

Aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
(Direktor: Univ.-Prof.Dr.rer.nat.habil.R. Walter)
Abteilung für Medizinische Biochemie
(Leiter: Univ.-Prof.Dr.med.habil.S.Krantz)

**Isolierung und Charakterisierung eines rekombinanten Nucleophosmins und
Nachweis von Nucleophosmin als Bestandteil fructoselysinspezifischer Rezeptoren
in Zellmembranen der monocytären Zelllinien Mono Mac 6 und U937**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr.med.)
der Medizinischen Fakultät
der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald 2006

Vorgelegt von:
Mato Nawka
Geb. am 26.09.1979
In Bautzen

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer
1. Gutachter: Prof. Dr. S. Krantz
2. Gutachter: Prof. Dr. E. Schleicher
Ort, Raum: Lutherstr. 6, 17489 Greifswald, Seminarraum des FLI für
Medizinische Mikrobiologie
Tag der Disputation: 12.02.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Nichtenzymatische Glycosylierung von Proteinen	6
1.2	Rezeptoren für glycosylierte Proteine	8
1.2.1	Rezeptoren für frühe Maillard-Produkte	8
1.2.2	Rezeptoren für späte Maillard-Produkte	12
1.3	Nucleophosmin	13
1.4	Zielstellung	16
2	Materialien und Methoden	18
2.1	Materialien	18
2.1.1	Lösungen und Medien	18
2.1.2	Primer, sequenzspezifisch für Nucleophosmin	18
2.1.3	Die Vektoren	18
2.2	Methoden	20
2.2.1	Präparation von Gesamt-RNA mittels RNeasy Mini Kit (Quiagen)	20
2.2.2	RNA-Gelelektrophorese	20
2.2.3	RT-PCR	21
2.2.4	Plasmidpräparation der Low Copy Number Plasmide mittels peqlab Plasmidminiprep Kit 1	22
2.2.5	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	22
2.2.6	Restriktionsverdau	23
2.2.7	Reinigung des Vektors und Inserts nach erfolgtem Restriktionsverdau	24
2.2.8	Bestimmung der Mengenverhältnisse Vektor – Insert	24
2.2.9	Ligation	25
2.2.10	Herstellung kompetenter Zellen E.coli XL1	25
2.2.11	Transformation	25
2.2.12	Induktion eines positiven Klonen und Überprüfung des Wachstumsverhaltens	26
2.2.13	Zellaufschluss	27
2.2.14	Proteinmengenbestimmung	28
2.2.15	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.2.16	Western Blot und Immunodetektion	30
2.2.17	Das QIAexpress Detection System	32
2.2.18	Zellaufschluss und Reinigung von Nucleophosmin mittels QIAexpress-System	34
2.2.19	Massenspektrometrische Untersuchung des His-tag Proteins	36
2.2.20	Reinigung von Nucleophosmin aus Großkulturen	37
2.2.21	Reinigung von Nucleophosmin aus einer 8M Harnstofflösung, pH 4,5, mittels Dialyse und Lyophilisation	38
2.2.22	Herstellung eines Antiserums durch Immunisierung von Kaninchen	38

2.2.23	Präparation von Membranproteinen der monocytären Zelllinien MonoMac6 und U937	39
2.2.24	Proteinauftrennung, Western Blot und Immunodetektion von Membranproteinen	40
2.2.25	Kompetitionsexperiment (Immunabsorption)	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Präparation von Gesamtzell-RNA aus MM6-Zellen und Herstellung einer Nucleophosmin-cDNA	43
3.2	Herstellung eines rekombinanten Klones	45
3.3	Nachweis eines His-tag Proteins von 40 kDa mittels des Penta-His-Antikörpers	46
3.4	Reinigung des His-tag Proteins mittels Affinitätschromatographie	48
3.5	Nachweis der Identität von B23/Nucleophosmin mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie	51
3.6	Nachweis von Nucleophosmin im 200 kDa Rezeptorprotein mittels eines polyklonalen Antiserums	52
3.6.1	Überprüfung der Spezifität des hergestellten polyklonalen Antiserums	52
3.6.2	Nachweis von Nucleophosmin in Membranproteinen der monocytären Zelllinien MM6 und U937	54
4	Diskussion	57
5	Zusammenfassung	62
6	Literaturverzeichnis	64
7	Anhang	71

Abkürzungsverzeichnis

A.dest	Destilliertes Wasser
AGE	Advanced glycosylation endproducts
AK	Antikörper
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BFB	Bromphenolblau
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre (complementary) Desoxyribonucleinsäure
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-Tetracetat
HSA	Humanes Serumalbumin
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktosid
IS	Immunserum
kDa	Kilodalton
LDL	Low density lipoproteins
MCS	Multiple Cloning Site
mM	Milli-molar
MM6	Mono-Mac-6
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MP	Milchpulver
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonylflorid
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
U	Unit

1 Einleitung

1.1 Nichtenzymatische Glycosylierung von Proteinen

Die kovalente Bindung von Zuckern (Glucose, Fructose) an Proteine ist die bekannteste nicht-enzymatische posttranslationale Modifikation. Louis Camille Maillard beschrieb 1912 braunefärbte, aromatisch riechende Produkte, die aus einem Gemisch von Aminosäuren in Anwesenheit reduzierender Zucker nach Erhitzen bei 100°C über mehrere Stunden entstanden (Maillard, 1912).

Hierbei reagiert die Aldehyd/Ketogruppe von (offenkettigen) Monosacchariden mit einer freien N-terminalen Aminogruppe eines Proteins oder einer funktionellen Aminogruppe in den Seitenketten beteiligter Aminosäuren. Betroffene Aminosäuren sind dabei besonders Lysin und Arginin.

Zunächst kommt es durch Kondensation des Monosaccharids mit dem Amin zur Bildung eines labilen Aldimins, einer instabilen Schiff'schen Base. Dem schließt sich die Amadori-Umlagerung unter Bildung eines Ketoamins an. Diese Reaktion verläuft wesentlich langsamer und ist praktisch nur in Proteinen mit einer langen biologischen Halbwertszeit umkehrbar (Mortensen et al., 1983).

Die hierbei aus offenkettiger Glucose entstehenden Fructosyllysine bilden den Hauptteil der Amadori-Produkte an extrazellulären Proteinen (Krantz et al., 1986).

Unter Katalyse von Übergangsmetallen (Kupfer, Eisen) kommt es durch Oxidation, Dehydratation, Kondensation, Reduktion etc. an Amadori-Addukten zur Bildung reaktiver Zwischenprodukte und freier Radikale (Hydroxyl-, Superoxidradikale) (Brownlee et al., 1995; Bucula et al., 1992; Vlassara et al., 1994). Der als autoxidative Glycierung bezeichnete Vorgang führt über die Autoxidation von Monosacchariden und, wesentlich schneller, an den korrespondierenden Aldiminen zu oxidativem Stress (Singh et al., 2001; Hunt et al., 1988).

Als reaktive Zwischenprodukte bzw. reaktive Carbonylverbindungen wurden eine Reihe von Verbindungen identifiziert. Hierzu gehören Glyoxal, entstehend durch Lipid-Peroxidation; Methylglyoxal, welches über einen nicht-oxidativen Mechanismus in der anaeroben Glycolyse und aus dem Fructosemetabolismus entsteht und 3-Desoxy-

Einleitung

Glucoson, entstehend aus nicht-oxidativer Umlagerung und Hydrolyse von Amadori-Addukten sowie aus Fructose-3-Phosphat.

Diese reaktiven Carbonylverbindungen können auch durch Degradierungserscheinungen an der Schiff'schen Base und dem Ketoamin entstehen.

Die Chemie der Bildung fortgeschrittener Glycierungsprodukte, eines heterogenen Gemisches heterocyclischer Ringverbindungen, ist noch nicht eindeutig geklärt. Sie werden als advanced glycosylation endproducts (AGEs) bezeichnet und entstehen unter anderem direkt aus Amadori-Produkten, dem Fett- und Aminosäureabbau, Carbonylverbindungen aus der Autoxidation der Glucose und durch Bildung von Quervernetzungen (Crosslinks) zwischen Aminosäureresten glycosylierter Proteine. AGEs bewirken im weiteren die Bildung gleichartiger Quervernetzungen, besonders an Lysinresten.

Als genauer charakterisierte AGE-Verbindungen gelten die Imidazolysine GOLD (Glyoxal-Lysin-Dimer) zwischen zwei Lysinresten und MOLD (Methylglyoxal-Lysin-Dimer), die Imidazolone A und B, Pyrralin, Crosslines, Vesperlysine, Pentosidin und Carboxymethyllysin (CML). Letzteres ist das häufigste in vivo nachgewiesene AGE. Pyrralin und Pentosidin können als Biomarker für die AGE-Quervernetzungen angesehen werden (Singh et al., 2001).

Verbindungen wie GOLD und MOLD sind farblos und nicht fluoreszierend, so dass die ursprüngliche Charakterisierung der AGEs als Verbindungen gelbbrauner Farbigkeit mit Fähigkeit zum Crosslinking und Fluoreszenz heute weiter gefasst wird (Wells-Knecht et al., 1996).

Glucose weist hierbei im Vergleich zu Fructose, Ribose, Threose, Glucose-6-Phosphat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat, Xylulose oder Methylglyoxal die langsamste Glycosylierungsrate auf (Namiki et al., 1988).

Die AGE-Bildung kann Aminosäuren, Proteine, Lipide und Nucleinsäuren (DNA) betreffen, besonders jedoch langlebige Proteine wie Kollagen und das Kristallin der Augenlinse aber auch Myelin, Tubulin u.a. (Singh et al.; 2001, Monnier et al., 1981). Die Bildung von Amadori-Produkten und AGEs zieht Struktur- und Funktionsänderungen der betreffenden Proteine nach sich.

Als Beispiel für die sich daraus ergebenden Konsequenzen soll hier das Kollagen aufgeführt werden. Die Löslichkeit von Kollagenmolekülen nimmt durch Ausbildung

intra- und intermolekularer Quervernetzungen zwischen den Kollagen-Polypeptidketten bzw. Tropokollagenen durch AGEs ab, während die temperaturabhängige Reißfestigkeit und mechanische Widerstandsfähigkeit des Kollagens zunimmt. Ursache hierfür ist eine durch die Glycosylierung des Proteins und anschließende AGE-Bildung bedingte Veränderung der Ladungsverteilung. Über eine veränderte Assoziation der Fibrillen bei der Faserbildung wird so die Stabilität des Kollagenmoleküls beeinflusst. Dies hat weitreichende Konsequenzen. So nimmt beispielsweise die Elastizität von Gefäßwänden ab, das Bindegewebe ist einer vorzeitigen Alterung unterworfen und Gelenke werden in ihren Bewegungsmöglichkeiten eingeschränkt und versteifen (Bai et al., 1992; Sims et al., 1996; Odetti et al., 1992).

Der Interaktion von AGEs mit deren Bindungsproteinen und zellständigen Oberflächenrezeptoren wird eine wichtige Rolle in der Entstehung einer erhöhten vaskulären Permeabilität, Proliferation von glatten Muskelzellen, Expression von Adhäsionsmolekülen, Produktion von Cytokinen und Wachstumsfaktoren, Induktion von oxidativem Stress im Gefäßgewebe und transendothelialer Hämotaxis von Monocyten zugeschrieben. Diese Prozesse sind an der Pathogenese der Frühstadien einer Arteriosklerose beteiligt (Ivanov et al., 1999).

Des Weiteren spielen AGEs in der Pathogenese von Nierenerkrankungen (Glomerulosklerose, diabetische Nephropathie), degenerativer Erkrankungen des ZNS (Morbus Alzheimer), der Dialyse-assoziierten Amyloidose sowie den sich im Alterungsprozess ergebenden Komplikationen [arteriosklerotische Läsionen (Palinski et al., 1995; Nakayama et al., 1993), Katarakt (Dunn et al., 1989; Ramanakoppa et al., 1992; Nakayama et al., 1993), Demenz (Kimura et al., 1996)] eine wesentliche Rolle.

1.2 Rezeptoren für glycosylierte Proteine

1.2.1 Rezeptoren für frühe Maillard-Produkte

1.2.1.1 Rezeptoren für eine Amadori-modifizierte Sequenz im Albumin

Glyciertes Albumin liegt in vivo vornehmlich in Form von Amadori-Addukten vor. Als Proteine, die das so modifizierte Albumin selektiv binden, wurden zwei Polypeptide von 110 und 205 kDa identifiziert. Hierbei spielt der glycierte Lysinrest 525 in der Aminosäuresequenz des Albumins eine wesentliche Rolle für die Bindungsspezifität.

Einleitung

Die Rezeptorstruktur liegt sowohl auf Endothelzellen der Aorta, als auch auf mesangialen Zellen der Nierenglomeruli vor. Im Gegensatz zu der unter 1.2.1.2 dargestellten Rezeptorstruktur war Amadori-modifiziertes LDL nicht kompetitiv für das fructoselysin-modifizierte Albumin (Wu et al., 1993, 1994, 1995).

In Folge der Bindung von glycosyliertem Albumin an glomeruläre mesangiale Zellen konnte ein Anstieg der Typ IV-Kollagensekretion beobachtet werden. In folgenden Untersuchungen wurde eine Stimulierung der Transkription des Typ IV-Kollagen-Gens und eine Zunahme der Kopienzahl der korrespondierenden mRNA festgestellt (Cohen et al., 1994, 1995).

Ein weiterer Effekt einer Bindung von Amadori-modifiziertem Albumin an glomeruläre mesangiale Zellen ist ein Anstieg der mRNA-Menge des Wachstumsfaktors TGF β (transforming growth factor β). Ein Effekt dieses Cytokins ist die vermehrte Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix, z.B. Fibronectin. Hiermit steht sowohl ein Anstieg der Kopienzahl der Fibronectin-mRNA als auch eine vermehrte Translation des Proteins nach Stimulierung der Zellen mit glycosyliertem Albumin in Übereinstimmung. Des Weiteren ist ein Anstieg der mRNA des TGF β -Typ II-Rezeptors zu verzeichnen. Diese Effekte spielen in der Pathogenese der diabetischen Nephropathie eine wesentliche Rolle (Ziyadeh et al., 1998).

Sowohl an Koronargefäßen als auch an der renalen Bürstensaummembran wurde auf eine Bindungsstelle für Albumin in seiner nativen als auch in seiner glycierten Form hingewiesen. Glyciertes Albumin vermag die native Form des Proteins zu 85% von seiner Bindung an die renale Bürstensaummembran zu verdrängen. In der erwähnten Studie an mesangialen Zellen der Nierenglomeruli konnte jedoch keine Bindung für natives Albumin an die Rezeptorstruktur nachgewiesen werden. Daraus kann man schließen, dass sich die Bindungsstellen für natives und glyciertes Albumin abhängig vom Zelltyp in unterschiedlichen Abständen zueinander befinden und sich so die jeweiligen Bindungsstellen des Albumins für die beiden Rezeptorstrukturen teilweise überlappen (Predescu et al., 1988; Wu et al., 1995; Vebeke et al., 1996).

In humanen peritonealen Mesothelzellen stieg nach Exposition mit glycosyliertem Albumin die Menge der transkribierten mRNA des angiogenetischen Cytokins VEGF (vascular endothelial growth factor) und die Menge des korrespondierenden Translationsproduktes (Mandl-Weber et al., 2002).

1.2.1.2 Fructoselysinspezifische Rezeptoren

Sowohl Peritonealmakrophagen von Ratten als auch menschliche Monocyten und die monocytären Zelllinien U937 und MM6 binden über eine fructoselysinspezifische Rezeptorstruktur fructoselysin-modifiziertes Albumin und glyciertes LDL. Radioaktiv markiertes fructoselysin-modifiziertes Albumin wird hierbei durch natives Albumin, maleyliertes Albumin, mannose-modifiziertes Albumin, Chondroitinsulfate, Glucose, Fructose, L-Lysin, Hexitolysin und AGE-modifiziertes Albumin nicht aus seiner Bindung verdrängt. Fructoselysin jedoch verdrängt fructoselysin-modifiziertes Albumin konzentrationsabhängig von dessen Bindungsstelle am Rezeptor (Salazar et al., 1995). In vergleichbarer Weise wird radioaktiv markiertes glyciertes LDL durch nicht-markiertes fructoselysin-modifiziertes LDL aus seiner Bindung verdrängt. Glyciertes Albumin und Fructoselysin erwiesen sich ebenfalls als Kompetitoren (Krantz et al., 1997).

Die Spezifität der Bindung spricht für eine selbstständige Rezeptorstruktur.

Der Grad der Rezeptorexpression auf menschlichen Monocyten ist weder vom Alter noch vom Geschlecht abhängig. Des weiteren wird der Expressionsgrad des Rezeptors in in vitro Untersuchungen an der monocytären Zelllinie U937 durch hohe Glucosekonzentrationen und fructoselysin-modifizierte Proteine im umgebenden Medium nicht beeinflusst. Die potentielle pathophysiologische Bedeutung der Interaktion von fructoselysin-modifizierten Proteinen mit deren spezifischer Rezeptorstruktur zeigte sich in einer positiven Korrelation zwischen der individuell unterschiedlichen Expression des fructoselysinspezifischen Rezeptors und dem Ausprägungsgrad bzw. dem zeitlichen Einsetzen einer diabetischen Mikroangiopathie. Dies wurde durch Untersuchungen an Peritonealmakrophagen diabetischer Ratten bestätigt. An diabetischen Ratten, die den fructoselysinspezifischen Rezeptor exprimierten, konnte eine verstärkte Verdickung der kapillären Basalmembran in der Muskulatur beobachtet werden (Brandt et al., 1996).

Als an diesem Rezeptor beteiligt wurden Membranproteine mit einem Molekulargewicht von 110 kDa und 200 kDa identifiziert. Ein 150-kDa Membranprotein wies ebenfalls eine Bindungsspezifität für fructoselysin-modifiziertes

Einleitung

Albumin auf, wurde bisher jedoch als Degradierungsprodukt des 200 kDa-Proteins angesehen (Krantz et al., 1995).

Aufgrund einer Sequenzanalyse des 110 kDa-Proteins besteht Grund zu der Annahme, dass es sich hierbei um das zur Superfamilie der RNA-bindenden Proteine gehörige Nucleolin handelt. Dies wird dadurch bestärkt, dass das Protein mittels polyklonaler Antikörper gegen Nucleolin detektiert werden kann.

Das 200 kDa-Protein wurde massenspektroskopisch untersucht. Es ergaben sich Sequenzhomologien zum Schwerekettenmyosin Typ A (myosin-heavy-chain type A). In Western Blots und anschließender Immunodetektion wies das Protein sowohl bei der monocytären Zelllinie U937 (Salazar et al., 2000) als auch MM6 (Salazar et al., 2001) positive Reaktionen auf ein Antiserum gegen Schwerekettenmyosin Typ A auf (Krantz et al., 1995; Brandt et al., 1996). Cytosolisches Schwerekettenmyosin besitzt ein Molekulargewicht von 224 kDa. Bei dem detektierten Protein von 200 kDa könnte es sich um ein im Vergleich zum cytosolischen Protein verkürztes Produkt handeln.

Beide an der Rezeptorstruktur beteiligte Proteine, sowohl Nucleolin, als auch Schwerekettenmyosin Typ A, sind im Gegensatz zum cytosolischen Protein glycosyliert (Salazar et al., 2000).

In Untersuchungen an der Zelllinie MM6 wurde nach Inkubation mit fructoselysin-modifiziertem Albumin eine Aktivierung der Proteinkinase C ϵ (PKC) durch deren Translokation vom Cytosol in die Zellmembran nachgewiesen. In Folge dieser Aktivierung wurde eine Translokation der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP1 in den Zellkern beobachtet. Eine Aktivierung der Proteintyrosin-Kinase (PTK) nach Inkubation mit fructoselysin-modifiziertem Albumin bewirkte die Translokation des Transkriptionsfaktors AP1 in den Zellkern (Salazar et al., 2001).

Im weiteren war ein Anstieg der Cytokinkonzentration (IL1, TNF α) im umgebenden Medium und nach PKC-Aktivierung ein Anstieg der IL1 β -mRNA nachweisbar (Salazar et al., 1995; Salazar et al., 2001). Durch ein Antiserum gegen Schwerekettenmyosin Typ A wurde die Transkription der IL1 β -mRNA reduziert. Diese Befunde sprechen für eine eigenständige Rezeptorstruktur, deren Bestandteile die besprochenen fructoselysinbindenden Proteine bilden.

Sowohl NF κ B als auch AP1 besitzen als Transkriptionsfaktoren Bindungsstellen auf Transkriptionkontrollelementen des IL1-Genes (Watkins et al., 1999). Die Ergebnisse

deuten auf eine Verbindung zwischen der Aktivierung der Kinasen PKC und PTK an der Zelllinie MM6 nach Inkubation mit fructoselysin-modifiziertem Albumin und dem Anstieg von sowohl IL1 β -mRNA als auch deren Translationsprodukt IL1 (Salazar et al., 2001).

1.2.2 Rezeptoren für späte Maillard-Produkte

Nicht nur glucose-modifizierte Proteine, sondern auch advanced glycation endproducts (AGEs) sind durch Wechselwirkungen mit spezifischen Rezeptoren an der Ausbildung von Gefäßkomplikationen und Demenzen verantwortlich. Im folgenden soll in gekürzter Form auch auf diese Rezeptorstrukturen eingegangen werden.

