze stabiles Enterotoxin aus <i>E.coli</i>
T	Thymin
TE	Tris-EDTA
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	Tertramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
ÜNK	Übernacht Kultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen bei Prozentangaben
w/v	Masse pro Volumen bei Prozentangaben
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-galactopyranosid
Y	Pyrimidine
ZnAc	Zinkacetat

Lebenslauf

Persönliche Daten

Familienname: Hill
Vorname: Oliver
Anschrift: Hölderlinweg 8
07749 Jena
Geboren am: 01.02.1966 in Hannover
Religion: evangelisch
Familienstand: verheiratet, ein Kind

Schulbildung

1972-1976 Grundschule Mecklenheide, Hannover
1976-1985 Besuch des Gymnasiums Lutherschule, Hannover
1985 Abitur

Wehrdienst

07.1985-10.1986 Grundwehrdienst, Celle

Studium

10.1986-02.1994 Studiums der Biologie an der Technischen
Universität Hannover, Abschluß: Diplom-Biologe

Beruflicher Werdegang

02.1994-06.1997 Dissertationsarbeit am Niedersächsischen Institut für
Peptidforschung
seit 08.1997 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Molekulare
Biotechnologie (IMB), Jena

Publikationsliste

I. Originalveröffentlichungen:

Hill, O., Kuhn, M., Zucht, H.D., Cetin, Y., Kulaksiz, H., Adermann, K., Klock, G., Rechkemmer, G., Forssmann, W.G. und Mägert, H.J. (1995). Analysis of the human guanylin gene and the processing and cellular localization of the peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 2046-2050.

Hill, O., Cetin, Y., Hess, R., Cieslak, A., Adermann, K., Mägert, H.J. und Forssmann, W.G. (1995). A new human guanylate cyclase-activating peptide (GCAP-II, Uroguanylin): precursor cDNA and colonic expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1253, 146-149.

Pardigol, A., Mägert, H.J., Hill, O. und Forssmann, W.G. (1996). Functional analysis of the human guanylin (GCAP-I) gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 638-644.

in Vorbereitung:

Mägert, H.J., Reinecke, M., David, I., Zucht, H.D., Hill, O., Pardigol, A., Hess, R. und Forssmann, W.G.. Gene structure and tissue distribution of the gastrointestinal peptide hormone uroguanylin / GCAP-II.

II. Monographien:

Forssmann, W.G., Cetin, Y., Hill, O., Mägert, H.J., Kuhn, M., Kulaksiz, H. und Rechkemmer G. (1995). Review: guanylin is a new gastrointestinal hormone regulating water-electrolyte transport in the gut. In: *Symposium on gastrointestinal tract and endocrine system* (editors Singer, M.V. & Ziegler, R.), Falk Symposium 77, 279-292, MTP Press, Lancaster UK.

III. Abstracts und Kongressbeiträge:

Hill, O., Mägert, H.J., Kuhn, M. und Forssmann, W.G..
Characterization of the human guanylin gene.
Vortrag. 9. Jahrestagung der AGD e.V.
Kronberg/Taunus 20. u. 21. August 1993.

Cetin, Y., Kuhn, M., Kulaksiz, H., Mägert, H.J., Hill, O., Zucht, H.D., Bargsten, G., Grube, D. und Forssmann, W.G. (1994). Enterochromaffin cells of the gastrointestinal tract: cellular source of guanylin, a new guanylate-cyclase-activating peptide. *Acta Anat.* 149, 146

Hill, O., Mägert, H.J., Kuhn, M., Zucht, H.D. und Forssmann, W.G. (1994).
Molecular cloning of the human gene for the novel peptidehormone guanylin.
Exp. Clin. Endocrinol. 102 (Suppl. 1), 129.

Kuhn, M., Cetin, Y., Kulaksiz, H., Hill, O., Mägert, H.J. und Forssmann, W.G. (1994).
Guanylin: a new gastrointestinal hormone that stimulates guanylate cyclase C.
Hepato-Gastroenterol. 41, 91-92.

Forssmann, W.G., Kuhn, M., Kruhøffer, M., Hess, R., Hill, O., Meyer, M., Cetin, Y. und Mägert, H.J. (1995).
Expression of guanylin and guanylyl cyclase C in the stomach.
Hepato-Gastroenterology 42, 1073.