Ein AGE-Rezeptorkomplex ist auf verschiedenen Zelltypen wie dem Aortenendothel und mesangialen Zellen der Nierenglomeruli nachgewiesen. Durch Expression des Rezeptors auf Monocyten/Makrophagen dient er unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich der Elimination von AGE-modifizierten Geweben und stimuliert das Wachstum und den Gewebersatz in Umgebung der rezeptorexprimierenden Zellen (Vlassara et al., 2001). Für den Komplex sind 3 membranständige Komponenten beschrieben, wobei zwei dieser Komponenten an den untersuchten Zellen in Reaktion auf ein erhöhtes AGE-Angebot im umgebenden Medium überexprimiert werden (Stitt et al., 1999).

RAGE (receptor of advanced glycation endproducts) ist wahrscheinlich die bedeutendste Rezeptorstruktur für AGEs. RAGE scheint nicht an der Detoxifikation von AGEs beteiligt zu sein. In Folge der AGE-RAGE Interaktion werden jedoch verschiedene Kinasen und Transkriptionsfaktoren aktiviert, wodurch die Umgebung der betroffenen Gewebsabschnitte über die Wirkung von Cytokinen in einen proinflammatorischen Zustand versetzt wird (Wendt et al., 2002). Des Weiteren entsteht in Folge dieser Interaktion intrazellulär oxidativer Stress (Wautier et al., 2001). Im Entzündungsfall wurde an Gefäßendothelien eine erhöhte Expression von RAGE beobachtet.

Scavenger Rezeptoren binden chemisch modifizierte Proteine wie methyliertes Albumin, verschiedene AGEs und vermitteln deren Aufnahme in die Zelle. Eine der zu dieser Rezeptorklasse gehörigen Strukturen ist der MSR (macrophage scavenger

receptor). Dieser vermittelt die Endocytose acetylierter und oxidiertes LDL durch Makrophagen und ist so ein wesentlicher Faktor in der Genese der Atherosklerose und Schaumzellbildung (Horiuchi et al., 1996).

Des Weiteren weist das Enzym Lysozym eine hohe Affinität für AGEs auf. An mit Lysozym behandelten diabetischen Mäusen konnte in Folge einer erhöhten renalen AGE-Clearance eine frühe Albuminurie unterdrückt werden (Vlassara et al., 2001).

1.3 Nucleophosmin

Nucleophosmin ist ein multifunktionelles Protein, welches vornehmlich im Nucleolus lokalisiert ist. Es wurde 1974 erstmalig als B23 erwähnt (Prestayko et al., 1985). In der Literatur wird es später auch unter dem Namen Numatrin oder NO38 behandelt.

Nucleophosmin hat mit seinen 294 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 37 kDa und formt Hexamere. Für die Bildung von Hexameren erwiesen sich bestimmte Aminosäuresequenzen am N- und C-Terminus des Proteins als wesentlich, wobei β -Mercaptoethanol keine Auswirkung auf die Bildung von Oligomeren hatte, so dass eine Beteiligung von Disulfidbrücken an einer Verbindung der Monomere zu Oligomeren ausgeschlossen werden kann (Liu et al., 1991).

In menschlichen Zellen existieren zwei Spleißvarianten des Nucleophosmins, genannt B23.1 und B23.2. Letztere unterscheidet sich von B23.1 durch den geringeren Expressionsgrad und das Fehlen von 35 Aminosäuren am C-Terminus des Proteins. Die Fähigkeit des Nucleophosmins, Ribonucleinsäuren zu binden und RNA zu prozessieren sind an diese C-terminale Region gebunden. Ein wesentlicher Grund für die Lokalisation von B23.1 im Nucleolus liegt wahrscheinlich in dessen Fähigkeit, RNA zu binden. Hiermit stimmt die Tatsache überein, dass B23.1 als Monomer vorwiegend im Nucleolus, B23.2 jedoch zusätzlich verteilt im Cytoplasma und Nucleoplasma anzutreffen ist. B23.2 scheint im Cytoplasma mit Elementen des Cytoskelettes assoziiert zu sein (Wang et al., 1993).

Beide Spleißvarianten komplexieren in vivo miteinander. Hierbei werden Oligomere mit Molekulargewichten von 230–350 kDa gebildet (Umekawa et al., 2001). Der Expressionsgrad von B23.1 korreliert positiv mit der Teilungsrate der Zelle, während

Einleitung

B23.2 in relativ konstanter Menge exprimiert wird. Die RNA-Bindungsfähigkeit von B23.1 wird durch Komplexierung mit B23.2 dosisabhängig verringert. Sowohl die RNase-Aktivität von B23.1 als auch dessen RNA-Bindungsfähigkeit könnten auf diese Weise durch die oben genannte Bildung von Hetero-Oligomeren mit B23.2 verringert werden (Okuwaki et al., 2002).

Nucleophosmin besitzt das Potential eines molekularen Chaperons. Dies wurde an der Rhodanese der Rinderleber und an der DNA-Polymerase α nachgewiesen und wird für Protein p53 sowie Präsenilin-1, einem Protein, welchem eine Rolle in der Pathogenese der Demenz vom Alzheimer-Typ zugeschrieben wird, diskutiert (Maezawa et al., 2002). Der Schutz vor Hitze-Inaktivierung und Aggregation dieser Proteine durch B23 ist hier, wie für viele Chaperone, von dessen Oligomerisierungsstatus abhängig und im wesentlichen an den unpolaren N-Terminus des Proteins gebunden (Hingorani et al., 2000).

Eine Beteiligung des Nucleophosmins an der Ribosomenreifung ist sehr wahrscheinlich, da Nucleophosmin mit 60S und 80S präribosomalen Partikeln assoziiert (Yung et al., 1985). In einem Proteinaufschluss von Polyribosomen, ribosomalen Untereinheiten und nucleolären präribosomalen Partikeln befand sich Nucleophosmin unter denjenigen Proteinen, die nur im Zellkern anzutreffen sind. Es ist also anzunehmen, dass es zwar mit präribosomalen Partikeln assoziiert, jedoch keinen Bestandteil der endgültigen ribosomalen Untereinheiten bildet (Prestayko et al., 1985).

Aufgrund von elektronenmikroskopischen Studien konnte Nucleophosmin konzentriert in der granulären Region des Nucleolus nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass die rRNA-Synthese in den fibrillären Zentren des Nucleolus stattfindet, also auch dort, wo sich die nucleoläre DNA befindet, um sich dann mit den in der granulären Region des Nucleolus befindlichen präribosomalen Partikeln zu verbinden (Liu et al., 1999).

Des Weiteren wurde beobachtet, dass Nucleophosmin zwischen Kern und Cytoplasma wandert (Borer et al., 1989). Hierbei könnte es als Shuttleprotein für ribosomale Partikel als auch für über die Zellmembran ins Cytoplasma translozierte, und von dort zum Zellkern transportierte Proteine dienen (Frick et al., 2002).

Einleitung

Die Menge an Nucleophosmin steigt in proliferierenden Zellen um das 20fache. In einer Untersuchung von mitogen aktivierten B-Lymphozyten konnte auch ein wesentlicher Anstieg an Nucleophosmin-mRNA verzeichnet werden (Chan et al., 1990).

Das Protoonkogen Myc induziert die Expressierung von Nucleophosmin (Zeller et al., 2001). Durch die Interaktion von Nucleophosmin mit dem Transkriptionsfaktor IRF1 wird dieser inaktiviert. Da IRF1 tumorsuppressive Eigenschaften zugeschrieben werden, könnte es sich bei der Entstehung eines Ungleichgewichtes zwischen der Menge an Nucleophosmin und IRF1 in der Zelle um eine mögliche Ursache für ein verstärktes Zellwachstum handeln (Kondo et al., 1997).

In Membranproteinen ist Nucleophosmin bisher nicht nachgewiesen worden.

1.4 Zielstellung

Grundlage der vorliegenden Arbeit bilden die Ergebnisse einer MALDI-MS-Untersuchung an dem unter 1.2.1.2 beschriebenen 200 kDa-Rezeptorprotein in den Membranen der monocytären Zelllinie Mono-Mac-6 (MM6) und U937. In der Untersuchung der tryptischen Peptide des 200 kDa-Proteins der Zelllinie MM6 deckten sich die Massen von insgesamt 6 der 19 erfassten Peptide mit den entsprechenden Peptidmassen in der Aminosäuresequenz des Nucleophosmins. Im Falle der Zelllinie U937 konnte Nucleophosmin keine der erfassten Massen der tryptischen Peptide zugeordnet werden.

In dieser Arbeit sollte Nucleophosmin bzw. die mit einem polyklonalen Antikörper gegen dieses Protein erfassbaren Sequenzabschnitte des Proteins eindeutig als Bestandteil der 200 kDa-Rezeptorproteinfraktion bestätigt werden. Es sollten hierbei sowohl die monocytäre Zelllinie MM6 als auch U937 untersucht werden.

Zum Zeitpunkt der Themenvergabe war kein Antikörper gegen Nucleophosmin kommerziell erhältlich. Für die Herstellung eines solchen Antikörpers bot sich die Möglichkeit, mit Hilfe eines rekombinanten Proteins ein polyklonales Antiserum herzustellen. Dies schien erfolgversprechend, da humanes Nucleophosmin bereits rekombinant hergestellt worden war (Yang et al., 2002).

Ziel war es zunächst, ausgehend von der Gesamtzell-RNA von MM6-Zellen mittels RT-PCR und sequenzspezifischer Primer eine Nucleophosmin-cDNA herzustellen. Diese sollte dann in einen Expressionsvektor eingebaut werden. Der Vektor sollte ermöglichen, das rekombinant hergestellte Protein später mit Hilfe eines angefügten Histidin-Hexapeptides (6 x His-tag) am N-Terminus spezifisch zu isolieren und zu reinigen.

Nach Expression des rekombinanten Nucleophosmins in E.coli, dessen Aufreinigung und Anreicherung, kann durch Immunisierung eines Kaninchens ein polyklonales Antiserum gegen Nucleophosmin gewonnen werden.

In einem parallelen Auftrag und Western-Blot von Membranproteinen jeweils einer monocytären Zelllinie sollte ein Auftrag separat mit einem polyklonalen Antikörper gegen Schwerkettenmyosin Typ A, der andere mit dem polyklonalen Antiserum gegen Nucleophosmin behandelt werden. Würden sich beide Banden in gleicher Höhe im 200

Zielstellung

kDa-Bereich befinden, wäre der Nachweis von sowohl Schwerekettenmyosin Typ A, als auch Nucleophosmin als Bestandteil der 200 kDa-Membranproteinfraktion gelungen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Lösungen und Medien

Die in den einzelnen Arbeitsschritten verwendeten Lösungen und Medien sind detailliert im Anhang dargestellt.

2.1.2 Primer, sequenzspezifisch für Nucleophosmin

reverse primer	5'-ACAGCCCGGGATCAACTGTTACAGAAAT-3'
forward primer	5'-CCCCGGATCCTCTCCTACCTAAGTGCGT-3'

Die sequenzspezifische Position der Primer an der Nucleophosmin-cDNA ist im Anhang, Abbildung 18 dargestellt.

2.1.3 Die Vektoren

Als Vektor wurde das Plasmid pQE 32 verwandt. Dieses ist eines von drei „Typ IV-Konstrukten“ der Firma Quiagen (siehe Abb.1).

Von entscheidender Bedeutung ist der Plasmidabschnitt um die Multiple Cloning Site (MCS) (siehe Abb.2). Dem Startkodon ATG folgen 9 Basen, welchen sich die kodierende Sequenz für 6 Histidinreste anschließt. Diese sechs Histidinreste bilden später die Grundlage des Proteinnachweises und der Aufreinigung, da sie als Hexapeptid mit hoher Affinität an Nickelagarose binden.

Für den Klonierungsvorgang, die Darstellung des Vektors im Agarosegel usw. war die Kenntnis über Schnittstellen der Restriktasen innerhalb der MCS wichtig (siehe Abb.3). Zwischen die Spaltstelle von BamHI und SmaI wurde die Nucleophosmin-cDNA ligiert. Die Spaltstelle von HindIII wurde durch Schneiden mit dem Enzym (Appligene) für die Linearisierung des Vektors zur Charakterisierung der Transfektanten genutzt. Weder BamHI noch SmaI oder HindIII weisen Schnittstellen in der Nucleophosmin cDNA auf.

Als Selektivmarker enthalten die Vektoren das bla-Gen, welches für die β -Laktamase kodiert und somit für die Ampicillinresistenz transfektierter Bakterien verantwortlich ist.

Für die spezifische Expression eines inserierten Gens ist aufgrund von Teilsequenzen des lac-Operons im Vektor eine Induktion mit dem β -Galaktosid IPTG möglich.

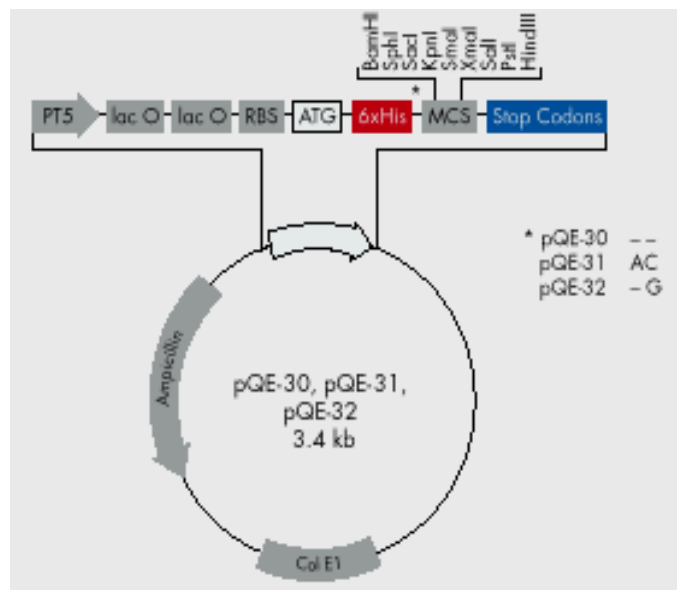


Abb.1: Grundaufbau der „Typ IV-Konstrukte“ (Quiagen); verwendet wurde das Plasmid pQE 32

5' Lac- Operon; Ribosomal binding site (RBS); ATG (Startkodon); Multiple Cloning Site (MCS); Stopkodon 3'

Abb.2: Grundaufbau der Vektorregion um die Multiple Cloning Site

5' BamHI, SphI, SacI, KpnI, SmaI, XmaI, Sall, PstI und HindIII 3'

Abb.3: Schnittstellen der MCS für Typ II Restriktionsenzyme

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation von Gesamt-RNA mittels RNeasy Mini Kit (Quiagen)

Als Ausgangsmaterial diente eine Mono-Mac-6 (MM6) – Kultur. $1,5 \times 10^6$ Zellen wurden mit $300 \times g$ 5 Minuten zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet in Lösungspuffer (1 ml Lösungspuffer + $10 \mu\text{l}$ β -Mercaptoethanol) resuspendiert. Dieser guanidinisothiocyant-haltige Puffer lysiert und homogenisiert die Probe und inaktiviert somit auch enthaltene RNAsen, zugesetztes β -Mercaptoethanol verhindert den RNA-Abbau.

Nach Auftrag der Zellsuspension auf die Qia-Schreddersäule wurde das Eluat 2 Minuten bei $15000 \times g$ in ein Eppendorfgefäß zentrifugiert.

Dem Homogenat hinzugefügt wurde 70% Alkohol und anschließend sorgfältig gemischt. Die RNA dieser Probe wurde in einem ersten Aufreinigungsschritt durch Zentrifugation, 15 Sekunden bei $8000 \times g$, in der RNeasy-Minisäule arretiert.

Dieses Material wurde mit ethanolhaltigem Waschpuffer gereinigt. Die Zentrifugationsschritte glichen hierbei den zuletzt angegebenen, wobei die Zeit beim letzten Waschschrift zum Trocknen der Membran auf 2 Minuten erhöht wurde.

Die RNA erhielt man durch zweimaliges Eluieren mit $30 \mu\text{l}$ RNase-freiem Aqua bidest. Aliquotiert wurden Proben a $5 \mu\text{l}$ und bei -70°C gelagert.

2.2.2 RNA-Gelelektrophorese

Die Proben aus der RNA-Präparation wurden zur Vorbereitung für eine Kontrollelektrophorese nach Zugabe eines formamid- und formaldehydhaltigen Ladungspuffers 5 Minuten bei 65°C denaturiert und auf 4°C abgekühlt. Verwendet wurden 37% Formaldehyd-Gele mit einer 1,2% Agarosekonzentration. Die Konzentration des Laufpuffers entsprach in der Zusammensetzung dem 1 x MOPS-Puffer (aus einem 10 x MOPS-Puffer-Konzentrat). Das Gel wurde vor dem Lauf 30 Minuten im Laufpuffer equilibriert. Die Proben wurden bei einer Spannung von konstant 100V aufgetrennt. Die Laufzeit betrug 45 Minuten.

2.2.3 RT-PCR

Die RT-PCR wurde mittels OneStep RT-PCR Kit von Qiagen durchgeführt. Eine Omniscript Reverse Transkriptase schreibt die RNA in die komplementäre cDNA um. Das Temperaturoptimum dieser Transkriptase liegt bei 50°C. Hiermit ist auch die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Sekundärstrukturen der RNA vermindert.

Die Amplifizierung der erstellten cDNA erfolgt durch eine HotStar Taq Polymerase.

Folgende Bedingungen wurden gewählt:

30 Minuten reverse Transkription, Inaktivierung der reversen Transkriptase und Aktivierung der hitzstabilen Polymerase (HotStar Taq Polymerase) für 15 Minuten bei 95°C, Denaturierung für 30 Sekunden bei 94°C, Anlagerung der Primer (Annealing) bei 57°C mit einer Dauer von 30 Sekunden und Elongation für 90 Sekunden bei 72°C.

Der Zyklus von Denaturierung über Annealing bis Elongation wurde 34 mal durchlaufen.

Der RNA-Probe wird im Reaktionsmix neben RNase freiem Wasser, einem entsprechenden Reaktionspuffer, Desoxynucleotidtriphosphaten und den Primern ein RNase-Inhibitor (40 U/ µl) hinzugefügt.

Im einzelnen für einen Ansatz von 50 µl:

RNase freies Wasser in variablem Volumen (entsprechend dem eingesetzten RNA-Probenvolumen), 10 µl Reaktionspuffer, 2 µl dNTP- Mix (Konzentration 10 mM pro dNTP), 2 µl Enzymmix, 0,5 µl RNase-Inhibitor, jeweils 1,5 µl des entsprechenden Primers mit einer Endkonzentration von 0,6 µM.

Um die Menge an einzusetzender RNA für folgende Reaktionen zu optimieren, wurden variable Mengen von Gesamt-RNA in einem Bereich von 280 bis 2484 ng verwendet.

Nachfolgende RT-PCRs wurden ausgehend von 744 ng RNA-Template (0,3 µl Probenvolumen) durchgeführt.

Das PCR-Produkt wurde anschließend mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ von Boehringer Mannheim gereinigt und in A.dest aufgenommen.

2.2.4 Plasmidpräparation der Low Copy Number Plasmide mittels peqlab Plasmid-miniprep Kit 1

Das Bakterium E.coli XL1 wurde wie unten beschrieben mit dem Plasmid pQE32 transformiert und auf ampicillinhaltigem Nährboden (LB-Plattenmedium, Ampicillinkonzentration 100 µg pro ml) ausplattiert.

Für die Plasmidpräparation wurde ein Klon über Nacht in 10 ml LB-Medium (Ampicillinkonzentration 100 µg pro ml) bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Die Bakterien wurden 15 Minuten bei 2500 x g pelletiert und das Pellet alkalisch lysiert. Zunächst wurde es in 500 µl RNase-haltigem Puffer aufgenommen. Nachdem das Pellet durch Vortexen vollständig resuspendiert war, entstand durch Zugabe von 500 µl eines Puffers II und durch sofortiges Invertieren ein klares Lysat, welches 2 Minuten bei Raumtemperatur belassen wurde.

Durch Zugeben von 700 µl einer das Lysat neutralisierenden Lösung und sofortiges Invertieren präzipitierten denaturierte Proteine, hochmolekulare RNA, denaturierte chromosomale DNA und bakterielle Zelldebris in einem unlöslichen (salzhaltigen) Komplex. Plasmidmoleküle verbleiben unter diesen Bedingungen in Lösung und können durch den Neutralisationsschritt renaturieren.

Die unlösliche Komponente wurde zwei Mal 10 Minuten bei 10000 x g abzentrifugiert und das klare Lysat vorsichtig abgenommen und auf eine HiBind-Säule aufgetragen.

Die Plasmide wurden durch mehrere Waschschrte mit ethanolhaltigem Puffer gefällt und gewaschen.

Eluiert wurde mit 50 µl A.dest.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration einer ribonucleinsäurehaltigen Probe wurde durch Absorptionsmessung bei 260 nm in Quarzküvetten bestimmt. RNase-freies, mit Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser diente als Referenz. Einer Absorption von 1,0 Einheiten entspricht hierbei eine Konzentration von 40 µg RNA pro ml.

Für desoxyribonucleinsäurehaltige Proben erfolgte die Konzentrationsbestimmung ebenfalls durch Absorptionsmessung bei 260 nm. A.dest diente als Referenz. Einer Absorption von 1,0 Einheiten entspricht hierbei eine Konzentration von 50 µg DNA pro ml.

2.2.6 Restriktionsverdau

Der Vektor pQE32 als auch das Insert (Nucleophosmin-cDNA) wurden nacheinander mit sowohl SmaI als auch BamHI geschnitten, was durch Umpuffern in die den Restriktasen zugehörigen Puffer ermöglicht wurde. Die Zusammensetzung der Reaktionspuffer für die verwendeten Restriktasen ist im Anhang dargestellt.

Beide Restriktionsverdaus im Ansatz sowohl des Vektors als auch des Inserts wurden je eine Stunde inkubiert, zunächst der SmaI-Verdau (Gibco) bei 25°C, gefolgt von einem zehnminütigen Denaturierungsschritt bei 65°C und dem BamHI-Verdau (Gibco) bei 37°C.

Im einzelnen:

1. Spaltung der Vektors

16 µl pQE 32 (3,84 µg Plasmid-DNA) 1 µl 10 x Sma-Puffer 2 µl Enzym SmaI (10U pro µl)

Spaltung des Inserts

7 µl A.dest 1 µl 10 x Sma-Puffer 9 µl cDNA (3,6 µg) 2 µl Enzym SmaI (10U pro µl)

2. Inkubation für eine Stunde

3. Denaturierung von SmaI durch zehnminütiges Temperieren bei 65°C

4. Anschließend wurde für jeden Vektoransatz hinzugefügt:

3,7 µl A.dest 2,3 µl 10 x BamHI-Puffer 4,0 µl Enzym BamHI (10U pro µl)
--

Auch dem Ansatz, welcher die cDNA enthielt, wurde hinzugefügt:

3,7 µl A.dest 2,3 µl 10 x BamHI-Puffer 4,0 µl Enzym BamHI

5. Inkubation für eine Stunde

2.2.7 Reinigung des Vektors und Inserts nach erfolgtem Restriktionsverdau

Der linearisierte Vektor wurde nach Auftrennung im Agarosegel ausgeschnitten und mittels „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen aus dem Gelstück extrahiert.

Die Gelstücke wurden mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel getrennt und gewogen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die durch Färbung mit Ethidiumbromid und Anregung mit UV- Licht sichtbaren DNA-Fragmente unter diesen Bedingungen schnell ausgeschnitten wurden, um eine Fragmentierung der DNA im UV- Licht zu vermeiden. Nun wurden auf 1 Gelvolumen 3 Volumen an Puffer QG hinzugefügt. Um hiermit die gelierte Agarose vollständig zu verflüssigen, wurde 10 Minuten unter gelegentlichem Vortexen bei 50°C temperiert. Die Lösung wurde nun auf die Säule gegeben und die DNA durch einminütiges Zentrifugieren bei 10000 x g auf der Membran arretiert. Um die DNA zu reinigen und zum Trocknen der Membran wurde mit einem ethanolhaltigen Puffer gewaschen. Eluiert wurde mit 40 µl A.dest.

Das Insert wurde mit oben erwähntem Kit von Boehringer Mannheim gereinigt. Auch hier erfolgte die Elution mit 40 µl A.dest.

2.2.8 Bestimmung der Mengenverhältnisse Vektor – Insert

Um die genauen Mengenverhältnisse von gespaltenem Vektor zu gespaltenem cDNA-Insert zu ermitteln wurden jeweils 5 µl der Vektorproben, 5 µl der gereinigten cDNA-Probe und HindIII-verdaute DNA eines λ-Phagen (Stratagene) als Marker auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Mengenverhältnisse der Phagenfragmente waren bekannt. Durch eine Analyse des Bildes in einem „Gel-Pro“ Programm (Media Cybernetics) konnten über die Interkalation von Ethidiumbromid zwischen die Basen der Nucleinsäuren und die damit verbundene Verstärkung der Fluoreszenz die Mengen an Nucleinsäuren der einzelnen Banden in der Bilddatei ermittelt werden und in Beziehung zueinander gesetzt werden. Die Stärke der Fluoreszenz der einzelnen Banden steht hierbei in Beziehung zur jeweiligen Menge an entsprechender Nucleinsäure.

2.2.9 Ligation

Ligiert wurde mit einer T4 Ligase von Q-Biogene. Das Mengenverhältnis von Vektor zu Insert betrug 1 zu 1,5 (wobei berücksichtigt ist, dass der Vektor etwa 3 mal so lang ist wie das Insert).

Der Ligationsansatz bestand im einzelnen aus:

7,5 µl Vektor pQE32 (397,5 ng)
4,5 µl Insert (186,8 ng)
1,0 µl A.dest
1,5 µl 10 x Puffer
0,5 µl Enzym (5U pro µl)
Gesamtvolumen: 15 µl

Inkubiert wurde 1 Stunde und 15 Minuten bei 22°C.

2.2.10 Herstellung kompetenter Zellen E.coli XL1

Ein Klon dieses Stammes wurde über Nacht bei 37°C in 5 ml LB-Medium (Ampicillinkonzentration 100 µg pro ml) inkubiert. Diese 5 ml wurden auf 100 ml LB-Medium überimpft und das Bakteriengemisch wuchs unter Schütteln mit guter Belüftung bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 .

Auf Eis abgekühlt wurden die Bakterien bei 4°C und 4500 x g 15 Minuten lang zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 30 ml RF1 resuspendiert, 2 Stunden bei 0°C gehalten, unter den gleichen Bedingungen nochmals zentrifugiert und in 8 ml RF2 aufgenommen.

Nach 15 Minuten bei 0°C wurden 200 µl-Aliquote in einem Ethanol-Trockeneis-Gemisch schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.11 Transformation

Einem 200 µl-Aliquot kompetenter E.coli XL1 wurden 10 µl des oben beschriebenen

Ligationsansatzes zugegeben und 30 Minuten auf Eis gehalten. Der Ligationsansatz enthielt 377,5 ng DNA in einem Volumen von 10 μ l.

Zur Aufnahme des Ligationsproduktes wurde für 90 Sekunden auf 42°C erhitzt, um unmittelbar darauf wiederum 20 Minuten auf Eis abzukühlen. Nach Zugabe von 800 μ l LB- Medium wurde zur Expression der β -Laktamase (Selektivmarker) 45 Minuten bei 37°C inkubiert.

Jeweils 100 bzw. 200 μ l-Aliquote der so transformierten Bakterien wurden auf ampicillinhaltigem LB-Plattenmedium (Ampicillinkonzentration 100 μ g pro ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.11.1 Überprüfung der Transformation

Das Transformationsergebnis wurde durch Plasmidpräparation (siehe oben) der positiven Klone und Linearisierung mittels Restriktionsverdau mit HindIII (Appligene) überprüft. Der Restriktionsansatz (20 μ l) lautete für jeweils eines der 32 Plasmideluate unterschiedlicher Klone:

10 μ l	Plasmid-Eluat (etwa 1,8 μ g)
2 μ l	10 x HindIII- Puffer
1 μ l	Enzym (10 U/ μ l)
7 μ l	A.dest

Von diesem Ansatz wurden je 10 μ l auf ein Agarosegel aufgetragen. 10 μ l des jeweiligen unverdauten Plasmids wurden parallel dazu aufgetragen.

2.2.12 Induktion eines positiven Klones und Überprüfung des Wachstumsverhaltens

Für alle Induktionen und Kulturen ampicillinresistenter Bakterien enthielt das Medium Ampicillin in einer Konzentration von 100 μ g pro ml.

Drei Milliliter einer Übernachtskultur eines positiven Klones, welcher das Plasmid

pQE32 mit Nucleophosmin-cDNA beinhaltete, wurden bei 37°C unter guter Belüftung in LB-Medium inkubiert. Hiervon wurde jeweils 1 ml auf 20 ml LB-Medium überimpft. Diese Kultur wuchs bei 37°C in einem 100 ml fassenden Kolben unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6. Nun wurden dieser Kultur 21 µl einer 1M IPTG-Stammlösung (Endkonzentration 1 mM) hinzugefügt. Die Transkription des Nucleophosmins mit His-tag wurde also zu diesem Zeitpunkt in dieser Kultur induziert.

Danach wuchsen die Kulturen für weitere 2,5 Stunden.

Um das Wachstumsverhalten der induzierten Kultur mit der nicht induzierten Kultur vergleichen zu können, wurden von beiden Kulturen aller 30 Minuten Proben zu 500 µl entnommen und deren OD₆₀₀ notiert. Diese Werte dienten zur Erstellung einer Wachstumskurve.

2.2.13 Zellaufschluss

Die Kulturen wurden wie oben beschrieben inkubiert und induziert. Vier Stunden nach Induktionszeitpunkt wurden sie in 50 ml-Blue caps überführt und bei 4°C und 2500 x g 15 Minuten pelletiert.

Die Pellets wurden in 200 µl eiskaltem Lösungspuffer aufgenommen und Proteaseinhibitor PMSF in einer Endkonzentration von 1 mM dazugegeben.

Die Zellwände wurden durch dreimaligen Wechsel von Schockgefrieren mittels Trockeneis/Ethanol-Gemisch und Auftauen (freezing and thawing) sowie durch Ultraschall bei 50 Watt in 0,5 Sekunden Abständen gebrochen. Beschallt wurde eine Minute in einem 2 ml Eppendorfgefäß und unmittelbar nach Beschallung wurde nochmals PMSF auf eine Endkonzentration von nun 1,5 mM ergänzt. Alle Schritte wurden unter Kühlung mit Eis durchgeführt.

Der Proteinextrakt wurde bei 4°C 30 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt.

2.2.14 Proteinmengenbestimmung

Die Proteinmengenbestimmung erfolgte mittels Absorptionsmessung bei 280 nm. A.dest diente als Referenz. Einer Absorption von 0,58 Einheiten entspricht hierbei eine Konzentration von 1 µg Protein pro µl.

Die zweite Methode zur Bestimmung der Proteinmenge war die Proteinmengenbestimmung nach Bradford. Dies erfolgte mittels eines Protein Assays von Bio-Rad.

Die Grundlage bildet die Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie-Brilliant-Blau von 465 auf 595 nm in Gegenwart von Proteinen in saurem Milieu.

Als Standardprotein diente humanes Serumalbumin. Es wurde in dem jeweiligen Lösungspuffer, hier in 20 µl Puffer E gelöst. Als Leerwert diente destilliertes Wasser. Die Probenvorbereitung wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Tab.1: Pipetierschema zur Probenvorbereitung und Erstellung einer Eichkurve nach der „Microassay Procedure“ (Bio-Rad)

Volumen einer HSA Lösung von 1 mg pro ml (in Puffer E)	1 µl	2 µl	3 µl	usw.
Volumen an Puffer E	19 µl	18 µl	17 µl	usw.
Volumen an A.dest	780 µl	780 µl	780 µl	usw.
Volumen an 5fach Konzentrat der Färbelösung	200 µl	200 µl	200 µl	usw.

Auf diese Weise konnte folgende Eichkurve erstellt werden:

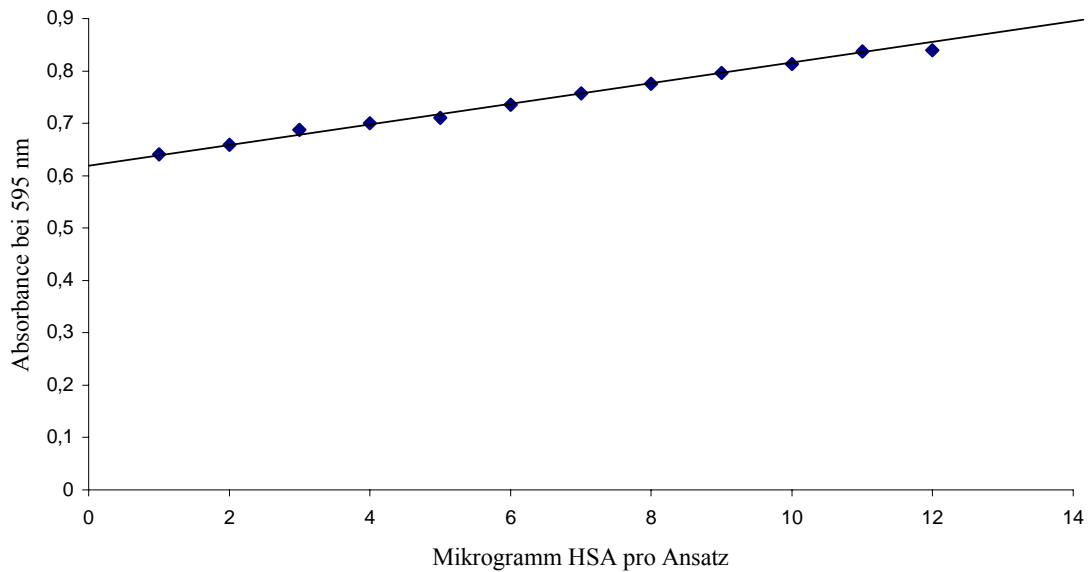


Abb.4: Eichkurve zur Proteinmengenbestimmung nach Bradford, HSA diente als Standard

2.2.15 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Darstellung des rekombinanten Nucleophosmins wurden Gele mit einer Polyacrylamidkonzentration von 10% gewählt, da der Trennbereich hier zwischen 20 und 70 kDa liegt. Auf 37,5 µl der Proteinproben kamen 12,5 µl 4 x Ladungspuffer. Die Proteine wurden 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend aufgetragen. Sekundär- und Tertiärstrukturen wurden durch den Überschuss an SDS im Ladungspuffer und durch die hohe Temperatur über Aufspalten der Wasserstoffbrückenbindungen gelöst.

Die Proben wurden in Mini-Gelen mit einer Stromstärke von 25 mA in einem Zeitintervall von 45 bis 60 Minuten aufgetrennt. Die Maße des Trenngels betragen 9,5 cm in der Breite und 5,5 cm in der Länge.

2.2.16 Western Blot und Immunodetektion

Die Immunodetektion des His-tag Proteins wurde mit Penta-His-Antikörpern von Qiagen als Primäantikörper durchgeführt. Dies sind monoklonale IgG1 Antikörper, die aus Hybridomen von Mauslymphozyten und Mausmyelomzellen gewonnen wurden. Diese Antikörper weisen eine hohe Spezifität für das Histidinhexapeptid auf und sind für einen indirekten Nachweis eines rekombinanten Proteins mit His-tag auf Nitrozellulosemembranen geeignet.

Als Sekundäantikörper wurde ein Anti-Maus IgG, welches mit dem Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt war, verwendet. Der als Markerenzym eingesetzten Phosphatase diente BCIP als Substrat, wobei der in der Farbreaktion entstehende Niederschlag von Indigo in seiner Farbintensität durch NBT verstärkt und um das purpurfarbene Diformazan ergänzt wird.

Für den Western-Blot wurde eine Tankblotting Apparatur verwandt (siehe Abbildung 5). Das Gel wurde vorsichtig aus der Midget-Apparatur entnommen und mit Handschuhen, um mögliche Kontamination zu vermeiden, auf ein Nitrozellulosemembranstück der selben Größe aufgebracht. Sowohl auf Membran-, als auch auf Gelseite befinden sich 4 Stücken Filterpapier. Membran und Filterpapier waren vorher in Transferpuffer eingeweicht worden. Beim Zusammensetzen des Blot-sandwiches wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen befanden.

Transferiert wurde aufgrund der geringen Größe des zu detektierenden Proteins nur etwa 1,5 Stunden bei 164 – 177 mA und maximaler Spannung.

Nach Transfer wurden sowohl die Membran als auch das Gel markiert, um nach erfolgter Immunodetektion eine Orientierung auf der Membran zu haben. Die Membran wurde mit Ponceau-S Färbelösung eingefärbt und die Markerbahn abgeschnitten.

Da Milchpulver als Blockierreagenz die Detektion des His-tags mittels der Anti-His-AK erschwert, wurde BSA als blockierendes Reagenz verwendet.

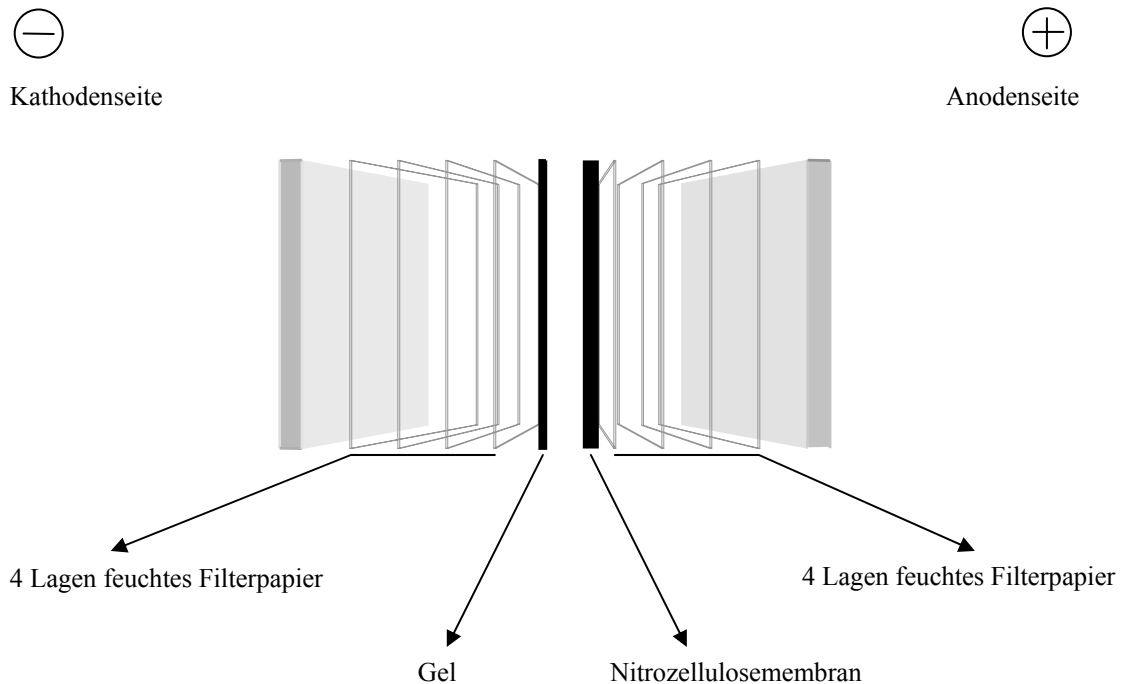


Abb.5: Aufbau der Tank-blotting Apparatur

Die Membran wurde nun in folgender Weise behandelt:

1. Waschen von 2 x 10 Minuten in TBS-Puffer
2. Eine Stunde Inkubation in Blockierpuffer
3. Waschen von 2 x 10 Minuten in TBS-Tween/Triton-Puffer und 10 Minuten in TBS-Puffer
4. Eine Stunde Inkubation mit dem Primärantikörper: Penta-His-Antikörper (Qiagen) in einer Verdünnung von 1 zu 1000 in Blockierpuffer
5. Waschen von 2 x 10 Minuten in TBS-Tween/Triton-Puffer und 10 Minuten in TBS-Puffer
6. Eine Stunde Inkubation mit dem Sekundärantikörper: Anti-Maus-IgG (Qiagen) mit alkalischer Phosphatase in einer Verdünnung von 1 zu 10000 in Blockierpuffer
 - aufgrund der zunächst schwachen Ergebnisse wurde das Membranstück in den folgenden Western-Blots über Nacht in einem geschlossenen Gefäß bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert
7. Waschen von 4 x 10 Minuten in TBS-Tween/Triton-Puffer

8. Waschen von 5 Minuten in Puffer A
9. Färben in Färbelösung bis Banden sichtbar waren
10. Abstoppen der Reaktion mit 20 mM EDTA, pH 8,0
11. Spülen mit Wasser

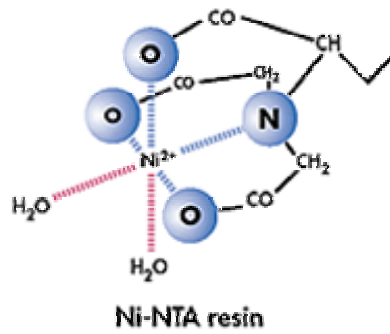
2.2.17 Das QIAexpress Detection System

Das QIAexpress Detection System basiert auf einer Nickel-Nitrotriessigsäure (Ni-NTA) Metall-Affinitätschromatographie. Diese gründet auf der Selektivität und Affinität für Proteine, die ein tag in Form von 6 Histidinresten aufweisen. NTA besetzt vier von sechs Ligandenbindungsstellen in der Koordinationssphäre des Nickelions, so dass das Metallion fest an der Matrix haftet. Zwei Bindungsstellen verbleiben zur Komplexbildung mit dem His-tag (siehe Abb.6).

Die Reinigung eines Proteins mit His-tag erfolgt nach dem QIAexpress Protein Purification System in vier Schritten: Zellyse, Bindung, Waschen und Elution. Hierbei ist es möglich, die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen oder in nativer Form vorzunehmen.