Hill, O., Pardigol, A., Heß, R., Kuhn, M., Zucht, H.D., Mägert, H.J. und Forssmann, W.G. (1995).
Molecular biological characterization of guanylyl cyclase C-stimulating peptides with special reference to novel peptide hormones of the intestine.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 376 (Spec. Suppl.), S106.

- Mägert, H.J., Pardigol, A., Cieslak, A., Hill, O., Raida, M., Schulz-Knappe, P. und Forssmann, W.G. (1995). HCC-1, a novel chemokine isolated from human plasma, is expressed in various tissues. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **376** (Spec. Suppl.), S129.
- Pardigol, A., Mägert, H.J., Hill, O., Zucht, H.D. und Forssmann, W.G. (1995). Characterization of the 5'-flanking region of the human guanylin gene. *Exp. Clin. Endocrinol.* **103** (Suppl. 1), 81.
- Pardigol, A., Mägert, H.J., Hill, O., Cieslak, A., Schulz-Knappe, P. und Forssmann, W.G. (1995). Characterization of the cDNA and the gene for the novel human chemokine HCC-1. *Eur. J. Cell Biol.*, Suppl., 169.
- Pardigol, A., Mägert, H.J., Cieslak, A., Hill, O., Schreek, S., Raida, M., Forssmann, W.G. und Schulz-Knappe, P. (1996). Molecular biological characterization of HCC-1, a novel chemokine isolated from human plasma. *Exp. Clin. Endocrinol.* **104** (Suppl. 1), 66.
- Hill, O., Cieslak, A., Pardigol, A., Hess, R., Zucht, H.D., Cetin, Y., Kuhn, M., Mägert, H.J. und Forssmann, W.G. (1996). Precursor structure and expression pattern of the novel gastrointestinal peptide hormone GCAP-II. *Exp. Clin. Endocrinol.* **104** (Suppl. 1), 100.
- Hill, O., Cieslak, A., Cetin, Y., Mägert, H.J. und Forssmann, W.G.. cDNA sequence and tissue distribution of guanylyl cyclase activating peptide II (GCAP-II, uroguanylin) (1996). *FASEB J.* **10**, A380.
- Hill, O., Cieslak, A., Fuchs, M., Forssmann, W.G. und Mägert, H.J.. Structure and expression pattern of the human guanylyl cyclase activating peptide II gene (GCAP-II, uroguanylin). Vortrag. 11th International Symposium on Regulatory Peptides, Copenhagen, Dänemark, 3.-7. September, 1996.
- IV. Datenbankeintragen:**
- Hill, O., Maegert, H.J., Zucht, H.D., Kuhn, M. und Forssmann, W.G. (1993). H. sapiens gap-I gene (Human guanylyl cyclase c activating peptide I gene). *EMBL database*, accession number X74322.
- Hill, O., Maegert, H.J. und Forssmann, W.G. (1995). GCAPIIcDNA (Human guanylyl cyclase c activating peptide II cDNA). *EMBL database*, accession number Z50753.
- Maegert, H.J., Schulz-Knappe, P., Hill, O., Cieslak, A., Pardigol, A. und Forssmann, W.G. (1995). HCC1cDNA (Human hemofiltrate chemokine CC1 cDNA). *EMBL database*, accession number Z49270.
- Pardigol, A., Maegert, H.J., Cieslak, A., Hill, O., Schulz-Knappe, P. und Forssmann, W.G. (1995). HCC1Gene (Human hemofiltrate chemokine CC1 gene). *EMBL database*, accession number Z49269.
- Pardigol, A., Maegert, H.J., Hill, O. und Forssmann, W.G. (1995). HSGNLNPRO (Homo sapiens guanylin/GCAP-I gene promoter DNA). *EMBL database*, accession number Z68182.
- Hill, O., Zucht, H.D., Luttermann, D., Maegert, H.J. und Forssmann, W.G. (1996). SDGCAP-I (Sus domestica GCAP-I / Guanylin cDNA). *EMBL database*, accession number Z73607.
- Hill, O., Maegert, H.J. und Forssmann, W.G. (1996). SDGCAPII (S.domestica GCAP-II/Uroguanylin-cDNA) *EMBL database*, accession number Z83746
- Maegert, H.J., Hill, O. und Forssmann, W.G. (1996). HSUROGU (Homo sapiens uroguanylin/GCAP-II gene). *EMBL database*, accession number Z70295