Die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen, die zu einem unerwünschten Hintergrund bzw. mangelnder Reinheit des Proteins führen, ist bei einer Reinigung unter nativen Bedingungen höher. Imidazol dient bei dieser Methode als Kompetitor am Nickelion, unter Zuhilfenahme von Waschpuffern steigender Imidazolkonzentration können unspezifische Bindungen gelöst werden. Die Elution erfolgt ebenfalls über diesen kompetitiven Weg (Imidazolkonzentration im Puffer 100-250 mM).

In manchen (seltenen) Fällen kann das His-tag in der nativen Form des Proteins in der Tertiärstruktur verborgen sein und steht somit nicht für eine Reinigung zur Verfügung. Im Gegensatz dazu liegt bei einer Reinigung unter denaturierenden Bedingungen das tag in jedem Falle frei vor und ist damit gut zugänglich.



6 x His Metallion Chelator

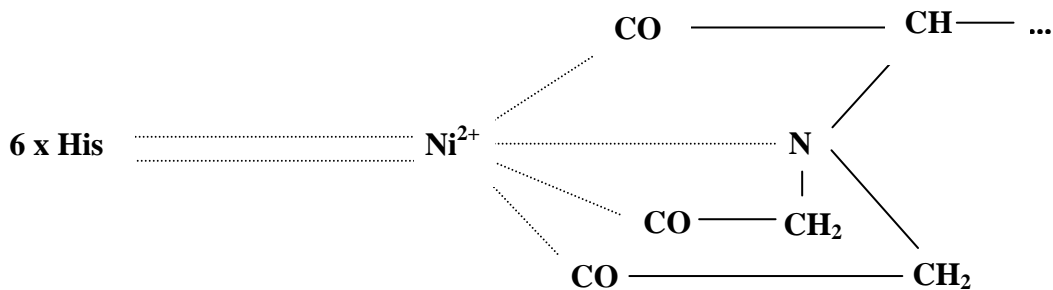


Abb.6: Abbildung zur Verdeutlichung der Struktur und des Bindungsverhaltens des Nickelions an sowohl Matrix (Chelator) als auch 6 x His-tag; obere Abbildung im Internet unter <http://www.qiagen.com>

Die Wasch- und Elutionsmethode bei Reinigung unter denaturierenden Bedingungen besteht in einer Senkung des pH-Wertes von 8,0 auf 4,5. Die Histidinreste des tags mit einem pK_a -Wert von 6,0 werden protoniert, wenn der pH-Wert gesenkt wird. Unter diesen Bedingungen wird die Bindung des tags an das Nickelion gelöst und das Protein eluiert.

Die Reinigung ist in einem Säulen- oder Batch-Verfahren möglich. Beim Batch-Verfahren wird die Nickel-Agarose direkt zum Lysat gegeben und nach jedem Wasch- bzw. Elutionsschritt abzentrifugiert. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass auch Protein, welches in geringer Konzentration vorliegt, gut aus dem Gesamtlisat gereinigt wird und eluiert werden kann.

2.2.18 Zellaufschluss und Reinigung von Nucleophosmin mittels QIAexpress-System

Aufschluss und Reinigung wurden sowohl unter denaturierenden als auch unter nativen Bedingungen und mit einer Kombination von beiden durchgeführt, um die Methode zu ermitteln, mit der die optimale Reinheit und Ausbeute an Protein mit tag erzielt werden konnte.

2.2.18.1 Native Bedingungen

Das Pellet einer induzierten 21 ml-Kultur, die Kultur war nach Induktionszeitpunkt 4 Stunden gewachsen (siehe oben), wurde in 750 µl Lösungspuffer (10 mM Imidazol) aufgenommen und PMSF zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt.

Nun wurden 350 µg Lysozym hinzugefügt und diese Suspension 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Da die Zellen auch nach gründlichem Vortexen dieser Lösung noch nicht vollständig lysiert waren (trübe, nicht durchsichtige Suspension), wurde zusätzlich eine Minute lang unter Kühlung in 0,5 Sekunden-Intervallen bei 50 Watt mit Ultraschall behandelt. Ein klares Lysat zeigte eine vollständige Lyse an.

Das Lysat wurde 10 Minuten bei 13500 x g zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt.

Nun wurden 70 µl der Nickel-Agarose (Quiagen) hinzugefügt und 30 Minuten unter sanftem Schütteln bei 4°C inkubiert.

Gewaschen wurde unter Schütteln drei Mal 10 Minuten mit 350 µl Waschpuffer (20 mM Imidazol), die Nickel-Agarose wurde vor jedem Waschschrift 10 Sekunden bei 13500 x g abzentrifugiert, das überstehende Lysat bzw. der überstehende Waschpuffer abgenommen und neuerlich Waschpuffer hinzugefügt.

Eluiert wurde drei Mal auf die gleiche Art mit 30 µl Elutionspuffer (250 mM Imidazol).

2.2.18.2 Denaturierende Bedingungen

Das Pellet einer induzierten 21 ml-Kultur (siehe oben), wurde in 750 µl Puffer B (pH 8,0) aufgenommen und PMSF zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt.

Die Zellsuspension wurde gründlich gevortext und anschließend wie oben mit Ultraschall behandelt. An dieser Stelle wurde nochmals 5 mM PMSF dazugegeben. Auch hier zeigte ein klares Lysat eine vollständige Lyse an.

Das Lysat wurde 10 Minuten bei 13500 x g zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt.

Nun wurden 30 µl der Nickel-Agarose (Quiagen) hinzugefügt und 30 Minuten unter sanftem Schütteln inkubiert.

Gewaschen wurde unter Schütteln drei Mal 10 Minuten mit 350 µl Puffer C (pH 6,3), die Nickel-Agarose wurde vor jedem Waschschrift wie oben 10 Sekunden bei 13500 x g abzentrifugiert.

Eluiert wurde drei Mal mit 30 µl Puffer E (pH 4,5).

2.2.18.3 Denaturierende und native Bedingungen

Hierbei wurden wieder ausgehend von dem Pellet einer 21 ml-Kultur zunächst die Schritte der Reinigung unter denaturierenden Bedingungen bis zu den Waschschriften durchlaufen. Nach dreimaligem Waschen mit Puffer C (pH 6,3) sollte die Nickelagarose mit dem rekombinanten Protein durch weitere Waschschriften gereinigt werden. Es war davon auszugehen, dass die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen nach drei Waschschriften erschöpft war (siehe Ergebnisse). Deshalb wurden, um die Reinheit des Eluats noch zu erhöhen, Waschschriften, die Verunreinigungen kompetitiv aus der Bindung an Nickelagarose verdrängen, zusätzlich durchgeführt.

Um den pH-Wert wieder zu heben wurden die Proben 5 Minuten im Lösungspuffer der nativen Vorgehensweise inkubiert (10 mM Imidazol, pH 8,0) und anschließend ebenfalls kompetitiv gewaschen (20 mM Imidazol, pH 8,0) und eluiert (250 mM Imidazol, pH 8,0).

2.2.19 Massenspektrometrische Untersuchung des His-tag Proteins

Für einen eindeutigen und definitiven Nachweis der Identität des unter den genannten Bedingungen gereinigten Proteins wurde dieses massenspektrometrisch untersucht.

Hierfür wurden 10 µl der unter denaturierenden Bedingungen gereinigten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Potentielle Bruchstücke und Oligomere wurden nicht analysiert, da sie im Eluat in einer Konzentration nahe der Nachweisgrenze vorlagen.

Das Gel wurde mit dem Farbstoff Roti-Blue gefärbt. Diese Färbung basiert auf der hochspezifischen Bindung von Coomassie-Brilliant-Blau G-250 an Proteine. Dieses hat in der Roti-Blue-Färbelösung kolloidale Eigenschaften, wodurch der Gelhintergrund nur minimal angefärbt und auch die Sensitivität gegenüber der herkömmlichen Färbung erhöht ist (weniger als 30 ng Protein sind auf diese Weise in einem Polyacrylamidgel nachweisbar).

Das Gel wurde zunächst für eine Stunde in eine Fixierlösung gegeben. Um eine hohe Tiefenfärbung zu erreichen, wurde es anschließend über Nacht in Färbelösung geschwenkt, um dann in einer Waschlösung gereinigt zu werden.

Die im Bereich von 40 kDa prominente Bande wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in 80 µl A.dest aufgenommen.

Alle Schritte wurden mit Mundschutz und Handschuhen durchgeführt, um eine mögliche Kontamination des Materials mit dem Keratin der Hautschuppen oder ähnlichen verunreinigenden Substanzen zu vermeiden.

Mit der Protease Trypsin lassen sich Proteine direkt in der Polyacrylamidmatrix spalten. Die entstandenen Bruchstücke werden dann massenspektrometrisch analysiert und die Teilmassen mit einer entsprechenden Datenbank verglichen. Da die Massen der tryptischen Peptide charakteristisch für das jeweilige Protein sind, kann aus dieser Massenbestimmung direkt auf das zugrundeliegende Protein geschlossen werden.

Das Gelstück wird für die Spaltung mit Puffer gewaschen, geschrumpft und anschließend mit in Puffer gelöster Protease versetzt. Das geschrumpfte Gel nimmt beim Quellen Puffer und Protease auf. Die Spaltpeptide werden dann durch Diffusion aus dem Gel eluiert.

Das Protein wurde bei 37°C über Nacht mit der Protease inkubiert. Die Peptidlösung wurde anschließend mittels eines POROS 50R2-Materials (Applied Biosystems, Foster City, MD, USA) entsalzt. Eine gesättigte α -Cyano-4-Hydroxymethylsäurelösung in 70% Acetonitril, welche Standardpeptide enthielt, wurde verwendet, um die Peptide aus der Entsalzungssäule zu eluieren. Zur Erstellung der Massenspektren wurde eine MALDI-TOF-Massenspektroskopie (Voyager, DE-STR, Applied Biosystems) durchgeführt. Die Analyse der Peptidmassen erfolgte mittels MS-FIT-Software, im Internet unter <http://prospector.ucsf.edu>. Zum Vergleich der Peptidmassen und Teilsequenzen mit berechneten Werten für die entsprechenden tryptischen Peptide wurde die NCBI-Datenbank genutzt.

2.2.20 Reinigung von Nucleophosmin aus Großkulturen

Für die Reinigung von Nucleophosmin aus größeren Kulturen, z.B. 700 ml, wurden jeweils 5% des Volumens an LB_{Amp}-Medium, z.B. 35 ml, mit einem positiven Klon, mit welchem bis zu diesem Zeitpunkt gearbeitet worden war, angeimpft. Diese 35 ml wurden dann nach Inkubation über Nacht (gute Belüftung, 37°C) in vorbereitete 700 ml LB_{Amp} gegeben und die nun 735 ml inkubiert und induziert wie oben angegeben. 5 Stunden nach Induktionszeitpunkt wurde die Kultur in 50 ml blue caps verteilt und in diesen 15 Minuten bei 4°C mit 2500 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden über Nacht bei -20°C eingefroren.

Jedes Pellet, das 50 ml Bakterienkultur entsprach, wurde in 2000 μ l Puffer B (pH 8,0) aufgenommen und 7,5 μ l einer 100 mM PMSF-Stammlösung (Endkonzentration 0,37 mM) hinzugefügt.

Die Zellsuspension wurde gründlich gevortext. Nun wurden jeweils 1000 μ l der Zellsuspension in frische 2 ml Eppendorfgefäße überführt. Jedes Gefäß enthielt nun etwa eine Proteinmenge, die 25 ml Kultur entsprach. Anschließend wurde wie oben mit Ultraschall behandelt. Unmittelbar nach Beschallung wurde nochmals PMSF auf eine Endkonzentration von 1 mM ergänzt.

Das Lysat wurde 10 Minuten bei 13500 x g zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt.

70 µl der Nickel-Agarose wurden zu je 1000 µl Proteinlösung (25 ml Bakterienkultur) hinzugefügt und 30 Minuten unter sanftem Schütteln inkubiert.

Gewaschen wurde unter Schütteln zwei Mal 10 Minuten mit 350 µl Puffer C (pH 6,3), die Nickel-Agarose wurde vor jedem Waschschrift wie oben 10 Sekunden bei 13500 x g abzentrifugiert.

Eluiert wurde sechs Mal mit 30 µl Puffer E (pH 4,5).

2.2.21 Reinigung von Nucleophosmin aus einer 8M Harnstofflösung, pH 4,5, mittels Dialyse und Lyophilisation

Das vereinigte Eluat wurde zwei Mal 10 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert, um Restbestände an Nickelagarose vollständig zu entfernen. Das Material wurde anschließend gegen steriles Wasser dialysiert.

Verwendet wurden jeweils 1 ml des Eluats gegen 1,5 Liter steriles Wasser. Nach 24 Stunden Dialyse wurde nochmals 24 Stunden gegen 800 ml steriles Wasser dialysiert. Die Dialyseflüssigkeit wurde hierbei auf konstant 4°C gehalten. Bei einer vollständigen Gleichgewichtseinstellung, den Volumenzuwachs des Dialysats nach dem ersten Teilschritt mitberücksichtigt, läge Harnstoff nun in einer Konzentration von 8 µM vor. Diese und höhere Harnstoffkonzentrationen im Lyophilisat waren in der anschließenden Immunisierung tolerierbar.

2.2.22 Herstellung eines Antiserums durch Immunisierung von Kaninchen

Die Herstellung von Antikörpern gegen das so gereinigte Protein erfolgte durch Immunisierung zweier Kaninchen. Mit dieser Immunisierung wurde die Firma SeqLab (Göttingen) beauftragt. Vor Erstapplikation wurde den Tieren Blut abgenommen, um ein Prä-Immuserum zu erhalten. Der Erstapplikation bzw. Immunisierung folgten im Abstand von einem Monat drei Auffrischungsinjektionen bzw. Booster-Injektionen. Einen Monat nach den Boosterungen wurden den Tieren die Antiseren mit polyklonalen Antikörpern gegen das lyophilisierte Protein entnommen.

2.2.23 Präparation von Membranproteinen der monocytären Zelllinien MonoMac6 und U937

Die Zellen der monocytären Zelllinien MM6 und U937 wurden in RPMI-Medium (Biochrom) mit einem 10% Anteil hitzeinaktivierten fetalen Kälberserums und 100 µg/ml Kanamycin aufgezogen. Für eine Präparation wurden $8 \cdot 10^7$ Zellen der entsprechenden Zelllinie, die in mittelgroßen Zellkulturflaschen (Volumen 260 ml mit einer Grundfläche von 75 cm²) konfluent gewachsen waren, vereinigt.

Die Zellen wurden 10 Minuten bei 4°C und 2600 x g pelletiert.

Das Zellpellet wurde zwei Mal mit 50 ml 1 x PBS und ein Mal mit 50 ml 1 x PBS, mit 10 mM EDTA versetzt, gewaschen und wieder abzentrifugiert wie oben angegeben.

Anschließend wurde das Pellet in einem Homogenisierungspuffer von 3 ml 1 x PBS, 10 mM EDTA mit Proteaseinhibitoren (in Art und Zusammensetzung dem Lösungspuffer entsprechend) aufgenommen und resuspendiert. Zur Homogenisierung dieser Suspension wurde ein Glas-Homogenisator verwandt.

Das so erzeugte Homogenisat wurde 30 Minuten bei 4°C und 100000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um membrangebundene Proteine zu entfernen wurden die pelletierten Proteine in einem zehnfachen Volumen an Homogenisierungspuffer und anschließend in einer Lösung von 10 mM Tris/HCl – 0,1 mM EDTA (pH 7,4) gewaschen.

Das Pellet wurde nun in 3 ml eines oktylglucosidhaltigen Lösungspuffers mit Proteaseinhibitoren aufgenommen und nochmals wie oben homogenisiert. Das Homogenisat wurde nun 30 Minuten bei 4°C geschüttelt.

Die zellulären Debris wurden durch nochmaliges Zentrifugieren von 60 Minuten bei 4°C und 100000 x g pelletiert und verworfen. Die durch das verwendete nichtionische Detergenz in Lösung verbliebenen Membranproteine wurden schockgefroren und bei 70°C gelagert.

Die Proteinmengenbestimmung erfolgte wie beschrieben durch Absorptionsmessung bei 280 nm.

2.2.24 Proteinauftrennung, Western Blot und Immunodetektion von Membranproteinen

Die Auftrennung von Membranproteinen der monocytären Zelllinien MM6 und U937 erfolgte in einem 7,5% Polyacrylamidgel, da hier im Gegensatz zum Nucleophosmin mit einem Molekulargewicht von 37 kDa das Hauptaugenmerk auf einem Protein mit einem Molekulargewicht von 200-220 kDa lag (siehe Kapitel 1, Abschnitt 1.2.1.2 und 1.4). Der Trennbereich liegt bei einem 7,5% Gel zwischen 50 und 210 kDa.

Das maximal aufgetragene Probenvolumen an Membranproteinen in den verwendeten Mini-Gelen (9,5 x 5,5 cm) betrug unter Zusatz des verwendeten 4 x Ladungspuffers 200 µl. Die Konzentration von β -Mercaptoethanol im Ladungspuffer betrug 5%. Dies erwies sich für eine Reduktion von Disulfidbrücken in den Proteinen als ausreichend. Die Denaturierung der Proben erfolge wie unter 2.2.15 beschrieben. Die aufgetragenen Proteinmengen sind den Tabellen 2 und 3 zu entnehmen.

Die Zusammensetzung des Blotsandwiches wurde wie unter 2.2.16 vorgenommen. Der Tank-blotting Puffer enthielt für einen guten Transfer im höhermolekularen Bereich kein Methanol. Die Wechselwirkung von SDS-Molekül und Protein bleibt so im Blotverlauf länger erhalten; es erfolgt eine effizientere Elution der höhermolekularen Proteine aus der Gelmatrix.

Transferiert wurde 5 bis 8 Stunden bei 500 mA und maximaler Spannung.

Die ausgewählte transferierte Bahn auf der Nitrozellulosemembran wurde nach Einfärbung mit Ponceau-S Färbelösung in folgender Weise behandelt:

1. Waschen von 2 x 10 Minuten in TBS-Puffer
2. Zwei Stunden Inkubation in Blockierpuffer (Blockierreagenz Milchpulver)
3. Über Nacht Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper in Blockierpuffer (siehe auch Kapitel 3, Abschnitt 3.6.2); die Verdünnung der verwendeten Primärantikörper ist detailliert in Tabelle 2 und 3 dargestellt.
 - Prä-Immunserum aus der Auftragsimmunisierung
 - Immunserum aus der Auftragsimmunisierung

Materialien und Methoden

- Anti-B23 AK (Santa Cruz); ein polyklonaler Peptidantikörper, im Kaninchen erstellt
 - Anti-Myosin heavy chain Typ A (Eurogentec, Amsterdam, Niederlande); ein im Kaninchen erstelltes polyklonales Antiserum
4. Waschen von 2 x 10 Minuten in TBS-Tween/Triton-Puffer und 10 Minuten in TBS-Puffer
 5. Eine Stunde Inkubation mit Anti-Kaninchen-IgG, gekoppelt mit dem Enzym alkalische Phosphatase (Sigma) in einer Verdünnung von 1:10000 bis 1:20000 in Blockierpuffer
 6. Waschen von 3 x 10 Minuten in TBS-Tween/Triton-Puffer
 7. 2 Minuten Inkubation in Puffer A
 8. Färben in Färbelösung bis Banden sichtbar waren
 9. Abstoppen der Reaktion mit 20 mM EDTA, pH 8,0
 10. Spülen mit Wasser

Tab.2: Menge an aufgetragenen MM6-Membranproteinen und Konzentrationen der in den Western-Blots eingesetzten Primärantikörper

Abb. 15, Bahn	1	2	3	4	5	6
Aufgetragene Menge MM6-Membranproteine in mg	4,1	1,0	4,5	4,5	4,5	4,5
Verwendeter Primärantikörper	Prä-IS	Anti-Myosin heavy chain Typ A	IS aus 2. Blutung	IS aus 2. Blutung	Anti B23 AK	IS aus 2. Blutung, mit lyophilisiertem Nucleophosmin in Lösung vorinkubiert (Kompetitions-experiment)
Verdünnung	1:1000	1:2000	1:1000	1:500	1:100	1:1000

Tab.3: Menge der aufgetragenen U937-Membranproteine und Konzentrationen der in den Western-Blots eingesetzten Primärantikörper

Abb.16 Bahn	1	2	3	4	5
Aufgetragene Menge U937- Membranprote- ine in mg	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
Verwendeter Primärantikörper	IS aus 2. Blutung	Anti- Myosin heavy chain Typ A	IS aus 2. Blutung	IS aus 2. Blutung	Anti-B23 AK
Verdünnung	1:250	1:2000	1:250	1:250	1:100

2.2.25 **Kompetitionsexperiment (Immunabsorption)**

100 µg des rekombinanten Nucleophosmins (Kapitel 2, Abschnitt 2.2.21) wurden in 195 µl 1 x PBS-Puffer gelöst. Dieses Volumen wurde mit 5 µl des Immuserums aus 2. Blutung auf 200 µl ergänzt. Der Ansatz wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden der Probe 4,8 ml Blockierpuffer hinzugefügt (Blockierreagenz MP). Der so ergänzte Ansatz wurde nochmals zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Die Konzentration des so behandelten Primärantikörpers im Blockierpuffer betrug nun 1:1000.

Der Western-Blot eines im Polyacrylamidgel aufgetrennten Probenaliquotes der Membranproteine MM6 wurde mit diesem vorbehandelten Primärantikörper wie unter 2.2.24 beschrieben behandelt.

3 Ergebnisse

3.1 Präparation von Gesamtzell-RNA aus MM6-Zellen und Herstellung einer Nucleophosmin-cDNA

Für die durchgeführten Präparationen von Gesamtzell-RNA der monocytären Zelllinie MonoMac 6 wurden RNA-Konzentrationen von 140 bis 2484 µg RNA/ml ermittelt. In einem 37% Formaldehyd-Gel konnten eine jeweils stärkere 28S-Bande und eine schwächere 18S-Bande ribosomaler RNA nachgewiesen werden.

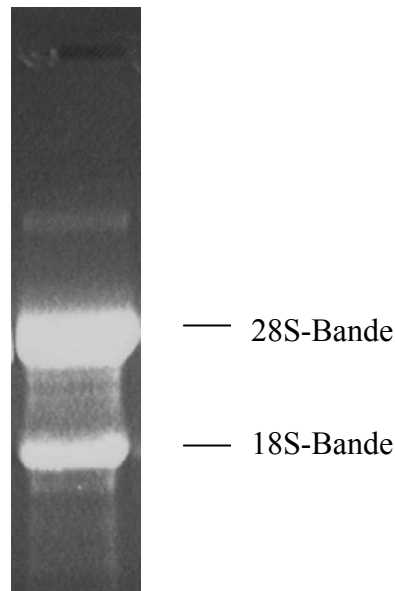


Abb.7: Präparation von Gesamtzell-RNA aus MM6 Zellen
37% Formaldehydgel; 2,5 µl (6,3 µg) RNA in Ladungspuffer aufgetragen

Die gesuchte mRNA liegt in ihrer Kopienzahl unter der Nachweisgrenze. Der Nachweis von weitgehend intakter ribosomaler RNA wird als repräsentativ angesehen.

Diese RNA sollte für eine RT-PCR genutzt werden, wofür auch die Proben niedriger Konzentration gut verwendbar waren.

Ausgehend von der Total-RNA aus MM6-Zellen wurde mittels RT-PCR eine Nucleophosmin-cDNA hergestellt. Innerhalb der verwendeten Primer (die Sequenzen sind in Kapitel 2, Abschnitt 2.1.2, die sequenzspezifische Position der Primer an der Nucleophosmin-cDNA ist im Anhang, Abbildung 18 dargestellt) befinden sich

Ergebnisse

Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen; Nucleotidsequenz GGATCC für Restriktase BamHI im forward primer und CCCGGG für Restriktase SmaI im reverse primer. Diese Restriktasen wurden nach Überprüfung der B23-Nucleotidsequenz ausgewählt, da sie die cDNA lediglich an den über eine RT-PCR angepassten Enden schneiden würden, innerhalb der cDNA existieren keine Schnittstellen.

Die Konzentration der auf diese Weise hergestellten amplifizierten cDNA nach Reinigung betrug ausgehend von 744 ng RNA-Template durchschnittlich 400 µg pro ml.

Die Gesamtlänge der Nucleophosmin-cDNA beträgt 1296 bp. Unter Berücksichtigung der Anlagerungsstellen der Primer an der mRNA bzw. cDNA in der RT-PCR ergaben sich für die Länge des Amplifikates 988 Basenpaare (siehe Abbildung 8). Hierbei wurden 63 Basenpaare vom 5'- und 245 Basenpaare vom 3'- Ende nicht mitamplifiziert.

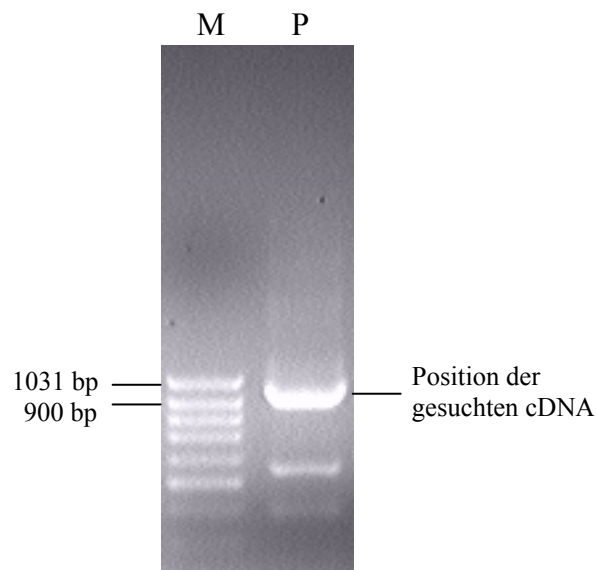


Abb. 8: Überprüfung der Länge des Amplifikates nach RT-PCR. Bahn M: PeqGOLD 100 bp-Leiter; Bahn P: Probe von 10 µl ungereinigten RT-PCR-Materials. Die erwartete Bande lag in der gewünschten Position von etwa 1000 bp

3.2 Herstellung eines rekombinanten Klones

Der E.coli-Stamm XL1 wurde mit dem Plasmid pQE 32 transformiert. Anschließend wurde das Plasmid mittels peqlab Plasmidminiprep Kit 1 aus den Zellen isoliert. Die erzielten Konzentrationen an Plasmid-DNA im Eluat betragen im Mittel 250 µg pro ml. Nun wurden sowohl das Plasmid pQE 32 als auch die cDNA als Insert nacheinander mit den Restriktasen SmaI und BamHI geschnitten. Die Restriktionsansätze wurden in einem Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurden sowohl Vektor als auch Insert aus dem Gel geschnitten und gereinigt.

Die Bestimmung der Konzentrationsbezüge von Vektor pQE32 zum cDNA-Insert ermöglichte es, in der Ligation die Menge an Vektor-DNA zu cDNA in einem Verhältnis von 1 zu 1,5 einzusetzen.

Nach erfolgter Ligation wurde der rekombinante Vektor auf kompetente Zellen E.coli XL1 transformiert. Zur Einzelkolonieselektion wurden die rekombinanten Zellen auf ampicillinhaltigem LB-Plattenmedium (Ampicillinkonzentration 100 µg pro ml) ausplattiert und nach Wachstum über Nacht konnten Kolonien beobachtet werden.

Die Größe des Plasmids mit cDNA-Insert betrug damit etwa 4400 Basenpaare.

Das Transformationsergebnis wurde durch Plasmidpräparation der positiven Klone und Linearisierung der Plasmide mittels Restriktionsverdau mit HindIII überprüft.

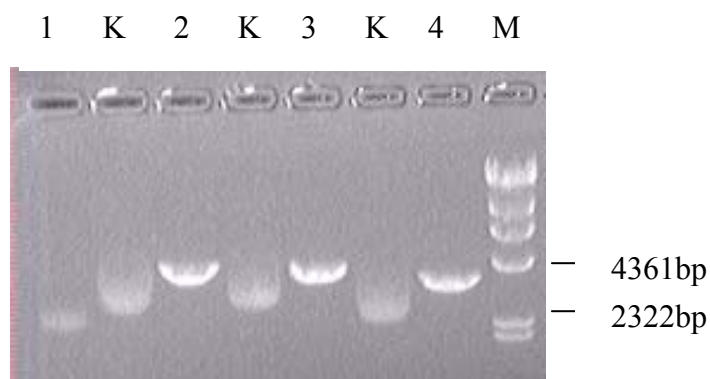


Abb.9: Durch Verdau mit Hind III linearisierte Plasmide rekombinanter Klone
Bahn 1: Linearisierter Vektor ohne Insert; Bahnen 2-4: Linearisierte Vektoren mit Nucleophosmin-cDNA Insert; Bahnen K: nicht linearisierte Kontrollen; Bahn M: λ-DNA, HindIII gespalten

Ergebnisse

Aufgrund der gewählten Spaltstellen für BamHI und SmaI im Plasmid und Restriktionsverdau des Inserts mit den selben Enzymen ließ sich voraussagen, dass das Plasmid pQE32 als Vektor das Insert mit hoher Wahrscheinlichkeit in korrektem Leseraster für Nucleophosmin beinhaltete (siehe auch Kapitel 2, Abschnitt 2.1.3.):

- 1) 5' ccc **cgg** **atc** *ctc tcc tac cta agt gcg* t 3'
- 2) 5' **g** **atc** *ctc tcc tac cta agt gcg tgc cgc cac ccg atg* ... 3'
- 3) 5' ...*ATG* **AGA GGA TCT** ; 6 x His ; **GGg** **atc** *ctc tcc tac cta agt gcg tgc cgc cac ccg atg* ... 3'

Unter 1) ist der in der RT-PCR für die Amplifikation der Nucleophosmin-cDNA verwendete Forward Primer dargestellt. Er enthält am 5'Ende einen BamHI Linker und wurde so konstruiert, dass der offene Leseraster für das Nucleophosmin im Expressionsvektor pQE32 erhalten bleibt. Die BamHI Linkerstruktur ist fett hervorgehoben.

Das 5'Ende des Nucleophosmin-cDNA-Amplifikationsproduktes, d.h. der codogene Strang nach BamHI-Spaltung, ist unter 2) aufgezeigt. Hierbei ist der originäre Translationsstart des Nucleophosmins kursiv in Kleinbuchstaben dargestellt.

Unter 3) der Ausschnitt aus dem rekombinanten Plasmid, der das aminoternale Ende des rekombinanten Nucleophosmins determiniert. Vektorsequenzen des verwendeten Plasmids pQE32 sind durch große Buchstaben, die Sequenz der Nucleophosmin cDNA durch kleine Buchstaben markiert. Der Translationsstart des rekombinanten Proteins ist kursiv in Großbuchstaben dargestellt.

Von den auf Platten gewachsenen Klonen wurden 32 auf ein positives Ergebnis getestet. Von 16 ausgewählten Klonen mit dem pQE32-Vektor wiesen 8 Klone die richtige Plasmidlänge von etwa 4400 bp auf.

3.3 Nachweis eines His-tag Proteins von 40 kDa mittels des Penta-His-Antikörpers

Die Transkription der in das Plasmid inserierten cDNA wurde in den mit dem rekombinanten Plasmid transformierten E.coli XL1 durch IPTG induziert. Zellen einer induzierten Kultur wurden aufgeschlossen, um das Gesamtzellprotein, welches das

Ergebnisse

exprimierte Protein enthalten sollte, in gelöster Form zu erhalten. Die Proteinmengenbestimmung nach Bradford ergab etwa 6 mg Gesamtprotein aus dem Zellpellet einer induzierten 21 ml-Kultur eines positiven Klones.

Zunächst wurde nun das exprimierte Nucleophosmin mit seinem Molekulargewicht von etwa 40 kDa mittels des His-tags an dessen N-Terminus nachgewiesen.

Hierfür wurden drei Probenaliquote des Gesamtzellproteins einer induzierten Kultur im Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine anschließend im Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion mittels des Penta-His-(Primär-) Antikörpers wurde wie unter 2.2.16 beschrieben durchgeführt.

Zwei der drei transferierten Aliquote dienten als Negativkontrollen und wurden auf der Nitrozellulosemembran jeweils nur mit dem Primär- bzw. dem Sekundärantikörper inkubiert.

Folgendes Ergebnis war zu beobachten:

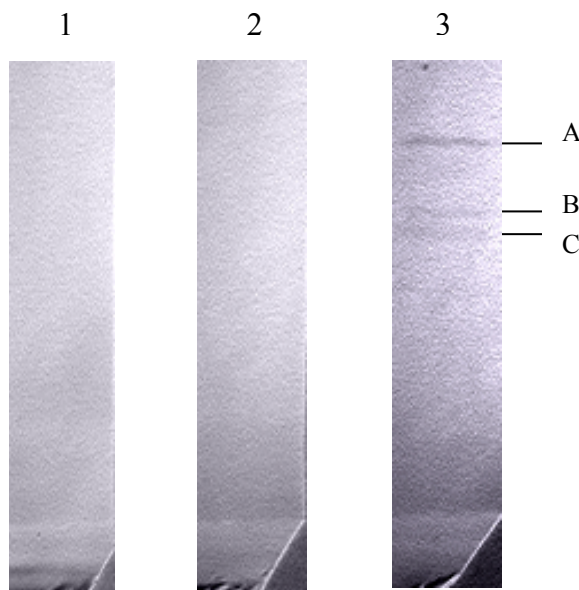


Abb.10: Ergebnisse der Immunodetektion des His-tag Proteins/Nucleophosmins aus einer Präparation von Gesamtzellprotein

1: Negativkontrolle, Membranstück nur mit Penta-His-Antikörpern behandelt; 2: Negativkontrolle, Membranstück nur mit Anti-Maus IgG-Antikörpern behandelt; 3: Positivkontrolle, Behandlung mit beiden Antikörpern; A: Gesuchtes Protein in etwa 40 kDa-Position; B,C: Potentielle Bruchstücke des gesuchten Proteins mit His-tag am N-Terminus im niedermolekularen Bereich

Ergebnisse

Das auf diese Weise detektierte His-tag Protein wurde nun in einer spezifischen Nickel-Nitrotriessigsäure (Ni-NTA) Metall-Affinitätschromatographie, basierend auf der Komplexbildung von His-tag und Nickelion, gereinigt.

3.4 Reinigung des His-tag Proteins mittels Affinitätschromatographie

Die Zellen einer induzierten Kultur eines positiven Klonen wurden wie unter 2.2.17 ff. beschrieben sowohl unter nativen und denaturierenden Bedingungen, als auch in einer Kombination beider Verfahren aufgeschlossen. Anschließend erfolgte die Reinigung und Detektion des His-tag Proteins mittels der für das His-tag spezifischen Nickel-Agarose im Batch-Verfahren. Auch hier wurden die nativen und denaturierenden Bedingungen beibehalten.

Jeweils 30 µl des gereinigten His-tag Proteins wurden in einem 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Gele wurden über Nacht in Färbelösung geschwenkt und anschließend entfärbt.

Folgendes Ergebnis war zu beobachten:

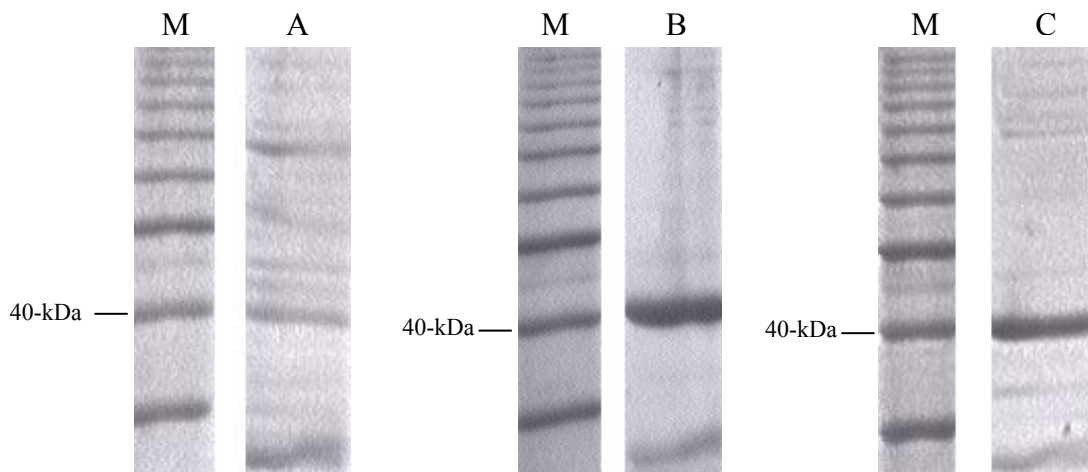


Abb.11: Aufreinigung des rekombinanten Nucleophosmins unter verschiedenen Bedingungen: Coomassiefärbung nach SDS-PAGE
M: 10 kDa Protein Ladder (lifetech); A: unter nativen Bedingungen gereinigtes Protein; B: unter denaturierenden Bedingungen gereinigtes Protein; C: Unter denaturierenden und kompetitiven (Imidazol) Bedingungen gereinigtes Protein

Ergebnisse

Die Abbildung zeigt, dass die Reinigung unter nativen Bedingungen eindeutig nicht die Methode der Wahl sein konnte. Auch unterscheiden sich Reinigung unter denaturierenden und denaturierend/kompetitiven Bedingungen kaum voneinander, so dass die Reinigung im folgenden unter (einfachen) denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurde.

Um den Wasch- und Elutionsvorgang unter denaturierenden Bedingungen zu veranschaulichen, wurden Aliquote des groben Lysats nach Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile, Aliquote der Waschlösungen und ein Aliquot des Lysats in einem 10% SDS-PAA-Gel aufgetragen:

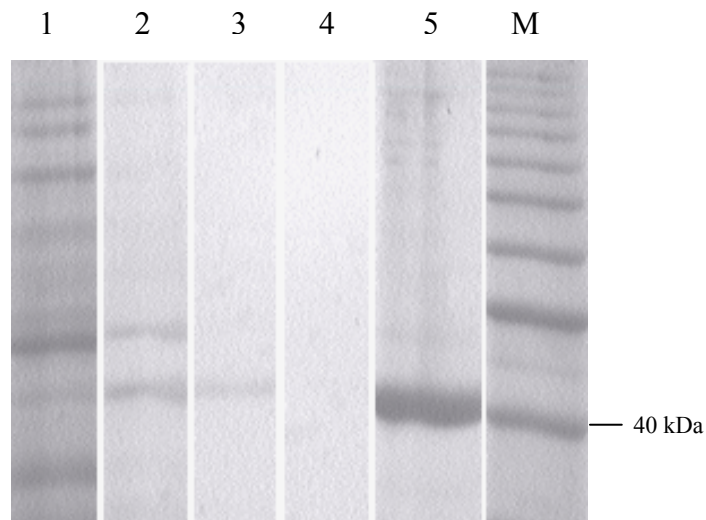


Abb.12: Aufreinigung des rekombinanten Nucleophosmins unter denaturierenden Bedingungen: das Protein wurde in *E.coli* XL1 exprimiert und über Ni-NTA-Agarose gereinigt, Coomassiefärbung nach SDS-PAGE
1: 37,5 µl des groben Lysats; 2: 37,5 µl des ersten Waschrisses; 3: 37,5 µl des zweiten Waschrisses; 4: 37,5 µl eines dritten Waschrisses; 5: 30 µl des Eluats; M: 10 kDa Protein Ladder (lifetech)

Aus der Abbildung geht hervor, dass das Einfügen eines dritten Waschrisses nicht nötig war und die Reinheit des Eluats nicht erhöhte. Die Anzahl der Elutionsschritte wurde ebenfalls auf diesem Weg empirisch ermittelt. Nach dem sechsten Elutionsschritt mit 30 µl pro Kulturaliquot war der Großteil des gebundenen Nucleophosmins eluiert.

Ergebnisse

Eine Proteinmengenbestimmung nach Bradford ergab eine Durchschnittskonzentration des Eluats von 600 µg Protein pro ml.

Um die Zugänglichkeit des His-tags unter denaturierenden und nativen Bedingungen zu überprüfen, wurde ein Western-Blot mit dem Penta-His-Antikörper durchgeführt. 30 µl des Eluats, welche unter denaturierenden Bedingungen gewonnen wurden und 30 µl Eluat aus Präparation in nativer Form wurden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach erfolgter Immunodetektion bot sich das in Abb. 13 dargestellte Bild.

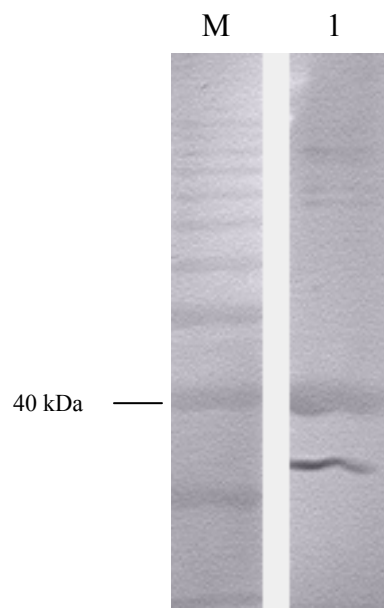


Abb.13: Western-Blot unter Proteinauflösungs- und Proteinreinigungsbedingungen des QIAexpress Detection Systems
M: 10 kDa Protein Ladder (lifetech), Ponceau S gefärbt; 1: unter denaturierenden Bedingungen gereinigtes Protein nach spezifischer Detektion mit Penta-His AK

Nach Reinigung des Proteins unter nativen Bedingungen, Transfer und Detektion, war die Farbintensität der detektierten Bande für eine Darstellung zu schwach. Das Ergebnis bestätigt, dass nicht nur die Menge an aufgereinigtem Protein bzw. das als Monomer vorliegende Protein unter denaturierenden Bedingungen in größerer Menge vorliegt, sondern auch, dass sich das His-tag in der Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen an einer in der Affinitätschromatographie besser zugänglichen Position befindet und so die Aufreinigung einerseits effizienter gestaltet

Ergebnisse

wird und andererseits auch in der Immunodetektion ein deutlich klareres Bild erscheint.

Die in Abbildung 13 in Bahn 1 unterhalb der sichtbar breiten Bande befindliche schmale und prägnante Bande in 32-33 kDa Position kennzeichnet wahrscheinlich ein besonders häufig auftretendes Bruchstück des aufgereinigten Proteins.

3.5 Nachweis der Identität von B23/Nucleophosmin mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Das unter denaturierenden Bedingungen gereinigte His-tag Protein wurde nun massenspektrometrisch untersucht, um dessen Identität als B23/Nucleophosmin eindeutig nachzuweisen. Das Massenspektrum ist im Anhang dargestellt. Insgesamt zeigten 25% der ermittelten Massen und Sequenzen der tryptischen Peptide Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz von Nucleophosmin. Dies kann als eindeutiger Nachweis angesehen werden.

1	11	21	31	41
MEDSMDMDMS	PLRPQNYLFG	CELKADKDYH	FKVDNDENEH	QLSLRTVSLG
51	61	71	81	91
AGAKDELHIV	EAEAMNYEGS	PIKVTLATLK	MSVQPTVSLG	GFEITPPVVL
101	111	121	131	141
RLKCGSGPVH	ISQHLVAVE	EDAESEDEEE	EDVKLLSISG	KKSAPGGGSK
151	161	171	181	191
VPQKKVKLAA	DEDDDDDDDEE	DDDEDDEDDDD	FDDEEAEEKA	PVKKGQESFK
201	211	221	231	241
KQEKTPTKTPK	GPSSVEDIKA	KMQASIEKGG	SLPKVEAKFI	NYVKNCRFMT
251	261			
DQEIQLDWQ	WRKSL			

Abb. 14: Aminosäuresequenz des Nucleophosmins
Rot dargestellt sind die Peptide, deren Massen den entsprechenden Sequenzabschnitten zugeordnet werden konnten, insgesamt decken sich diese mit 25% der Gesamtsequenz

Tab.4: Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung des rekombinant hergestellten Nucleophosmins

Masse : m/z	Masse : MH	Zugeordneter Sequenzabschnitt	Position
1568,7230	1568,7305	(K)VDNDENEHQLSLR(T)	32-45
2145,0446	2145,0174	(K)DELHIVEAEAMNYEGSPIK(V)	54-73
2227,2120	2227,2161	(K)MSVQPPTVSLGGFEITPPVVLRL(L)	81-101
1835,8410	1835,8387	(R)MTDQEIQLDWQWR(K)	249-262

3.6 Nachweis von Nucleophosmin im 200 kDa Rezeptorprotein mittels eines polyklonalen Antiserums

Nach der Reinigung von Nucleophosmin aus Großkulturen und Dialyse des Eluats gegen steriles Wasser wurden die so erhaltenen Proben lyophilisiert. Die Firma Seqlab (Göttingen) wurde mit der Immunisierung zweier Kaninchen zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen Nucleophosmin beauftragt. Als Ausgangsmaterial dienten die lyophilisierten Proben.

3.6.1 Überprüfung der Spezifität des hergestellten polyklonalen Antiserums

Für die Überprüfung der Spezifität des hergestellten polyklonalen Antiserums wurden Aliquote des gereinigten Nucleophosmins in einem 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Jede Bahn enthielt jeweils 2,5 µg gereinigtes Protein. Nach erfolgtem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde jeweils eine Bahn separat mit dem Prä-Immuserum, dem Immuserum aus zweiter Blutung und dem Anti-B23 AK (Santa Cruz) als Primärantikörper inkubiert. Prä-Immuserum und Immuserum wurden hierbei in einer Konzentration von 1:1000 in Blockierpuffer (Blockierreagenz Milchpulver), der Anti-B23 AK in einer Konzentration von 1:100 in Blockierpuffer eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente ein Anti-Kaninchen AK, der mit dem Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt war in einer Konzentration von 1:10000 in Blockierpuffer.

Nachdem die Ergebnisse der Nachweise mit dem hergestellten Immuserum vorlagen, wurden Western-Blots mit dem aufgeführten polyklonalen B23 AK der Firma Santa Cruz an gereinigtem Nucleophosmin und Membranproteinen der monocytären Zelllinien MM6 und U937 (Kapitel 3.6.2) durchgeführt. Dieser war zum Zeitpunkt der Themenvergabe nicht erhältlich und wurde hier eingesetzt, um die Ergebnisse, welche mit dem hergestellten Antiserum erzielt wurden, zu verifizieren.

Ergebnisse

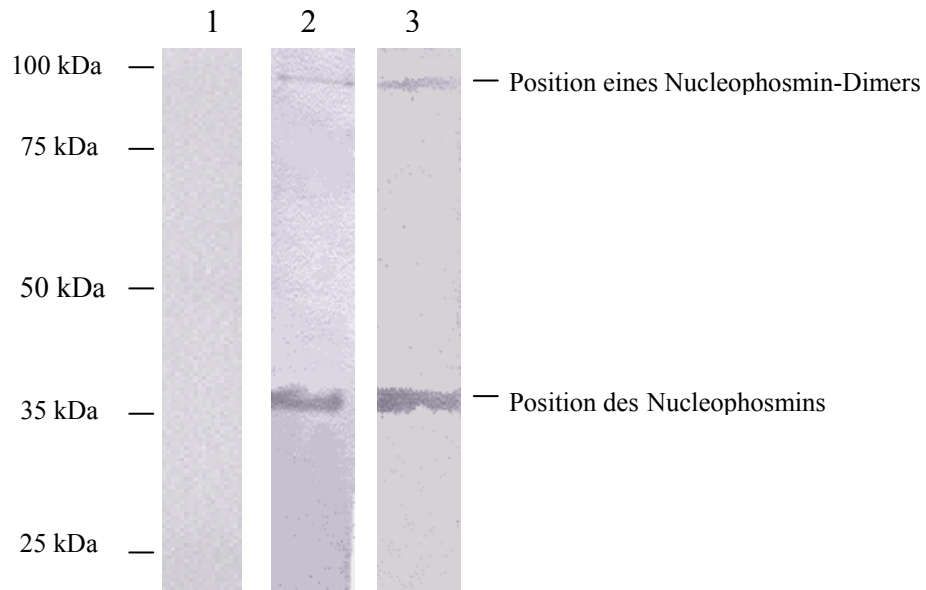


Abb.15: Überprüfung der Spezifität des hergestellten polyklonalen Antiserums mittels Western Blot
1: gereinigtes Nucleophosmin nach Detektion mit Prä-Immuneserum,
2: gereinigtes Nucleophosmin – Nachweis mit Immuneserum aus der zweiten Blutung der Auftragsimmunisierung, 3: gereinigtes Nucleophosmin – Nachweis mit Anti-B23 AK (Santa Cruz)

Sowohl bei dem Einsatz des Immuneserums als auch des kommerziell erhältlichen Anti-B23 AK als Primärantikörper wurde Nucleophosmin mit einem Molekulargewicht von 37 kDa detektiert. Des Weiteren ist in Position von etwa 90 kDa ein Dimer des Nucleophosmins dargestellt, welches bei Einsatz sowohl des Immuneserums als auch des Anti-B23 AK nachweisbar war (Liu et al., 1991). Diese Ergebnisse blieben bei Einsatz des Prä-Immuneserums aus.

Die Spezifität des hergestellten Immuneserums gegen Nucleophosmin wurde mit Hilfe eines Konkurrenzexperimentes an Membranproteinen der untersuchten monocytären Zelllinien nachgewiesen. Hierauf wird im folgenden Kapitel eingegangen.

3.6.2 Nachweis von Nucleophosmin in Membranproteinen der monocytären Zelllinien MM6 und U937

Die Präparation von Membranproteinen der monocytären Zelllinien MM6 und U937 erfolgte wie unter 2.2.22 beschrieben. Die durchschnittliche Konzentration der Membranproteine in Lösung betrug 27 µg Protein pro µl.

Zunächst wurden die Membranproteine der Zelllinie MM6 untersucht. Nach Auftrennung der Proteine im Polyacrylamidgel und Western-Blot war das in Abb.16 dargestellte Ergebnis zu beobachten.

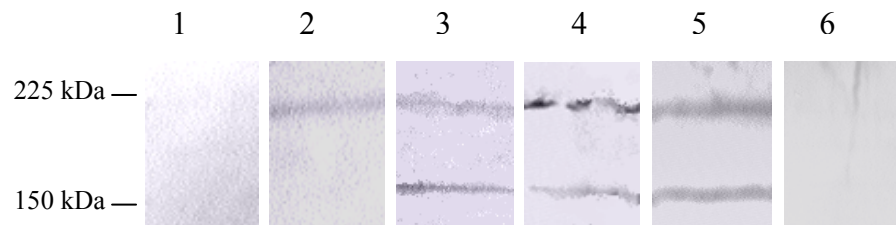


Abb.16: Nachweis von Nucleophosmin in Membranproteinen der monocytären Zelllinie MM6 mittels Western Blot
 1: Membranproteine MM6 – im Western-Blot mit Prä-Immunsrum aus der Auftragsimmunisierung; 2: Membranproteine MM6 – Nachweis des 200 kDa Membranproteins mittels Anti-Myosin Heavy Chain AK (Eurogentec); 3: Membranproteine MM6 – Nachweis von Nucleophosmin mit Immunsrum aus zweiter Blutung der Auftragsimmunisierung; 4: Membranproteine MM6 – Nachweis von Nucleophosmin mit Immunsrum aus zweiter Blutung der Auftragsimmunisierung, Zusatz β -Mercaptoethanol im Ladungspuffer (reduzierende Bedingungen); 5: Membranproteine MM6 – Nachweis von Nucleophosmin mit Anti-B23 AK (Santa Cruz), Zusatz β -Mercaptoethanol im Ladungspuffer (reduzierende Bedingungen); 6: Membranproteine MM6 – im Western-Blot mit Immunsrum aus zweiter Blutung; das Serum war hier vorher mit in PBS-Puffer gelöstem Lyophilisat absorbiert worden (Kompetitionsexperiment)

Drei Aliquote der Membranproteinproben wurden parallel auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran als separate Bahnen mit verschiedenen Primärantikörpern inkubiert. Die Position des Schwerekettenmyosins Typ A in Höhe von 200 kDa wurde mittels des Anti-Myosin heavy chain AK ermittelt (Abb. 16, Bahn 2). In der selben Position befand sich, im Gegensatz zur mit dem Prä-Immunsrum behandelten Bahn (Abb.16, Bahn 1), eine der

Ergebnisse

zwei spezifischen Banden, die nach Inkubation mit dem hergestellten polyklonalen Antiserum gegen Nucleophosmin nachgewiesen werden konnten (Abb.16, Bahn3).

In einem Konkurrenzexperiment wurde das hergestellte Antiserum mit in 1 x PBS und Blockierpuffer gelöstem lyophilisiertem Nucleophosmin vorinkubiert (Kapitel 2, Abschnitt 2.2.25). Die in der Behandlung mit dem Immunsersum aus 2. Blutung beobachtbaren Banden konnten hier nicht mehr nachgewiesen werden. Hiermit war die Spezifität der enthaltenen polyklonalen Antikörper für Epitope des Nucleophosmins nachgewiesen (Abb.16, Bahn 6).

Nach Vorliegen dieser Ergebnisse wurden Membranproteine der Zelllinie MM6 auch mit dem B23 AK der Firma Santa Cruz untersucht. Es bot sich das gleiche Bild, wie in der Behandlung mit dem von SeqLab hergestellten Antiserum (vergleiche Abb.16, Bahn 5 vs. 3 und 4).

In gleicher Weise wurden die Membranproteine der monocytären Zelllinie U937 untersucht. Nach Auftrennung der Proteine im Polyacrylamidgel und Western-Blot (Kapitel 2, Abschnitt 2.2.24) war das in Abb.17 dargestellte Ergebnis zu beobachten.

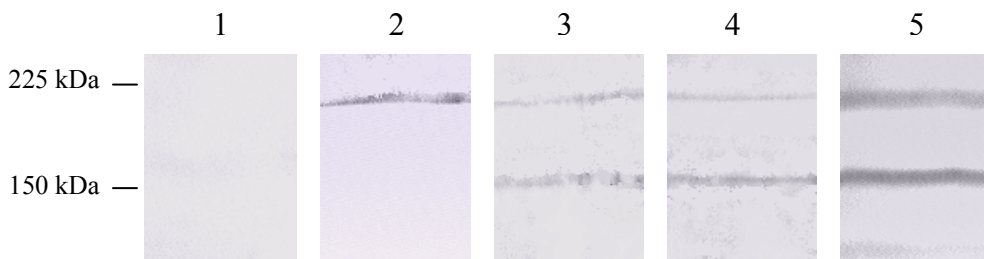


Abb.17: Nachweis von Nucleophosmin in Membranproteinen der monocytären Zelllinie U937 mittels West Blot
1: Membranproteine U937 – im Western-Blot mit Prä-Immunsersum, 2: Membranproteine U937 - Nachweis des 200 kDa-Proteins mittels Anti-Myosin Heavy Chain AK, 3: Membranproteine U937 – Nachweis des 200 kDa-Proteins mit Immunsersum aus zweiter Blutung, 4: Membranproteine U937 – Nachweis des 200 kDa-Proteins mit Immunsersum aus zweiter Blutung, Zusatz β -Mercaptoethanol im Ladungspuffer (reduzierende Bedingungen); 5: Membranproteine U937 – Nachweis des 200 kDa-Proteins mit Anti-B23 AK (Santa Cruz), Zusatz β -Mercaptoethanol im Ladungspuffer (reduzierende Bedingungen)

Ergebnisse

In den hier durchgeführten Versuchen wurde Nucleophosmin, analog zu den Untersuchungen an der Zelllinie MM6, in einer Position von 200 kDa nachgewiesen (Abb.17, Bahn 2 und 3). In der Behandlung des Western Blots eines im Polyacrylamidgel aufgetrennten Probenaliquots der Membranproteine U937 mit dem kommerziell erhältlichen Anti-B23 AK bot sich das gleiche Bild, wie in der Behandlung mit dem von Seqlab hergestellten Antiserum (vergleiche Abb.17, Bahn 5 vs. 3 und 4).

4 Diskussion

Monocytäre Zelllinien ermöglichen es, eukaryontische Zellen eines identischen genetischen Pools in praktisch unbegrenzter Menge zu erhalten. Jede Zelllinie kann hierbei für ein Segment in dem Kontinuum der normalen hämopoetischen Differenzierung stehen.

Die monocytäre Zelllinie U937 wurde 1974 aus einem 37-jährigen Patienten mit generalisiertem histiocytärem Lymphom isoliert. In der Entwicklungsstufe ist diese Zelllinie zwischen dem Monoblasten und Promonocyten angesiedelt (Sundström et al., 1976).

Die monocytäre Zelllinie MM6 wurde 1988 von Ziegler-Heitbrock et al. etabliert und charakterisiert (Ziegler-Heitbrock et al., 1988). Sie stammt aus dem peripheren Blut eines 64-jährigen Patienten mit monoblastischer Leukämie. Die MM6-Zelllinie kann nach morphologischen, cytochemischen und immunologischen Kriterien als die erheblich differenziertere Zelllinie angesehen werden.

Humane Monocyten exprimieren, ebenso wie die monocytären Zelllinien MM6 und U937 eine fructoselysinspezifische Rezeptorstruktur, deren Bestandteile sich in mehreren Membranproteinfraktionen darstellen. Ein zu dieser Struktur gehöriges 110 kDa-Protein wurde als das zur Familie der RNA-bindenden Proteine gehörige Nucleolin identifiziert, ein multifunktionelles Protein, welchem eine Beteiligung an der Reifung ribosomaler RNA zugeschrieben wird (Liu et al., 1999; Pinol-Roma et al., 1999).

Als Bestandteil eines 200 kDa-Rezeptorproteins wurde die schwere Kette des Myosins Typ A nachgewiesen. Eine MALDI-MS-Untersuchung dieses Proteins ergab Hinweise darauf, dass neben Schwerkettenmyosin Typ A in den Membranen von MM6-Zellen auch das vornehmlich im Nucleolus anzutreffende Nucleophosmin einen Bestandteil dieser Rezeptorstruktur bilden könnte. Im Gegensatz dazu war Nucleophosmin im 200-kDa-Membranprotein der Zelllinie U937 nicht nachweisbar.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Nucleophosmin als auch die schwere Kette des Myosins an Membranproteinen in einer Position von 200 kDa nachgewiesen. Untersucht wurden hierbei sowohl die monocytäre Zelllinie MM6 als auch U937. Die

Diskussion

Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen ein rekombinantes Nucleophosmin erwies sich als eine gute Methode, um Nucleophosmin in Western-Blots von präparierten Membranproteinen beider Zelllinien spezifisch nachzuweisen.

Ausgehend von der Gesamtzell-RNA der monocytären Zelllinie MM6 war es mit Hilfe von RT-PCR und sequenzspezifischer Primer möglich, eine Nucleophosmin-cDNA zu synthetisieren, welche in den Expressionsvektor pQE 32 ligiert wurde. Durch diesen Vektor wird dem rekombinanten Protein am N-Terminus kovalent ein tag von 6 Histidinresten hinzugefügt. Das tag ermöglicht in einer Nickel-Nitrotriessigsäure (Ni-NTA) Metall-Affinitätschromatographie eine spezifische Aufreinigung des rekombinanten Proteins.

Um die Zugänglichkeit des His-tags in verschiedenen Aufreinigungsformen vergleichen zu können, wurde in Western-Blots, in denen gereinigtes Protein aus einem Gesamtlysat der transformierten E.coli-Bakterien aufgetragen wurde, mittels des Penta-His-Antikörpers zunächst ein His-tag Protein von 40 kDa nachgewiesen. Im Vergleich zu dem Western-Blot der Proteinlösung, welche das über die Nickel-Nitrotriessigsäure (Ni-NTA) Metall-Affinitätschromatographie spezifisch aufgereinigte rekombinante Protein enthielt, war das Ergebnis relativ schwach. Die Reinheit des Proteins in der spezifischen Aufreinigungsform über die Affinitätschromatographie beeinflusste hier das Verhältnis von sichtbar nachweisbarer Bande zu unspezifischem Hintergrund. Als beste Aufreinigungsmethode des rekombinanten Proteins erwies sich die Reinigung des Gesamtlysates unter denaturierenden Bedingungen, woran sich die Ni-NTA Metall-Affinitätschromatographie anschloss. Die Reinheit des Eluats war hier am höchsten und auch die Zugänglichkeit des tags im Eluat war, wie aus Western-Blots mit Penta-His-Antikörpern hervorging, gut. Aufgrund dieser Versuche war es möglich, das rekombinante Nucleophosmin effizient in den erforderlichen Mengen für eine Immunisierung zu gewinnen. Die Massen der tryptischen Peptide des rekombinant hergestellten Proteins konnten in einer massenspektrometrischen Untersuchung eindeutig Nucleophosmin zugeordnet werden. In der anschließenden Immunisierung zweier Kaninchen konnten polyklonale Antikörper gegen das rekombinante Nucleophosmin hergestellt werden.

Die Zelllinie MM6 weist nach morphologischen, cytochemischen und immunologischen Kriterien Charakteristika eines reifen Monocyten auf, während der weniger differenzierte U937-Monocyt in seinem Entwicklungsstadium zwischen Monoblast und Promonocyt angesiedelt ist. Western-Blots an Membranproteinen beider Zelllinien ergaben in der Immunodetektion mit den polyklonalen Antiseren spezifische Banden in Höhe von 150 und 200 kDa. Mit einem zum Zeitpunkt der Themenvergabe noch nicht kommerziell erhältlichen Peptidantikörper gegen die Aminosäuren 189-294 von Nucleophosmin konnte dieses Ergebnis bestätigt werden.

Sowohl Nucleophosmin als auch Schwerkettenmyosin Typ A wurden mit Hilfe des hergestellten polyklonalen Antiserums und kommerzieller polyklonaler Antikörper gegen Schwerkettenmyosin Typ A in der gleichen Position von 200 kDa nachgewiesen. Da sich beide Banden unter vergleichbaren Untersuchungsbedingungen in Höhe von 200 kDa befanden, war der Nachweis von sowohl Schwerkettenmyosin Typ A, als auch Nucleophosmin als Bestandteil der 200 kDa-Membranproteinfraction möglich und unter Berücksichtigung der Ergebnisse der MALDI-MS-Untersuchung am 200 kDa-Rezeptorprotein Nucleophosmin definitiv als Bestandteil des 200 kDa-Rezeptorproteins identifiziert.

Um eine mögliche Verunreinigung der in dieser Arbeit gewonnenen Membranproteine mit cytosolischen Proteinen auszuschließen, wurden Zellen der monocytären Zelllinie MM6 immunhistochemisch untersucht. Hierbei diente der kommerzielle B23-Antikörper (Santa Cruz) als Primärantikörper. Durch einen mit Fluoreszein konjugierten Sekundärantikörper (Santa Cruz, sc 2012) wurde die anschließende Bildgebung ermöglicht. Unter Bedingungen, welche eine Endocytose und unspezifische Bindung des Antikörpers minimieren, konnte Nucleophosmin in seiner Lokalisation der Zellmembran der untersuchten Zellen zugeordnet werden (Brandt et al., 2004).

Nucleophosmin ist ein multifunktionelles Protein mit einem Molekulargewicht von 37 kDa. Es formt, abhängig von der Zusammensetzung aus den beiden Isoformen B23.1. und B.23.2 Oligomere mit Molekulargewichten von 230-350 kDa (Umekawa et al., 2001). Eine hexamere Form von Nucleophosmin mit einem Molekulargewicht von 200 kDa wurde beschrieben (Yung et al., 1987). Das Hexamer ist auch in der elektrophoretischen Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen in einer Position

Diskussion

von 200 kDa zu beobachten (Liu et al., 1991). Es ist nicht auszuschließen, dass mit den verwendeten Antikörpern gegen Nucleophosmin eine hexamere Form dieses Proteins in den Membranen der untersuchten Zelllinien nachgewiesen wurde. Dieses Hexamer würde sich mit seiner Molmasse von 200 kDa in der selben Position wie das als Bestandteil des fructoselysinspezifischen Rezeptors nachgewiesene Schwerekettenmyosin Typ A befinden.

Beide an der fructoselysinspezifischen Rezeptorstruktur beteiligten Proteine, Nucleolin, als auch Schwerekettenmyosin Typ A, sind im Gegensatz zum cytosolischen Protein glycosyliert (Salazar et al., 2000). Es gibt Hinweise, dass auch Nucleophosmin-Derivate als Bestandteil der 200 kDa-Proteinfraktion des Rezeptors glycosyliert sind (unveröffentlichte Ergebnisse).

Neben dem 200 kDa-Protein konnte in den Immunodetektionen von Nucleophosmin, im Gegensatz zu den Versuchen mit polyklonalen Antikörpern gegen Schwerekettenmyosin Typ A, an Membranproteinen der untersuchten Zelllinien ein Protein von 150 kDa identifiziert werden. Ein 150 kDa fructoselysinspezifisches Bindungsprotein in Membranen der monocytären Zelllinie U937 wurde bisher als Zerfallsprodukt des 200 kDa-Proteins dargestellt (Krantz et al., 1995). Mit dem Nachweis von Nucleophosmin als Bestandteil eines Membranproteins des selben Molekulargewichtes scheint dies unwahrscheinlich und spricht für ein weiteres eigenständiges fructoselysinspezifisches Bindungsprotein.

Nucleophosmin, welches bis dahin nicht in Membranproteinen nachgewiesen worden war, konnte in der vorliegenden Arbeit als membranständiges Protein identifiziert werden. Die verschiedenen Membranproteinfraktionen der fructoselysinspezifischen Rezeptorstruktur beinhalten also in Position von 110, 150 und 200 kDa Proteine, welche im Cytoplasma, in Nähe der NORs („nucleolus organizer regions“) und in der perichromosomalen Region (PR) in verschiedenen Stadien des Zellzyklus gemeinsam in Ribonucleinsäurekomplexen (RNPs) und „nucleolus-derived foci“ (NDFs) auftreten und deren Beteiligung an der Reifung ribosomaler RNA in Form dieser Komplexe in verschiedenen Arbeiten belegt ist (Liu et al., 1999; Peter et al., 1990; Chan et al., 1989;

Pinol-Roma, 1999; Dundr et al., 2000; Okuwaki et al., 2002; Savkur et al., 1998; Hingorani et al., 2000). Des weiteren tritt sowohl Nucleophosmin als auch Nucleolin in Assoziation mit dem Cytoskelett auf (Wang et al., 1993; Hovanessian et al., 2000).

Im Gegensatz zum Nucleophosmin wurde Nucleolin bereits in Membranproteinen verschiedener Zelllinien nachgewiesen. Es erfüllt hier verschiedene Funktionen, so bindet es z.B. Apo B- und Apo E - enthaltende Lipoproteine, den Midkin-Wachsumsfaktor (MK) sowie Faktor J, einen Inhibitor des klassischen und alternativen Weges der Komplementaktivierung (Semenkovich et al., 1990; Larrucea et al., 1998; Said et al., 2002). Des weiteren gewinnt Nucleolin in membrangebundener Form Bedeutung als Adhäsionsprotein für den HIVirus und ist nach Eintritt des HIVirus ins Cytoplasma gemeinsam mit der viralen Matrix und der reverser Transkriptase des Virus isolierbar (Nisole et al., 2002).

In Folge der Bindung von fructoselysin-modifiziertem Albumin an den fructoselysin-spezifischen Rezeptor der monocytären Zelllinie MM6 kommt es zu einer Aktivierung der Proteinkinase C ϵ (PKC), der Proteintyrosin-Kinase (PTK) und einer Translokation der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP1 in den Zellkern. Dies ist von einem Anstieg der Konzentration von IL1 und TNF α im umgebenden Medium als auch einem Anstieg der Kopienzahl der IL1-mRNA begleitet. Sowohl die Interaktion des glycierten Albumins mit dem Rezeptor als auch die nachfolgenden zellulären Effekte wurden mit einem polyklonalen Antiserum gegen Schwerekettenmyosin Typ A blockiert.

Es bleibt zu überprüfen, welche Funktion Nucleophosmin als Bestandteil des 200 kDa-Rezeptorproteins an menschlichen Monocyten ausübt und ob es als Protein mit zahlreichen Funktionen in der Ribosomenreifung, Centrosomduplikation u.a. an der oben genannten Signaltransduktion beteiligt ist. Da es wahrscheinlich ist, dass die polyklonalen Antikörper des hergestellte Antiserums gegen ein rekombinantes Nucleophosmin und der kommerzielle Peptidantikörper an unterschiedliche Epitope des mit dem 200 kDa-Protein assoziierten Nucleophosmins binden, könnten in Folge der Bindung der entsprechenden Antikörper verschiedene funktionelle Abschnitte des Proteins aktiviert oder blockiert werden und die Folgen dieser Interaktion auf die Zellfunktion untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Sowohl Peritonealmakrophagen von Ratten als auch menschliche Monocyten und die monocytären Zelllinien U937 und MM6 weisen eine membranständige Rezeptorstruktur mit Bindungsspezifität für fructoselysin-modifizierte Proteine auf. An dieser Struktur sind Membranproteine mit einer Molmasse von 110, 150 und 200 kDa beteiligt. Bestandteil der 200 kDa-Proteinfraction ist Schwerekettenmyosin Typ A.

In einer MALDI-MS-Untersuchung wiesen Massen einiger tryptischer Peptide des 200 kDa-Rezeptorproteins der monocytären Zelllinie MM6 nach Vergleich dieser Massen mit einer Datenbank Übereinstimmung mit dem vornehmlich im Zellkern anzutreffenden Nucleophosmin auf. In der Zelllinie U937 konnten diese Peptide nicht nachgewiesen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Nucleophosmin, ein multifunktionelles Protein, welches bis dahin nicht in Membranproteinen nachgewiesen worden war, eindeutig in der 200 kDa-Proteinfraction des membranständigen fructoselysinspezifischen Rezeptors zu identifizieren. Hierbei sollten beide Zelllinien (MM6 und U937) untersucht werden. Der Nachweis sollte über ein polyklonales Antiserum gegen ein rekombinantes Nucleophosmin erbracht werden.

Sowohl Nucleophosmin als auch Schwerekettenmyosin Typ A konnten in Western-Blots in der gleichen Position von 200 kDa immunodetektiert werden. Dieses wurde durch das hergestellte polyklonale Antiserum, einen kommerziellen Peptidantikörper gegen Nucleophosmin und kommerzielle polyklonale Antikörper gegen Schwerekettenmyosin Typ A ermöglicht. Hiermit konnte Nucleophosmin eindeutig als Bestandteil des 200 kDa-Rezeptorproteins identifiziert werden.

Für die Herstellung des rekombinanten Nucleophosmins wurde zunächst die Gesamtzell-RNA von MM6-Zellen präpariert. Mittels RT-PCR und sequenzspezifischer Primer konnte eine Nucleophosmin-cDNA erstellt werden. Diese wurde in den Expressionsvektor pQE32 (Qiagen) unter Erhalt des offenen Leserahmens für Nucleophosmin eingebaut. Der Vektor ist so konstruiert, dass nach dem Einfügen der erstellten cDNA in dessen Multiple Cloning Site (MCS) mit dem Translationsprodukt

Zusammenfassung

N-terminal ein Hexapeptid von 6 Histidinresten (His-tag) kovalent verbunden ist. Nach der Transformation des Bakteriums *E.coli* XL1 mit dem rekombinanten Vektor, in welchen die hergestellte cDNA ligiert wurde, und Expression des rekombinanten Proteins im Bakterium war es mittels einer Nickel-Nitrotriessigsäure (Ni-NTA) Metall-Affinitätschromatographie möglich, das His-tag, und damit das hergestellte rekombinante Protein, spezifisch zu detektieren und zu isolieren.

Um die Identität des so isolierten rekombinanten Proteins eindeutig zu charakterisieren, wurde es mittels MALDI-MS massenspektrometrisch untersucht. In den Massen und Sequenzen der tryptischen Peptide konnten 25% Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz von Nucleophosmin nachgewiesen werden. Aufgrund dieses Ergebnisses konnte man sicher gehen, in einem Antiserum gegen dieses rekombinante Protein polyklonale Antikörper gegen Nucleophosmin zu erhalten.

Über eine Aufreinigung des in Großkulturen exprimierten rekombinanten Nucleophosmins, Dialyse und Lyophilisation der gereinigten Proteinlösung war es möglich, die erforderliche Menge an rekombinantem Protein für eine Immunisierung von Kaninchen zu isolieren. Auf diese Weise konnte ein polyklonales Antiserum gegen das rekombinante Nucleophosmin hergestellt werden.

Nach Anzucht der monocytären Zelllinien MM6 und U937 wurden deren Membranproteine präpariert. Diese wurden im Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Nach jeder Blutung wurde anhand dieser Western-Blots die Qualität des Antiserums beurteilt.

Auf diese Weise konnte das geeignetere Tier und das Serum, welches das beste Verhältnis von detektierter Bande zu unspezifischem Hintergrund lieferte, ermittelt werden. Mit Hilfe des Immunserums aus zweiter Blutung konnte Nucleophosmin in einer Position von 200 und 150 kDa am besten dargestellt werden. Die spezifische Bande in 200 kDa-Position befand sich hierbei in der gleichen Position wie diejenige, welche sich in Immunodetektionen an den transferierten Membranproteinen mit polyklonalen Antikörpern gegen Schwerekettenmyosin Typ A darbot.

6 Literaturverzeichnis

Bai P., Phua K., Hardt T., Cernadas M., Brodsky B.; Glycation alters collagen fibril formation *Connective Tissue Research* 28,1-12 (1992)

Borer R.A., Lehner C.F., Eppenberger H.M., Nigg E.A. *Cell* 60,379-390 (1989)

Brandt R., Landmesser C., Voigt L., Hehmke B., Hanschke R., Kasbohm J., Hartmann K., Jäger B., Krantz S., Michaelis D.; Differential expression of fructosyllysine-specific receptors on monocytes and macrophages and possible pathophysiological significance *Diabetologia* 39,1140-1147 (1996)

Brandt R., Nawka M., Kellermann J., Salazar R., Becher D., Krantz S.; Nucleophosmin is a component of the fructoselysine-specific receptor in cell membranes of Mono Mac 6 and U 937 monocyte-like cells *Biochim Biophys Acta* 1670, 132-136 (2004)

Brownlee M.; Advanced protein glycosylation in diabetes and aging *Annu Rev Med* 46,223-234 (1995)

Bucala R., Cerami A.; Advanced glycosylation: chemistry, biology and implications for diabetes and aging *Adv Pharmacol* 23,1-34 (1992)

Chan P.K., Liu Q.-R., Durban E.; The major phosphorylation site of nucleophosmin is phosphorylated by a nuclear kinase II *Biochem.J.* 270,549-552 (1990)

Chan W.-Y., Liu Q.-R., Borjigin J., Busch H., Rennert O.M., Chan P.-K.; Characterization of the cDNA Encoding Human Nucleophosmin and Studies of Its Role in Normal and Abnormal Growth *Biochemistry* 28,1033-1039 (1989)

Cohen M.P., Hud E., Wu V.Y., Ziyadeh F.N.; Albumin modified by Amadori glucose adducts activates mesangial cell type IV collagen gene transcription *Mol Cell Biochem* 151(1),61-7 (1995)

Cohen M.P., Ziyadeh F.N.; Amadori glucose adducts modulate mesangial cell growth and collagen gene expression *Kidney Int* 45(2),475-84 (1994)

Dundr M., Misteli T., Olson M.O.J.; The Dynamics of Postmitotic Reassembly of the Nucleolus *Journal of Cell Biology* 150(3),433-446 (2000)

Dunn J.A., Patrick J.S., Thorpe S.J., Baynes J.W.; Oxidation of glycated proteins: age-dependent accumulation of N-ε-(carboxymethyl)lysine in lens proteins *Biochemistry* 28,9464-9468 (1989)

Frick I.M., Axcrona K., Hardig Y., Tapper H., Gustafsson L., Kellner R., Leanderson T., Bjorck L.; Uptake and intracellular transportation of a bacterial surface protein in lymphoid cells *Mol Microbiol.* 44(4), 917-34 (2002)

Hingorani K., Szebeni A., Olson M.O.J.; Mapping the Functional Domains of Nucleolar Protein B23 *Journal of Biological Chemistry* 32,24451-24457 (2000)

Hori O., Yan S.D., Ogawa S., Kuwabara K., Matsumoto M., Stern D., Schmidt A.M.; The receptor for advanced glycation end-products has a central role in mediating the effects of advanced glycation end-products on the development of vascular disease in diabetes mellitus *Nephrol Dial Transplant* 11 (Suppl 5),13-16 (1996)

Horiuchi S., Hiroyuki S., Takayuki H., Kazuyoshi I., Yoshiteru J., Nagai R., Kiyoshi T.; Extra- and intracellular localization of advanced glycation end-products in human atherosclerotic lesions *Nephrol Dial Transplant* 11(Suppl 5),81-86 (1996)

Hovanessian A.G., Puvion-Dutilleul F., Nisole S., Svab J., Perret E., Deng J.S., Krust B.; The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton *Exp Cell Res* 261,312-328 (2000)

Hunt J.V., Dean R.T., Wolff S.P.; Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation *Biochem J* 256,205-212 (1988)

Ivanov G.I., Chaushev T.A., Dakovska L.N., Kyurkchiev S.D.; Increased adhesion of lymphoid cells to glycosylated proteins *IJBCB* 31,797-804 (1999)

Kimura et al.; Accumulation of advanced glycation endproducts of the Maillard reaction with age in human hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 208,53 (1996)

Klein J., Grummit I.; Cell cycle-dependent regulation of RNA polymerase I transcription: the nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G1 *Proc.Matl.Acad.Sci.USA.* 98,6096-6101 (1999)

Kondo T., Minamino N., Nagamura-inoue T., Matsumoto M., Taniguchi T., Tanaka N.; Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF1 and manifests oncogenic activity *Oncogene* 15,1275-1281 (1997)

Krantz S., Lober M., Henschel L.; The nonenzymatic glycation of proteins and nucleic acids, their importance for the development of diabetic complications, possible molecular basis of aging and autoimmunological processes *Exp Clin Endocrinol* 88,257-69 (1986)

Krantz S., Michalke M., Brandt R., Salazar R., Hartmann K.; Evidence for binding of in vitro glycosylated low-density lipoproteins by fructosyllysine-specific sites on macrophages and U937 monocyte-like cells, *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 105,263-270 (1997)

- Krantz S., Salazar R., Brandt R., Kellermann J., Lottspeich F.; Purification and partial amino acid sequencing of a fructosyllysine-specific binding protein from cell membranes of the monocyte-like cell line U937 *Biochim Biophys Acta* 1226,109-112 (1995)
- Larrucea S., Gonzalez-Rubio C., Cambronero R., Ballou B., Bonay P., Lopez-Granados E., Beuvet P., Fontan G., Fresno M., Lopez-Trascasa M.; Cellular adhesion mediated by factor J, a complement inhibitor. Evidence for nucleolin involvement *J Biol Chem* 273,31718-31725 (1998)
- Liu H.T., Yung B.Y.M.; In vivo interaction of nucleophosmin and protein C23 during cell cycle progression in HeLa cells *Cancer Letters* 144,45-54 (1999)
- Liu Q.-R., Chan P.K.; Formation of nucleophosmin/B23 oligomers requires both the amino- and the carboxyl-terminal domains of the protein *Eur.J.Biochem* 200,715-721 (1991)
- Maezawa I., Wang B., Hu Q., Martin G.M., Jin L.W., Oshima J.; Alterations of chaperone protein expression in presenilin mutant neurons in response to glutamate excitotoxicity *Pathol Int.* 52(9), 551-4 (2002)
- Maillard L.C. ; Action des acides amines sur les sucres ;formation des melanoides par voie methodique *CR Hebd Seances Acad Sci* 154,66-68 (1912)
- Mandl-Weber S., Cohen C.D., Haslinger B., Kretzler M., Sitter T.; Vascular endothelial growth factor production and regulation in human peritoneal mesothelial cells *Kidney Int* 61, 570-578 (2002)
- Monnier V.M., Cerami A.; Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins *Science* 211,491-493 (1981)
- Mortensen H.B., Christophersen C.; Glycosylation of human haemoglobin A in red blood cells studied in vitro, kinetics of the formation and dissociation of haemoglobin A1c *Clin Chim Acta* 134,317-326 (1983)
- Nakayama H., Mitsuhashi T., Kuwajima S., Aoki S., Kuroda Y., Itoh T., Nakagawa S.; Immunohistochemical detection of advanced glycation end products in lens crystallins from streptozocine-induced diabetic rat *Diabetes* 42,345-350 (1993)
- Nakayama Y., Horii Y., Nishino T.; Immunohistochemical localization of advanced glycosylation endproducts in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus *Am J Pathol* 143,1649-1656 (1993)
- Namiki M.; Chemistry of Maillard reactions: recent studies of the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens *Adv Food Res* 32,115-184 (1988)

Nisole S., Krust B., Hovanessian A.G.; Anchorage of HIV on permissive cells leads to coaggregation of viral particles with surface nucleolin at membrane raft microdomains *Exp Cell Res* 276,155-173 (2002)

Nisole S., Said E.A., Mische C., Prevost M.C., Krust B., Bouvet P., Bianco A., Briand J.P., Hovanessian A.G.; The anti-HIV pentameric pseudopeptide HB-19 binds the C-terminal end of nucleolin and prevents anchorage of virus particles in the plasma membrane of target cells *J Biol Chem* 277,20777-20886 (2002)

Odetti P.R., Borgoglio A., Rolandi R.; Age-related increase of collagen fluorescence in human subcutaneous tissue *Metabolism* 41,655-658 (1992)

Okuda M., Horn H.F., Tarapore P., Tokuyama Y., Smulian A.G., Chan P.-K., Knudsen E.S., Hofmann I.A., Snyder J.D., Bove K.E., Fukasawa K.; Nucleophosmin is a target of CDK2/Cyclin E in Centrosome Duplication *Cell* 103, 127-140 (2000)

Okuwaki M., Tsujimoto M., Nagata K.; The RNA Binding Activity of a Ribosome Biogenesis Factor, Nucleophosmin/B23, Is Modulated by Phosphorylation with a Cell Cycle-dependent Kinase and by Association with Its Subtype *Molecular Biology of the Cell* 13,2016-2030 (2002)

Palinski W., Koschinsky T., Butler S.W., Miller E., Vlassara H., Cerami A., Witztum I.L.; Immunological evidence for the presence of advanced glycolylation endproducts in atherosclerotic lesions of euglycemic rabbits *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15,571-582 (1995)

Peter M., Nakagawa J., Doree M., Labbe J.C., Nigg E.A.; Identification of Major Nucleolar Proteins As Candidate Mitotic Substrates of cdc2 Kinase *Cell* 60,791-801 (1990)

Pinol-Roma, S.; Association of Nonribosomal Nucleolar Proteins in Ribonucleoprotein Complexes during Interphase and Mitosis *MBC* 10 (1),77-90 (1999)

Predescu D., Simionescu M., Simionescu N., Palade G.E.; Binding and Transcytosis of Glycoalbumin by the Microvascular Endothelium of the Murine Myocardium: Evidence That Glycoalbumin Behaves as a Bifunctional Ligand *Journal of Cell Biology* 107,1729-1738 (1988)

Prestayko A.W., Klomp G.R., Schmoll D.J., Busch H.; Comparison of Proteins of Ribosomal Subunits and Nucleolar Preribosomal Particles from Novikoff Hepatoma Ascites Cells by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis *Biochim Biophys Acta* 826,167-173 (1985)

Ramanakoppa H., Nagaraj, Monnier V.M.; Isolation and characterization of a blue fluorophore from human eye lens crystallins: In vitro formation from Maillard reaction with ascorbate and ribose *Biochimica et Biophysica Acta* 1116,34-42 (1992)

Said E.A., Krust B., Nisole S., Svab J., Briand J.P., Hovanessian A.G.; The Anti-HIV Cytokine Midkine Binds the Cell Surface-expressed Nucleolin as a Low Affinity Receptor *J Biol Chem* 277,37492-37502 (2002)

Salazar R., Brandt R., Kellermann J., Krantz S.; Purification and characterization of a 200 kDa fructosyllysine-specific binding protein from cell membranes of U937 cells *Glycoconjugate Journal* 17,713-716 (2000)

Salazar R., Brandt R., Krantz S.; Binding of Amadori glucose-modified albumin by the monocytic cell line MonoMac 6 activates protein kinase C ϵ , protein tyrosin kinases and the transcription factors AR-1 and NF- κ B *Glycoconj Journal*. 18(10),769-77 (2001)

Salazar R., Brandt R., Krantz S.; Expression of fructosyllysine receptors on human monocytes and monocyte-like cell lines *Biochim Biophys Acta* 1266,57-63 (1995)

Savkur R.S., Olson M.O.J.; Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease *Nucleic Acids Research* 26,4508-4515 (1998)

Semenkovich C.F., Ostlund R.E. Jr, Olson M.O., Yang J.W.; A protein partially expressed on the surface of HepG2 cells that binds lipoproteins specifically is nucleolin *Biochemistry* 29,9708-13 (1990)

Sims T.J., Rasmussen L.M., Oxlund H., Bailey A.J.; The role of glycation cross-links in diabetic vascular stiffening *Diabetologia* 39, 946-951 (1996)

Singh R., Barden A., Mori T., Beilin L.; Advanced glycation end-products: a review *Diabetologia* 44,129-146 (2001)

Stitt A.W., He C., Vlassara H.; Characterization of the Advanced Glycation End-Product Receptor Complex in Human Vascular Endothelial Cells *Biochem Biophys Res Com* 256,549-556 (1999)

Sundström C., Nilsson K.; Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937) *Int.J.Cancer* 17,565-577 (1976)

Umekawa H., Sato K., Takemura M., Watanabe Y., Usui S., Takahashi T., Yoshida S., Olson M.O.J., Furuichi Y.; The Carbonyl Terminal Sequence of Nucleolar Protein B23.1 Is Important in Its DNA Polymerase α -Stimulatory Activity *J.Biochem.*130,199-205 (2001)

Vebeke P., Perichon M., Schaefferbeke J., Bakala H.; Effect of glycation of albumin on its binding to renal brush-border membrane vesicles: influence of aging in rats *Biochim Biophys Acta* 1282(1),98-100 (1996)

Vlassara H., Bucala R., Striker L.; Biology, biologic and clinical implications for diabetes and aging *Lab invest* 70,138-151 (1994)

Literaturverzeichnis

- Vlassara H.; The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications *Diabetes Metab Res Rev* 17,436-443 (2001)
- Wang D., Umekawa H., Olson M.O.; Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells *Cell Mol Biol Res* 39(1), 33-42 (1993)
- Watkins L.R., Hansen M.K., Nguyen K.T., Lee J.E., Maier S.V.; Dynamic regulation of the proinflammatory cytokine, interleukin 1beta: molecular biology for non-molecular biologists *Life Sci* 65,449-81 (1999)
- Wautier M.-P., Chappey O., Corda S., Stern D., Schmidt A.M., Wautier J.-L.; Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280,685-694 (2001)
- Wells-Knecht K.J., Brinkmann E., Wells-Knecht M.C., Litchfield J.E., Ahmed M.U.; New biomarkers of Maillard reaction damage to proteins *Nephrol Dial Transplant* 11(Suppl 5),41-47 (1996)
- Wendt T., Bucciarelli L., Qu W., Lu Y., Yan S., Stern D., Schmidt A.M.; Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) and Vascular Inflammation: Insights into the Pathogenesis of Macrovascular Complications in Diabetes *Current Atherosclerosis Reports* 4,228-237 (2002)
- Wu V.-Y., Cohen M.P.; Identification of Aortic Endothelial Cell Binding Proteins for Amadori Adducts in Glycated Albumin *Biochemical and Biophysical research communications* 193(3),1131-1136 (1993)
- Wu V.-Y., Cohen M.P.; Receptors Specific for Amadori-Modified Glycated Albumin on Murine Endothelial Cells *Biochemical and Biophysical research communications* 198(2),734-739 (1994)
- Wu V.-Y., Cohen M.P.; Evidence for a ligand receptor system mediating the biologic effects of glycated albumin in glomerular mesangial cells *Biochemical and Biophysical research communications* 207(2),521-528 (1995)
- Yang C., Maignel D.A., Carrier F.; Identification of nucleolin and nucleophosmin as genotoxic stress-responsive RNA-binding proteins *Nucleic Acids Research* 30,2251-2260 (2002)
- Yung B.Y.-M., Busch H., Chan P.-K.; Translocation of nucleolar phosphoprotein B23 induced by selective inhibitors of ribosome synthesis *Biochim Biophys Acta* 826,167-173 (1985)
- Yung B.Y.-M., Chan P.-K.; Identification and characterization of a hexameric form of nucleolar phosphoprotein B23 *Biochim Biophys Acta* 925, 74-82 (1987)

Literaturverzeichnis

Zeller K.I., Haggerty T.J., Barrett J.F., Guo Q., Wonsey D.R., Dang C.V.; Characterization of Nucleophosmin (B23) as a Myc Target by Scanning Chromatin Immunoprecipitation *Journal of Biological Chemistry* 51, 48285-48291 (2001)

Ziegler-Heitbrock H.W.L., Thiel E., Fütterer A., Herzog V., Wirtz A., Riethmüller G.; Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes *Int.J.Cancer* 41,456-461 (1988)

Ziyadeh F.N., Han D.C., Cohen J.A., Guo J., Cohen M.P.; Glycated albumin stimulates fibronectin gene expression in glomerular mesangial cells: involvement of the transforming growth factor-beta system *Kidney Int* 53(3),631-8 (1998)

7 Anhang

Zu Kapitel 2, Abschnitt 2.1.2. und Kapitel 3, Abschnitt 3.1.

```
1 gggcgggatt ccgtcctgcg cggttgttct ctggagcagc gttcttttat ctcc  
  
      forward primer  
      ccccgatcctctcctacctaagtgcgt  
  
55 ⇒ gtccgccttctctcctacctaagtgcgt | gccgccac ccgatggaag attcgatgga  
    catggacatg  
  
121 agccccctga ggccccagaa ctatcttttc ggttgtgaac taaaggccga caaagattat  
181 cactttaagg tggataatga tgaaaaatgag caccagttat cttaagaac ggtcagttta  
241 ggggctggtg caaaggatga gttgcacatt gttgaagcag aggcaatgaa ttacgaaggc  
301 agtccaatta aagtaacact ggcaactttg aaaatgtctg tacagccaac ggtttcctt  
361 gggggctttg aaataacacc accagtggtc ttaaggttga agtgtggttc agggccagtg  
421 catattagtg gacagcactt agtagctgtg gaggaagatg cagagtcaga agatgaagag  
481 gaggaggatg tgaaactctt aagtatatct ggaaagcggc ctgcccctgg aggtggtagc  
541 aaggttccac agaaaaaagt aaaacttgct gctgatgaag atgatgacga tgatgatgaa  
601 gaggatgatg atgaagatga tgatgatgat gattttgatg atgaggaagc tgaagaaaa  
661 gcgccagtga agaaatctat acgagatact ccagccaaaa atgcacaaaa gtcaaatcag  
721 aatggaaaag actcaaaacc atcatcaaca ccaagatcaa aaggacaaga atccttcaag  
781 aacaggaaa aaactcctaa aacaccaaaa ggacctagtt ctgtagaaga cattaagca  
841 aaaatgcaag caagtataga aaaaggtggt tctcttcca aagtggaagc caaattcatc  
901 aattatgtga agaattgctt ccggatgact gaccaagagg ctattcaaga tctctggcag  
961 tggaggaagt ctctttaaga aaatagttta aacaatttgt taaaaaattt tccgtcttat  
  
      reverse primer  
      taaagacattgtcaactagggcccgaca  
  
1021 ttc | atttctgtaacagttgatatctggctgt ⇐ cctttttat aatgcagagtgagaac  
    tttc  
  
1081 cctaccgtgt ttgataaatg ttgtccaggt tctattgcca agaatgtggt gtccaaaatg  
1141 cctgtttagt ttttaaagat ggaactccac cctttgcttg gttttaagta tgtatggaat  
1201 gttatgatag gacatagtag tagcggtggt cagacatgga aatggtgggg agacaaaaat  
1261 atacatgtga aataaaactc agtatttttaa taaagt
```

Anhang

Abb.18: cDNA von humanem Nucleophosmin (Chan et al., 1989) mit Position der sequenzspezifischen Nucleophosmin-Primer; die im reverse und forward primer von der Nucleotidsequenz der cDNA abweichenden Elemente sollten der Bildung von Sekundärstrukturen der Primer in der PCR vorbeugen; des weiteren entsprechen diese Elemente teilweise den benötigten BamH1 und Sma1 Linkerstrukturen (kursiv)

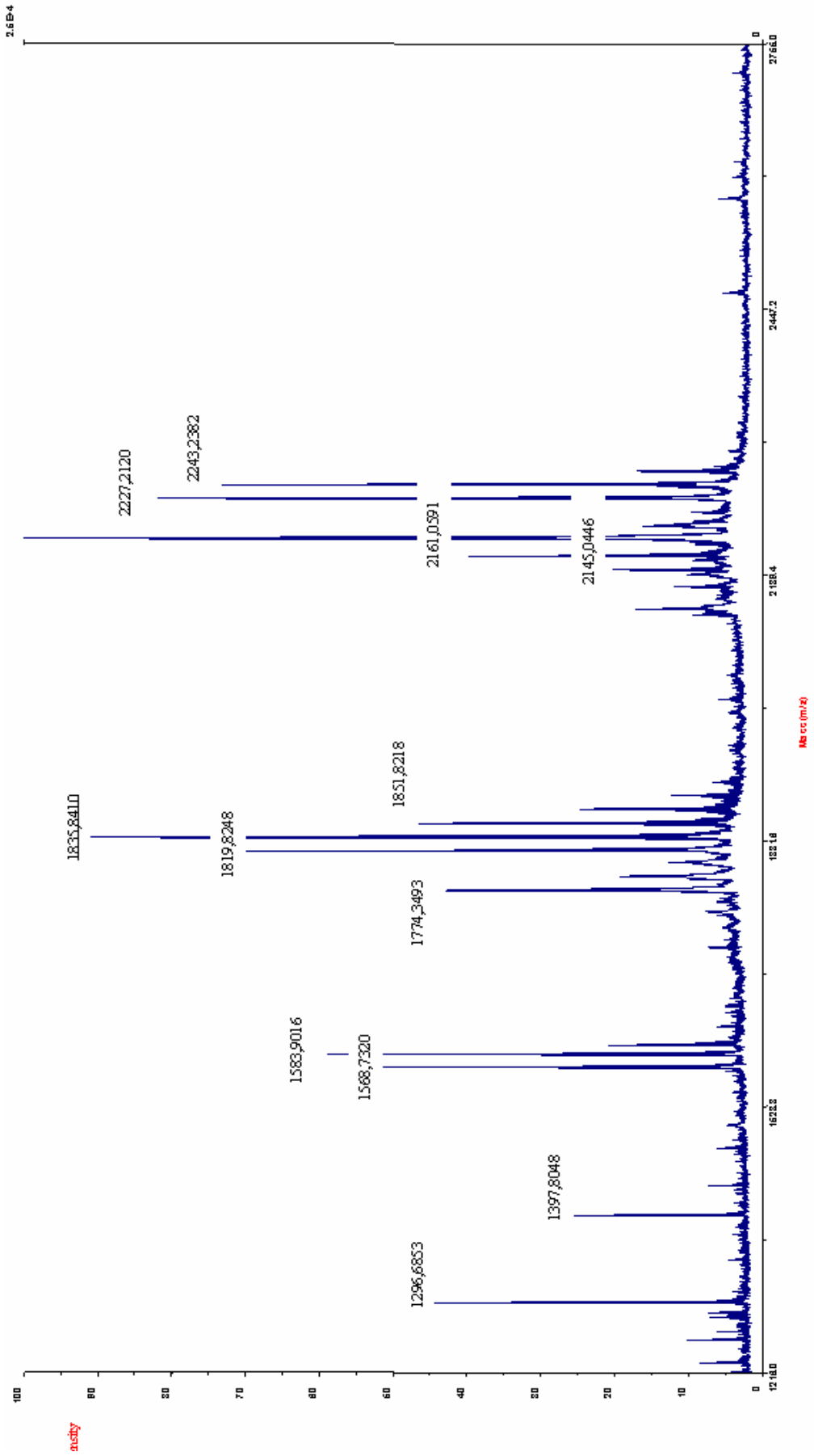


Abb.19: Massenspektrum des gereinigten Proteins

Anhang

7.1 Lösungen und Medien

In den Arbeiten mit RNA verwendete Lösungen

10 x MOPS-Puffer	0,2 M MOPS 0,5 M Natriumacetat 0,01M EDTA
RNA Ladungspuffer (2 ml)	16 µl 500mM EDTA 144 µl 37% Formaldehyd 400 µl 100% Glycerol 616,8 µl Formamid (mit Ionenaustauscherharz behandelt) 800 µl 10 x MOPS- Puffer 23,8 µl gesättigte BFB- Lösung
RNAse freies Wasser	100 ml A.dest 0,1 ml DEPC über Nacht inkubiert autoklaviert

Lösungen für Agarose-Gele

10 x TAE-Puffer	48,4 g Tris in 500 ml A.dest lösen 20,0 ml EDTA (0,5 M, ph 8,0) 11,42 ml Eisessig auf 1 Liter mit A.dest aufgefüllt
-----------------	--

Reaktionspuffer der verwendeten Restriktasen

Sma-Puffer	20 mM Tris-Hcl 5 mM MgCl ₂ 50 mM KCl
BamHI-Puffer	500 mM Tris-HCl 100 mM MgCl ₂ 1000 mM NaCl

Lösungen für Bakterienkulturen

LB-Medium	10g Trypton 5g Hefeextrakt 10g NaCl auf pH 7,0 mit NaOH eingestellt autoklaviert Angaben für 1 Liter
LB-Plattenmedium	LB-Medium mit Zusatz von 1,5% Agarose

Lösungen für Herstellung kompetenter Zellen

RF1	75 mM KCl 50 mM Kaliumacetat, pH 7,5 50 mM MnCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 15% Glycerol
-----	---

Anhang

RF2	10 mM MOPS 10 mM KCl 75 mM CaCl ₂ 15% Glycerol
-----	--

Lösungen für Zellaufschluss

Protein-Lösungspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH8,0 300 mM NaCl 1 mM EDTA autoklaviert vor Nutzung dazugegeben: 0,1% Tween-20 1 mM PMSF 5 mM β-Mercaptoethanol
-----------------------	--

Unter denaturierenden Bedingungen (QIAexpress)

Puffer B	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris- HCl 8 M Harnstoff 300 mM NaCl 0,1% Tween auf pH 8,0 mit NaOH
Puffer C	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris- HCl 8 M Harnstoff auf pH 6,3 mit HCl
Puffer E	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris- HCl 8 M Harnstoff auf pH 4,5 mit HCl

Unter nativen Bedingungen (QIAexpress)

Lösungspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol auf pH 8,0 mit NaOH
Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol auf pH 8,0 mit NaOH
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol auf pH 8,0 mit NaOH

Anhang

Lösungen für SDS-PAGE

Acrylamid-Sammelgelpuffer (pH 8,8)	56,8 g Tris auf 150 ml A.dest vorsichtig auf pH 8,8 mit konzentrierter Salzsäure Endvolumen 250 ml
Acrylamid-Trenngelpuffer (pH 6,8)	37,8 g Tris auf 150 ml A.dest vorsichtig auf pH 6,8 mit konzentrierter Salzsäure Endvolumen 250 ml
10 x Acrylamidgel-Elektrodenpuffer	144,2 g Glycin 30,3 g Tris 10 g SDS in 1 Liter A.dest gelöst pH 8,3 ohne Justierung
4 x Acrylamidgel-Ladungspuffer	4 ml A.dest 1 ml 0,5 M Tris- HCl, pH 6,8 0,8 ml Glycerol 1,6 ml 10% SDS- Lösung 0,2 ml 0,05% BPB

Polyacrylamidgel	Trenngel (10 ml)		Sammelgel (5 ml)
	10%	7,5%	3,5%
Acrylamid-Stammlösung 30%ig	3,332 ml	2,5 ml	0,58 ml
H ₂ O	4,5 ml	5,33 ml	3,834 ml
Tris (pH 8,8)	2 ml		
Tris (pH 6,8)			0,5 ml
10% SDS	100 µl		50 µl
TEMED	5 µl		2,5 µl
Ammoniumpersulfat (APS)	80 µl		50 µl

Färbelösungen für PAGE

Coomassie- Färbung

Färbelösung

10% Methanol
10% Eisessig
0,025% Serva Blue G (Coomassie-Brilliant-Blau)
in A.dest

Entfärbelösung

10% Methanol
10% Eisessig
in A.dest

Kolloidale Coomassie- Färbung

Fixierlösung

12% Trichloressigsäure
50% Methanol

Färbelösung

60 ml A.dest
20 ml Ethanol
unter Rühren mit
20 ml Roti-Blue 5fach Konzentrat versetzt

Anhang

Waschlösung	25 ml Methanol 75 ml A.dest
Lösungen für Western-Blot	
Ponceau-S Färbelösung	0,5% Ponceau 1 % Essigsäure
Tank-blotting Transferpuffer für niedermolekulare Proteine	25 mM Tris 150 mM Glycin 20% Methanol pH 8,3 ohne Justierung
Tank-blotting Transferpuffer für höhermolekulare Proteine	22 mM Tris 190 mM Glycin pH 8,3 ohne Justierung
TBS-Puffer	10 mM Tris- HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TBS-Tween/Triton- Puffer	20 mM Tris- HCl, pH 7,5 500 mM NaCl 0,05% Tween 20 0,2 % Triton X-100
Blockierpuffer (Blockierreagenz BSA)	3% BSA in TBS- Puffer (die Verwendung von Milchpulver als Blockierreagenz setzt die Sensitivität von Penta-His Antikörper gegenüber einem rekombinanten Protein mit His-tag herab) auf pH 7,4 mit Natronlauge
Blockierpuffer (Blockierreagenz MP)	2% MP in TBS-Puffer, auf pH 7,4 mit Natronlauge
Lösungen für Färbung mit alkalischer Phosphatase	
Puffer A	100 mM Tris- HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
NBT-Stammlösung	5% NBT in 70% Dimethylformamid
BCIP-Stammlösung	5% BCIP in 100% Dimethylformamid
Färbelösung (unmittelbar vor Gebrauch anfertigen)	66 µl NBT- Stammlösung 33 µl BCIP- Stammlösung auf 10 ml Puffer A
Lösungen für Membranpräparationen	
10 x PBS	KH ₂ PO ₄ 1,44 g/l NaCl 90,00 g/l Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 5,28 g/l Auf pH 7,4 wenn für Gebrauch auf 1 x PBS verdünnt

Anhang

Lösungspuffer	0,02 M Tris 0,23 M NaCl 0,01 M EDTA
+Proteinaseinhibitoren	1,5% Oktylglycosid 1 mM PMSF 20mM Benzamidin 10µg/ml Antipain 10µg/ml Leupeptin 10µg/ml Pepstatin 10µg/ml Bacitracin 50µg/ml Aprotinin

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegenden Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum:

Unterschrift:

Lebenslauf

Name: Nawka
Vorname: Mato
Geburtsdatum: 26.09.1979
Geburtsort: Bautzen
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Namen der Eltern: Lubina und Alfons Nawka

Ausbildung:

1986 – 1987 Polytechnische Oberschule „Handrij Zejler“ in Hoyerswerda
1987 – 1990 Oberschule „Bjarnat Krawc“ in Königswartha
1990 – 1992 Oberschule „Sula Čisinskeho“ in Panschwitz-Kuckau
1992 – 1998 Sorbisches Gymnasium Bautzen
07/1998 Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife
09/1998 – 09/1999 Zivildienst beim KBF in Tübingen, Bereich „Betreutes Wohnen“
10/1999 bis dato Studium der Humanmedizin an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
09/2001 Ärztliche Vorprüfung
09/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2006 Voraussichtlicher Abschluss des Studiums mit Bestehen des dritten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung

Promotion

10/2001 – 10/2002

Institut für medizinische Biochemie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald unter wissenschaftlicher Betreuung von Prof.Dr.S.Kranz und Dr.R.Brandt

Thema:

Isolierung und Charakterisierung eines rekombinanten Nucleophosmins und Nachweis von Nucleophosmin als Bestandteil fructoselysinspezifischer Rezeptoren in Zellmembranen der monocytären Zelllinien Mono Mac 6 und U937

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof.Dr.S.Krantz für die Vergabe des Promotionsthemas und fachliche Unterstützung. Hierzu zähle ich die Präzision der Problemstellung, Beurteilung experimenteller Zwischenergebnisse und die Durchsicht der Dissertationsarbeit.

Mein Dank gilt auch Frau Dr.R.Brandt für eine exzellente Betreuung während der experimentellen Arbeiten sowie der Beurteilung schriftlicher Zwischenergebnisse.

Danken möchte ich Herrn Prof.Dr.S.Krantz und Frau Dr.R.Brandt auch für die Unterstützung beim Verfassen der Veröffentlichung meiner Ergebnisse (Brandt R., Nawka M., Kellermann J., Salazar R., Becher D., Krantz S.; Nucleophosmin is a component of the fructoselysine-specific receptor in cell membranes of Mono Mac 6 and U937 monocyte-like cells *Biochimica et Biophysica Acta* 1670, 132-136 (2004)) sowie Prof.R.Jack für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Frau Will und Frau Liebmann danke ich für wertvolle Ratschläge im Laboralltag.

Abschließend gilt mein Dank meiner Familie und Frau D.Praeger für Unterstützung in der Zeit der experimentellen Arbeiten.